

Virkingen av økte nærings saltutslipp fra akvakultur på strukturen i planteplanktonsamfunnet

Maren Løken

Marine Coastal Development

Innlevert: juni 2013

Hovedveileder: Yngvar Olsen, IBI

Medveileder: Lasse Mork Olsen, IBI

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for biologi

Forord

Denne masteroppgaven har vært en del av prosjektet *Can waste emission from fish farms change the structure of marine food webs?* (WAFOW, Inst. For biologi, NTNU), en komparativ studie av kystøkosystemer i Norge og Chile, finansiert av Forskningsrådet. Det eksperimentelle arbeidet ble utført ved Sletvik feltstasjon i september 2011. Laboratoriearbeidet ble utført ved Trondheim biologiske stasjon (TBS) i perioden høsten 2011- høsten 2012.

Jeg vil takke mine veiledere Yngvar Olsen og Lasse Mork Olsen for all hjelp og tilbakemelding underveis. Takk til alle som deltok WAFOW 3 forsøket og gjorde oppholdet på Sletvik både lærerikt og morsomt. På TBS ønsker jeg spesielt å takke Kjersti Andresen for hjelp til HPLC-analyser og Øystein Leiknes for opplæring i bruk av mikroskop, og mange nyttige innspill til oppgaven. Takk til ansatte og studenter på TBS har bidratt til to lærerike og fine studieår. Til slutt vil jeg takke familien min, og Christopher, for alle oppmuntringer og støtte.

Trondheim, juni 2013

Maren Løken

Sammendrag

Et mesokosmeforsøk ble gjennomført over 20 dager i Hopavågen, Sør-Trøndelag. Forsøket ble startet under en typisk sensommer med resirkulerte næringsstoffer i et stratifisert vannlag (~10 m) og dominans av dinoflagellater i planteplanktonsamfunnet. Næringsalter ble tilsatt for å simulere utslipp av ammonium (NH_4^+) og fosfat (PO_4^{3-}) fra oppdrett av laks i merdanlegg. Nitrat og silikat ble tilsatt i konsentrasjoner lik naturlig bakgrunn mens ammonium og fosfat ble tilsatt i variable mengder som varierte mellom 0,25 og 4,68 $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{L}^{-1} \text{dag}^{-1}$, og tilsvarende 0,02 og 0,228 $\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1} \text{dag}^{-1}$ til 8 mesokosmer (M1-8), med to replikate mesokosmer (A, B) for M1, M3, M5 og M7 (totalt 12 mesokosmer).

Klorofyll *a* og biomasse planteplankton beregnet fra biovolum viste en lav respons i planteplankton frem til dag 16, en unormalt lang periode uten endringer i planteplanktonbiomasse som funksjon av tilførsel av næringsalter. Estimat av primærproduksjon ved fluorescenskinetikk viste at produksjonen i mesokosmene var en funksjon av biomassen, og at det gjennom hele forsøket var god kondisjon, målt som kvantutbytte i fotosystem II, i planteplanktonet. Det er derfor antatt planteplanktonet ikke var næringsbegrenset og at beiting begrenset biomassen i alle mesokosmene frem til dag 16. Ved bruk av mikroskopi og HPLC ble det vist at 3 grupper planteplankton dominerte planteplanktonsamfunnet: diatomeer, dinoflagellater og nanoplankton < 10 μm . Pigmentanalyser med HPLC viste høye konsentrasjoner av peridinin, som er kjemotaksonomisk markør for dinoflagellater, og fucoxanthin så ut til å være en god markør for diatomeer. Det ble observert en endring i samfunnsstrukturen i planteplanktonsamfunnet allerede fra dag 6. Diatomeer responderte på tilførselen av næringsalter på dag 6, mens nanoplankton < 10 μm viste ingen tydelig respons på tilførselen av næringsalter. Thekate dinoflagellater responderte alle dager på økt tilførsel av NH_4^+ og økningen i biomasse på dag 16 for NH_4^+ tilsats > 1,23 $\mu\text{g L}^{-1} \text{dag}^{-1}$ var forårsaket av en sterk respons i thekate dinoflagellater. Heterotrofe dinoflagellater var trolig viktige beitere på planteplankton og ciliatene begrenset mengden nanoplankton. En økning i mengde thekate dinoflagellater mot slutten av sommerperioden ser ut til å være en mulig indikator på økt tilførsel av næringsalter fra akvakultur.

Abstract

A mesocosm experiment was conducted over 20 days in Hopavågen, Sør-Trøndelag. The experiment was started during a typical autumn situation of recycled nutrients in the water and dinoflagellates dominated the phytoplankton community. Nutrients were added to simulate the emissions of ammonium (NH_4^+) and phosphate (PO_4^{3-}) from salmon farming in cages. Nitrate and silicate were added at concentrations equal to natural background while ammonium and phosphate was added in variable amounts ranging between 0.25 and 4.68 $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ L}^{-1} \text{ day}^{-1}$, and equivalent to 0.02 and 0.228 $\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ to 8 mesocosms (M1-8), with two replicates mesocosms (A, B) for M1, M3, M5 and M7 (a total of 12 mesocosms).

Chlorophyll *a* and phytoplankton biomass estimated from biovolume showed a low response in phytoplankton until day 16, after an unusually long period without changes in phytoplankton biomass as a function of the supply of nutrients. Estimates of primary production at fluorescence kinetics showed that production mesocosms mainly was a function of biomass, and that throughout the experiment the condition of the phytoplankton was good. It was therefore assumed that the phytoplankton was not nutrient limited and that grazing restricted the biomass in all mesocosms until day 16. Using microscopy, it was shown that three groups of phytoplankton dominated phytoplankton community: diatoms, dinoflagellates and nanoplankton $<10 \mu\text{m}$. We observed a change in the community structure of the phytoplankton community from day 6 Diatoms responding to the supply of nutrients on day 6, while nano plankton <10 microns showed no apparent response to the supply of nutrients. Dinoflagellates responded every day on increased supply of NH_4^+ and the increase in biomass on day 16 for loading rate of $\text{NH}_4^+ > 1.23 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ was a result of a positive response in dinoflagellates. Heterotrophic dinoflagellates was assumed to be important grazers on the phytoplankton community, while ciliates was grazing on nanoplankton. Pigment analysis by HPLC showed high concentrations of peridinin, which is a chemotaxonomic marker for dinoflagellates. the amount of dinoflagellates in late summer period appears to be an possible indicator of increased supply of nutrients from aquaculture.

Innhold

Forord	ii
Sammendrag	iii
Abstract	iv
Innhold	v
1 Introduksjon	1
1.1 Bakgrunn for oppgaven	1
1.2 Utslipp av næringssalter fra akvakultur	1
1.3 Pelagiske økosystem: plankton i eufotisk kystvann	2
1.4 Primærproduksjon	3
1.5 Overvåkning av planteplankton	5
1.6 Mål med oppgaven	6
2 Materialer og metoder	7
2.1 Eksperimentelt oppsett	7
2.2 CTD	8
2.3 Lysmålinger	8
2.4 Næringssaltanalyser	9
2.5 Planktonprøver	9
2.6 Klorofyll <i>a</i> – <i>in vitro</i>	12
2.7 Pigmentanalyser og rekonstruksjon av absorpsjonsspektrum	13
2.8 Fotosyntese-effektivitet og elektrontransport målt med fluorescenskinetikk	14
3 Resultater	18
3.1 Fysisk-kjemisk miljø	18
3.2 Heterotroft plankton	18
3.3 Lys	18
3.4 <i>In vivo</i> fluorescens	20
3.5 Utvikling av klorofyll <i>a</i> konsentrasjon over tid	21
3.6 Konsentrasjoner av andre pigment	23
3.7 Planteplankton	26
3.8 Estimat av brutto primærproduksjon fra bio-optikk	28
3.9 Respons på gradienten av næringssalter	31
4 Diskusjon	38
4.1 Startforhold	38
4.2 Generelt hendelsesforløp	38

4.3	Planteplanktonsamfunnet.....	39
4.4	Endring i pigmentsammensetning	42
4.5	Næringssalter	42
4.6	Produksjon	43
4.7	Sammenligning av ulike metoder	45
4.8	Indikatorer på økt konsentrasjoner av næringssalter	47
4.9	Effekten av økt tilførsel av næringssalter på pelagiske økosystem	48
4.10	Veien videre.....	49
4.11	Oppsummering	50
5	Referanser	51
6	Vedlegg A Klorofyll <i>a</i>	59
7	Vedlegg B <i>In vivo</i> fluorescens	60
8	Vedlegg C Celleantall planteplankton	61
10	Vedlegg D Biovolum	63
11	Vedlegg E Ciliater.....	64
12	Vedlegg F Kvanteutbytte i fotosystem II.....	65
13	Vedlegg G Pigmentkonsentrasjoner av zeaxhating og klorofyll <i>b</i>	66

1 Introduksjon

1.1 Bakgrunn for oppgaven

Verdens akvakulturindustri vokser, og mange ser på akvakultur som et redskap for å dekke verdens mat- og proteinbehov. Akvakulturproduksjonen i Norge har økt fra 151 999 tonn i 1990 til mer enn en million tonn i 2010, dette takket være oppdrett av Atlantisk laks (*Salmo salar*) (FAO, 2012). Det er viktig å studere miljøeffekter av akvakultur for å se på hvordan miljøet kan endres av akvakulturindustri. Akvakulturproduksjon er sårbar for miljøpåvirkninger (FAO, 2012) og akvakulturindustrien selv er den første som kommer til å lide av dårligere vannkvalitet i kystfarvann og miljøendringer (Olsen og Olsen, 2008).

Langs norskekysten foregår oppdrett av laks i merdanlegg («Cage Aquaculture Systems», CAS). Merdanleggene er svært kostnadseffektive, men uten kontroll av utslipp (Olsen et al., 2012). Merdene er åpne system og produserer avfall som slippes ut i det omkringliggende vannet. Dette avfallet er rikt på næringsstoffer som nitrogen og fosfor (Islam, 2005, Enell, 1995, Wang et al., 2012). Disse utslippene av næringsstoffer fra akvakultur har en potensiell virkning på det pelagiske økosystemet og eventuelle negative effekter av økte næringsalter vil mest sannsynlig komme til uttrykk som endret struktur og funksjon av det planktoniske økosystemet. (Olsen et al., 2012).

Effekten av utslipp på det bentiske økosystemet i umiddelbar nærhet til anleggene er lettere å observere, og det finnes en klar praksis for overvåkning og forvaltning, de såkalte MOM-undersøkelser (Ervik et al., 1997). Det har vært viet mindre oppmerksomhet til utslipp av organiske stoff og næringsalter til vannmassene, kanskje spesielt i Norge, fordi norsk kystvann har stor evne til å assimilere organisk stoff og næringsalter uten at det oppstår synlige negative økologiske effekter (Olsen et al., 2012)

1.2 Utslipp av næringsalter fra akvakultur

Oppdrett av fisk i merder gir utslipp av uorganiske næringsstoffer (NH_4 , PO_4), partikulært organisk nitrogen og fosfor (PON, POP) fra fiske-faeces og fôrspill, og løste organiske næringsstoffer ved resuspensjon fra partikulær fraksjon (Olsen et al., 2008). Mens næringsholdige partikler fra utslippene synker til bunnen vil næringsaltene i utslippene, som utgjør den største fraksjonen av nitrogenutslippene fra norsk fiskeoppdrett, primært påvirke det pelagiske økosystemet (Olsen et al., 2012, Olsen og Olsen, 2008).

Assimilering av næringssaltene skjer ved (i) biologisk opptak der næringssaltene DIN og DIP tas opp av planteplankton og vil dermed overføres til PON og POP, og overføres videre til høyere trofiske nivåer eller (ii) fortynnings-hydrodynamikk der hydrodynamiske krefter ved oppdrettslokaliteten transporterer og fortynner næringssaltene eller organismene som har tatt opp næringssaltene (Olsen et al., 2012). Effektene av næringsutslipp fra et anlegg er derfor

avhengig av lokale hydrodynamiske forhold som vannsirkulasjon og vannets oppholdstid (Enell, 1995).

Utslipp av næringsstoffer fra akvakultur er spesielt fordi en relativt stor mengde ammonium skilles ut over fiskens gjeller, mens utslipp av fosfat fra fisk er relativt lavt sammenlignet med det av ammonium (Olsen og Olsen, 2008). En økning av næringsstoffer i vannet, med endret N:P ratio tenkes å være fordelaktig for enkelte planteplanktongrupper (Li et al., 2011).

1.3 Pelagiske økosystem: plankton i eufotisk kystvann

Den metabolske aktiviteten i pelagiske økosystemet er nesten totalt dominert av planktonorganismer (Olsen et al., 2012). Mindre organismer i det marine næringsnett og de trofiske forholdene mellom disse danner livsgrunnlaget for større organismer som fisk og marine pattedyr (Melle et al., 2004). En typisk vannprøve kan inneholde flere hundre arter, og kunnskapen om enkeltarters fullstendige levemåte er ofte begrenset (Tett, 2008). Et alternativ er derfor å se på økosystemet som et sett av funksjonelle økologiske grupper med ulike roller som må fylles av organismene i et velfungerende økosystem (Tett, 2008). Planktonet kan da deles inn i funksjonelle grupper. Disse gruppene er relatert til trofisk nivå til autotrofe eller heterotrofe organismer og basert på fødepartiklenes størrelse (Gismervik et al., 1997). Akvatiske næringsnett er strukturert etter organismenes størrelse, der heterotrofe organismer beiter på organismer mindre enn seg selv, predasjonstrykket bestemmes av størrelsen på gapet til predatoren (Verity og Smetacek, 1996).

Planteplankton er autotrofe organismer og de viktigste primærproducentene i pelagiske økosystem som danner næringsgrunnlaget for organismer på høyere trofiske nivå (heterotrofe organismer). Planteplankton omfatter organismer med svært ulik størrelse (0,2 μm til flere hundre μm), og mål som biovolum eller biomasse vil kunne gi et bedre bilde av sammensetningen av planteplanktonsamfunnet fremfor celleantall (HELCOM, 2006). Biovolum kan konverteres til karbonbiomasse gjennom konversjonsfaktorer til karbon er bestemt eksperimentelt (se for eksempel Menden-Deuer og Lessard, 2000, Verity et al., 1992).

I løpet av årstidene foregår det en suksesjon i planteplanktonsamfunnet, med en typisk diatomeoppblomstring om våren. Denne er basert på næringsstoffer som er tilført fra dypvannet i løpet av vinteren. Etter denne følger gjerne en periode med dominans av pigmenterte nanoflagellater om sommeren, mens en oppblomstring av dinoflagellater basert på resirkulerte næringsstoffer i vannmassene kan forekomme senere ((Rey, 2004). Endringer i konsentrasjonen av ulike næringsstoffer er ofte vist å fremme suksesjon av planteplankton arter, noe som igjen er vil kovariere med fotofysiologi og bio-optiske tilpasninger (Chauton et al., 2004).

I pelagiske økosystem er ciliater viktige beitere på planteplankton, spesielt på celler $<10 \mu\text{m}$ (Vadstein et al., 2004, Granéli og Turner, 2002), og det er forventet at ciliater dominerer som beitere når samfunnet består av små planteplankton. Kopepoder er viktige beitere på større

planteplankton og på ciliater (Gismervik et al., 1997). Heterotrofe dinoflagellater kan vise et betydelig beitetrykk på andre planteplankton, og denne gruppen er mye mindre begrenset av byttets størrelse enn andre grupper av predatorer (Hansen, 1991).

1.4 Primærproduksjon

Primærproduksjon (PP) kan defineres som mengden karbon (C) som fikseres i løpet av en tidsperiode (for eksempel mg C dag⁻¹), enten over et gitt areal eller et gitt volum (Falkowski og Raven, 1997). Karbonfikseringen skjer i fotosyntesen, en prosess der energi fra lys omdannes til kjemisk energi. Fotosyntesen består av en rekke reaksjoner som starter med absorpsjon av lys som først fører til syntese av de midlertidige energibærende komponentene NADPH og ATP som til slutt avgir energi og fører til at CO₂ fiksering i Calvin-Benson syklus (Falkowski og Raven, 1997). Primærproduksjonen som funksjon kan beregnes ved hjelp av fire parametere: fotosyntetisk effektivitet (α), lysmetningsindeksen (I_k), planteplanktonets spesifikke absorpsjonskoeffisient og forholdet mellom karbon og klorofyll *a* i planteplankton (Sathyendranath et al., 2009). α og I_k beregnes fra fotosyntese-irradianskuver, som kan måles ved hjelp av fluorescenskinetikk.

1.4.1 Fotosyntese

Fotosyntesen begynner med at lysenergi absorberes av pigmenter lokalisert i lyshøstende komplekser i thylakoidmembranen hos fotosyntetiske celler og overføres via klorofyll *a* til reaksjonsentere i fotosystemene (PSI og PSII). Alle planteplankton inneholder klorofyll *a* (K1a), og i tillegg inneholder de lyshøstende kompleksene klorofyllmolekyler (for eksempel K1b og ulike K1c), karotenoider (for eksempel fucoxanthin og peridinin) og/eller fykobiliner. Ulike algeklasser har ulike aksessoriske pigmenter (Jeffrey et al., 1997, Roy et al., 2011), og variasjon i pigmentsammensetning gjør at ulike taksonomiske grupper har ulik evne til å absorbere lys (Sathyendranath et al., 1987). Når den absorberte energien eventuelt treffer et reaksjonsenter vil dette føre til at et elektron i reaksjonsenteret eksiteres fra en grunntilstand til en høy-energi tilstand. Eksitasjonsenergien går i større eller mindre grad til tre prosesser: (i) fotokjemi (fotosyntese), (ii) utgår som varme eller (iii) avgis fluorescens (Maxwell og Johnson, 2000).

Om energien brukes til å drive fotosyntesen (i) vil det eksiterte elektronet doneres til det første molekylet i elektrontransportkjeden. Elektrontransportkjeden katalyseres av 3 store membranomsluttende komplekser: fotosystem (PS) I og II og cytokrom b₆/f komplekset (cytb₆/f). PSII og cyt b₆/f er koblet sammen med den mobile elektronbæreren plastoquinon, mens cyt b₆/f og PSI er sammenkoblet med plastocyanin eller cytokrom c. I tilknytning til PSII ligger et vannsplittende kompleks. Når et elektron doneres fra reaksjonsenteret i PSII (P680) vil dette erstattes av et elektron fra et vannmolekyl som splittes i komplekset. De 2 vannmolekyler som splittes vil danne oksygen (O₂) og 4 H⁺ ioner. Når elektroner overføres gjennom elektrontransportkjeden oppstår en elektrokjemisk gradient over thylakoidmembranen, de reduserte elektronbærerne binder et hydrogenion fra stroma-siden av membranen, og frigjør dette på innsiden av membranen når elektronet overføres til en ny elektronbærer. Denne elektrokjemiske gradienten driver ATP-syntese, hydrogenene

diffunderer tilbake over thylakoidmembranen gjennom enzymet ATP-syntase og ATP dannes fra ADP og en fosfatgruppe (Geider og MacIntyre, 2008). I enden av elektrontransportkjeden kobler ferredoxin PSI til reduksjon av NADP^+ . Karbonfiksering skjer i en syklus av reaksjoner kalt Calvin-Benson hvor karbon som CO_2 omdannes til sukkerfosfater. Calvin-Bensons syklusen bruker energi i form av ATP og NADPH (Geider og MacIntyre, 2008).

Den absolutte elektrontransporten i fotosystem II, ETR_{PSII} , vil i tillegg til innkommen irradians for PAR 400-700 nm, være avhengig av hvor stor andel av det innkomne lyset som absorberes (Suggett et al., 2010). Lysets tilgjengelighet for fotosystemet er avhengig av lysets spektrale sammensetning som en funksjon av bølgelengde ($E_0(\lambda)$) og pigmentsammensetningen i planteplankton, da ulike pigmenter har ulik absorpsjon for ulike bølgelengder. ETR er direkte relatert til O_2 produksjon i PSII, og fiksert karbon (C) beregnes ved fotosyntetisk kvotient (PQ). PQ er forholdet mellom O_2 produsert per fiksert CO_2 (Sakshaug et al., 1997). Disse beregningene tar ikke hensyn til cellenes respirasjon og tap av reduksjonskraft til andre prosesser og de representerer derfor et brutto estimat av fotosyntesen.

1.4.2 Fluorescenskinetikk

Når et eksitert elektron går tilbake til grunnstadiet kan energien frigjøres som lys og denne prosessen kalles fluorescens. Klorofyll *a* fluorescens vil gi en topp ved 685 nm (Sakshaug og Johnsen, 2006). Fordi utbytte fra en av de tre prosessene (fotokjemi, varme, lys) avhenger av de andre vil man ved å måle klorofyll *a* fluorescens kunne beskrive endringer i fotokjemi og varmetap (Maxwell og Johnson, 2000). Observert fluorescens vil stamme fra PSII fordi PSI nesten ikke induserer fluorescens i romtemperatur (Falkowski og Raven, 1997)

Når man utsetter mørkeakklimatiserte alger for lavest mulig lysintensitet som fremkaller fluorescenssignal uten å indusere elektrontransport kalles denne fluorescensen grunnfluorescens (F_0). Når den mørkeakklimatiserte cellen utsettes for en puls av fotoner som metter alle funksjonelle reaksjonsentre kalles dette maksimal fluorescens, F_m . F_0 og F_m brukes for å beregne maksimum kvanteutbytte, eller av *Kla* fluorescens, $\Phi_{\text{PSII}_{\text{maks}}}$ fra likning (5, Materialer og metoder, avsnitt 2.8.3). $\Phi_{\text{PSII}_{\text{maks}}}$ indikerer cellenes kondisjon (Baker, 2008, Maxwell og Johnson, 2000)

Utsetter man i stedet planteplanktonet for aktinisk lys vil man måle grunnfluorescensen, F'_0 , for cellene under bestemte lysforhold. Utsetter man så cellene for en mettende lyspuls måler man maksimal fluorescens (F'_m). Videre kan operasjonelt kvanteutbytte av ladeseparasjoner i PSII (Φ_{PSII}) definert som mol elektroner generert per mol fotoner absorbert i fotosystem II beregnes (likning 6). Fluorescensmålingene kan brukes til å beregne den relative overføringsrate av elektroner mellom PSII og PSI. $r\text{ETR}$ indikerer derfor brutto fotosyntetisk rate og beregnes ved å multiplisere Φ_{PSII} med det aktiniske lyset ($\mu\text{mol fotoner s}^{-1}$) som ble brukt for å måle grunnfluorescens (F'_0) (likning 7)

1.4.3 Fotosyntese-irradianskurver

Fotosyntesehastighet som funksjon av irradians kan fremstilles i en fotosyntese-irradians kurve (P-I kurve)(Sakshaug et al., 1997). Fotosyntesen vil øke lineært med mengden lys opp til en gitt irradiansverdi og vinkelkoeffisienten til kurven i origo kalles α og er den fotosyntetiske effektiviteten. Punktet hvor fotosyntesen ikke lenger øker lineært med lys kalles lysmetningsindeks (I_k , enhet: $\mu\text{mol fotoner m}^{-1} \text{s}^{-1}$). Ved fortsatt stigende irradians vil fotosyntesen være mettet, og nå maksimum (P_{maks}) (Sakshaug et al., 1997). α er hovedsakelig avhengig av spektral irradians, mens P_{maks} ikke er spektralt avhengig, og i fravær av næringsbegrensning er reaksjonene som bestemmer P enzymatisk kontrollert og temperaturavhengig. (Sakshaug et al., 1997). α og P_{maks} er kan være C-normaliserte eller $Kl\alpha$ -normaliserte (Sakshaug og Johnsen, 2006). Fotosyntetiske parametere påvirkes av eksterne variabler som lysregime (intensitet, spektral kvalitet og daglengde), temperatur og næringsstoffer (Sakshaug et al., 1997).

Fotosyntetiske målinger for å beregne P-I kurver krever lang akklimatisering i algene til det aktiniske lyset, i stedet kan man måle såkalte raske lyskurver (*eng. Rapid Light Curves*, RLC). RLC vil på samme måte som P-I kurver vise fotosyntese som funksjon av irradians, men cellene utsettes for irradians over et så kort tidsrom (ned mot 1 minutt) at prøven ikke akklimatiseres fullstendig til gitt irradians (Hawes et al., 2003, Suggett et al., 2010). RLCer har likevel vist seg å være nyttig for å studere trender i fotosynteserespons på økende irradians, og man kan beregne de samme parameterne (α , P_{maks} , I_k) fra RLC (Ralph og Gademann, 2005).

1.5 Overvåkning av planteplankton

Tradisjonelt har overvåkning av næringssaltutslipp fra fiskeoppdrettsanlegg basert seg på måling av næringskonsentrasjonene i omkringliggende vannmasser, som pga. hydrodynamiske krefter varierer over kort tidsrom, og krever høy frekvens av prøvetakinger. På grunn av de omkringliggende vannmassenes evne til å assimilere næringssaltene som slippes ut er det vanskelig å påvise næringssaltutslipp fra akvakulturen (Islam, 2005). Fordi økte næringskonsentrasjoner stimulerer primærproduksjon kan planteplankton brukes som en indikator på overføring av nitrogen til primærprodusenter (Dalsgaard og Krause-Jensen, 2006).

Utslipp av uorganiske næringsstoffer kan påvirke planteplankton i eufotisk kyst-vann ved at planktonet tar opp stoffene og bruker dem til vekst (Olsen og Olsen, 2008). Konsentrasjonen av klorofyll *a* brukes som et mål på biomasse av primærprodusenter (planteplankton) (Sakshaug et al., 2009, Babin, 2008, Johnsen et al., 2010), da klorofyll *a* er felles for alle autotrofe organismer. Standard overvåkning av planteplankton i norsk kystvann skjer ved å måle klorofyll *a* konsentrasjonen (Veileder01:2009). Forholdet mellom klorofyll *a* og biomassen til planteplanktonet varierer med blant annet konsentrasjoner av næringsalter og lysforholdene, og det er derfor ønskelig med et bedre mål på planteplankton biomasse. Den totale konsentrasjonen av klorofyll *a* vil heller ikke si noe om planteplanktonsamfunnet.

1.6 Mål med oppgaven

Målet med oppgaven var å undersøke hvordan utslipp av næringssalter fra lakseoppdrett kan påvirke strukturen til planteplanktonsamfunnet i kystvann. Undersøkelsene omfattet bruk av forskjellige metoder for kvantifisering og klassifisering av planteplankton. I tillegg til å basere vurderingene på tradisjonelle telleprøver av planteplankton skulle oppgaven undersøke om det er mulig å (i) anvende pigmentsammensetning som indikator for endringer i planteplanktonsamfunnet og (ii) anvende fluorescenskinetikk til å måle fotosynteseaktivitet og om dette i kombinasjon med pigmentsammensetning i planteplanktonsamfunnet kan brukes til å estimere primærproduksjon. Et viktig forhold ved anvendelse av flere metoder blir å kunne sammenlikne metodene for å best mulig karakterisere planteplanktonsamfunnet og lete etter indikatorer som kan påvise negative effekter i planteplanktonsamfunnet som følge av utslipp av næringssalter fra fiskeoppdrett.

2 Materialer og metoder

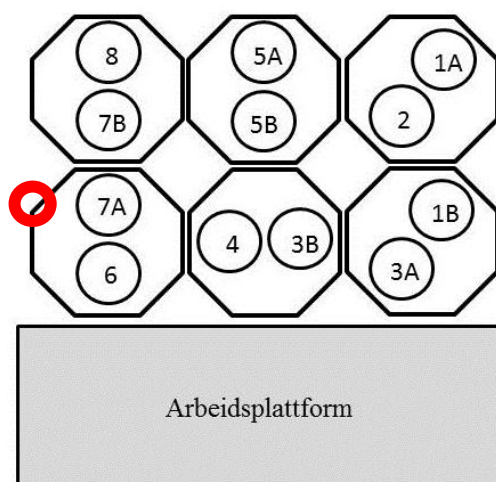
2.1 Eksperimentelt oppsett

Den eksperimentelle delen av oppgaven ble utført som en del av et mesokosme eksperiment i Hopavågen, Sletvik i Sør-Trøndelag (63°35'38 N, 9° 32' 48 Ø) i september 2011 (7.9-27.9.2011). Hopavågen er et naturlig fjærebasseng, beskyttet for vær og vind, med minimalt med ferskvannstilløp. Hopavågen har flere ganger vært brukt som forsøktsted for eutrofieringsstudier og mesokosmeforsøk (Olsen et al., 2006, Olsen et al., 2007, Gismervik et al., 2002, Vadstein et al., 2004).

Forsøket omfattet 12 mesokosmer med totalt 8 ulike behandlinger. Mesokosmene ble fylt med sjøvann fra Hopavågen på dag 0, og ble deretter tilsatt næringssalter hver dag med et overskudd av nitrogen i forhold til naturlig sjøvann (Redfield, 1958) og med ammonium som hovedkilde til nitrogen, i samsvar med næringssaltutslipp fra oppdrettsanlegg, se Tabell 1 (Olsen og Olsen, 2008). Det ble tatt prøver fra mesokosmene annenhver dag, fra dag 2 til og med dag 20.

2.1.1 Oppsett av mesokosmer

Mesokosmene ble laget av sylindere av polyetylen plast, med volum ca. 8 m³, diameter 1,0 m og total dybde 10,4 m, med form av en sylinder (10,0 m) med en kjegleformet bunn. Et lodd ble festet i bunnen av hver mesokosme for å holde mesokosmene i loddrett posisjon i vannet. Mesokosmene ble fylt med sjøvann ved å senke dem ned til 10 m og deretter dra dem opp mens de fyltes med vann fra hele vannsøylen. Halvparten av mesokosmene ble fylt dagen før forsøkets start og den andre halvparten ble fylt på dag 0 før tilsats av næringsstoffer til alle mesokosmene på dag 0. Mesokosmene ble montert i merder og festet til en flytebrygge som fungerte som arbeidsplattform under forsøket (Figur 1). Tidevannsstrømmer i Hopavågen førte til miksing mesokosmene. En irradians-logger (Li-COR) ble montert på en merd for loggføre irradians hvert 5. minutt.



Figur 1: Skjematisk oversikt over mesokosmenes plassering i merder med arbeidsplattform. Rød sirkel markerer hvor Li-COR lyslogger ble plassert på merden.

2.1.2 Tilsats av næringsstoffer

Tilførselen av for næringsalter er presentert i Tabell 1. Næringssaltene nitrat (NO_3), silisium (Si) og fosfat (PO_4^{3-}) ble tilsatt i alle mesokosmene i like mengder for å etterlikne den naturlige tilførselen av næringsalter i Hopavågen (Olsen et al., 2007), mens det i tillegg ble tilsatt en gradient av ammonium (NH_4^+) og (PO_4^{3-}) som tilsvarte utslipp fra lakseoppdrett i merdanlegg (Tabell 1) (Olsen og Olsen, 2008). Forsøket bestod av totalt 8 ulike behandlinger med replikate mesokosmer (A og B) for halvparten av disse (Tabell 1). Den laveste nærings-tilsetningen var i mesokosmene M1A og M1B, med stigende tilsetninger til M8.

Næringsstoffer ble tilsatt hver dag etter prøvetaking homogent gjennom hele vannsøylen i mesokosmene ved å senke ned en plastlange fylt av næringsstoffer blandet i sjøvann til 10 m og deretter dra den opp med jevn hastighet. Dette sikret jevn fordeling av næringsstoffene i mesokosmene.

Tabell 1: Tilførselsrate ($\mu\text{mol d}^{-1} \text{L}^{-1}$) av ammonium (NH_4^+), fosfat (PO_4^{3-}), silisium (Si) og nitrat (NO_3) per liter og dag til de ulike mesokosmene under forsøket (totalt 20 dager)

Behandling	M1A M1B	M2	M3A M3B	M4	M5A M5B	M6	M7A M7B	M8
NH_4^+	0,25	0,43	0,72	1,23	1,60	2,09	3,55	4,68
PO_4^{3-}	0,02	0,033	0,047	0,060	0,078	0,102	0,173	0,228
Si	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
NO_3	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

2.1.3 Prøvetaking og oppbevaring

På dag null ble det tatt ut en nullprøve utenfor mesokosmene. Etter det ble det hver 2. dag tatt en integrert vannprøve (0-10 m) med en rørvannhenter (2 m lang, 4,2 L volum). Prøver til filtrering og fiksering ble lagret i plastkanner ved 4 °C og i mørke frem til prosessering (maks 6-9 timer). Prøver for måling av fluorescens-kinetikk ble oppbevart på brune medisinflasker (~300 mL) i vannbad av sjøvann som ble kontinuerlig pumpet opp fra Hopavågen for å holde temperaturen konstant. Filterprøver ble umiddelbart etter filtrering lagt i fryseskap på feltstasjonen, transportert frosne til Trondheim biologiske stasjon etter forsøkets slutt og oppbevart i fryser (-20 °C) frem til analysering < 5 måneder etter prøvetaking.

2.2 CTD

Temperatur og salinitet i mesokosmene ble målt med en CTD (SD 204, SAIV A/S Environmental Sensors & Systems) to ganger i løpet av forsøket, på dag 9 og dag 13 i tillegg ble det gjennomført to målinger utenfor mesokosmene på dag 2 og 13.

2.3 Lysmålinger

Irradians innenfor bølgelengder 400-700 nm (Fotosyntetisk aktiv irradians, PAR), E_{PAR} , ble målt med et irradians-meter (LI-COR) plassert på flåten ved siden av mesokosmene (Figur 1).

Irradiansmålinger ble registrert hvert 5. minutt gjennom hele døgnet på følgende dager: 3-7,10-11,13-14 og gjennom deler av døgnet på dag 1-2, 8-9, 12, 15 og 20. Ingen målinger ble gjort dag på 0 og dag 16-19. Manglende lyslogging skyldes teknisk svikt med lysloggeren og for dager og tidsintervaller uten målinger ble E_{PAR} rekonstruert ved bruk av informasjon om skydekke ved Ørlandet målestasjon¹ (~13 km fra Hopavågen). Et irradiansspekter ble laget for en mesokosme (3B) med RAMSES spektrofotometer (TriOS Optical Sensors). Irradiansspekteret ble målt både formiddag og ettermiddag på dag 2 (9.9.2011) med 2 replikate målinger (totalt 4 replikater) for 9 ulike dyp (0 – 8 m, hver meter).

2.4 Næringssaltanalyser

Vann til analyser av uorganiske næringsalter (nitrat, ammonium og fosfat, 50 mL) ble tatt fra de generelle vannprøvene, og fryst frem til analyse etter Parsons et al. (1984). Nitrat og fosfor ble analysert fra samme vannprøve, mens ammonium ble analysert fra en separat vannprøve. Prøvene ble tint i romtemperatur og deretter filtrert med 0,2 µm filter og målt med en auto analyser (Flow Solution IV, O-I-Analytical, USA). Nitrat ble analysert etter standard metode (EPA/600/R-79-020, 1984), fosfat etter standard metode (EPA-600/4-79-020, 1984) og ammonium som beskrevet av Kérouel og Aminot (1997)

2.5 Planktonprøver

Sjøvann fra mesokosmene (~300 mL) ble filtrert gjennom en 600 µm sil over på brune glassflasker og fiksert med sur Lugols løsning (~3 mL, dvs. ~1 % av total prøve). Prøvene ble lagret mørkt og kjølig frem til mikroskopering. Det ble tatt prøver av kopepoder som beskrevet av Olsen et al. (2007).

2.5.1 Mikroskopering

Mikroskopering ble utført etter Uthermöls metoden (Edler og Elbrächter, 2010) med et omvendt lysmikroskop (LEICA DM IRB). Prøvene ble romtemperert i minst 24 timer før sedimentering for å unngå dannelse av luftbobler under sedimentering. Prøvene ble homogenisert ved å vendes opp ned 150 ganger med asymmetriske bevegelser. Sedimentering foregikk deretter i 50 mL eller 25 mL sedimentasjonskamre, i henholdsvis 24 eller 16 timer.

Planteplankton ble identifisert til ulike taksonomiske grupper og inndelt i ulike størrelseskategorier (se Tabell 2). Identifiseringen ble gjort basert på *Phytoplankton of norwegian coastal waters* (Thronsen et al., 2007), *Coastal Plankton Photo Guide for European Seas* (Larink og Westheide, 2011) og *Marine mikroalger i farger* (Thronsen og Eikrem, 2001). Dinoflagellater ble telt i flere grupper, basert på taksonomisk orden. Nakne dinoflagellater (orden Gymnodiales) ble telt i 3 størrelseskategorier: 10-20, 20-40 og > 40 µm, og inndelt i «lange» og «kompakte» etter cellenes form for mer nøyaktig beregning av

¹ <http://www.yr.no/sted/Norge/Sør-Trøndelag/Agdenes/Agdenes~215756/almanakk.html?dato=2011-09-07>

volum (Tabell 3). Thekate dinoflagellater ble inndelt basert på antall plater: Prorocentrales med to thekate plater, Dinophysales med 4 plater, mens Peridinales ble telt som to grupper, *Ceratium* spp. ble skilt ut som egen gruppe på grunn av høy tallrikhet og relativt store celler, mens de resterende Peridinales telt i en gruppe. Ciliater ble telt i tellekategorier basert om cellene var kjegle- eller sfæreformet og i tre størrelseskategorier: 10-20µm, 20-40 µm og >40µm. *Myriconecta* sp ble telt separat på grunn av cellenes form.

Tabell 2: Tabellen gir en oversikt over hvordan mikroskopering ble gjennomført

Total forstørrelse	Beskrivelse av metode
100x	Hele prøven ble telt for <i>Ceratium</i> spp., sortert i tre grupper: <i>Ceratium fusus</i> , <i>Ceratium</i> «type 1» og <i>Ceratium</i> «type 2» ^[1] .
200x	Øvrige celler > 10 µm ble telt og artene identifisert. Diatomeceller i kjeder bredere enn 5µm ble telt. Alle striper eller annenhver ble telt etter skjønn.
400x	Enkeltceller < 10 µm ble telt uten videre identifisering, tellingen foregikk ved å telle minst 100 celler i ulike tilfeldige synsfelt. Samtidig ble antall diatomekjeder smalere enn 5 µm målt i µm lengde og telt

^[1]Kategoriene av *Ceratium*: «type 1» og «type 2» ble bestemt ut ifra cellenes form for beregning av biovolum (Tabell 3)

2.5.2 Beregning av biovolum

Under mikroskopering ble det tatt bilder av representanter (~5 første observerte algeceller) fra hver tellekategori i hver prøve med et digitalt kamera (SONY DFW-X700) knyttet til mikroskopet og programvare (Fire-i, Unibrain). Et bildebehandlingsprogram (Image J, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) ble brukt for å måle størrelsen på planteplankton og ciliater. Individuer til måling ble valgt tilfeldig fra bilder fra alle mesokosmer og alle dager. For beregningene ble minst 30 bilder lagt til grunn, eller det antall bilder som krevdes for at standardfeilen var < ±10 % av middelvolumet. For taksonomiske grupper med stor variasjon i biovolum ble 10 % av de største og minste cellene ikke medregnet ved beregning av gjennomsnittsvolum for gruppen (se Vedlegg D).

Planteplankton ble delt inn i ulike geometriske former basert på taksonomi (Hillebrand et al., 1999, HELCOM, 2006), presentert i Tabell 3. Biovolumet ble beregnet per telle-enhet (celleantall). For tynne (<5 µm) diatomekjeder ble volum beregnet for 100µm tråder (HELCOM, 2006).

For volumberegning av uidentifiserte thekate dinoflagellater ble formen antatt å være ellipsoide der eventuelle horn som for eksempel hos *Proto-peridinium* ble utelatt da disse er vist å bidra lite (~ 1 %) til artens totale biovolum (Menden-Deuer og Lessard, 2000). Ikke alle dimensjoner av en algecelle er synlig ved mikroskopering med bruk av Uthermöhl-metoden. En del arter (for eksempel *Dinophysis* sp., *Proto-peridinium* sp. og *Chaetoceros* sp.) tenderer til å sedimentere flatt (HELCOM, 2006), og her ble dybden av cellene antatt å være 2/3 av cellens bredde.

Tabell 3: Ulike taksonomiske grupper ble karakterisert som geometriske former for beregning av biovolum

Gruppe	Inndeling for beregning av volum	Geometrisk form	Referanse
Dinoflagellater	Athecate «lang» ikke identifisert	2 kjegler	(HELCOM, 2006)
	Athecate «kompakt» ikke identifisert	Ellipsoide	(Hillebrand et al., 1999)
	<i>Ceratium fusus</i>	2 kjegler	(Hillebrand et al., 1999)
	<i>Ceratium</i> «type 1»	Ellipsoide (kropp) + sylinder (horn) + 2 kjegler (horn)	(Hillebrand et al., 1999)
	<i>Ceratium</i> «type 2»	Kjegle (kropp) + sylinder (horn) + 2 kjegler (horn)	(Hillebrand et al., 1999)
	<i>Dinophysis</i> spp.	Ellipsoide	(Hillebrand et al., 1999)
	<i>Prorocentrum</i> spp.	Ellipsoide	(HELCOM, 2006)
	Thekate un.	Ellipsoide ^[2]	(Hillebrand et al., 1999)
Diatomeer	<i>Chaetoceros</i> spp.	Elliptisk prisme	(Hillebrand et al., 1999)
	<i>Leptocylindricus</i> spp.	Sylinder	(Hillebrand et al., 1999)
	<i>Rhizoaolenia</i> spp.	Sylinder	(Hillebrand et al., 1999)
	<i>Thalassiosira</i> spp.	Sylinder	(HELCOM, 2006)
	Diatomeer, ikke identifisert	Sylinder	(Hillebrand et al., 1999)
	Filamenter < 5µm brede	Sylinder	(HELCOM, 2006)
Kiselflagellater	<i>Dictyocha speculum</i>	Halv sfære	(HELCOM, 2006)
Svelgflagellater		Kjegle + ½ sfære	(Hillebrand et al., 1999)
Nanoplankton < 10 µm		Forlenget sfære	(Verity et al., 1992)
Ciliater	Oligotriche ciliater	Kjegle eller sfære	
	<i>Myriconecta</i> sp.	To halve sfærer	

^[1] Det ble hovedsakelig observert *P. minimum*, for andre *Prorocentrum* arter kan andre formler anbefales (HELCOM, 2006)

^[2] Avgjørelse basert på stor andel av *Alexandrium*, ved direkte observasjon

Biomasse for ulike grupper av planteplankton ble beregnet ved konverteringsfaktorer fra Menden-Deuer og Lessard (2000), vist i Tabell 4 og likning (1):

$$\log \text{pg C celle}^{-1} = \log a + b \times \log \text{Volum } (\mu\text{m}^3) \quad (1)$$

Der $\log a$ og b er koeffisienter som beskriver forholdet mellom volum og karbon (C) for spesifikke grupper av planteplankton.

Tabell 4: Koeffisienter for konvertering av biovolum til karbon, $\log a$ og b er koeffisienter for beregning av volum etter likning (1) og spesifikke for ulike grupper av planteplankton. Tabellen er bearbeidet fra (Menden-Deuer og Lessard, 2000)

		log a	b
Diatomeer	<i>Chaetoceros</i>	-0,541	0,811
	<i>Lepticylindricus</i>		
	Tynne filamenter		
Diatomeer > 3000 μm^3	<i>Rhizosolenia</i>	-0,933	0,881
	<i>Thaleosiorisa</i>		
	Diatomeer un		
Dinoflagellater		0,353	0,864
Protist plankton	<i>Dichtyoca</i>	-0,583	0,860
	Svelgflagellater		
	Nanoplankton		

Volumet av ciliater ble beregnet basert på cellenes form under direkte observasjon, karakterisert som enten en kjegle eller sfære for tre størrelseskategorier: 10-20 μm , 20-40 μm og >40 μm . *Myriconecta sp.* ble skilt ut, og volumet beregnet som to halve sfærer (10-20 μm og 20-40 μm , ingen større observert). For å beregne biomasse (μg karbon L^{-1}) for ciliater ble en konverteringsfaktor 0,19 $\text{pg C } \mu\text{m}^{-3}$ for oligotriche ciliater fra Putt og Stoecker (1989) brukt.

2.6 Klorofyll *a* – *in vitro*

Vannprøver fra mesokosmene ble filtrert med GF/F filter (0,45 μm nominell porestørrelse, Whatman, 2 replikater per mesokosme, 1 replikat per mesokosme på dag 4 og 3 replikater av nullprøven). Filtrene ble oppbevart i fryser (-20 °C) før analyse innen <24 timer). Klorofyll *a* ble ekstrahert med metanol (10,0 mL) i mørket (pakket i aluminiumsfolie) i fryser over natten. Prøvene ble refiltrert gjennom en planktonduk (10 μm) før måling. Et fluorometer (Turner Designs) ble brukt til å måle fluorescens fra klorofyll *a* og konsentrasjonen beregnet i henhold til standard prosedyre (NS4767:1983)

Fraksjonert klorofyll *a* < 10 μm ble målt ved å først filtrere vannprøver fra mesokosmene gjennom en 10 μm planktonduk og deretter filtrere filtratet med GF/F filter (0,45 μm nominell

porestørrelse, Whatman). Videre ble analysen utført som beskrevet for totalt klorofyll *a* (over).

2.7 Pigmentanalyser og rekonstruksjon av absorpsjonsspektrum

Pigmenter ble separert med HPLC (“*High performance liquid chromatography*”). Vannprøver som senere ble analysert for pigmenter med HPLC ble først silt gjennom en sil (maskevidde 600 µm) for å fjerne større organismer (for eksempel geleplankton), og oppbevart på mørke plastkanner. Deretter ble vannprøven filtrert på GF/F filter (0,45 µm nominell porestørrelse, Whatman). Lyskilder ble dekket med mørk plast for å hindre nedbrytning av pigmentene. Filtre ble pakket i aluminiumsfolie og frosset ned umiddelbart (-20 °C).

Prøvene ble analysert ved Trondheim biologiske stasjon. Metoden som ble brukt var den beskrevet av Zapata et al. (2000) og ved bruk av et Hewlett Packard 1100 Series HPLC system. Frosne 25mm GF/F filtre ble overført til glassrør og tilsatt metanol (1,6 mL). Rørene ble ristet med en Vortex mikser (~3 sekunder) og forseglet med nitrogengass (N₂) før de ble oppbevart i fryser (-20 °C) over natten. Påfølgende dag ble prøvene refiltrert gjennom sprøytefilter (0,2 µm, VWR International) for å fjerne filterrester og overført til mørke glassrør, som igjen ble forseglet med N₂-gass og plassert i HPLC instrumentet. For prøver fra dag 6 og for enkelte prøver fra dag 16 fra M3B, M5A, M5B, M7A, M2 og M8 ble det bare brukt ett filter. For alle andre prøver ble to replikate filtre plassert i et rør for å øke pigmentkonsentrasjonen.

Absorpsjonen til pigmentene ble lest av ved 440 nm. Identifisering av de ulike pigmentene ble gjort ved å sammenligne retensjonstiden og formen på absorpsjonsspekteret til det enkelte pigmentet ved 440 nm ved hjelp av et HPLC bibliotek og litteratur (Roy et al., 2011, Jeffrey et al., 1997). Arealet under kurvene (areal) ble manuelt justert og data for retensjonstid og areal ble brukt for å kvantifisere pigmentkonsentrasjonen (i MS Excel) ved likning (2):

$$\mu\text{g /L} = \frac{\text{areal} \times R_{fs} \times V_e \times 1000}{V_i} \quad (2)$$

der R_{fs} er en responsfaktor beregnet fra kalibrering ved 440 nm, areal er arealet under pigmenttoppen målt ved HPLC ved 440 nm, V_e er ekstraksjonsvolum av metanol som ble brukt for å ekstrahere pigmenter fra filtre (1,6 mL) og V_i injeksjonsvolumet (77µL) til HPLC instrumentet. Dersom arealet < 20 ble pigmentet kun registret som «spor» da kvantifisering i vil gi betydelig usikkerhet. Klorofyll c_1 og klorofyll c_2 ble slått sammen i beregningene.

Pigmentsammensetningen til ulike planteplanktonsamfunn i de ulike mesokosmene ble vurdert basert på forholdet mellom de enkelte pigmentene til klorofyll *a*

2.8 Fotosyntese-effektivitet og elektrontransport målt med fluorescenskinetikk

2.8.1 Rekonstruksjon av *in vivo* absorpsjonsspektrum

Absorpsjonsspektre for det totale planteplanktonsamfunnet ble rekonstruert basert på summen av Gaussiske kurver, ved bruk av likning (3), hentet fra Hoepffner og Sathyendranath (1991). Beregningene ble basert på 4 pigmentgrupper: klorofyll *a*, klorofyll *b*, klorofyll *c* (klorofyll $c_1 + c_2 + c_3$) og karotenoider:

$$a_p(\lambda) = \sum_{i=1}^n a'_i(\lambda_m) C_i \exp \left[-\frac{(\lambda - \lambda_{mi})^2}{2W_i^2} \right] \quad (3)$$

der C_i er konsentrasjonen av pigmentet ansvarlig for *i*'te gaussiske bånd, λ_m plasseringen av maksimum absorpsjon for båndet og W_i gjennomsnittlig spesifikk absorpsjonskoeffisient for *i*'te komponent ved λ_{mi} . For verdier av koeffisientene som er brukt se (Hoepffner og Sathyendranath, 1991).

2.8.2 Spektralt veid klorofyll *a* spesifikk absorpsjonskoeffisient

Spektralt veid klorofyll *a* spesifikk absorpsjons koeffisient (\bar{a}^*) ble beregnet etter likning (4) (Babin, 2008):

$$\bar{a}^* = \frac{\int_{400}^{700} a_{\phi}^*(\lambda) E_0(\lambda) d\lambda}{\text{PAR}} \quad (4)$$

der $a_{\phi}^*(\lambda)$ ($\text{m}^2 \text{mg}^{-1}$) er klorofyll *a* spesifikk absorpsjonskoeffisient for planteplankton (rekonstruert, avsnitt 2.8.1), beregnet med likning (3), $E_0(\lambda)$ er spektral irradians ($\mu\text{mol fotoner m}^{-2} \text{s}^{-1}$) målt med RAMSES spektrometer, og λ er bølgelengde (nm). Integreert irradians fra 400-700 nm (PAR) ble målt med Li-COR lysmåler (avsnitt 2.3).

2.8.3 *In vivo* fluorescenskinetikk, beregning av produksjon fra elektrontransport

Fluorescenskinetikk ble målt ved bruk av et håndholdt AquaPen fluorometer (AquaPen-C AP-C 100, Photon Systems Instruments, Tsjekkia) og et dataprogram (FluorPen software) ble brukt for å overføre data fra AquaPen til en datamaskin. AquaPen var utstyrt med en PIN fotodiode som sender ut blått lys ved 455 nm og med 667 til 750 nm båndpass filter.

Det ble tatt ut vann for måling av fluorescenskinetikk fra vannprøvene hentet fra mesokosmene før resterende vannprøver ble lagret kaldt. Disse ble lagret på brune medisinflasker i et vannbad med sjøvann pumpet direkte fra sjøen for å beholde samme temperatur som i mesokosmene, frem til målinger ble gjort så snart som mulig etter prøvetaking. For hver mesokosme ble det gjennomført 3 målinger: *in vivo* fluorescens, maksimalt kvanteutbytte for fotosystem II ($\Phi_{PSII_{maks}}$) og en måleprosedyre for å lage en lyskurve (LC-1 protokoll, AquaPen Manual).

En kyvette ble fylt $\frac{3}{4}$ full med prøvevannet (3-4 mL). Prøven stod i mørke inne i fluorometeret i 1 min før målinger. For hver nye måling ble det tatt ut en ny vannprøve, og prøvene ble alltid akklimatisert i 1 min før måling. AquaPen har deteksjonsgrense $0,5 \mu\text{g KLa L}^{-1}$ (AquaPen Manual), men ved målinger opplevdes signalet som ustabil også for høyere

konsentrasjoner. Dersom signalet var svakt ble prøven oppkonsentrert ved hjelp av en Sartorius filteroppsats og 0,47 mm filter (porestørrelse 0,8µm, Millipore) og manuelt svakt sug. Vannet ble holdt kontinuerlig i bevegelse for å hindre at algeceller sedimenterte. De aktuelle prøvene er merket i Vedlegg B.

AquaPen ble først brukt til å måle *in vivo* fluorescens i prøvene. Denne måling tilsvarer F_0' for alger akklimatisert til mørke og representerer bakgrunns fluorescens (Roháček og Barták, 1999). AquaPen måler kontinuerlig *in vivo* fluorescens ved å sende ut en svak målepuls, og et gjennomsnitt av målinger over ~1 min ble notert.

Videre ble det tatt ut en ny vannprøve (fra samme mesokosme) for å måle maksimalt kvanteutbytte for mørkeakklimatiserte $\Phi\text{PSII}_{\text{maks}}$. F_0 ble målt etter 1 minutt mørkeakklimatisering. AquaPen sendte så ut en puls med mettende lysintensitet (~3000 µmol fotoner m⁻² s⁻¹) for å «lukke» alle reaksjons-sentere. $\Phi\text{PSII}_{\text{maks}}$ ble beregnet fra F_0 og F_m etter likning (5).

$$\Phi\text{PSII}_{\text{maks}} = \frac{F_m - F_0}{F_m} \quad (5)$$

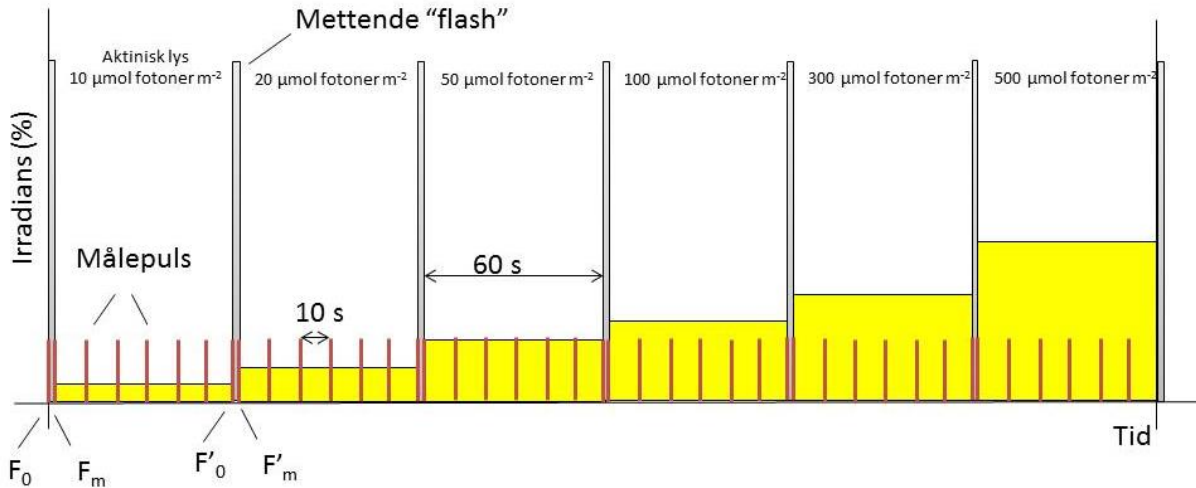
der F_0 er grunnfluorescensen for en mørkeadaptert prøve og F_m maksimal fluorescens etter en mettende lypuls.

En ny prøve ble brukt for måling av LC-1 protokollen og metoden er illustrert i Figur 2. Fluorescens målt rett før og rett etter første mettende lys er F_0 og F_m . Deretter ble prøven utsatt for stigende aktinisk lysintensitet i intervaller (10, 20, 50, 100, 300 og 500 µmol fotoner s⁻¹) som varte i 60 sekunder. Grunnfluorescens (nå F_0' i aktinisk lys) ble målt med en målepuls med lav intensitet hvert tiende sekund (totalt 5 ganger) før fluorescens ble målt igjen før og etter en mettende lypuls (nå F_m').

Maksimalt kvanteutbytte for mørkeakklimatiserte ($\Phi\text{PSII}_{\text{maks}}$) ble beregnet etter likning (5) og operasjonelt kvanteutbytte for fotosystem II (ΦPSII) ble beregnet som i likning (6).

$$\Phi\text{PSII} = \frac{F_0' - F_m'}{F_m'} \quad (6)$$

der F_0' er grunnfluorescens under en gitt aktinisk irradians, og F_m' er maksimal fluorescens under samme aktiniske irradians.



Figur 2: Illustrasjon over måling av fotosyntese-irradians med AquaPen, F_0 og F_m (hhv. grunnfluorescens og maksimal fluorescens) ble målt etter 1 minutt mørkeakklimatisering. Videre ble F'_0 og F'_m (hhv. grunnfluorescens og maksimal fluorescens i aktinisk lys) målt under aktinisk lys etter 60 sekunders akklimatisering for 6 stigende irradianser (10, 20, 50, 100, 300 og 500 $\mu\text{mol fotoner m}^{-2}$). Figuren baserer seg på AquaPen manualen.

Relativ elektronoverføringsrate for PSII ($r\text{ETR}_{\text{PSII}}$) ble deretter beregnet etter likning (7):

$$r\text{ETR}_{\text{PSII}} = \phi_{\text{PSII}} \times \phi_{\text{RC}} \times E \quad (7)$$

der ϕ_{RC} er antall elektroner generert per antall fotoner som treffer reaksjonscenteret, antatt å være $1,0 \text{ mol elektroner (mol fotoner)}^{-1}$, ϕ_{PSII} er operasjonelt kvantutbytte fra fotosystem II, og E er det aktuelle aktiniske lyset.

Fotosyntese-irradians ble plottet i SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc) og P-I kurver tilpasset etter likning (8) fra (Webb et al., 1974):

$$r\text{ETR} = r\text{ETR}_{\text{maks}} \left[1 - e^{-\left(\frac{\alpha E}{r\text{ETR}_{\text{maks}}}\right)} \right] \quad (8)$$

De fotosyntetiske parameterne α og $r\text{ETR}_{\text{maks}}$ ble beregnet fra kurvetilpasningen ved bruk av SigmaPlot. I_k ble beregnet etter likning (9):

$$I_k = \frac{r\text{ETR}_{\text{maks}}}{\alpha} \quad (9)$$

der α er fotosyntetisk effektivitet og I_k lysmetningsindeksen.

Absolutt elektronoverføringsrate for fotosystem II normalisert til klorofyll a ($\text{ETR}_{\text{PSII}}^{\text{Kla}}$) ble beregnet som i likning (10):

$$ETR_{PSII}^{Kla} = \Phi'_{PSII} \times \Phi_{RC} \times \bar{a}^* \times E \quad (10)$$

der Φ_{RC} er antall elektroner generert per foton ($1,0 \text{ mol elektroner (mol fotoner)}^{-1}$), Φ_{PSII} operasjonelt kvanteutbytte fra fotosystem II, \bar{a}^* spektralt veid klorofyll a spesifikk absorpsjonskoeffisient og E det aktiniske lyset.

Ved å multiplisere med den målte konsentrasjonen av klorofyll a (Kla) ble absolutt elektronoverføringsrate for fotosystem II beregnet som i likning (11):

$$ETR_{PSII} = ETR_{PSII}^{Chla} \times Kla \quad (11)$$

der ETR_{PSII}^{Kla} er absolutt elektronoverføringsrate for fotosystem II (Kla)⁻¹ beregnet i likning (6), og klorofyll a konsentrasjonen som ble brukt for å beregne spektralt veid klorofyll a absorpsjonskoeffisient (avsnitt 2.8.2).

2.8.4 Konvertering fra ETR til karbonproduksjon

Elektrontransportrate ble konvertert til karbon ved likning (12):

$$\mu\text{mol C L}^{-1}\text{dag}^{-1} = ETR_{PSII} \times fAQ_{PSII} \times \Phi_e \times PQ^{-1} \quad (12)$$

der Φ_e er elektronutbytte for oksygen, antall ladningsseparasjoner i PSII som kreves for å redusere et oksygenmolekyl og PQ er fotosyntetisk kvotient, mengden karbon som fikseres per O_2 som produseres. Det ble antatt at halvparten av fotonene absorberes av PSII ($PSII: fAQ_{PSII} = 0,5$, (Suggett et al., 2010)). I beregningene er det antatt at $\Phi_e = 0,2$ fordi 10 elektroner, altså 5 fra PSII, er målt til å være minste kvantekravet for O_2 produksjon (Ley og Mauzerall, 1982) og $PQ = 1,0$ fordi det ble antatt at ammonium var hovedkilden til nitrogen (Eriksen et al., 2007).

3 Resultater

3.1 Fysisk-kjemisk miljø

CTD data fra forsøket viste et stratifisert vannlag ned til ~10 meter, med temperatur i overkant av 12 °C og liten variasjon i både temperatur og salinitet. Temperaturen i vannet sank med 0,5 °C i løpet av forsøket. Saliniteten ble målt til 31,5-32 PSU i alle mesokosmer. Nedbør førte til variasjon i salinitet i mesokosmenes øverste vannlag (mellom 0,2 – 2 m).

Tabell 5 viser konsentrasjonen av fosfat, nitrat + nitritt og ammonium målt i Hopavågen før forsøkets start (dag 0, 0-10 m). Den største mengden av løst nitrogen i vannmassene forekom som ammonium (NH₄⁺), og forholdet uorganisk N:P var 5,5.

Tabell 5: Konsentrasjoner (µmol L⁻¹) av næringssalter ved dag 0.

	µmol L ⁻¹
PO ₄ ³⁻	0,17 ± 0,10
NO ₃ + NO ₂ ⁻	0,35 ± 0,15
NH ₄ ⁺	0,61 ± 0,22

Videre i forsøket ble det funnet en tilsynelatende økning i nitrat- og fosfatkonsentrasjonene som funksjon av tid, og som funksjon av tilførsel av næringssalter (upubliserte prosjekresultater). Det ble tatt prøver for ammonium, men på grunn av kontaminering av prøvene før analyse er disse resultatene ikke tatt videre med i oppgaven.

3.2 Heterotroft plankton

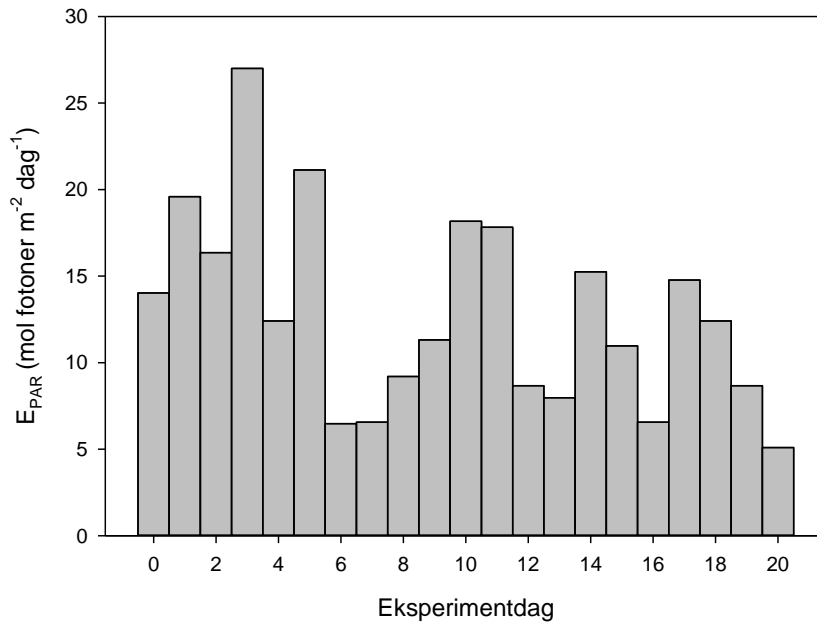
Biomassen av ciliatene varierte mellom 5-20 µg C L⁻¹) i løpet av hele forsøket, og var totalt dominert av oligotriche ciliater, med bare enkeltobservasjoner av tintinnider. I halvparten av mesokosmene ble det observert en økning i ciliatbiomasse (µg C L⁻¹) mellom dag 0 og 6, uavhengig av tilførselsrate av næringsstoffer. Etter dag 6 ble det funnet en nedgang i ciliatbiomasse for alle behandlinger. Det ble observert en svak positiv respons på tilførsel av NH₄⁺ i de to største størrelsesgruppene av ciliater (20-40 µm og > 40 µm) på dag 16 (upubliserte prosjekresultater).

Gjennom hele forsøket ble det observert lave konsentrasjoner av kopepoder og store mengder geleplankton (*Ctenophora sp.*) i alle mesokosmene, uten at disse blir videre kvantifisert og inkludert i denne masteroppgaven (upubliserte prosjekresultater).

3.3 Lys

Figur 3 viser integrert lys (E_{PAR}) målt som fotosyntetisk aktiv irradians 400-700 nm, i løpet av forsøket, med rekonstruert E_{PAR} for dager uten lysmåling. Det var stor variasjon i E_{PAR} de

ulike dagene av forsøket, med høyest lysinnstråling de første 6 dagene (dag 0-5) før en periode mindre lys (dag 6-9). Mellom dag 10 og 20 varierte lysmengden mye. I løpet av forsøket ble daglengden redusert med en time.

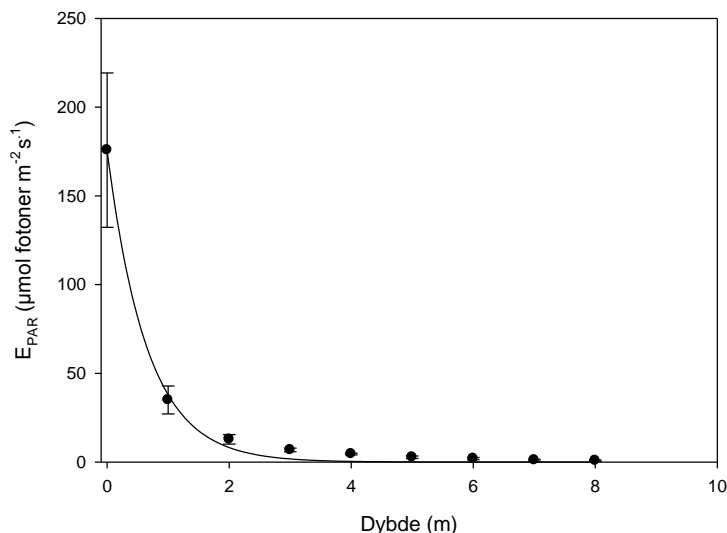


Figur 3: Integrert lys (E_{PAR} , mol fotoner $m^{-2} dag^{-1}$) for fotosyntetisk aktiv irradians (PAR, 400-700 nm) de ulike forsøksdagene.

Figur 4 viser hvordan E_{PAR} målt i overflaten ($E_{PAR,0m}$) ble svekket med økende dyp i mesokosme 3B på dag 2 (9.9.2011). Lyset ble sterkt redusert øverst i vannsøylen. Punktene passer en synkende eksponentiell kurve ($R^2 = 0,997$) og gjennomsnitts PAR fra 0-10 m kunne beskrives av kurven gitt i likning (13)

$$\bar{E}_{PAR,0-10m} = \frac{E_{PAR,0m} \times \int_0^{10} e^{-0,1523 \times X} dx}{2} \quad (13)$$

der $\bar{E}_{PAR,0-10m}$ er gjennomsnittlig fotosyntetisk aktiv irradians (400-700 nm) fra 0-10 meter, $E_{PAR,0m}$ er E_{PAR} målt i overflaten og x er dyp.

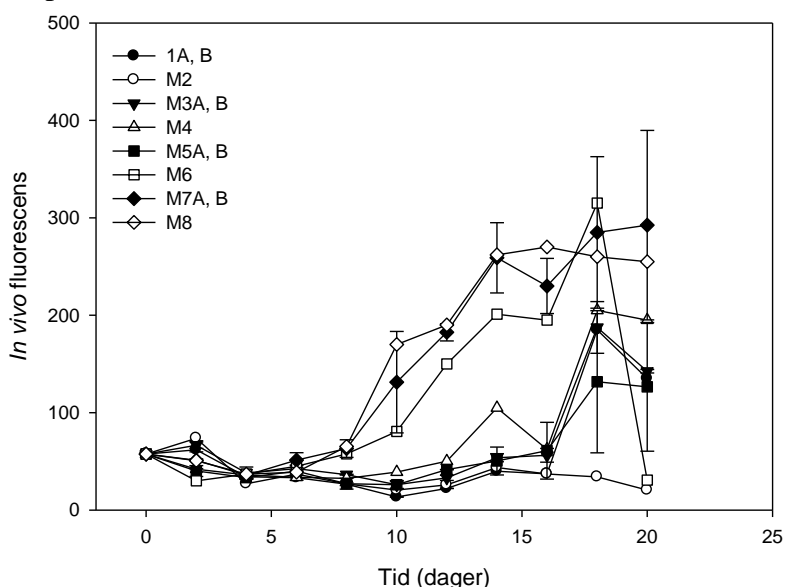


Figur 4: Svekking av lys (PAR: fotosyntetisk aktiv irradians) med dyp i mesokosme 3B, dag 2.

3.4 *In vivo* fluorescens

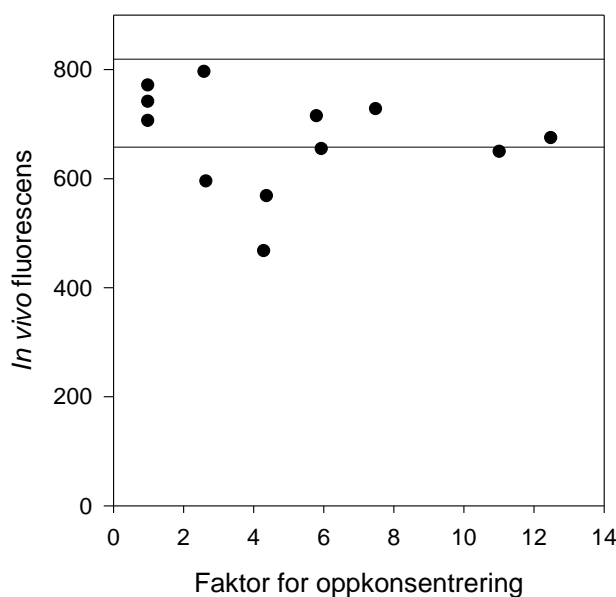
Figur 5 viser *in vivo* fluorescensmålinger i de ulike mesokosmene som funksjon av tid. Det ble i løpet av forsøket observert en økning i *in vivo* fluorescens i alle mesokosmene. Behandlingene med høyest tilførsel av næringssalter (M6-M8) skilte seg ut med høyere fluorescensverdier fra dag 10, mens det først ble observert en betydelig økning i fluorescensverdier for de resterende mesokosmene ved dag 16. Mesokosme 2 var eneste mesokosme som ikke viste betydelig endring i fluorescensverdi gjennom forsøket.

På dag 15 falt Mesokosme 1A sammen, og fra og med dag 14 er verdier for M1 i resten av forsøket som funnet i M1B. Vedlegg B viser alle målte fluorescensverdier, og oppkonsentrerte prøver er merket.



Figur 5: Utvikling av *in vivo* fluorescens over tid for de ulike mesokosmene. For replikate mesokosmer er det vist gjennomsnitt mens bærene uttrykker standardfeil.

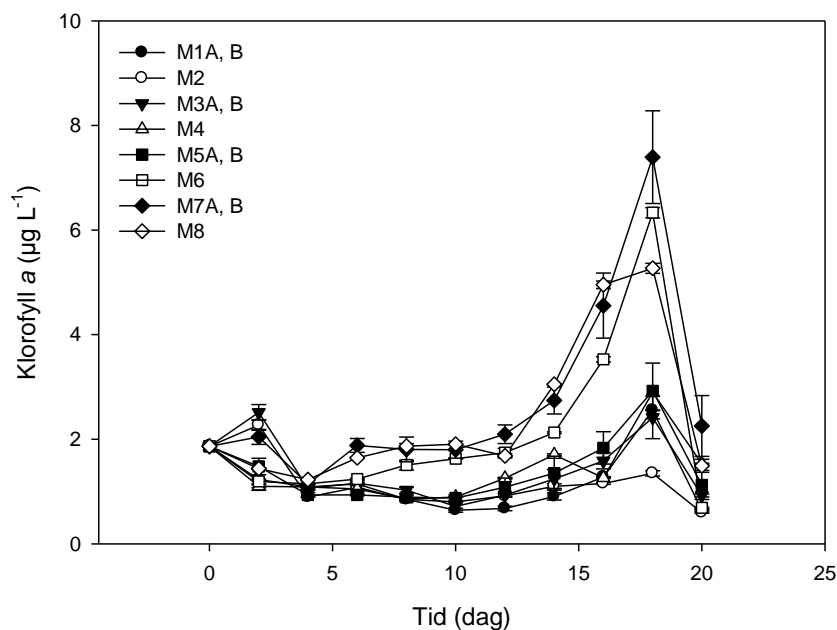
Figur 6 viser hvordan oppkonsentrering av prøver til AquaPen (avsnitt 2.8.3) påvirket resultatene for *in vivo* fluorescens. Det var tydelig at oppkonsentreringen kunne påvirke planteplanktonet og førte til reduksjon i fluorescenssignal, men det ble ikke funnet en god korrelasjon mellom grad av oppkonsentrering og resultat (lineær regresjon: $R^2 = 0,03$). Variasjonen i påvirkning ved oppkonsentrering viste at de oppkonsentrerte fluorescensverdiene i Figur 5 ikke ga et nøyaktig resultat, og legger til en ekstra usikkerhet i de bio-optiske målingene i forsøket.



Figur 6: *In vivo* fluorescens ved ulik grad av oppkonsentrering (faktor = 1 er ikke oppkonsentrert prøve), i Mesokosme 7A dag 16. Linjene viser 95 % konfidensintervall for ikke oppkonsentrerte prøver.

3.5 Utvikling av klorofyll *a* konsentrasjon over tid

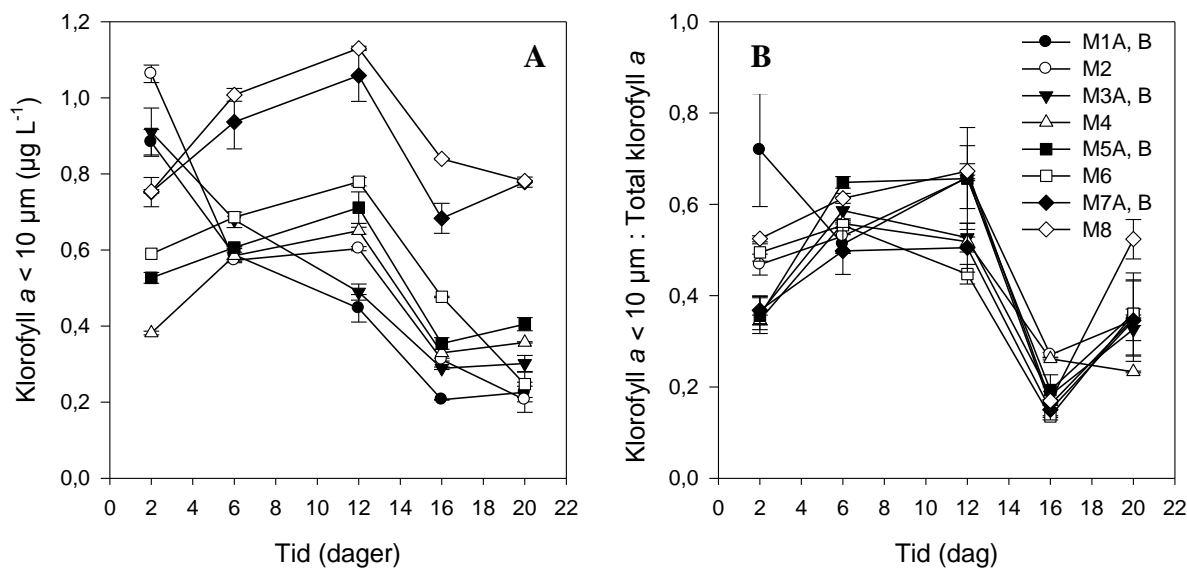
Figur 7 viser utvikling av klorofyll *a* gjennom hele forsøket varighet for mesokosmene som ble tilsatt ulike mengder av næringssalter (Tabell 1). Det ble observert en nedgang eller en liten respons i klorofyll *a* konsentrasjonen før dag 10, og deretter en økning for de ulike mesokosmene. Fra og med dag 6 skilte de mesokosmene som ble tilsatt størst dose med næringssalter (M7 og M8) seg ut med høyere klorofyll *a*-konsentrasjon. På dag 18 ble det observert et maksimum i responsen i klorofyll *a* på tilsats av næring i mesokosmene M6-M8, mens det ble observert en mindre økning i de resterende mesokosmer (M1-M5). Dette tydet på at økt tilsats av ammonium ga økt biomasse av planteplankton i mesokosmene. Fullstendige klorofylldata er vist i Vedlegg A.



Figur 7: Klorofyll a ($\mu\text{g L}^{-1}$) som funksjon av tid i de ulike mesokosmene. Målingene er gjennomsnitt av to replikate målinger per mesokosme, og for mesokosme 1, 3, 4 og 7 også gjennomsnittet av to replikate behandlinger (A og B). Barrene viser standardfeil, $n=4$ for M1, 3, 5 og 7 og $n=2$ for M2, 4, 6 og 8

Figur 8 viser endring i konsentrasjonen av klorofyll a i celler $<10 \mu\text{m}$ over tid i de ulike mesokosmene (Figur 8A) og forholdet mellom totalt klorofyll a og klorofyll a i $<10 \mu\text{m}$ fraksjonen i samme tidsperiode (Figur 8B). Det ble ikke funnet den samme økningen i klorofyll a $<10 \mu\text{m}$ utover i forsøket som for totalt klorofyll a (Figur 7), men en nedgang. I mesokosmene med lavest tilførsel av næringssalter, M1-M3, ble det funnet en nedgang i klorofyll a $<10 \mu\text{m}$ gjennom hele forsøket. I de resterende mesokosmene (M4-M8) ble det observert en svak økning frem til dag 12 og deretter en nedgang for alle behandlinger etter dag 12 (Figur 8A).

Forholdet mellom klorofyll a $<10 \mu\text{m}$ og totalt klorofyll a i Figur 8 B viser en svak økning i andelen klorofyll a $<10 \mu\text{m}$ i de fleste mesokosmer unntatt M1A og M1B. Videre ble det funnet en nedgang i andel fraksjonert klorofyll i alle mesokosmer frem til dag 16.



Figur 8A: Tidsutvikling for klorofyll *a* < 10 μm ($\mu\text{g L}^{-1}$) for de ulike mesokosmene. For replikate mesokosmer (M1, M3, M5 og M7) er det vist et gjennomsnitt. (B): forholdet mellom fraksjonert klorofyll *a* < 10 μm og totalt klorofyll *a* for ulike tilførselsrater og utvalgte dager (2, 6, 12, 16 og 20). Barrene i begge figurer representerer standardfeil.

3.6 Konsentrasjoner av andre pigment

Følgende andre pigmenter enn klorofyll *a* ble identifisert i pigmentanalysene: klorofyll c_3 , klorofyll c_{1+2} , peridinin, fucoxanthin, prasinoxantjon, diadinoxanthin, cis-viola, diatoxanthin, gyroxanthin og klorofyll *b*. Mange pigmenter ble bare observert i få mesokosmer, i lave konsentrasjoner og ofte kun som sporverdier. Peridinin, fucoxanthin, klorofyll c_3 og klorofyll c_{1+2} ble funnet i de fleste mesokosmene, og forløpene er vist i Figur 9. Pigmentene klorofyll *b* og zeaxanthin, viste minkende konsentrasjon i alle mesokosmer i løpet av forsøket varighet (se Vedlegg G). Ofte ble det bare observert spor av pigmentene, verdier under deteksjonsgrenser, noe som gjorde kvantifisering umulig. Også diatoxanthin og diadinoxanthin ble funnet i alle mesokosmer, men resultatene er ikke inkludert i oppgaven da disse er av liten kjemotaksonomisk verdi (Higgins et al., 2012).

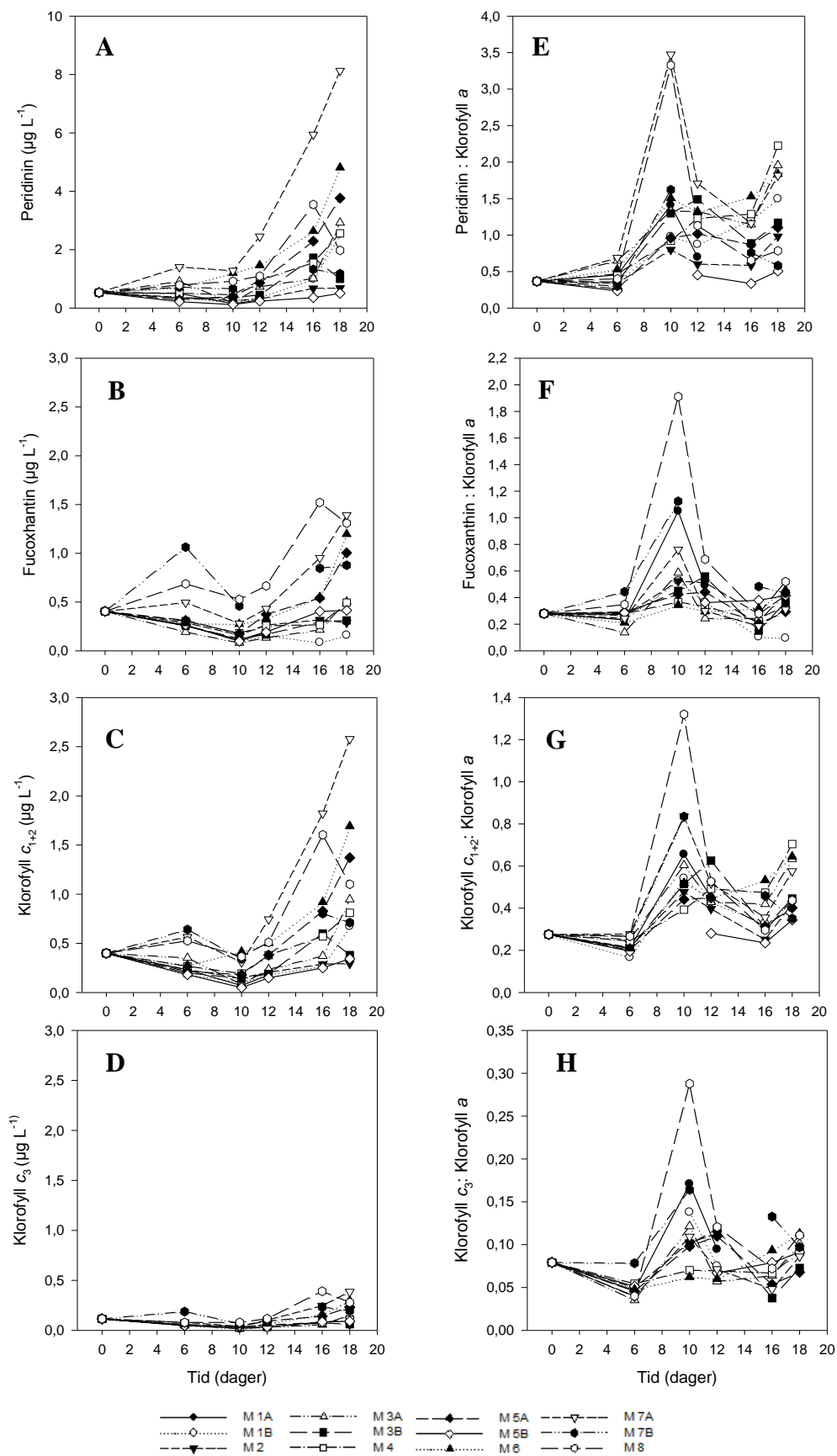
Figur 9 viser i tillegg til konsentrasjoner av ulike pigmenter også forholdet mellom det enkelte pigment og klorofyll *a* i mesokosmene som funksjon av tid. Peridinkonsentrasjonen i mesokosmene økte etter dag 10 (Figur 9A). Det ble observert størst økning i mesokosmene M7A og M4 og maksimum ble funnet ved dag 18.

Konsentrasjonen av fucoxanthin økte med økende tilsatt av næringssalter fra dag 0 til dag 6 og et maksimum ved dag 6 for tilførselsrate $> 3,55 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{L}^{-1} \text{dag}^{-1}$ (Figur 9B). På dag 10 ble det observert lavere verdier av fucoxanthin i alle mesokosmer før en ny økning etter dag 12.

Konsentrasjonen av klorofyll c_{1+2} fulgte tilsynelatende samme mønster som peridinkonsentrasjonen, og det ble observert en økning i konsentrasjon i alle behandlinger i løpet av

forsøket (Figur 9C). Det ble observert en svak økning fra dag 0 i til dag 6 og etter dette en nedgang i alle mesokosmer på dag 10. Fra dag 10 økte konsentrasjonen av klorofyll c_{1+2} igjen og nådde i alle mesokosmer høyest konsentrasjon ved høye tilførselsrater ved dag 18. Konsentrasjonen av klorofyll c_3 varierte lite, med noe høyere konsentrasjoner etter dag 16. (Figur 9 D).

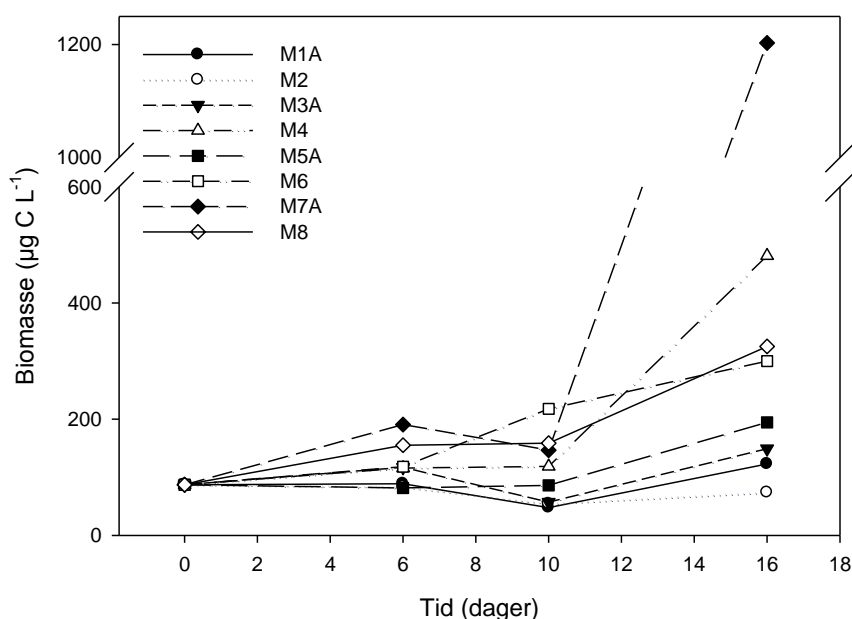
Forholdet mellom de ulike pigmentene og klorofyll a (pigment: klorofyll a) var lignende for de fire pigmentene (Figur 9 E-H) og viste et klart maksimum ved dag 10 for alle pigmenter med høyeste verdier ved høy tilførsel av næringsalter. Det ble videre observert en mindre økning av Peridinin: klorofyll a og Klorofyll c_{1+2} :Klorofyll a i alle mesokosmer mot slutten av forsøket (Figur 9 E-G).



Figur 9: Tidsutvikling av konsentrasjon ($\mu\text{g L}^{-1}$ sjøvann) av peridinin (A), fucoxanthin (B), klorofyll c_{1+2} (C) og klorofyll c_3 (D) for alle tilførselsrater. Figurene E-H viser forhold pigment: klorofyll *a*. Legg merke til at y-aksens lengde i A-D varierer.

3.7 Planteplankton

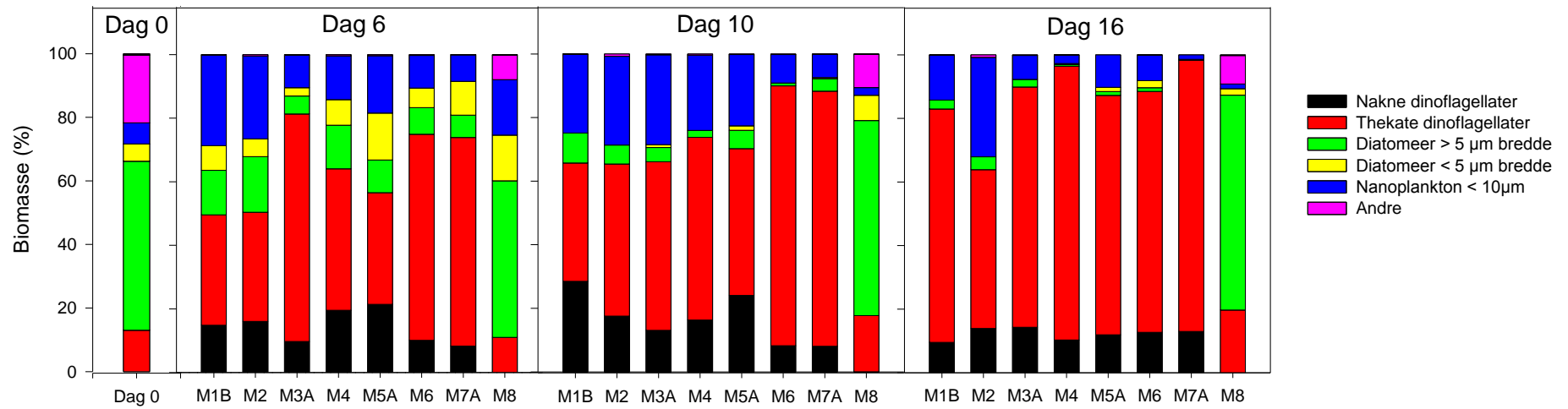
Figur 10 viser biomassen av planteplankton ($\mu\text{g C L}^{-1}$) for de ulike mesokosmene som funksjon av tid. Frem til dag 10 ble det ikke observert betydelig endring i biomasse i mesokosmene. På dag 16 ble det funnet en varierende økning i biomasse for alle behandlinger, men det var kun for fire mesokosmer (M4 og M6-8) at denne økningen var betydelig. Størst planteplanktonbiomasse ble observert i mesokosme 7A, med dobbelt så mye som M4 (nest høyeste). Generelt ble det funnet lavest biomasse alle dager i mesokosmene med lavest tilførsel av næringsalter (M1-M3, Tabell 1), mens høyere tilsats av næringsalter ga en respons i biomasse.



Figur 10: Biomasse av planteplankton ($\mu\text{g C L}^{-1}$) over tid for mesokosmene.

Tre grupper av planteplankton dominerte samfunnet i mesokosmene gjennom hele forsøket i alle behandlinger: nanoplankton (celler $< 10 \mu\text{m}$, ikke videre identifisert), diatomeer og dinoflagellater. Figur 11 viser biomassesammensetningen av ulike planteplanktongrupper i mesokosmene ved dag 6, 10 og 16 av eksperimentet, samt biomassesammensetningen av planteplanktonsamfunnet før forsøkets start (dag 0). Det skjedde tydelige endringer i sammensetningen av planteplankton under eksperimentet, både over tid, og som respons på tilførselen av ammonium (Tabell 1). Det ble observert en tydelig nedgang i relativ biomasse i begge størrelsesgrupper av diatomeer som funksjon av tid, og tilførsel av næringsalter. Også den relative mengden av nanoplankton ble redusert. Relativ andel dinoflagellater økt i planteplanktonet under forsøket, og utgjorde opptil 97,3 % av biomassen på dag 16 i M7A ($3,55 \mu\text{mol NH}_4 \text{L}^{-1}$).

Fra dag 18 ble det observert påvekst av diatomeer på veggene i alle mesokosmer. Disse ble identifisert som *Pseudo-nitzschia sp* og *Cylindrotheca sp*, og ble ikke kvantifisert. De ble ikke gjenfunnet i vannprøver fra mesokosmene (mikroskopi) og påvirket trolig heller ikke klorofyll *a* konsentrasjoner og pigmentanalysene.



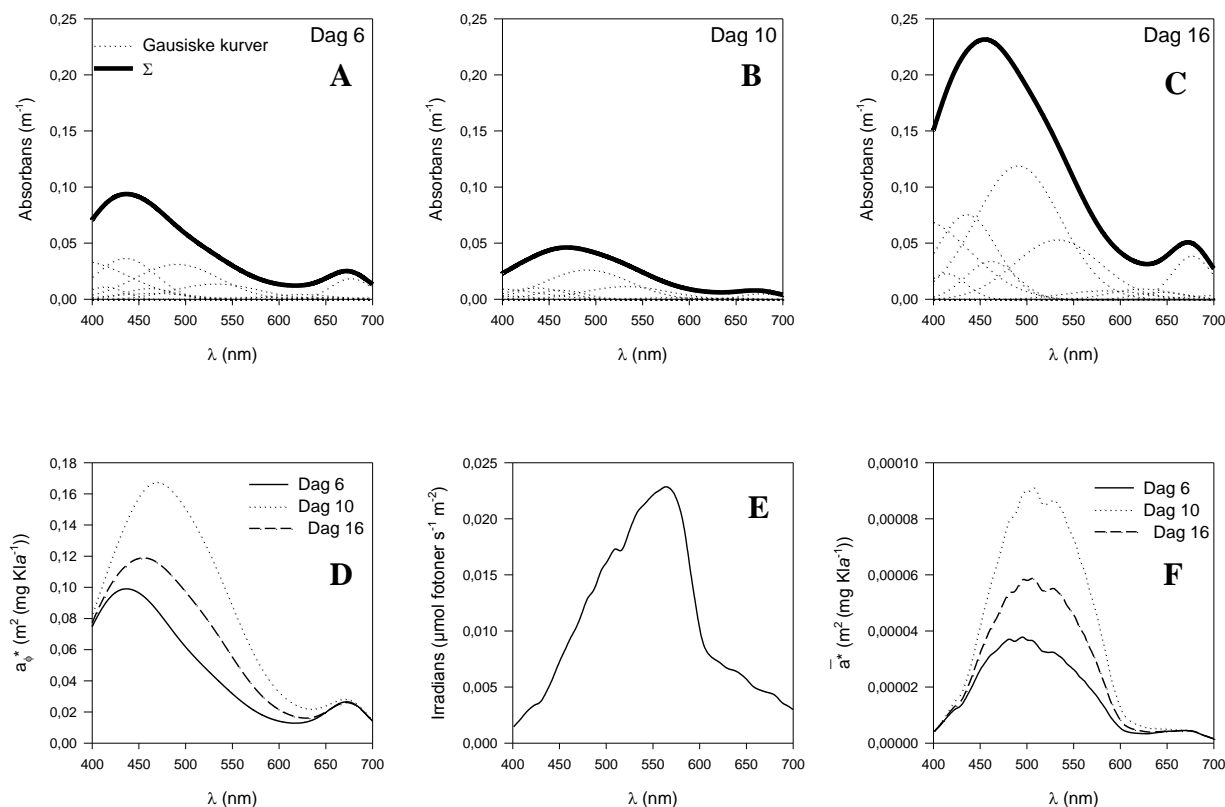
Figur 11: Relativ biomasse av planteplanktongrupper i de ulike mesokosmene ved dag 6, 10 og 16, samt i nullprøven tatt ved dag 0 (0-10 m).

3.8 Estimat av brutto primærproduksjon fra bio-optikk

3.8.1 Rekonstruksjon av absorpsjonsspektre

Figur 12 viser eksempler på rekonstruksjon av absorpsjonsspektre fra pigmentdata og lysmålinger. Figur 12(A-C) viser absorpsjonskoeffisienter (m^{-1}) som funksjon av bølgelengde (λ) i mesokosme M3B for tre ulike forsøksdager (6, 10 og 16, hhv. Figur 12 A, B og C) som funksjon av bølgelengde basert på rekonstruksjonen fra 11 gaussiske kurver konstruert fra pigmentdata. Det var mindre variasjon mellom absorpsjonsspektrene i de ulike mesokosmene ved samme tidspunkt, mens det ble observert en større variasjon over tid. Figur 12D viser beregnet klorofyll *a* spesifikt absorpsjonskoeffisienter for ulike bølgelengder (λ) spekter. Disse ble brukt for å beregne klorofyll *a* spesifikk absorpsjonskoeffisient (a_{ϕ}^* , $m^2(mg\ Kl a)^{-1}$) som funksjon av bølgelengde for dag 6, 10 og 16. Figur 12 E viser irradiansen beregnet som et gjennomsnitt for alle målingene (0-8 m) i M3B ved dag 2 som en funksjon av bølgelengde. Dette viser hvilket lys som i gjennomsnitt var tilgjengelig i mesokosmene.

Figur 12 F viser spektralt veid klorofyll *a* spesifikk absorpsjonskoeffisient (\bar{a}^*) som en funksjon av bølgelengde (altså spektralt veid klorofyll *a* spesifikk absorpsjonskoeffisient er summen av spekteret), og det er den summerte \bar{a}^* som blir brukt for å beregne ETR fra den målte rETR (2.8.3). Den spektralt veide klorofyll *a* spesifikke absorpsjonskoeffisienten (\bar{a}^*) varierte mellom 0,04 og 0,24, en variasjon som reflekterer variasjon i pigmentsammensetning og pigmentkonsentrasjon i de ulike behandlingene til ulik tid.



Figur 12: (A-C) rekonstruksjon av absorpsjonsspektrum fra pigmentdata basert på summen (heltrukken linje) av gaussiske kurver (prikkete linjer) i mesokosme 3B for 3 av eksperimentdagene (A: dag 6; B: dag 10; C: dag 16). (D) klorofyll a spesifikk absorpsjonskoeffisient (a_{ϕ}^* , $\text{m}^2(\text{mg K}l\text{a}^{-1})$) som funksjon av bølgelengde (λ) for de 3 dagene. (E) Irradians ($\mu\text{mol fotoner s}^{-1} \text{m}^{-2}$) som et gjennomsnitt av irradiansspektre målt 0-8 m målt dag 2. (F) Spektralt veid klorofyll a spesifikk absorpsjonskoeffisient (\bar{a}^* , $\text{m}^2(\text{mg K}l\text{a}^{-1})$) per bølgelengde for dag 6, 10 og 16.

3.8.2 Kondisjonen i planteplanktonsamfunnet, maksimalt kvanteutbytte (ΦPSII)

Maksimalt kvanteutbyttet for planteplankton i de ulike mesokosmene varierte mellom 0,12 og 0,71, og verdiene var generelt høye gjennom hele forsøket (i gjennomsnitt 0,58), uten en tydelig trend som følge av forskjellig næringstilsetning. I enkelte mesokosmer ble det målt et lavt kvanteutbytte på enkelte dager, dette skjedde hovedsakelig tidlig i forsøket (dag 2, se resultater i Vedlegg F). Dette viste at kondisjonen i planteplanktonsamfunnet var god gjennom hele forsøket, og antydte at gradienten i næringstilførsel ikke påvirket kondisjonen i planteplanktonsamfunnet i de ulike mesokosmene.

3.8.3 Fotosyntetiske parametere

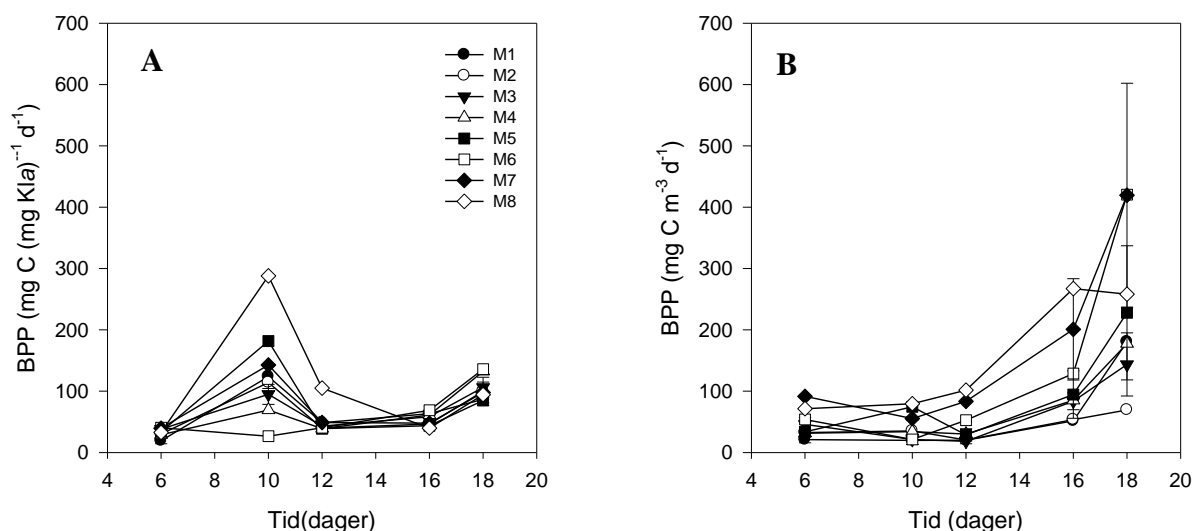
Fotosyntetisk effektivitet, α , varierte mellom 0,009 og 0,068 $\text{mg C} (\text{mg K}l\text{a})^{-1} \text{h}^{-1}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{h}^{-1}$). I_k varierte mellom 25,8 og 909 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ med gjennomsnitt på 205 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, med en verdi på 7142 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tatt bort fra beregningene. P_{max} varierte mellom 1,2 – 39,3 $\text{mg C} (\text{mg K}l\text{a})^{-1} \text{h}^{-1}$ med gjennomsnitt 10,1 $\text{mg C} (\text{mg K}l\text{a})^{-1} \text{h}^{-1}$. Variasjonen i de beregnede fotosyntetiske parametere (α og I_k) i de forskjellige mesokosmene til ulik tid er resultat av ulike P-I kurver, noe som viser at det var forskjeller i produksjon i de ulike mesokosmene ved ulik tid. Det ble ikke funnet responser på tilførsel av ammonium over tid, eller i de ulike

mesokosmene, men de fotosyntetiske parametrene er viktige resultater for å kunne estimere primærproduksjonen i mesokosmene.

3.8.4 Estimat av brutto primærproduksjon

Registrering av PAR i overflaten (Figur 3), beskrivelsen av hvordan lyset ble svekket med dyp i mesokosmene (Figur 4), den spektrale sammensetningen av PAR (Figur 12E), rekonstruksjon av planteplanktonsamfunnets absorpsjonsspekter (Figur 12A-C) og fluorescensmålingene gjort med AquaPen (AquaPen, avsnitt 3.8.3) gjorde det til sammen mulig å estimere brutto primærproduksjon (BPP) per klorofyll *a* ($\text{mg C m}^{-3} \text{ dag}^{-1} (\text{mg K1a})^{-1}$) og brutto primær produksjon (enhet $\text{mg C m}^{-3} \text{ dag}^{-1}$) i mesokosmene (avsnitt 2.8). Figur 13 A viser brutto primærproduksjon karbon per klorofyll *a* av ved ulike tilførselsrater som en funksjon av tid. Produksjonen per klorofyll *a* viste den samme tidsutviklingen for alle tilførsler av næringssalter, med et maksimum på dag 10, og videre en nedgang på dag 12. Fra dag 12 – 16 var det liten endring i BPP $\text{mg C m}^{-2} \text{ dag}^{-1} (\text{mg K1a})^{-1}$. På dag 18 ble det igjen observert en svak økning. Dag 6 var produksjonen per klorofyll *a* høyest i mesokosmen med høyest tilførsel av næringssalter (M8), men fulgte ellers ikke tilførselen av næringssalter. De resterende dagene ble det observert liten forskjell i klorofyll *a* normalisert produksjon mellom de ulike tilførselsratene.

Figur 13B viser estimert brutto primærproduksjon i mesokosmene, uttrykt som $\text{mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, som en funksjon av tid. Produksjonen økte i alle mesokosmer etter 12 dager. Det ble observert stor forskjell mellom behandlinger med høy og lav tilførselsrate fra dag 16. Etter 18 dager varierte estimatene for brutto primærproduksjon i de ulike mesokosmene med nesten en størrelsesorden, mellom $69,4 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ i M2 og $678 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ i M7A.

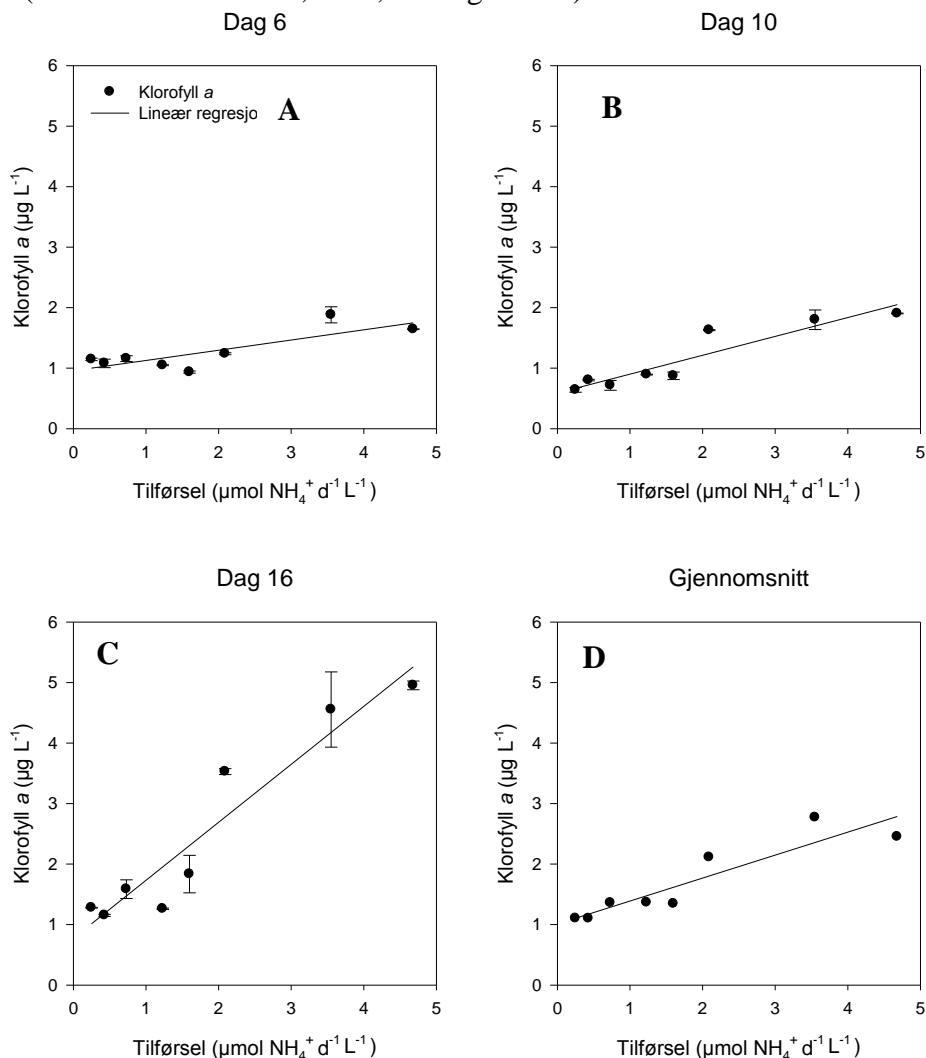


Figur 13: (A) brutto primærproduksjon per klorofyll *a* per dag i de ulike mesokosmene som funksjon av tid. (B) brutto primærproduksjon pr. volum i mesokosmene per dag ($\text{mg karbon m}^{-3} \text{ d}^{-1}$).

3.9 Respons på gradienten av næringsalter

I løpet av eksperimentet ble det observert en tydelig respons i planteplanktonet på tilsats av næringsalter, og de neste figurene presenterer hvordan klorofyll *a* (Figur 14), brutto primærproduksjon (Figur 15) og biomassen av ulike grupper av planteplankton (Figurene 16-19) responderte på tilsats av næringsalter uttrykt som ammonium (NH_4^+ , Tabell 1) for tre utvalgte dager (dag 6, 10 og 16). Figur 20 viser respons i konsentrasjoner av pigmenter uttrykt på samme måte.

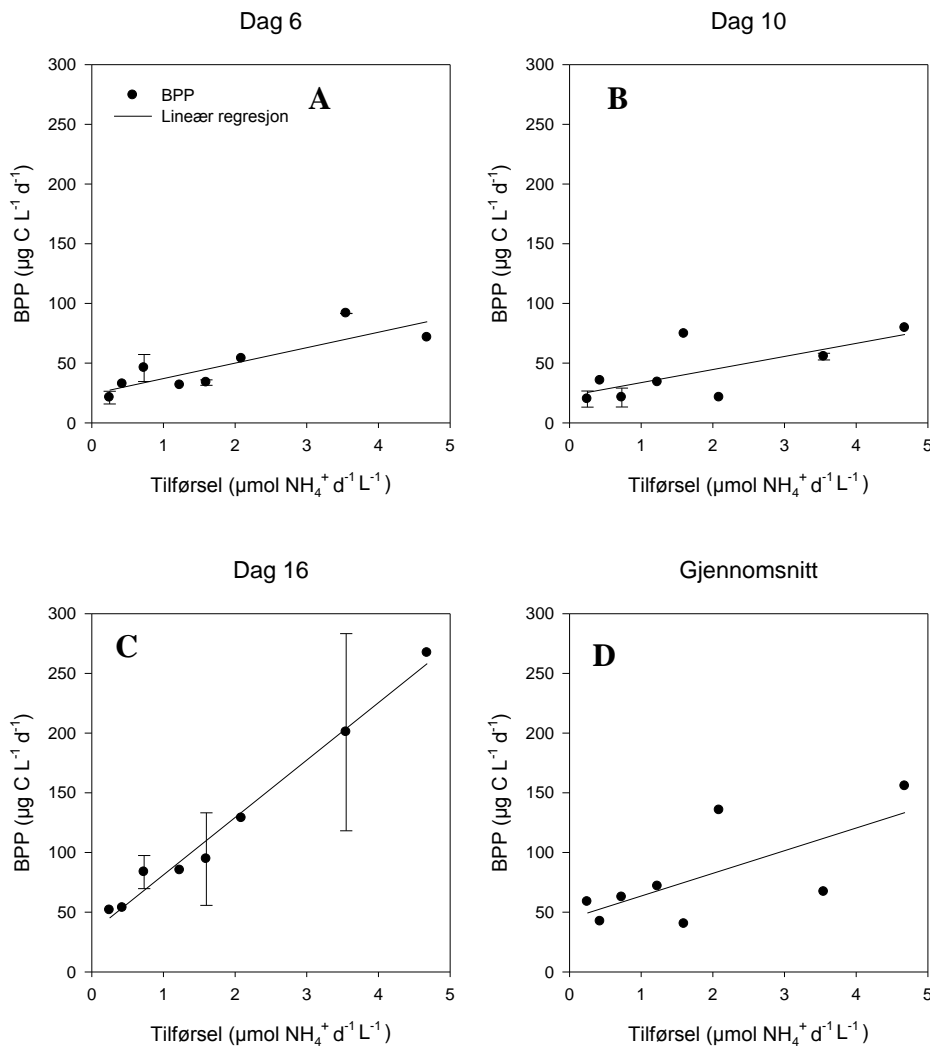
Figur 14 viser klorofyll *a* som funksjon av tilførselsraten av ammonium for dag 6, 10 og 16. Det ble funnet en signifikant positiv respons i klorofyll *a* konsentrasjonen med økende tilførsel av ammonium for de 3 aktuelle dagene ($P < 0,05$). På dag 16 ble det observert en relativt kraftig respons i klorofyll *a* på tilførselsrate. Sett som et gjennomsnitt over tidsperioden (dag 2-20) ble det funnet en positiv respons i klorofyll *a* på økt tilførsel av ammonium (vinkelkoeffisient > 0 , $P = 0,001$ Figur 14D).



Figur 14: Klorofyll *a* som funksjon av tilsatsrate av ammonium (Tabell 1) ved 3 ulike eksperimentdager; dag 6 (A), dag 10 (B), dag 16 (C) og som gjennomsnitt for perioden (dag 2-18, D). På dag 16 ble klorofyll *a* konsentrasjon for M1 basert på vannprøve fra

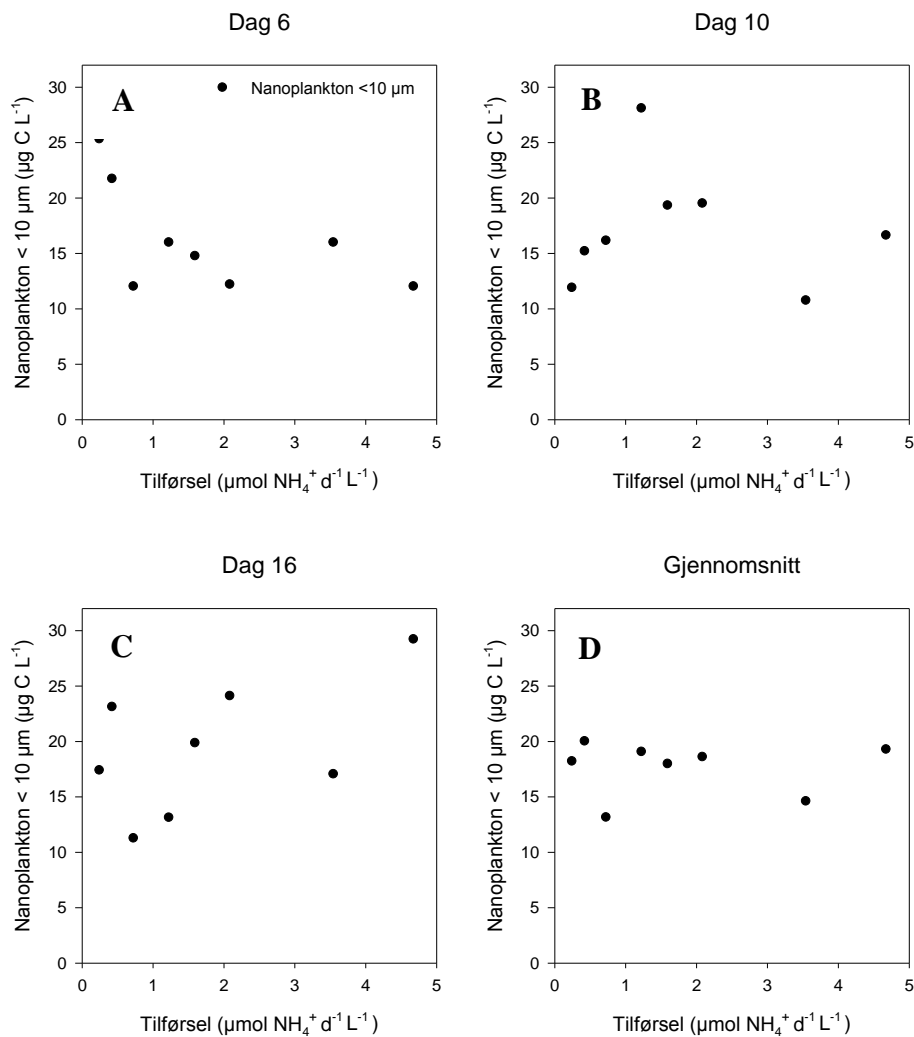
mesokosme M1B. I Figur A-C viser barrene standardfeil med $n=2$ for M2, M4, M6 og M8, og $n=4$ for M1, M3, M5 og M7.

Figur 15 viser estimert brutto primærproduksjon basert på fluorescenskinetikk som funksjon av tilførselsrate av NH_4^+ for tre ulike dager. Det ble funnet en tilsynelatende positiv respons i brutto primærproduksjon ved økt tilførsel av ammonium i løpet av forsøket. Ved dag 6 ble det ikke funnet en signifikant positiv respons ($P>0,05$, Figur 15A), mens det ble observert en signifikant positiv respons på økt tilførsel av ammonium på dag 10 og 16 ($P<0,05$ Figur 15B og C). Responsen var størst på dag 16. Sett som et gjennomsnitt av estimert primærproduksjon var estimatene noe mer spredt, med en tendens til høyere produksjon ved høy tilførsel av næringssalter, uten at vinkelkoeffisienten ble funnet å være signifikant positiv ($P=0,054$, Figur 15D).



Figur 15A-C: Respons av BPP ved økende tilførsel av ammonium for 3 ulike dager (6, 10 og 16). Barrene viser standardfeilen for gjennomsnitt av replikate mesokosmer i figur A-C beregnet gjennomsnitt med standardavvik ($n=2$). D: Gjennomsnittlig respons av BPP ved økende tilførsel av ammonium.

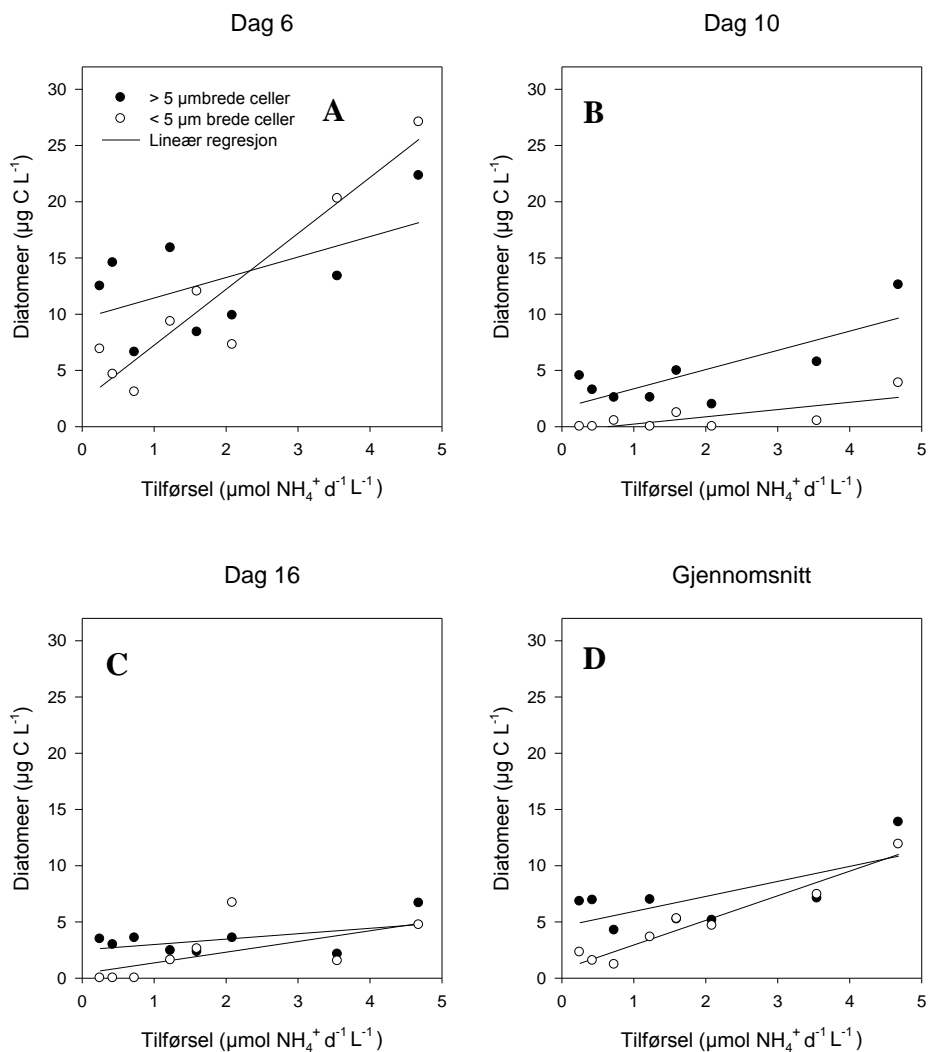
Figur 16(A-D) viser dose-responskurver for biomasse ($\mu\text{g C L}^{-1}$) av nanoplankton (celler $< 10 \mu\text{m}$) som funksjon av NH_4^+ -tilførsel ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{dag}^{-1}$) for dag 6, 10 og 16. Det ble observert en tilsynelatende negativ respons i biomassen av nanoplankton med økende ammoniumtilførsel på dag 6, men responsen var ikke signifikant ($P=0,143$). Ved dag 10 ble det observert høyest biomasse for midlere tilførselsrater ($1,23 \mu\text{mol NH}_4$, M4) der biomassen tilsynelatende minket ved de høyeste tilførselsene av næringssalter. På dag 16 var det ingen tydelig respons på næringstilsats ($P=0,160$). Som et gjennomsnitt av biomasse nanoplankton $< 10\mu\text{m}$ for de tre dagene ble det ikke funnet en tydelig respons på tilførselen av ammonium ($P=0,965$, Figur 16 D).



Figur 16: Respons i biomasse ($\mu\text{g C L}^{-1}$) nanoplankton $< 10 \mu\text{m}$ på tilførselsrate av ammonium (LN, $\mu\text{mol NH}_4 \text{d}^{-1} \text{L}^{-1}$) for dag 6, 10 og 16, samt et gjennomsnitt for responsen for de 3 dagene (D).

Figur 17A-D dose-respons relasjonene mellom tilførsel av ammonium og endring i biomasse ($\mu\text{g C L}^{-1}$) for to grupper av diatomeer som funksjon av tilførselen av ammonium (Tabell 1) for dag 6, 10 og 16, samt som et gjennomsnitt over perioden (dag 6,10 og 16). For diatomeer $> 5 \mu\text{m}$ brede ble det funnet en tilsynelatende positiv respons alle dager, men denne var bare

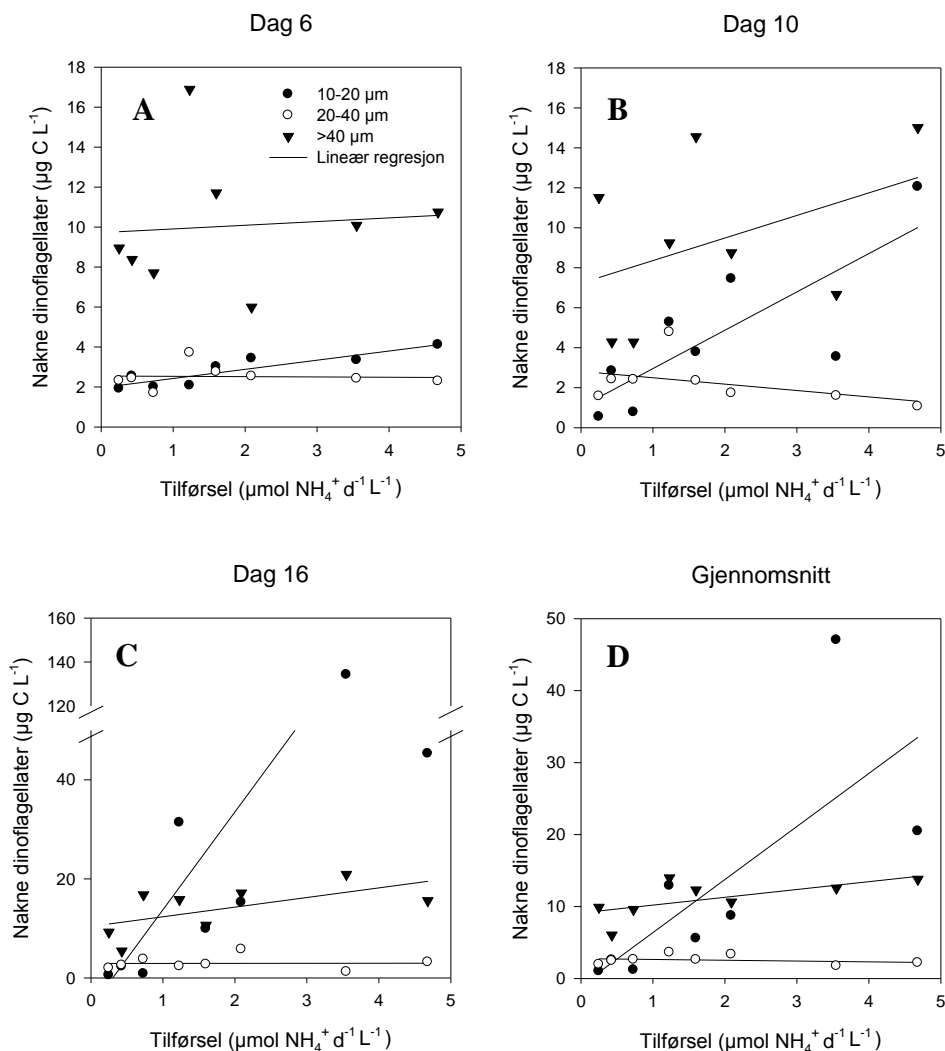
signifikant ($P < 0,05$) på dag 10. For diatomeer $< 5 \mu\text{m}$ brede ble det funnet en signifikant positiv respons på dag 6 og dag 10 ($P < 0,05$), men ikke på dag 16. Responsen i begge diatomegruppene avtok utover forsøket (dag 10, Figur 17 B) og lavest respons ble observert på dag på 16 (Figur 17 C). De minste diatomeene (celler $< 5 \mu\text{m}$) responderte sterkere på næringstilsatsen ved dag 10 og dag 16 enn større celler. Dette viser indirekte at biomassen av diatomeer avtok som funksjon av tid i alle mesokosmene, men at tilførselen av næringssalter også hadde påvirket mengden diatomeer i mesokosmene. Som et gjennomsnitt av dag 6, 10 og 16 ble det observert en signifikant respons i biomasse for begge størrelsesgruppene av diatomeer som funksjon av tilsatt av næringssalter ($P < 0,05$ for diatomeer $> 5 \mu\text{m}$ brede, $P < 0,001$ for diatomeer $< 5 \mu\text{m}$ brede, Figur 17D)



Figur 17: doserespons for to fraksjoner av diatomeer (> 5 µm brede celler og < 5µm brede filamenter) som funksjon av tilførsel av NH₄⁺ for tre ulike eksperimentdager, dag 6 (A), dag 10 (B), dag16 (C) og som en gjennomsnittlig respons i biomasse på ammoniumtilsats for de 3 dagene (D).

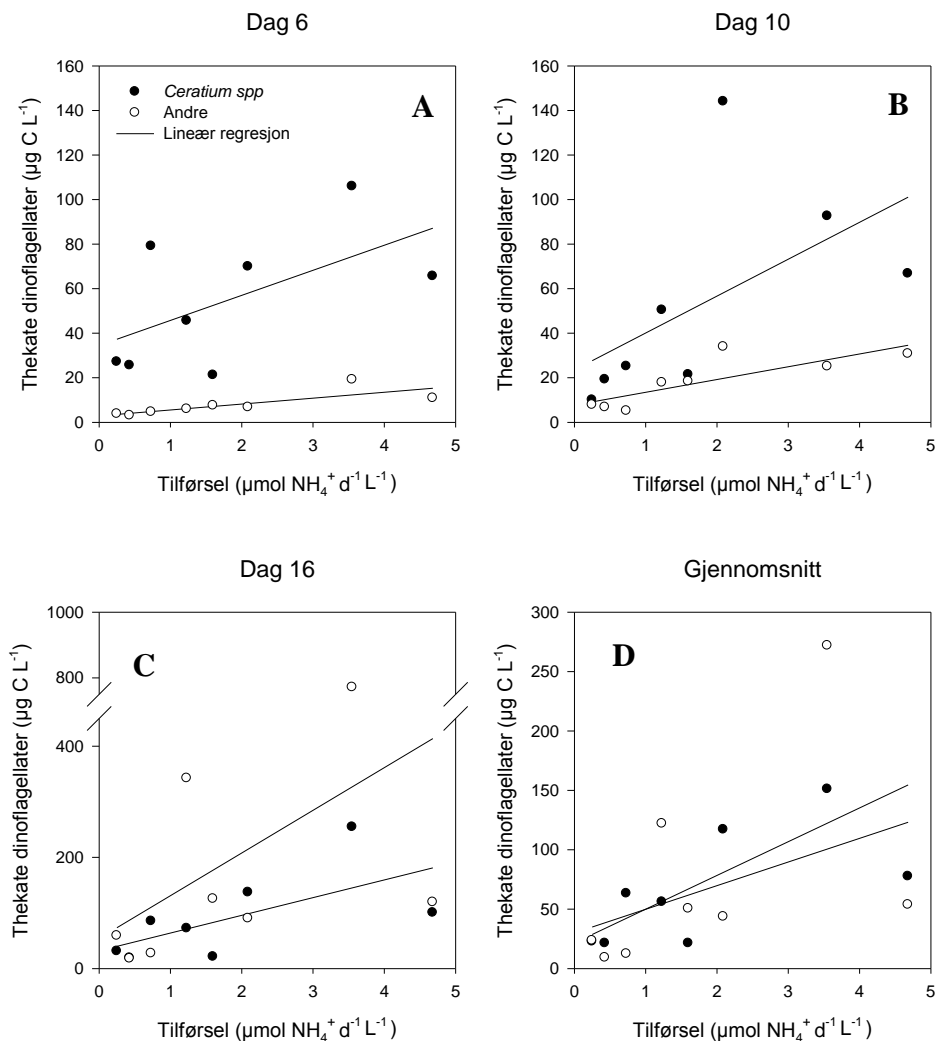
Figur 18 og Figur 19 viser respons i biomasse av ulike grupper dinoflagellater som funksjon av tilførselsrate av ammonium for dag 6, 10 og 16 og et gjennomsnitt (dag 6-16). Ulike grupper av dinoflagellater responderte ulikt på tilsatsen av næringssalter.

Figur 18 (A-D) viser respons i nakne dinoflagellater for 3 ulike størrelsesfraksjoner. Ved dag 6 og dag 10 ble det observert en signifikant positiv respons for dinoflagellater 10-20 μm på tilførsel av ammonium ($P < 0,05$, Figur 18A-B). På dag 16 ble det ikke funnet en signifikant respons i biomassen av de minste nakne dinoflagellatene ($P > 0,05$ Figur 18C). Det ble ikke observert signifikante responser i biomasse dinoflagellater i gruppene 20-40 μm og $> 40 \mu\text{m}$ som funksjon av næringstilsats for de tre dagene ($P > 0,05$). Sett som et gjennomsnitt for de 3 dagene ble det bare funnet en signifikant positiv respons i biomassen til nakne dinoflagellater med størrelse 10-20 μm ($P < 0,05$), men ikke for biomassen av nakne dinoflagellater 20-40 og $> 40 \mu\text{m}$ ($P > 0,05$).



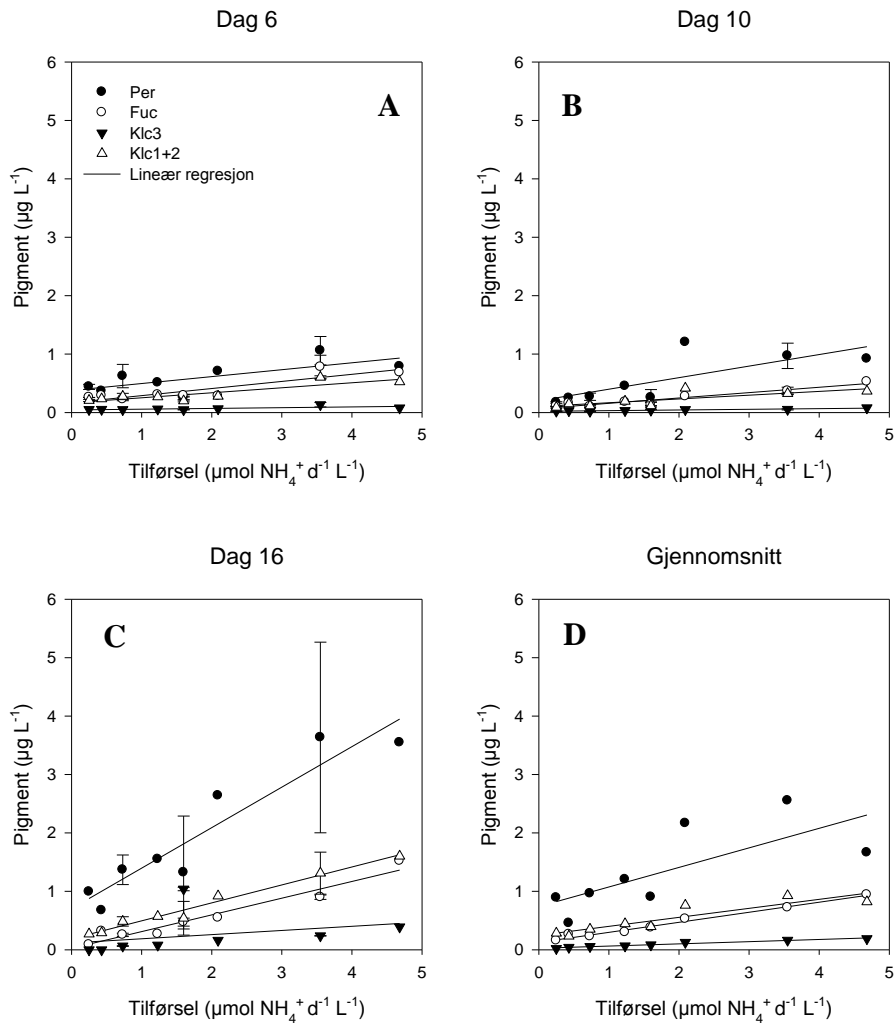
Figur 18(A-C): Respons i biomasse til tre ulike størrelsesgrupper (10-20, 20-40 og $> 40 \mu\text{m}$) av nakne dinoflagellater ($\mu\text{g C L}^{-1}$) på tilførselsrate av ammonium (LN, $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{d}^{-1} \text{L}^{-1}$) for hhv. dag 6, 10 og 16. D: Respons i biomasse for de samme gruppene som et gjennomsnitt for dag 6, 10 og 16.

Figur 19 (A-D) viser respons av thekate dinoflagellater, delt inn i *Ceratium* spp, og andre (de resterende artene) ved økt tilførsel av ammonium. For biomassen av *Ceratium* spp. ble det ikke funnet en positiv respons på dag 6, 10 og 16 ($P > 0,05$). På dag 6 og dag 10 ble det observert en signifikant respons i de resterende dinoflagellatene ($P < 0,05$, Figur 19A-B) som følge av økt tilførsel av næringssalter, mens det på dag 16 ikke ble observert en signifikant respons ($P > 0,05$). For dinoflagellatene økte responsen (vinkelkoeffisienten) som en funksjon av tid, og den observerte økningen i biomasse på dag 16 var generelt høyere. Gjennomsnittlig respons i biomasse for de tre dagene som funksjon av økt tilførselsrate var ikke signifikant ($P > 0,05$ for begge grupper, Figur 19), og det så ut til at midlere tilførselsrater ga biomasse av thekate dinoflagellater.



Figur 19: Respons i biomasse til to grupper av thekate dinoflagellater ($\mu\text{g C L}^{-1}$) på tilførselsrate av ammonium (LN, $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{d}^{-1} \text{L}^{-1}$) for dag 6 (A), dag 10 (B) og 16 (C). D viser gjennomsnittet av biomassen for de tre ulike dagene som funksjon av tilførselen av ammonium. Merk ulik skala på y-aksen ($\mu\text{g C L}^{-1}$) i figurene.

Figur 20 viser respons i konsentrasjonen av fire ulike pigmenter/ pigmentgrupper som funksjon av tilførsel av ammonium. Responsen i pigmentkonsentrasjoner på næringssalttilførsel var generelt lav frem til dag 16 der det ble funnet en kraftig positiv respons i konsentrasjonen av peridinin ($P < 0,001$) og en mindre positiv respons i fucoxanthin ($P < 0,001$) og klorofyll c1+2 ($P < 0,001$). Det ble ikke funnet en signifikant respons i klorofyll c3 ($P = 0,436$). Sett over hele tidsperioden (målt dag 6, 10, 12, 16 og 18) var det en forekom en betydelig respons i peridinin på ammoniumgradienten, og en svakere respons i fucoxanthin og klorofyll c1+c2, og en mulig svak respons i klorofyll c3 (Figur 20D).



Figur 20A-C: Respons i 4 pigmentkonsentrasjoner ($\mu\text{g L}^{-1}$) på økende tilførsel av ammonium ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{d}^{-1} \text{L}^{-1}$) for dag 6, 10 og 16. Barrene representerer standardfeil mellom to replikate mesokosmer. D: gjennomsnittlig pigmentkonsentrasjon i mesokosmene fra dag 6, 10, 12, 16 og 18. Per = peridinin, Fuc = fucoxanthin, Klc3 = klorofyll c_3 , Klc1+2 = summen av klorofyll c_1 og c_2 .

4 Diskusjon

Økte mengder næringssalter i vannet har en potensiell påvirkning på det pelagiske økosystemet, der planteplankton er de viktigste primærprodusentene og kilde til næring for høyere trofiske nivå i økosystemet. Målet med eksperimentet som er beskrevet var å studere om utslipp av næringssalter fra lakseoppdrett kan påvirke strukturen til planteplanktonsamfunnet og om dette kan påvises gjennom (i) mikroskopi, (ii) kjemotaksonomiske markører og (iii) estimere primærproduksjon fra målinger av fluorescenskinetikk og pigmentsammensetningen til planteplanktonsamfunnet.

I et mesokosmeforsøk vil alltid forholdene i vannmassene før forsøkets start legge rammene for forsøkets mulige utvikling. Når en naturlig vannmasse innelukkes og manipuleres, i dette forsøket gjennom tilsats av ulike mengder næringssalter, blir det naturlige økosystemet som fantes i utgangspunktet helt avgjørende for resultatet. Samtidig er forsøk med eksperimentelle økosystem i mesokosmer økologisk relevante, da man studerer hele det planktoniske økosystemet, og slike forsøk kan bidra til å vise hvilke indikatorer som kan anvendes for å påvise konsekvenser av utslipp av næringssalter i det naturlige økosystemet.

4.1 Startforhold

Dette forsøket ble startet tidlig i september med relativt lave næringssaltverdier målt på dag 0 (Tabell 5). Mesteparten av løst uorganisk nitrogen (DIN) fantes i form av ammonium, noe som er typisk en høstsituasjon med resirkulerte næringsstoffer. Planteplanktonsamfunnet i alle mesokosmer var fra start biomassemessig dominert av dinoflagellater (karbon, Figur 11). Dinoflagellater er en gruppe planteplankton som typisk dominerer planteplanktonsamfunnet på sensommeren (Margalef, 1978, Hansen, 1991).

4.2 Generelt hendelsesforløp

Alle metoder som ble brukt i forsøket beskriver det samme bildet av hendelsesforløpet i mesokosmene. *In vivo* fluorescens (Figur 6), klorofyll *a* konsentrasjoner (Figur 7) og planteplanktonbiomasse beregnet via biovolum (Figur 10) viste et planteplanktonsamfunn med relativt lav biomasse og små endringer frem til dag 12, og deretter en respons med maksimal biomasse ved dag 18.

En betydelig endring i biomasse ble bare funnet for mesokosmene M4, M6, M7A og M8 og det tok 16 dager før endringene ble observert. M4, M6, M7A og M8 var mesokosmer med tilførsel av ammonium $>1,23 \mu\text{mol d}^{-1} \text{L}$ og produksjonen var også høyest i disse mesokosmene. Basert på klorofyll *a* konsentrasjonene er det sannsynlig at maksimal biomasse forekom ved dag 18, før mengden planteplankton i vannmassene ble kraftig redusert. Tidligere mesokosmeforsøk har vist at det tar 3-7 dager for et planteplanktonsamfunn å respondere på tilsats av næringssalter (Olsen et al., 2006), men i dette forsøket var perioden lengre (>14 dager). En konstant biomasse ved tilsats av

næringssalter skyldes sannsynligvis at noe annet enn næringssalter begrenser veksten til planteplanktonsamfunnet, enten mangel på en annen næring, lys eller predasjon.

Heterotroft plankton vil regulere biomassen av planteplankton gjennom predasjon og vil derfor ta opp den økte tilførselen av næringssalter gjennom å beite planteplankton (Hansson, 1992). Det er først når det ikke foregår effektiv nedbeiting av planteplankton at biomassen til planteplankton vil akkumulere, noe som i dette forsøket hovedsakelig skjedde i de 4 nevnte mesokosmene på dag 16. Frem mot dag 16 var det derfor trolig heterotroft plankton som regulerte biomassen av planteplankton i mesokosmene. Ulike zooplankton beiter på ulike organismer, og også på ulikt trofisk nivå, noe som gjør at tilstedeværelsen av predatorer kan endre strukturen i planteplanktonsamfunnet.

Det er viktig å merke seg variasjonen mellom de replikate mesokosmene, og at de generelle observasjonene er en trend i responsen på næringssalttilførsel. Lysforhold og omrøring er to eksterne faktorer som vil påvirke økosystemet i mesokosmene. Selv med mest mulig avstand mellom mesokosmene kan noen ha stått mer i skyggen enn andre, og derfor opplevd lavere lysforhold (fotosyntetisk aktiv irradians, E_{PAR}) enn målt, da vil estimatet av produksjonen være mer usikker. De ytterste mesokosmene kan ha skjermet de innerste (Figur 1) for tidevannskreftene i Hopavågen og derfor omrøringen. Konsentrasjonen av større heterotrofe organismer kan også ha vært ulik i de ulike mesokosmene. Det ble ikke gjort noen form for kontroll av zooplankton i mesokosmene før forsøkets start.

4.3 Planteplanktonsamfunnet

Selv om det tok 16 dager før det ble registrert en betydelig endring i biomasse i mesokosmene, ble det allerede fra dag 6 funnet en endring innad i planteplanktonsamfunnet. I løpet av forsøket skjedde det to generelle tydelige responser i planteplanktonbiomasse (i) gjennom hele forsøket ble det observert en positiv respons i thekate dinoflagellater på tilførselen av næringssalter som gjennom hele perioden og (ii) på dag 6 ble det observert en positiv respons i relativ biomasse av diatomeer. Responsen i biomasse av nanoplankton var mindre tydelig. Zarauz et al. (2009) beskriver også et slikt skifte i størrelsesstruktur før en oppblomstring av biomasse i naturen.

Mengden nanoplankton var varierende i løpet av forsøket og det var trolig disse cellene som var mest utsatt for et beitetrykk fra ciliater. Små celler er typisk tallrike i et sommersamfunn og mindre dominerende på sensommeren (Hansen, 1991). Tidligere mesokosmeforsøk (Gismervik et al., 2002, Olsen et al., 2006) ble startet medio august, og her ble det funnet en sterk positiv respons i nanoplankton på tilførsel av næringssalter. En økning i konsentrasjon av næringssalter er vist å øke produksjonen hos både små og store celler, men fordi predasjon er sterkt relatert til størrelse, er det mer sannsynlig at de største cellene ikke ble spist og at det kan skje en respons i økt biomasse kun for disse (Zarauz et al., 2009)

Ciliater er viktige beitere på planteplankton $< 10 \mu\text{m}$ (Rassoulzadegan et al., 1988, Granéli og Turner, 2002), i dette forsøket inkluderer det nanoplankton $< 10 \mu\text{m}$ og antageligvis diatomeene i $< 5 \mu\text{m}$ brede kjeder. Biomassen av diatomeer med $< 5 \mu\text{m}$ bredde ble også

betydelig redusert i løpet av forsøket, selv om det ble funnet en signifikant positiv respons i biomasse på tilførsel av næringsalter. Det ble observert en positiv respons i ciliatbiomasse i halvparten av mesokosmene på dag 6 (se Vedlegg E). Også Vadstein et al. (2004) fant at ciliater responderer raskt på tilsats av næringsalter som følge av økt primærproduksjon (5-7 dager). I tidligere mesokosmeforsøk i Hopavågen har ciliatbiomassen nådd $35 \mu\text{g L}^{-1}$ i de høyeste behandlingene (Gismervik et al., 2002), i dette forsøket var høyeste biomasse $20 \mu\text{g C L}^{-1}$ og biomasse ved start var lavere. Den lave responsen til ciliatene ser ut til å være et resultat av den naturlige planteplanktonsuksesjonen i vannmassene før forsøkets start, mengden nanoplankton vil reduseres i løpet av sommerperioden og det er ikke forventet at ciliater er utbredt når dinoflagellater dominerer planteplanktonsamfunnet og mengden nanoplankton er lav (Hansen, 1991).

På dag 6 forekom den kraftigste responsen til diatomeene (Figur 17), med en tydelig respons på mengden tilsatte næringsalter. Diatomeer er ofte opportunistiske alger, og i mesokosmeforsøk er det tidligere vist at diatomeer ofte responderer ganske umiddelbart på tilsatsen av næringsalter dersom silikat tilsettes sammen med DIN og DIP (Børnheim et al., 2005, Nejstgaard et al., 2001, Olsen et al., 2007). Escaravage og Prins (2002) fant at diatomeoppblomstringer vil avsluttes når konsentrasjoner av Si $< 2 \mu\text{M}$. I dette forsøket ble det bare tilsatt $0,25 \mu\text{mol Si d}^{-1}\text{L}^{-1}$ (Tabell 1), noe som sannsynligvis var for lavt for å støtte en oppblomstring av diatomeer før etter > 8 dager. Veggvekst av *Pseudo-nitzschia* sp. og *Cylindrostecca* sp mot forsøkets slutt var trolig et resultat av forsøksoppsettet med mesokosmer der veggene utgjorde et nytt mulig habitat. Selv om disse sannsynligvis ikke påvirket målingene som er gjort (telling, klorofyll *a*, pigmenter) er det sannsynlig at blomstringen var mulig som følge av økte silisiumkonsentrasjoner. Diatomeene tok sannsynligvis opp næringsstoffer fra vannmassene, noe som kan ha bidratt til næringsmangel og påfølgende kraftig reduksjon i klorofyll *a* konsentrasjonen mot forsøkets slutt (på dag 20).

Det ble ikke funnet signifikante responser i biomassen av nakne dinoflagellater på tilførsel av ammonium. Den tilsynelatende negative responsen i nakne dinoflagellater 20-40 μm ved dag 6 kan ha vært forårsaket av beiting. For biomassen til de to resterende størrelsesgrupper av nakne dinoflagellater (10-20 og $> 40 \mu\text{m}$) ble det funnet en positiv respons på tilførselen av næringsalter (Figur 18 og Figur 19). Biomassen av thekate dinoflagellater økte som følge av tilsats av NH_4^+ og PO_4^{3-} i gitt i forholdet som tilsvarer utslipp fra lakseoppdrett (Tabell 1), med en tydelig respons allerede fra dag 6. Den betydelige økningen i planteplanktonbiomasse funnet i fire mesokosmer dag ved 16 var forårsaket av dinoflagellater. Den kraftigste tilsynelatende responsen ble funnet i *Ceratium* spp, selv om denne ikke var signifikant, noe som trolig skyldes dominans av denne gruppen fra start.

Dinoflagellater er en svært heterogen planteplanktongruppe, og halvparten av nålevende arter er antatt å være heterotrofe (Gaines og Elbrächter, 1987) selv om dinoflagellater beregnes for å være en del av «planteplankton». Fikseringen med Lugols løsning maskerer klorofyll og gjør det vanskelig å skille heterotrofe og autotrofe dinoflagellater (Sherr og Sherr, 2007). Resultatet av dette er at heterotrofe dinoflagellater kan ha blitt inkludert planteplanktonet i dette forsøket, dette selv om deres funksjonelle rolle er predatorer (heterotroft plankton).

Både nakne og thekate dinoflagellater er vist å beite på planteplankton (Sherr og Sherr, 2007). Beiting fra eventuelt heterotrofe dinoflagellater vil føre til endret struktur gjennom beiting. Mens det for ciliater er funnet at størrelsesforholdet bytte: predator ligger rundt 1:8-1:10 (Hansen et al., 1994, Hansen, 1991) er det vist at dinoflagellater kan beite bytte med forholdet 1:1 (Hansen, 1991). Det er derfor trolig liten konkurranse om bytte mellom ciliater og heterotrofe dinoflagellater (Hansen, 1991). Heterotrofe dinoflagellater er vist å være viktige predatorer i samme størrelsesklasser som calanoide kopepoder og andre grupper av mesozooplankton, samtidig som athekate heterotrofe dinoflagellater også er vist å være en viktig matkilde for mesozooplankton (Sherr og Sherr, 2007). Hansen (1991) fant også at heterotrofe dinoflagellater $> 20 \mu\text{m}$ var tallrike i perioder dominert av store planktonceller (diatomeer, dinoflagellater og kiselalger) og kunne oppnå en biomasse som korresponderte til 13-77 % av planteplankton i august-september. Det er derfor sannsynlig at heterotrofe dinoflagellater var betydningsfulle beitere på både diatomeer og andre dinoflagellater under dette mesokosmeforsøket.

Andre dinoflagellater er vist å være allopatiske, de reduserer vekst eller dreper andre alger ved å skille ut allelokimikalier. Fistarol et al. (2004) fant at *Alexandrium spp.* påvirket planteplanktonets samfunnsstruktur (den relative tallrikheten av arter, og hvilke arter som dominerte) ved å redusere vekstraten til diatomeer og også ciliater, men en negativ påvirkning på mindre dinoflagellater ble ikke bekreftet. I dette forsøket dominerte *Alexandrium spp.* gruppen «thekate dinoflagellater». En slik endring i samfunnsstruktur vil ha en indirekte effekt. Når noen planktongrupper reduseres vil artene som er mest motstandsdyktige mot allelokimikaliene ha en fordel. Eutrofiering og økt forekomst av akvakultur har også blitt knyttet opp mot skadelige algeoppblomstringer (Anderson et al., 2002), og slekter med potensielle giftige alger var representerte i den økende mengden dinoflagellater, spesielt *Alexandrium sp.*

I forsøket ble det bare tilsatt økende mengder av nitrogen og fosfor, mens silisium (Si) bare ble tilsatt som naturlig bakgrunn, og dette ga en relativ nedgang i utbredelsen av diatomeer. Lave Si-konsentrasjoner er vist å føre til en nedgang i relativ biomasse både om sommeren og høsten (Sommer et al., 2002). Med relativt lite Si:N og Si:P vil dinoflagellater favoriseres (Margalef, 1978, Sommer, 1994). Kombinert høy nitrogentilførsel i et stratifisert vannlag ble funnet å promoterte utvikling av potensielt skadelige dinoflagellater (Escaravage og Prins, 2002)

Om de observerte endringene i samfunnsstruktur er forårsaket av tilførselen av næringssalter generelt eller den endrede forholdet mellom næringssaltene er vanskelig å konkludere med. Om våren vil ikke hovedkilden til nitrogen i vannsøylen være ammonium men nitrat, og konsentrasjonene av næringssalter etter vinteromrøringen vil være så høye at utslipp fra akvakultur vil ha liten betydning for de totale næringssaltkonsentrasjonene. Si-konsentrasjonene vil trolig ikke være begrensende, og diatomeer ville trolig dominert planteplanktonsamfunnet som en umiddelbar respons i et liknende mesokosme-eksperiment.

4.4 Endring i pigmentsammensetning

Peridinin var dominerende pigmentet i alle planteplanktonprøvene. Peridinin er et markørpigment for fotosyntetiske dinoflagellater (Jeffrey et al., 1997, Higgins et al., 2012), og den høye konsentrasjonen av peridinin støtter opp om at dinoflagellater dominerte planteplanktonsamfunnet fra start. Heterotrofe dinoflagellater mangler fotosyntetiske pigmenter og vil derfor heller ikke oppdages i pigmentanalyser, annet enn som pigmenter av hva de eventuelt har konsumert (Higgins et al., 2012).

Fucoxanthin finnes i mange taksa av planteplankton (Higgins et al., 2012), inkludert diatomeer og dinoflagellater som utgjorde store andeler av planteplanktonbiomassen i dette forsøket. Barlow et al. (1993) brukte fucoxanthin som markør for diatomeer under en våroppblomstring. På dag 6 (Figur 9B) ble det observert en økning i fucoxanthin, mens de resterende pigmentene forble på et konstant nivå uavhengig av tilførselen av næringsalter, samtidig som det ble observert en positiv respons i biomasse av diatomeer og en økning i relativ biomasse av diatomeer i det totale planteplanktonsamfunnet.

Klorofyll c_1 , c_2 og c_3 er utbredt blant chromophyte alger (diatomeer, haptofytter og krysofytter), og kan i dette forsøket sees i sammenheng med den lave biomassen og responsen i diatomeer, selv om responsene var lave, var de i stor grad signifikant positive med tilførsel av ammonium.

Forskjeller i pigmentsammensetningen er ikke bare forårsaket av taksonomiske forskjeller. Flere miljøfaktorer påvirker pigmentsammensetning i planteplankton, inkludert: lys, spektral fordeling av lys, UV lys, daglengde, tid på døgnet, næringsforhold, konsentrasjon av jern, fysisk blandingsregime og vekstfase (Higgins et al., 2012). Pigmentdata begrenses til at man kan stole på at de identifiserte pigmentene var tilstede i vannet, uidentifiserte og mindre absorpsjonstopper blir ikke medregnet (Higgins et al., 2012). Nedgangen i konsentrasjoner av zeaxanthin og klorofyll b kan antyde en minkende diversitet av planteplankton i mesokosmene, men det ble ofte bare registrert sporverdier av pigmentene, noe som gjorde at mengdene ikke var sikkert kvantifiserbare.

Mengden lys (fotosyntetisk aktiv irradians, E_{PAR} , Figur 3) varierte under forsøksperioden, og den klare økningen i forholdet klorofyll a : pigment ved dag 10 (Figur 9E-H) kan være en respons på mindre lys fra dag 6 og frem mot dag 10. Pigment: klorofyll a forholdet vil variere med lysforholdene, og for lyshøstende pigmenter forventes en økning i forholdet pigment: klorofyll a under forhold med mindre lys (Rodriguez et al., 2006).

4.5 Næringsalter

I tilfeller med næringsbegrensning er det ikke forventet at konsentrasjonene av DIN og DIP responderer positivt på økt tilførsel av uorganiske næringsstoffer fordi næringssaltene umiddelbart tas opp av planteplankton (Pitta et al., 2009, Olsen et al., in prep). I dette forsøket ble det derimot observert en tendens til økning i både nitrat og fosfatkonsentrasjon som følge

av næringstilsats. Fosfat og ammonium ble tilsatt i økende mengder i mesokosmene og om næringssaltene ikke ble tatt opp var en økning derfor forventet. Nitrat derimot, ble kun tilsatt som naturlig bakgrunn, og den tidvis signifikante økningen som følge av tilførsel i mesokosmene antydte at mindre nitrat ble tatt om mer ammonium ble tilsatt mesokosmene. En mulig forklaring på dette er at ammoniumopptak kan inhibere nitratopptak (Harrison et al., 1996). Fordi analysene av ammonium i dette forsøket ikke ble gjennomført er det ikke mulig å vite om ammonium ble tilsatt i overskudd, eller om algene var nitrogenbegrenset. Ved bruk av målinger av fluorescenskinetikk er det likevel mulig å måle algenes kondisjon.

4.6 Produksjon

Fotosyntetiske målinger med høy kondisjon i planteplanktonsamfunnet gir, sammen med tendensen til økning i konsentrasjonen av næringssalter med økende næringstilførsel, et godt grunnlag for å anta at planteplanktonet i mesokosmene ikke var næringsbegrenset. Med unntak av dag 2 ble det målt høyt kvantutbytte i fotosystem II ($\Phi\text{PSII}_{\text{maks}}$) gjennom hele forsøket. God kondisjon hos planteplankton defineres som $\Phi\text{PSII}_{\text{maks}} > 0,65$ (Kolber og Falkowski, 1993). Det er vist at stress kan redusere $\Phi\text{PSII}_{\text{maks}}$ (Maxwell and Johnson 2000), og lav $\Phi\text{PSII}_{\text{maks}}$ brukes ofte som et diagnostisk indikasjon på næringsbegrensning i alger (Cleveland og Perry, 1987, Babin et al., 1996). Metoden er likevel omdiskutert da Parkhill et al. (2001) fant at det fortsatt ble målt $\Phi\text{PSII}_{\text{maks}} \sim 0,65$ for N-begrensete alger i kultur, så lenge disse var akklimatisert til næringsforholdene. I dette forsøket ble det bare funnet betydelig lavere $\Phi\text{PSII}_{\text{maks}}$ på dag 2, noe som faller sammen med de laveste konsentrasjonene av klorofyll *a* og derfor høyest grad av oppkonsentrering av prøvene. Oppkonsentreringen utsatte planteplanktonet for romtemperatur over noe tid (>20 min) og celler kan ha blitt skadet ved at de sedimenterte på filteret, noe som sannsynliggjør at oppkonsentrering, og ikke næringsbegrensning, var årsaken til lavere $\Phi\text{PSII}_{\text{maks}}$ de første dagene.

Variasjonen i absorpsjonsspekteret til det totale planteplanktonsamfunnet skyldes endringer i pigmentsammensetning, intracellulære pigmentkonsentrasjoner, cellestørrelser, mellom ulike arter og i respons til miljøfaktorer som lys og næringsstoffer. Den spektralt veide klorofyll *a* spesifikke absorpsjonskoeffisienten ($\bar{\alpha}^*$) varierte mellom 0,04 og 0,24, noe som skyldes både størrelsesordenen på variasjonen i planteplanktonets absorpsjonsspekter og $E_0(\lambda)$.

Fotosyntetisk effektivitet, α , varierte mellom 0,009 og 0,068 mg C (mg K1a)⁻¹ h⁻¹ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{h}^{-1}$), verdier som ligger innenfor det normale i sommerperioden (Saroussi og Beer, 2007). Lysmetningsindeksen, I_k varierte mellom 25,8 og 909 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ med gjennomsnitt på 205 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, også disse verdier som tidligere er blitt rapportert (Saroussi og Beer, 2007). Lav I_k betyr fotosyntetisk reaksjon vil være mettet ved lave irradianser, mens høyere I_k betyr at algene er høylysdapert, og tåler mye lys og om mer lys blir tilgjengelig vil produksjonen øke.

Fordi fluorescenskinetikken gir klorofyll *a* normaliserte data (Sakshaug og Johnsen, 2006) vil ikke disse kunne knyttes direkte til vekstrate og veksthastighet som ¹⁴C målinger kunne gjort, dette fordi forholdet mellom klorofyll *a* og karbon (K1a:C) varierer med blant annet

lysforhold og næringsforhold (Sakshaug og Johnsen, 2006). Tolkningen av resultatene i dette forsøket er derfor nødvendigvis ikke nødvendigvis helt riktig.

Den estimerte produksjonen i løpet av forsøket varierte mellom 10,4 i M1A på dag 10 og 677,8 mg C m⁻³ d⁻¹ i M7A på dag 18. Den estimerte brutto primærproduksjonen (BPP) fra fluorescenskinetikk var derfor noe lavere enn produksjonsestimater (BPP) fra tidligere høstforsøk med tilsvarende tilførsel av nitrogen i Hopavågen (Olsen et al., 2006). De laveste verdiene. Harding et al. (2002) fant at maksimal BPP i naturlig kystvann varierte mellom 1300 og 2200 mg C m⁻² d⁻¹ i perioden august-oktober, om det antas eufotisk sone og stratifisering ved 10 m, blir dette 130-220 mg C m⁻³ d⁻¹. Den estimerte produksjonen i dette mesokosmeforsøket var langt lavere ved forsøkets start, noe som trolig skyldes lav planteplankton biomasse. Etter 16 dager var produksjonen høyere enn målte verdier i naturlig kystvann i M4, M6, M7 og M8.

Produksjon av karbon har tradisjonelt blitt målt med ¹⁴C-metoden, først beskrevet av Stenman-Nielsen i 1952 (Peterson, 1980). Primærproduksjon målt med ¹⁴C-metoden er ikke direkte sammenlignbare med oppgavens estimater basert på fluorescenskinetikk. Produksjonsestimatene i oppgaven representerer brutto primærproduksjon, de er basert på elektrontransport som er direkte relatert til O₂ produksjon, og O₂ produksjonen (Hancke et al., 2008) ble deretter konvertert til karbon. ¹⁴C målinger gir verdier et sted mellom brutto og nette primærproduksjon (Falkowski og Raven, 1997), og fotosyntese estimert med den metoden som er brukt i oppgaven er vist å overestimere produksjonen (Kromkamp et al., 2008). Det brutto estimatet av produksjon representerer mengden karbon fiksert uten tanke på algenes egen respirasjon, som vil forbruke karbon.

Det er flere usikkerheter knyttet til fluorescensmålingene og videre beregninger frem til konvertering av karbon. Høy irradians vil indusere fotoinhibering i vannlaget nærmest overflaten, noe som sannsynligvis påvirker produktivitet og fordeling av planteplankton i vannsøylen. Her er antagelse for estimatene av primærproduksjon at planteplanktonet er homogent fordelt med dyp i mesokosmene, fordi det kun ble tatt en integrert vannprøve (0-10 m). Algene er avhengig av lys for fotosyntese og det er naturlig å anta at det er lite alger under svært lave lysforhold. Allerede på 8 meter ble det registrert 1 % av overflatelystet, noe vanligvis antatt å være kritisk dyp for fotosyntese. Mens noen viser at planteplankton er jevnt fordelt i det stratifiserte vannlaget er det her viktig å merke seg dinoflagellatenes dominans. Spesielt fordi samfunnet var dominert av dinoflagellater, som viser stor evne til å svømme og regulere sin egen posisjon i vannsøylen for å oppnå optimale lysforhold (Margalef, 1978). På grunn av den integrerte vannprøven av planteplankton ble også den gjennomsnittlige verdien av lys og spektral sammensetning anvendt i beregningene. I realiteten var mer lys tilgjengelig, både fordi lyset svekkes eksponentielt med dyp og den spektrale sammensetningen endres, noe som gjør disse estimatene konservative. For planteplankton i nærheten av overflaten var trolig produksjonen langt høyere, samtidig som det er viktig å merke seg at for mye lys kan skade celler og sette i gang kostbare fotoprotektive reaksjoner som reduserer utbyttet av fotosyntesen. For eksempel kunne profiler av fluorescens eller diskrete prøver vært brukt for å gi et bilde av vertikal fordeling av klorofyll *a* og derfor planteplankton. Olsen et al. (2007)

fant at forholdene på 2 meters dyp var mer representativt for mesokosmene, og om det i denne oppgaven hadde vært benyttet seg av lyset ved 2 m, fremfor gjennomsnittet hadde produksjonsestimatene vært høyere.

En rekke antagelser som påvirket estimatene ble gjort for å estimere primærproduksjonen i mesokosmene. Det ble antatt at fordelingen av absorberte fotoner var lik i PSI og PSII ($fAQPSII = 0,5$), slik at kvanteutbytte av de to fotosystemene er likt. Dette er vist å ikke alltid stemme, og $fAQPSII$ varierer mellom ulike taksonomiske grupper og innenfor samme taksonomiske gruppe med varierende lysforhold (Johnsen og Sakshaug, 2007).

Fra teorien er det beregnet at 8 elektroner er minimum for å danne et O_2 molekyl (Falkowski og Raven, 1997). I denne oppgaven ble det brukt $10e^-$ fordi det er det laveste som er målt eksperimentelt (Ley og Mauzerall, 1982), mens det i andre forsøk er målt opp mot 12-18 e^- per O_2 (Kromkamp et al., 2008), noe som gjør at estimert BPP på denne måten i oppgaven trolig representerer et maksimumsestimat. Dette er fordi planter også trenger reduksjonskraften fra NADPH og kjemisk energi fra ATP for å syntetisere proteiner, lipider og nukleinsyrer. Konversjonsfaktoren mellom mol O_2 produsert i lysreaksjonen i fotosyntesen og mol C fiksert i Calvin-Benson syklusen, fotosyntetisk kvotient (PQ), ble i dette forsøket antatt å være 1,0. PQ er ofte antatt $> 1,0$, fordi cellene bruker energien fanget av fotosystemene for å redusere nitrat til ammonium, og i noen grad redusere sulfat (Falkowski og Raven, 1997, Kromkamp et al., 2008). Fordi det i dette forsøket ble tilsatt ammonium i relativt store mengder, ble det også antatt at ammonium planktonets hovedkilde til nitrogen, og da er PQ vist å kunne være 0,1 (Eriksen et al., 2007). Antagelsene av PQ og antall mol elektroner til O_2 produksjon representerer derfor en øvre grense av hva som er mulig i vann under naturlige forhold,

4.7 Sammenligning av ulike metoder

I dette forsøket er utviklingen til planteplankton beskrevet med (i) tellinger i mikroskopi og beregning av biovolum og karbonbiomasse, (ii) klorofyll *a* konsentrasjon, (iii) kjemotaksonomiske pigmenter, *in vivo* fluorescens, (ii) klorofyll *a* og (iii) kjemotaksonomiske pigmenter, *in vitro*. Alle disse metodene har ulike fordeler og ulemper ved bruk i forskning og overvåkning av planteplankton.

Telling av planteplankton ved mikroskopi er det nærmeste man kommer en fasit på artene og gruppene av planteplankton i planteplanktonsamfunnet. Metoden er tidkrevende, krever taksonomisk ekspertise (Edler og Elbrächter, 2010) og viser gjerne varierende resultater mellom ulike laboratorier (Paerl et al., 2003). Videre er også beregning av biovolum, for å kunne beregne biomasse (karbon) svært tidkrevende. I tillegg er det ikke alle planteplanktongrupper som fikseres på en måte som er tilfredsstillende for telling (Mullin et al., 1966). Nøyaktigheten til beregninger av biovolum er et spørsmål, og metoden er tidkrevende slik at bruk må avveies med tanke på tidsbruk. Det er ønskelig å beskrive formen på cellene med færrest mulig målinger som samtidig beskriver formen på cellene best mulig (HELCOM, 2006). Metoden som er anvendt i beregningene i dette studiet omfatter beregning

av volum per celle og deretter gjennomsnittet for volumet av alle individene, dette fremfor å beregne et «gruppegjennomsnitt» fra gjennomsnittet av alle målelengdene. Dette resulterer i at de store cellene vektlegges mer enn de små (Hillebrand et al., 1999, Sun og Liu, 2003).

Ofte blir karbonbiomasse til planteplanktonet beregnet direkte som en konstant faktor av målt klorofyll *a* konsentrasjon i vannet (Geider et al., 1997). I dette forsøket varierte forholdet karbon: klorofyll *a* (C:Kla) fra 0,003-0,02 med midlere verdi 0,011. Korrelasjonen mellom klorofyll *a* målingene og planteplanktonbiomasse var relativt høy ($R^2 = 0,610$) og viste at 61 % av variasjonen i biomasse ble forklart av variasjon målt i klorofyll *a*. Forholdet klorofyll *a* og karbon er vist å endres blant annet med næringsforhold og lysforhold og det er forskjellig mellom ulike arter (Geider et al., 1997). Det vil derfor endres om artssammensetningen endres. Fiksering av planteplankton med sur Lugol maskerer klorofyll *a* og gjør det vanskelig å skille eventuelt heterotrofe dinoflagellater fra autotrofe. Om den relative mengden heterotrofe dinoflagellater endrer seg kan dette gi variasjon i C:Kla derfor påvirke C-estimatet.

Pigmentanalyser ved hjelp av HPLC er et alternativt verktøy for overvåking av planteplankton (Paerl et al., 2003). Metoden muliggjør identifisering av små planteplanktonceller (pico- og nanonivå) som er vanskelig å identifisere ved mikroskopi (Higgins et al., 2012). Presisjonen til HPLC-analyser er vanligvis høy, mens tellinger i mikroskop typisk har større standardavvik (Schluter og Havskum, 1997). I HPLC-prøvene i dette forsøket ble det filtrert relativt store vannvolum (1-3,4 L) for analyse, mens planteplankton er telt i prøver på 25 eller 50 mL. Store prøver reduserer usikkerheten ved prøvetaking. I dette forsøket var det god korrelasjon mellom Kla målt med Turner Fluorometer og Kla mål med HPLC ($R^2 = 0,668$).

I dette forsøket med et samfunn totalt dominert av dinoflagellater og diatomeer ved dag 6 og dinoflagellater ved dag 16 og HPLC-analysene bekreftet dette. Større celler inneholder mer pigmenter enn mindre celler, og mulige kjemotaksonomiske markører for nanoplankton ble ikke påvist. Selv om nøyaktig kjemotaksonomisk informasjon kan være vanskelig å hente fra HPLC-analyser har flere foreslått å bruke rådata fra pigmentanalyser for miljøovervåking av planteplankton (Higgins et al., 2012). Paerl et al. (2003) har foreslått at pigmentanalyser med HPLC burde implementeres som metode for langtidsovervåking av planteplankton.

Sherrard (2006) viser hvordan rådata fra pigmenter direkte kan brukes til å oppdage endring i planteplanktonsamfunnet som følge av eutrofiering. Det er ved bruk av rådata fra HPLC mulig å studere endringer i pigmentsammensetningen av planteplanktonsamfunnet, uten å videre undersøke hva disse endringene er. HPLC er raskere, mer reproducerbar og vil være lettere å anvende i storskala overvåkningsprogrammer for å kvantifisere planteplankton sammenlignet med mikroskopi (Sherrard et al., 2006). HPLC kan ikke erstatte tradisjonelle planktontellinger, men vil kunne fungere som et komplement, der man kan undersøke et mindre antall lokasjoner for å bekrefte HPLC-data. Sherrard et al. (2006) beskriver en form for overvåking der man bruker HPLC prøver for å screene et stort antall prøver/lokasjoner der mikroskopiske analyser brukes for å bekrefte identifiseringen.

Både klorofyll *a* målt *in vitro* og *in vivo* gir et mål på biomasse, men er som nevnt sensitivt for en rekke miljøfaktorer. Metodene vil heller ikke beskrive endringer i strukturen i planteplanktonsamfunnet. Fordelen med metodene er at de er lite tidkrevende og innebærer relativt lave kostnader. Et fortrinn med fluorescensmålinger er muligheten for *in situ* overvåkning, for eksempel ved bøyer eller skip (Volent et al., 2011), slik at omfanget av overvåkingen øker.

4.8 Indikatorer på økt konsentrasjoner av næringsalter

De kvantitative effektene av utslipp av uorganiske næringsalter fra merdanlegg på strukturen og funksjonen i de åpne pelagiske økosystemet i vannsøylen er fortsatt dårlig forstått (Cloern, 2001, Olsen et al., 2006). Effekten i lukkede system som mesokosmer er ikke direkte overførbare til naturen som følge av at økosystemet i naturlig kystvann er åpent i dynamiske interaksjoner med omgivende vannmasser. Det er derfor ikke mulig å sammenligne resultatene fra et mesokosmeforsøk med utslipp av næringsalter i naturen direkte. Likevel vil det være nyttig å studere effekten av økte tilførsler av næringsalter i mesokosmer for finne indikatorer på hvordan negative effekter av økt tilførsel av næringsalter kan arte seg i naturen. Vannet i direkte nærhet til oppdrettsanlegg opplever en kontinuerlig tilførsel av næringsalter hele året, mens vi i dette forsøket har studert effekter med økt tilførsel av næringsalter i løpet av tre uker. Etter 18-20 dager avvek forholdene i mesokosmene klart fra dem i et naturlig pelagisk økosystem med sterk påvekst av bentiske diatomeer på veggene i mesokosmene, som antagelig tok opp næringsalter fra vannmassene.

I en studie av effekter av næringsalter i havet vil prøvetaking gjennomføres på en annen måte enn i et mesokosmeforsøk. I havet vil det være mer naturlig å gjennomføre tidsserier med prøvetaking og sammenligne disse mellom ulike perioder og lokaliteter. Dette er årsaken til at det ble beregnet gjennomsnittlige responsen på tilførselen av næringsalter i forsøket (Figur 14-Figur 20). Effekten av økt tilsats av næringsalter over en tidsperiode kan sees som økt biomasse planteplankton (K_{la} , Figur 14 D), men på grunn av den observerte variasjonen i $C:K_{la}$ gir ikke klorofyll *a* et sikkert biomasseestimat. For gruppene av planteplankton var den sterkeste gjennomsnittlige responsen observert for biomassen av thekate dinoflagellater. En økning i dinoflagellater er vanlig i en høstsituasjon, og tilførselen av næringsalter var trolig fordelaktig for de allerede tilstedeværende artene.

Økt mengde dinoflagellater knyttes ofte til oppblomstring av skadelige algeoppblomstringer (HAB). Eutrofiering har i de siste tiårene ofte blitt knyttet til økte forekomster av skadelige algeoppblomstringer (Anderson et al., 2012). Økt tilførsel av næringsalter fører til økt planteplanktonproduksjon, men om dette får skadelige konsekvenser avhenger av om toksiske arter er tilstede. Relativ høy tilførsel av nitrogen er vist å fremme oppblomstringer av potensielt skadelige dinoflagellater (Escaravage og Prins, 2002). Det relative forholdet mellom ulike næringsalter, beiteintensitet og lysforhold kan være faktorer som påvirker om økte utslipp fører til oppblomstring av toksiske alger (Anderson et al., 2002).

4.9 Effekten av økt tilførsel av næringsalter på pelagiske økosystem

Utslipp av DIN eller ammonium fra produksjon av laks i merdanlegg i Norge er vist å utgjøre < 15 % av den naturlige tilførselsraten av nitrat fra dypvannet, noe som gjør at man kan anta at næringstilførselen fra oppdrett er innenfor trygge grenser (Wang et al., 2012). Produksjonen av laks i merdanleggene i Norge er ikke konstant gjennom året, men fôrforbruket og produksjonen er høyest i juni-november (hhv. 67 og 68 % av årsforbruk og -produksjon) (Wang et al., 2012). Som følge av dette er også utslippene av løste organiske og uorganiske næringsstoffer høyest i denne perioden, Wang et al. (2012) fant at utslippene var høyest i august, mens mindre enn halvparten av dette maksimale utslippet ble funnet i januar-mai. Dette betyr at utslippene av næringsalter fra merdanleggene til det pelagiske økosystemet er høyest når vannsøylen er stratifisert og næringssaltkonsentrasjonen naturlig er lav.

To mekanismer i pelagiske økosystem vil sørge for assimilering av næringssaltene: (i) responsen i næringsnett og (ii) hydrodynamikk (Olsen og Olsen, 2008). I et mesokosmeforsøk er det bare responsen i næringsnettet som studeres. Alle økosystemer har en naturlig evne til å motstå endringer i miljøforandringer ved organismenes adaptive responser på endrete miljøforhold. Næringsnettet vil derfor fungere som en buffer og dempe økologiske effekter av næringsutslipp, så lenge utslippene er under en kritisk grense (Olsen og Olsen, 2008). Ved økt næringstilsats under et kritisk nivå vil næringssaltene effektivt tas opp av planteplankton (og bakterier), noe som fører til økt biomasse av disse og altså økt konsentrasjon av mat for heterotrofe organismer. For heterotrofe organismer er det vist at det skjer en respons i karbonflyten mellom funksjonelle grupper av heterotrofe biomasser, men ingen sterk respons i biomasser (Olsen et al., 2006).

Økosystemet vil miste sin integritet om zooplankton ikke lenger kan beite unna den ekstra produksjonen av planteplankton som følger av en økt tilsats av næringsalter. Olsen et al. (2006) har vist at i et mesokosmeforsøk med nordøst-atlantisk kystvann at dette vil kunne skje en tilførsel av $N \geq 1 \mu\text{mol L}^{-1} \text{dag}^{-1}$. Uten effektiv nedbeiting av planteplankton vil biomassen av planteplankton akkumulere. I dette forsøket ble det observert en betydelig økning i planteplanktonbiomasse, enten som *Kla* og/eller *C* i M4-M8 (tilsatt $> 1,23 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{L}^{-1} \text{dag}^{-1}$) fra dag 16. For M4 ble det ikke funnet samme økning i *Kla* som av *C*, noe som kan skyldes at økningen i biomasse på dag 16 ikke skyldes bare planteplankton, men også heterotrofe dinoflagellater. En planteplanktonoppblomstring vil eventuelt føre til en økt strøm av dødt organisk materiale til dypvann og sedimenter, anoksiske forhold og negative effekter på det bentiske økosystemet i umiddelbar nærhet (<50 m) til oppdrettsanlegg (Mente et al., 2006).

Gjennom et eutrofieringsforsøk der DIN og DIP ble tilsatt direkte i Hopavågen ble det antydnet av at den kritiske verdien for negativ påvirkning av det pelagiske økosystemet i sommerperioden (juni-september) ikke vil skje før tilførsel av DIN overstiger den naturlige bakgrunnen med en faktor $> 1,3$ (Olsen, Y og Vadstein, O, upubliserte data). I dette forsøket tilsvarer det tilførsler $> 0,38 \mu\text{mol N L}^{-1} \text{dag}^{-1}$, og M2-M8 ble tilsatt NH_4^+ i konsentrasjoner som var over denne kritiske grensen. I M2-M3 ble det ikke observert betydelig økning i planteplanktonbiomasse, men samfunnsstrukturen i planteplanktongruppen undergikk

endringer, med en relativ reduksjon i antall diatomeer og nanoplankton og en økning i relativ andel, noe som trolig avspeilte en endring av strukturen til næringsnett.

Merdanlegg vil være en punktkilde for utslipp av næringssalter i naturlig kystvann. I naturen vil hydrodynamiske krefter fortynne både næringssaltene og organismene fra utslippsområdet til nedstrøms vannmasser. Den kontinuerlige reduksjonen i både næringssaltkonsentrasjoner og biomassen av planteplankton vil øke det pelagiske økosystemets kapasitet til å assimilere næringssalter (Olsen og Olsen, 2008). Vannets oppholdstid og hydrodynamikk vil følgelig påvirke vannmassenes kapasitet til å assimilere næringssalter (Yokoyama et al., 2004). På grunn av de normale hydrodynamiske forholdene i norsk lakseoppdrett vil oppholdstiden til planteplanktonet i nærheten av oppdrettsanlegget være relativt kort, og tilførselen av næringssalter vil oppleves som en enkel puls, fremfor en tilførsel over 20 dager som i dette mesokosmeforsøket. Olsen et al. (2001) klarte ikke å påvise de samme effektene ved utslipp av næringssalter direkte i Hopavågen for konsentrasjoner som hadde gitt økt biomasse i mesokosmeforsøk. Den økningen i biomasse som ble observert som resultat av økende tilførsel av næringssalter i dette forsøket vil ved tilsvarende tilførsel i et åpent og dynamisk system reduseres av adveksjon og miksing av vannmassene.

En respons i primærproduksjon er mindre sensitiv for fysiske blandingsprosesser og beiting (Olsen et al., 2006). Selv om opptaket av næringsstoffer i planteplankton skjer umiddelbart, kan det ta flere dager før planteplankton biomassen responderer. I mitt forsøk skjedde responsen i biomasse etter enda lengre tid (>12 dager). Andre har funnet at en typisk planteplanktonrespons skjer noe før (3-7 dager) og respons i crustacean zooplankton trenger > 10 dager (Olsen et al., 2006, Olsen et al., 2011). Dette fører som regel til at den økologiske effekten av utslipp fra merdanlegg først vil kunne realiseres og oppdages langt nedstrøms for merdanleggene (Olsen og Olsen, 2008).

For enda større vannområder, økosystem, som er relevant i en forvaltningssammenheng, vil andre fysiske krefter være viktige. Vannet i det norske pelagiske kystøkosystemet vil fortynnes enda mer enn Hopavågen, og også disse resultatene representerer derfor et maksimum (Olsen et al., in prep).

4.10 Veien videre

For å kunne overvåke den økologiske tilstanden i pelagiske vannmasser er det klart at det kreves mer enn målinger av klorofyll *a* som i dag er standard metode for å bestemme planktonisk tilstand i det pelagiske økosystemet. Forsøket viser at nye metoder og indikatorer må implementeres i overvåkning av kystvannet for å kunne studere langtidseffekten av utslipp av næringssalter fra akvakulturen på strukturen i planteplanktonsamfunnet. Bruk av HPLC-målinger av pigmenter i overvåkning vil føre til økt prøvetaking i rom og tid, mens det fortsatt er de tradisjonelle mikroskopiprøvene som gir det beste bildet av planteplanktonsamfunnet.

Effekten av ammonium som hovedkilde til nitrogen var vanskelig å skille fra effekten av økt tilførsel av næringssalter, dette fordi hovedformen for DIN i vannmassene i utgangspunktet

var ammonium, og fordi dinoflagellater som er vist å vokse godt med ammonium dominerte planteplanktonsamfunnet. Under våroppblomstringen av diatomeer er tilførselen av næringssalter fra dypvannet så høy at utslippene fra akvakultur blir ubetydelige (Wang et al., 2012), men effekten av en endring i nitrogen fra nitrat til ammonium som dominerende form vil muligens ha en større påvirkning på det naturlige planteplanktonsamfunnet om tidligere i sommerperioden, når mindre alger normalt dominerer. Det ville vært interessant å studere om det samme skiftet mot et samfunn dominert av dinoflagellater ville forekommet tidligere i sommerperioden.

Overvåkning av det pelagiske økosystemet er vanskeligere enn for det bentiske, da effektene fortynnes og et mye større område påvirkes. Mesokosmeforsøk med fortykning av vannmassene etter en tilsats av næringssalter fra start vil trolig gi en dempet og mer reell effekt av næringstilførselen fra akvakultur. Den kontinuerlige tilførselen i mesokosmeforsøk er også kunstig i forhold til utslipp fra akvakultur, studier av et enkelt utslipp av næringssalter vil kanskje fortelle oss mer om de reelle langtidseffektene av et slikt utslipp.

4.11 Oppsummering

I løpet av forsøket viste alle data det samme hendelsesforløpet med en akkumulering av planteplanktonbiomasse i mesokosmer som ble tilført NH_4^+ i mengder $> 1,23 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ dag}^{-1}$. Økt tilførsel av næringssalter hadde en effekt på samfunnsstrukturen av planteplankton, også i mesokosmer der det ble observert liten endring i biomasse gjennom forsøket. Både biomassebestemmelser basert på mikroskoptelling og pigmentdata analysert med HPLC viste en respons i diatomeer og dinoflagellater på økt tilførsel av næringssalter, mens samfunnsstrukturen i alle mesokosmer utviklet seg fra et samfunn dominert av diatomeer (21,3 %), nanoplankton $> 10 \mu\text{m}$ (12 %) og dinoflagellater (66,2 %) ved dag 0 mot et samfunn fullstendig dominert av dinoflagellater (64-98,3 %) ved dag 16. Dette antyder at K_{la} -prøver for å beskrive planteplankton ikke er nok for å oppdage eventuelle endringer som følge av utslipp av næringssalter fra akvakultur, og at mikroskopering med beregning av biomasse og/eller HPLC-målinger av pigmentsammensetning vil gi et mer nyansert og detaljert bilde av planktonsamfunnet.

Ved fluorescenskinetikk ble det målt generell høy kondisjon i planteplanktonet gjennom hele forsøket, noe som støtter opp om at planteplanktonet ikke var næringsbegrenset i utgangspunktet og at det derfor ble funnet en uvanlig lang lagperiode ($> 12-14$ dager) før biomassen økte i mesokosmene med høyest tilførsel av næringssalter. I dette forsøket ble det ikke funnet en betydelig forskjell i produksjon per biomasse ($\text{mg C (mg } K_{la})^{-1} \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), mellom de ulike mesokosmene, og estimat av primærproduksjon kunne hovedsakelig beskrives som en funksjon av biomassen i mesokosmene. Biomassen av planteplankton ble derfor sannsynligvis holdt nede gjennom beiting, der ciliater ble antatt å være viktige beitere på nanoplankton, mens også heterotrofe dinoflagellater kan ha vært viktige beitere på planteplankton.

5 Referanser

- AquaPen-C AP-C 100 Operation Manual*. PSI (Photon Systems Instruments), Czech Republic.
- ANDERSON, D. M., CEMBELLA, A. D. & HALLEGRAEFF, G. M. 2012. Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Annual Review of Marine Science*, 4, 143-176.
- ANDERSON, D. M., GLIBERT, P. M. & BURKHOLDER, J. M. 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries*, 25, 704-726.
- BABIN, M. 2008. Phytoplankton fluorescence: theory, current literature and in situ measurement. *Real-time Coastal Observing Systems for Marine Ecosystem Dynamics and Harmful Algal Blooms*.
- BABIN, M., MOREL, A., CLAUSTRE, H., BRICAUD, A., KOLBER, Z. & FALKOWSKI, P. G. 1996. Nitrogen-and irradiance-dependent variations of the maximum quantum yield of carbon fixation in eutrophic, mesotrophic and oligotrophic marine systems. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 43, 1241-1272.
- BAKER, N. R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 89-113.
- BARLOW, R., MANTOURA, R., GOUGH, M. & FILEMAN, T. 1993. Pigment signatures of the phytoplankton composition in the northeastern Atlantic during the 1990 spring bloom. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 40, 459-477.
- BØRSHEIM, K. Y., VADSTEIN, O., MYKLESTAD, S. M., REINERTSEN, H., KIRKVOLD, S. & OLSEN, Y. 2005. Photosynthetic algal production, accumulation and release of phytoplankton storage carbohydrates and bacterial production in a gradient in daily nutrient supply. *Journal of Plankton Research*, 27, 743-755.
- CHAUTON, M. S., TILSTONE, G. H., LEGRAND, C. & JOHNSEN, G. 2004. Changes in pigmentation, bio-optical characteristics and photophysiology, during phytoflagellate succession in mesocosms. *Journal of Plankton Research*, 26, 315-324.
- CLEVELAND, J. & PERRY, M. 1987. Quantum yield, relative specific absorption and fluorescence in nitrogen-limited *Chaetoceros gracilis*. *Marine Biology*, 94, 489-497.
- CLOERN, J. E. 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine Ecology Progress Series*, 210, 223-253.
- DALSGAARD, T. & KRAUSE-JENSEN, D. 2006. Monitoring nutrient release from fish farms with macroalgal and phytoplankton bioassays. *Aquaculture*, 256, 302-310.
- EDLER, L. & ELBRÄCHTER, M. 2010. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris: UNESCO, 13-20.
- ENELL, M. 1995. Environmental-Impact of Nutrients from Nordic Fish Farming. *Water Science and Technology*, 31, 61-71.

- EPA-600/4-79-020 1984. Phosphorus, All Forms. Methods for Chemical Analysis of Water and Wastewater, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, OH.
- EPA/600/R-79-020 1984. Nitrogen, Nitrate-Nitrite (Colorometric, Automated, Cadmium Reduction). Methods for the Chemical Analysis of Water and Wastes, Cincinnati, OH.
- ERIKSEN, N. T., RIISGÅRD, F. K., GUNTHER, W. S. & IVERSEN, J. J. L. 2007. On-line estimation of O₂ production, CO₂ uptake, and growth kinetics of microalgal cultures in a gas-tight photobioreactor. *Journal of applied phycology*, 19, 161-174.
- ERVIK, A., HANSEN, P. K., AURE, J., STIGEBRANDT, A., JOHANNESSEN, P. & JAHNSEN, T. 1997. Regulating the local environmental impact of intensive marine fish farming I. The concept of the MOM system (Modelling-Ongrowing fish farms-Monitoring). *Aquaculture*, 158, 85-94.
- ESCARAVAGE, V. & PRINS, T. 2002. Silicate availability, vertical mixing and grazing control of phytoplankton blooms in mesocosms. *Hydrobiologia*, 484, 33-48.
- FALKOWSKI, P. G. & RAVEN, J. A. 1997. *Aquatic photosynthesis*, Blackwell Science Malden, MA.
- FAO 2012. The state of world fisheries and aquaculture. *FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. ISBN 978-92-5-107225-7.*
- FISTAROL, G. O., LEGRAND, C., SELANDER, E., HUMMERT, C., STOLTE, W. & GRANÉLI, E. 2004. Allelopathy in *Alexandrium* spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquatic Microbial Ecology*, 35, 45-56.
- GAINES, G. & ELBRÄCHTER, M. 1987. Heterotrophic nutrition. *The biology of dinoflagellates*, 21, 224-268.
- GEIDER, R., MACINTYRE, H. & KANA, T. 1997. Dynamic model of phytoplankton growth and acclimation: responses of the balanced growth rate and the chlorophyll a: carbon ratio to light, nutrient-limitation and temperature. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 148, 187-200.
- GEIDER, R. J. & MACINTYRE, H. L. 2008. Physiology and biochemistry of photosynthesis and algal carbon acquisition. *Phytoplankton Productivity Carbon Assimilation in Marine and Freshwater Ecosystems*, 44-77.
- GISMERVIK, I., ANDERSEN, T. & VADSTEIN, O. 1997. Pelagic food webs and eutrophication of coastal waters: impact of grazers on algal communities. *Mar Pollut Bull*, 33, 22-35.
- GISMERVIK, I., OLSEN, Y. & VADSTEIN, O. 2002. Micro- and mesozooplankton response to enhanced nutrient input - a mesocosm study. *Hydrobiologia*, 484, 75-87.
- GRANÉLI, E. & TURNER, J. T. 2002. Top-down regulation in ctenophore-copepod-ciliate-diatom-phytoflagellate communities in coastal waters: A mesocosm study. *Marine Ecology Progress Series*, 239.

- HANCKE, T. B., HANCKE, K., JOHNSEN, G. & SAKSHAUG, E. 2008. Rate of O₂ production Derived from Pulse-Amplitude-Modulated Fluorescence: Testing Three Biooptical Approaches against Measured O₂-Production Rate. *Journal of Phycology*, 44, 803-813.
- HANSEN, B., BJØRNSSEN, P. K. & HANSEN, P. J. 1994. The size ratio between planktonic predators and their prey. *Limnology and Oceanography*, 39, 395-403.
- HANSEN, P. J. 1991. Quantitative importance and trophic role of heterotrophic dinoflagellates in a coastal pelagial food web. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 73, 253-261.
- HANSSON, L.-A. 1992. The role of food chain composition and nutrient availability in shaping algal biomass development. *Ecology*, 241-247.
- HARDING, L., MALLONEE, M. & PERRY, E. 2002. Toward a predictive understanding of primary productivity in a temperate, partially stratified estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55, 437-463.
- HARRISON, W., HARRIS, L. & IRWIN, B. 1996. The kinetics of nitrogen utilization in the oceanic mixed layer: Nitrate and ammonium interactions at nanomolar concentrations. *Limnology and Oceanography*, 41, 16-32.
- HAWES, I., SUTHERLAND, D. & HANELT, D. 2003. The use of pulse amplitude modulated fluorometry to determine fine-scale temporal and spatial variation of in situ photosynthetic activity within an *Isoetes*-dominated canopy. *Aquatic Botany*, 77, 1-15.
- HELCOM 2006. Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea. *Baltic Sea Environment Proceedings No. 106*. Helsinki Commission.
- HIGGINS, H., WRIGHT, S. & SCHLUTER, L. 2012. Quantitative interpretation of chemotaxonomic pigment data.
- HILLEBRAND, H., DÜRSELEN, C. D., KIRSCHTEL, D., POLLINGHER, U. & ZOHARY, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35, 403-424.
- HOEPFFNER, N. & SATHYENDRANATH, S. 1991. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 73, 1-23.
- ISLAM, M. S. 2005. Nitrogen and phosphorus budget in coastal and marine cage aquaculture and impacts of effluent loading on ecosystem: review and analysis towards model development. *Mar Pollut Bull*, 50, 48-61.
- JEFFREY, S. W., MANTOURA, R. F. C., WRIGHT, S. W., RESEARCH, I. C. O. S. U. S. C. O. O. & UNESCO 1997. *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*, UNESCO Publishing.
- JOHNSEN, G., BRICAUD, A., NELSON, N., PRÉZELIN, B. & BIDIGARE, R. 2010. In vivo bio-optical properties of phytoplankton pigments. In: ROY, S., EGELAND, E., LLEWELLYN, C. & JOHNSEN, G. (eds.) *Phytoplankton pigments: Updates on Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*. .

- JOHNSEN, G. & SAKSHAUG, E. 2007. Biooptical characteristics of PSII and PSI in 33 species (13 pigment groups) of marine phytoplankton, and the relevance for pulse-amplitude-modulated and fast-repetition-rate fluorometry. *Journal of Phycology*, 43, 1236-1251.
- KÉROUEL, R. & AMINOT, A. 1997. Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis. *Marine Chemistry*, 57, 265-275.
- KOLBER, Z. & FALKOWSKI, P. G. 1993. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis *in-situ*. *Limnology and Oceanography*, 38, 1646-1665.
- KROMKAMP, J. C., DIJKMAN, N. A., PEENE, J., SIMIS, S. G. & GONS, H. J. 2008. Estimating phytoplankton primary production in Lake IJsselmeer (The Netherlands) using variable fluorescence (PAM-FRRF) and C-uptake techniques. *European Journal of Phycology*, 43, 327-344.
- LARINK, O. & WESTHEIDE, W. 2011. *Coastal plankton: Photo guide for european seas*.
- LEY, A. C. & MAUZERALL, D. C. 1982. Absolute absorption cross-sections for Photosystem II and the minimum quantum requirement for photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 680, 95-106.
- LI, J., GLIBERT, P. M. & ALEXANDER, J. A. 2011. Effects of ambient DIN:DIP ratio on the nitrogen uptake of harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum* and *Prorocentrum donghaiense* in turbidistat. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29, 746-761.
- MARGALEF, R. 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica acta*, 1, 493-509.
- MAXWELL, K. & JOHNSON, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of experimental botany*, 51, 659-668.
- MELLE, W., ELLERTSEN, B. & SKJOLDAL, H. R. 2004. Zooplankton: the link to higher trophic levels. *The Norwegian Sea Ecosystem*, 137-202.
- MENDEN-DEUER, S. & LESSARD, E. J. 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnology and Oceanography*, 569-579.
- MENTE, E., PIERCE, G. J., SANTOS, M. B. & NEOFITOU, C. 2006. Effect of feed and feeding in the culture of salmonids on the marine aquatic environment: a synthesis for European aquaculture. *Aquaculture International*, 14, 499-522.
- MULLIN, M., SLOAN, P. & EPPLEY, R. 1966. Relationship between carbon content, cell volume, and area in phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 307-311.
- NEJSTGAARD, J. C., HYGUM, B. H., NAUSTVOLL, L.-J. & BAMSTEDT, U. 2001. Zooplankton growth, diet and reproductive success compared in simultaneous diatom- and flagellate-microzooplankton-dominated plankton blooms. *Marine Ecology Progress Series*, 221, 77-91.

NS4767:1983 *Vannundersøkelse - Bestemmelse av klorofyll a, spektrofotometrisk måling i metanolekstrakt, Standard Norge.*

OLSEN, L. M., HOLMER, M. & OLSEN, Y. 2008. Perspectives of nutrient emission from fish aquaculture in coastal waters: Literature review with evaluated state of knowledge. Fiskeri-og havbruksnæringens forskningsfond Norge.

OLSEN, Y., AGUSTÍ, S., ANDERSEN, T., DUARTE, C. M., GASOL, J. M., GISMERVIK, I., HEISKANEN, A. S., HOELL, E., KUUPPO, P., LIGNELL, R., REINERTSEN, H., SOMMER, U., STIBOR, H., TAMMINEN, T., VADSTEIN, O., VAQUÉ, D. & VIDAL, M. 2006. A Comparative Study of Responses in Planktonic Food Web Structure and Function in Contrasting European Coastal Waters Exposed to Experimental Nutrient Addition. *Limnology and Oceanography*, 51, 488-503.

OLSEN, Y., ANDERSEN, T., GISMERVIK, I. & VADSTEIN, O. 2007. Protozoan and metazoan zooplankton-mediated carbon flows in nutrient-enriched coastal planktonic communities. *Marine Ecology-Progress Series*, 331, 67-83.

OLSEN, Y., ANDERSEN, T., GISMERVIK, I. & VADSTEIN, O. 2011. Marine heterotrophic bacteria, protozoan and metazoan zooplankton may experience protein N or mineral P limitation in coastal waters. *Marine Ecology Progress Series*, 436, 81-100.

OLSEN, Y. & OLSEN, L. M. 2008. Environmental impact of aquaculture on coastal planktonic ecosystems. In: TSUKAMOTO, K., KAWAMURA, T., TAKEUCHI, T., BEARD JR, T. & KAISER, M. (eds.) *Fisheries for Global Welfare and Environment, 5th World Fisheries Congress 2008.*

OLSEN, Y., REINERTSEN, H., SOMMER, U. & VADSTEIN, O. in prep. Responses of biological and chemical components in North East Atlantic coastal water to experimental nitrogen and phosphorus addition – a full scale ecosystem study and its relevance for management.

OLSEN, Y., REINERTSEN, H., VADSTEIN, O., ANDERSEN, T., GISMERVIK, I., DUARTE, C., AGUSTI, S., STIBOR, H., SOMMER, U., LIGNELL, R., TAMMINEN, T., LANCELOT, C., ROUSSEAU, V., HOELL, E. & SANDERUD, K. A. 2001. Comparative analysis of food webs based on flow networks: effects of nutrient supply on structure and function of coastal plankton communities. *Continental Shelf Research*, 21, 2043-2053.

OLSEN, Y., TOKLE, N. & VADSTEIN, O. 2012. Hvordan forvalte vannmassene? Om samspillet mellom næringssaltutslipp og det planktoniske økosystem. In: HERSOUG, B. & JOHNSEN, J. P. (eds.) *Kampen om plass på kysten: Interesser og utviklingstrekk i kystzoneplanleggingen.* Universitetsforlaget.

PAERL, H. W., VALDES, L. M., PINCKNEY, J. L., PIEHLER, M. F., DYBLE, J. & MOISANDER, P. H. 2003. Phytoplankton photopigments as indicators of estuarine and coastal eutrophication. *BioScience*, 53, 953-964.

PARKHILL, J. P., MAILLET, G. & CULLEN, J. J. 2001. Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. *Journal of Phycology*, 37, 517-529.

- PARSONS, T. R., MAITA, Y. & LALLI, C. M. 1984. *Manual of chemical and biological methods for seawater analysis*, Pergamon.
- PETERSON, B. J. 1980. Aquatic primary productivity and the 14 C-CO₂ method: a history of the productivity problem. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11, 359-385.
- PITTA, P., TSAPAKIS, M., APOSTOLAKI, E. T., TSAGARAKI, T., HOLMER, M. & KARAKASSIS, I. 2009. Ghost nutrients' from fish farms are transferred up the food web by phytoplankton grazers. *Mar Ecol Prog Ser*, 374, 1-6.
- PUTT, M. & STOECKER, D. K. 1989. An experimental determined carbon-volume ratio for marine oligotrichous ciliates from estuarine and coastal waters. *Limnology and Oceanography*, 34, 1097-1103.
- RALPH, P. J. & GADEMANN, R. 2005. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic Botany*, 82, 222-237.
- RASSOULZADEGAN, F., LAVAL-PEUTO, M. & SHELDON, R. 1988. Partitioning of the food ration of marine ciliates between pico- and nanoplankton. *Hydrobiologia*, 159, 75-88.
- REDFIELD, A. C. 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *American scientist*, 46, 230A-221.
- REY, F. 2004. Phytoplankton: the grass of the sea. *The Norwegian Sea Ecosystem*, 97-136.
- RODRIGUEZ, F., CHAUTON, M., JOHNSEN, G., ANDRESEN, K., OLSEN, L. M. & ZAPATA, M. 2006. Photoacclimation in phytoplankton: implications for biomass estimates, pigment functionality and chemotaxonomy. *Marine Biology*, 148, 963-971.
- ROHÁČEK, K. & BARTÁK, M. 1999. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica*, 37, 339-363.
- ROY, S., LLEWELLYN, C., EGELAND, E. S. & JOHNSEN, G. 2011. *Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*, Cambridge University Press.
- SAKSHAUG, E., BRICAUD, A., DANDONNEAU, Y., FALKOWSKI, P. G., KIEFER, D. A., LEGENDRE, L., MOREL, A., PARSLow, J. & TAKAHASHI, M. 1997. Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. *Journal of Plankton Research*, 19, 1637-1670.
- SAKSHAUG, E. & JOHNSEN, G. 2006. Absorption, fluorescence, excitation and photoacclimation. In: RAO, D. V. S. (ed.) *Algal Cultures Analogues of Blooms and Applications*. Science Publishers, Enfield, USA. Dartmouth, NS
- Canada: Science Publishers.
- SAKSHAUG, E., JOHNSEN, G., KRISTIANSEN, S., VON QUILLFELDT, C., REY, F., SLAGSTAD, D. & THINGSTAD, F. 2009. *Phytoplankton and primary production*.

- SAROUSI, S. & BEER, S. 2007. Alpha and quantum yield of aquatic plants derived from PAM fluorometry: Uses and misuses. *Aquatic Botany*, 86, 89-92.
- SATHYENDRANATH, S., LAZZARA, L. & PRIEUR, L. 1987. Variations in the spectral values of specific absorption of phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 403-415.
- SATHYENDRANATH, S., STUART, V., NAIR, A., OKA, K., NAKANE, T., BOUMAN, H., FORGET, M.-H., MAASS, H. & PLATT, T. 2009. Carbon-to-chlorophyll ratio and growth rate of phytoplankton in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 383, 73-84.
- SCHLUTER, L. & HAVSKUM, H. 1997. Phytoplankton pigments in relation to carbon content in phytoplankton communities. *Marine Ecology-Progress Series*, 155, 55-65.
- SHERR, E. B. & SHERR, B. F. 2007. Heterotrophic dinoflagellates: a significant component of microzooplankton biomass and major grazers of diatoms in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, 352, 187.
- SHERRARD, N., NIMMO, M. & LLEWELLYN, C. 2006. Combining HPLC pigment markers and ecological similarity indices to assess phytoplankton community structure: An environmental tool for eutrophication? *Science of the total environment*, 361, 97-110.
- SOMMER, U. 1994. The impact of light intensity and daylength on silicate and nitrate competition among marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 39, 1680-1688.
- SOMMER, U., STIBOR, H., KATECHAKIS, A., SOMMER, F. & HANSEN, T. 2002. Pelagic food web configurations at different levels of nutrient richness and their implications for the ratio fish production: primary production. *Hydrobiologia*, 484, 11-20.
- SUGGETT, D. J., MOORE, C. M. & GEIDER, R. J. 2010. Estimating aquatic productivity from active fluorescence measurements. In: SUGGETT, D. J., BOROWITZKA, M. A. & PRASIL, O. (eds.) *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*.
- SUN, J. & LIU, D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 25, 1331-1346.
- TETT, P. 2008. Fish farm wastes in the ecosystem. *Aquaculture in the Ecosystem*. Springer.
- THRONDSSEN, J. & EIKREM, W. 2001. *Marine mikroalger i farger*, Almater Forlag AS.
- THRONDSSEN, J., HASLE, G. R. & TANGEN, K. 2007. *Phytoplankton of Norwegian coastal waters*, Almater Forlag AS.
- VADSTEIN, O., STIBOR, H., LIPPERT, B., LOSETH, K., ROEDERER, W., SUNDT-HANSEN, L. & OLSEN, Y. 2004. Moderate increase in the biomass of omnivorous copepods may ease grazing control of planktonic algae. *Marine Ecology Progress Series*, 270, 199-207.

- VEILEDER01:2009 Klassifisering av miljøtilstand i vann. Økologisk og kjemisk klassifiseringssystem for kystvann, innsjøer og elver i henhold til vannforskriften. Direktoratets gruppa for gjennomføringen av vanndirektivet.
- VERITY, P. & SMETACEK, V. 1996. Organism life cycles, predation, and the structure of marine pelagic ecosystems. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 130, 277-293.
- VERITY, P. G., ROBERTSON, C. Y., TRONZO, C. R., ANDREWS, M. G., NELSON, J. R. & SIERACKI, M. E. 1992. Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton. *Limnology and Oceanography*, 1434-1446.
- VOLANT, Z., JOHNSEN, G., HOVLAND, E. K., FOLKESTAD, A., OLSEN, L. M., TANGEN, K. & SØRENSEN, K. 2011. Improved monitoring of phytoplankton bloom dynamics in a Norwegian fjord by integrating satellite data, pigment analysis, and Ferrybox data with a coastal observation network. *Journal of Applied Remote Sensing*, 5, 21.
- WANG, X., OLSEN, L. M., REITAN, K. I. & OLSEN, Y. 2012. Discharge of nutrient wastes from salmon farms: environmental effects, and potential for integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture Environment Interactions*, 2, 267-283.
- WEBB, W. L., NEWTON, M. & STARR, D. 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*. *Oecologia*, 17, 281-291.
- YOKOYAMA, H., INOUE, M. & ABO, K. 2004. Estimation of the assimilative capacity of fish-farm environments based on the current velocity measured by plaster balls. *Aquaculture*, 240, 233-247.
- ZAPATA, M., RODRIGUEZ, F. & GARRIDO, J. L. 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C-8 column and pyridine-containing mobile phases. *Marine Ecology-Progress Series*, 195, 29-45.
- ZARAUZ, L., IRIGOIEN, X. & FERNANDES, J. A. 2009. Changes in plankton size structure and composition, during the generation of a phytoplankton bloom, in the central Cantabrian sea. *Journal of Plankton Research*, 31, 193-207.

6 Vedlegg A Klorofyll *a*

Tabell 6: Oversikt over konsentrasjonen av klorofyll *a* [$\mu\text{g L}^{-1}$] målt i de ulike mesokosmene med to replikater per mesokosme, og to replikate mesokosmer for behandling 1, 3, 5 og 7 (totalt 4 replikater) med tilhørende standardavvik. Mesokosme 1 A kollapset under forsøket og fra og med Dag 14 er beregninger for behandling 1 kun basert på prøver tatt av mesokosme 1B.

Dag	M1A, B	STDAV	M2	STDAV	M3A, B	STDAV	M4	STDAV	M5A, B	STDAV	M6	STDAV	M7A, B	STDAV	M8	STDAV
0	1,87	0,03	1,87	0,03	1,87	0,03	1,87	0,03	1,87	0,03	1,87	0,03	1,87	0,03	1,87	0,03
2	1,23	0,41	2,27	0,14	2,51	0,26	1,10	0,04	1,48	0,31	1,19	0,06	2,05	0,29	1,44	0,02
4	1,09	0,11	0,89	0,00	1,07	0,05	1,09	0,00	0,93	0,09	1,15	0,00	1,14	0,14	1,23	0,00
6	1,14	0,04	1,08	0,10	1,16	0,09	1,05	0,01	0,94	0,04	1,24	0,02	1,88	0,27	1,64	0,01
8	0,85	0,07	0,85	0,01	1,02	0,11	0,86	0,02	0,89	0,09	1,50	0,13	1,81	0,47	1,87	0,07
10	0,64	0,08	0,80	0,02	0,72	0,16	0,89	0,01	0,87	0,12	1,63	0,01	1,80	0,32	1,90	0,01
12	0,68	0,09	0,92	0,00	0,93	0,08	1,26	0,02	1,08	0,35	1,74	0,11	2,10	0,35	1,68	0,06
14	0,91	0,10	1,10	0,06	1,24	0,36	1,70	0,02	1,35	0,65	2,13	0,02	2,74	0,52	3,05	0,01
16	1,28	0,01	1,15	0,02	1,59	0,31	1,26	0,02	1,83	0,62	3,53	0,07	4,55	1,24	4,95	0,10
18	2,55	0,01	1,35	0,07	2,42	0,81	2,90	0,00	2,92	1,06	6,33	0,14	7,39	1,77	5,27	0,14
20	0,65	0,02	0,60	0,02	0,92	0,06	1,53	0,01	1,13	0,55	0,69	0,02	2,25	1,16	1,49	0,17

Tabell 7: Oversikt over konsentrasjonen av klorofyll *a* [$\mu\text{g L}^{-1}$] for fraksjon $< 10 \mu\text{m}$, målt i de ulike mesokosmene med to replikater per mesokosme, og to replikate mesokosmer for behandling 1, 3, 5 og 7 (totalt 4 replikater) utvalgte dager

Dag	M1A, B	STDAV	M2	STDAV	M3A, B	STDAV	M4	STDAV	M5A, B	STDAV	M6	STDAV	M7A, B	STDAV	M8	STDAV
2	0,88	0,07	1,06	0,03	0,91	0,13	0,38	0,01	0,53	0,03	0,59	0,00	0,75	0,08	0,75	0,01
6	0,59	0,04	0,57	0,00	0,68	0,04	0,58	0,01	0,61	0,01	0,69	0,00	0,94	0,14	1,01	0,02
12	0,45	0,07	0,60	0,01	0,49	0,04	0,65	0,01	0,71	0,08	0,78	0,02	1,06	0,14	1,13	0,01
16	0,21	0,00	0,31	0,01	0,29	0,01	0,33	0,00	0,35	0,03	0,48	0,00	0,68	0,08	0,84	0,00
20	0,23	0,07	0,21	0,01	0,30	0,04	0,36	0,00	0,41	0,03	0,25	0,01	0,78	0,03	0,78	0,00

7 Vedlegg B *In vivo* fluorescens

Tabell 8: *In vivo* fluorescens målt med AquaPen. *Indikerer at prøven ble oppkonsentrert før måling. Det ble ikke foretatt målinger av M1A etter dag 16

	1A	1B	2	3A	3B	4	5A	5B	6	7A	7B	8
Dag 0	170*	170*	170*	170*	170*	170*	170*	170*	170*	170*	170*	170*
Dag2	75*	49*	74*	62*	71*	42*	48*	32*	30*	39*	63*	51*
Dag 4	31*	38*	27*	30*	47*	36*	35*	32*	37*	40*	32*	37*
Dag 6	29*	37*	37*	48*	37*	34*	41*	39*	45*	62*	41*	39*
Dag 8	25*	29*	27*	36*	37*	33*	35*	19*	58*	76*	50*	65*
Dag 10	13*	14*	21*	21*	31*	39*	32*	20*	81*	205	58*	170
Dag 12	22*	22*	26*	37*	29*	50*	42*	41*	150	195	170	190
Dag 14	316 ^[1]	40*	44*	48*	60*	105*	71*	30*	201	310	208	262
Dag 16	-	37*	37*	46*	66*	62*	102*	20*	195	270	190	270
Dag 18	-	185	34*	225	150	205	235	29*	315	395	175	260
Dag 20	-	135	21*	145	140	195	220	33*	31*	430	155	255

[1] prøven ble kun tatt fra overflaten av mesokosme M1A (ikke integrert vannprøve 0-10 m) og verdien ikke brukt i videre beregninger.

8 Vedlegg C Celleantall planteplankton

Tabell 9: Tabellen viser celler per liter av ulike tellekategorier i vannprøven fra dag 0 og i 8 ulike mesokosmer dag 6.

	D0Nullprøve	D6M1B	D6M2	D6M3A	D6M4	D6M5A	D6M6	D6M7A	D6M8
Ciliat 10-20 µm	5280	9520	5600	5040	6740	2320	5120	10480	3440
Ciliat 20-40 µm	8000	10880	8680	14560	10260	11000	12000	13800	7560
Ciliat >40 µm	840	760	720	440	560	1480	640	1120	360
Nakne dinoflagellater 10-20 µm	14960	6720	9020	6880	7140	10360	12040	11320	14320
Nakne dinoflagellater 20-40 µm	2560	3000	3420	2360	6840	4000	3200	2360	2880
Nakne dinoflagellater > 40 µm	520	1040	960	840	1660	1240	600	1040	1000
<i>Ceratium fusus</i>	3820	2480	2400	6560	4260	720	6220	9880	5720
<i>Ceratium</i> «type 1»	300	140	280	1000	340	1160	660	540	640
<i>Ceratium</i> «type 2»	20	120	20	340	120	80	240	400	260
<i>Protoperdinium spp.</i>	40	800	640	640	1560	1400	1440	2280	2920
<i>Dinophysis spp.</i>	40	160	180	120	200	480	360	920	400
<i>Prorocentrum spp.</i>	240	40	40	120	80	0	0	200	80
Thekat dinoflagellat >20 µm	2720	1040	20	760	220	320	360	2720	400
<i>Rhizosolenia spp</i>	520	1400	2740	1360	3280	880	1600	2080	3000
<i>Chaetoceros spp</i>	2440	1960	1620	1000	1360	1840	1080	2160	4320
<i>Thalassiosira spp</i>	280	280	340	40	0	400	640	160	680
<i>Leptocylindricus spp</i>	720	4080	1860	760	1940	0	1920	4120	10240
Diatome, ikke identifisert	1160	3560	2460	920	2420	2920	1760	2680	4280
Nanoplankton < 10 µm	601654	817782	701930	387971	516225	476650	393314	516225	387971
Diatomeer (100 µm filamentlengde)	28476	34074	23000	15215	46128	59464	36021	100306	133983
Andre	3400	1720	2320	1520	2400	1720	3160	2200	1360

Tabell 10: Tabellen viser celler per liter av ulike tellekategorier i 8 mesokosmer dag 10 og dag 16

	D10M1 B	D10 M2	D10M3 A	D10 M4	D10M5 A	D10 M6	D10M7 A	D10 M8	D16M1 B	D16 M2	D16M3 A	D16 M4	D16M5 A	D16 M6	D16M7 A	D16 M8
Ciliat 10-20 µm	3260	6080	480	7200	3360	5720	4200	6080	2720	3880	2520	320	2400	1760	960	2720
Ciliat 20-40 µm	9240	6320	4540	6400	6640	12000	4640	5720	8080	4700	5200	4640	4480	5840	5840	11200
Ciliat >40 µm	640	400	240	400	520	840	520	680	1240	940	1560	680	880	1280	1120	1360
Nakne dinoflagellater 10-20 µm	1880	9560	2700	18520	12960	25240	12040	40720	1840	8400	2800	10575 3	33360	51440	452506	15272 0
Nakne dinoflagellater 20-40 µm	2100	3240	3000	7000	2960	2720	2120	1440	2000	3900	3600	3000	3040	5440	1120	2960
Nakne dinoflagellater > 40 µm	1160	520	440	1160	2340	800	720	4800	1000	520	2240	1680	960	1760	1760	1440
<i>Ceratium fusus</i>																
<i>Ceratium</i> «type 1»	120	1240	1940	4520	220	12600	8480	5240	140	680	5940	5480	400	11360	22840	8000
<i>Ceratium</i> «type 2»	640	460	500	560	1600	1660	840	1320	1480	820	1480	1360	1080	2320	2240	1960
<i>Protoperdinium spp.</i>	80	120	80	120	80	440	240	180	580	160	620	300	240	320	880	240
<i>Dinophysis spp.</i>	40	80	0	280	20	240	0	240	400	4600	440	280	1280	1360	480	3120
<i>Prorocentrum spp.</i>	460	440	440	680	660	1120	720	560	1080	700	520	1040	1040	1680	1920	1520
Thekat dinoflagellat >20 µm	0	80	0	80	20	80	200	280	0	60	80	120	0	0	2320	400
<i>Rhizosolenia spp</i>	1900	1280	800	5160	5860	10880	8280	10920	22120	860	9760	14760 0	50800	33040	329839	43840
<i>Chaetoceros spp</i>	1080	560	640	520	1020	120	1200	1560	320	20	80	0	0	80	160	0
<i>Thalassiosira spp</i>	420	520	0	0	360	320	0	1440	0	240	0	0	480	0	160	720
<i>Leptocylindricus spp</i>	0	0	0	0	140	0	240	600	0	0	0	0	400	0	160	160
Diatome, ikke identifisert	0	320	480	720	0	400	720	2960	0	620	0	0	0	0	0	560
Nanoplankton < 10 µm	480	720	140	360	800	880	720	3360	1560	1720	2160	1600	1120	2160	880	4000
Diatomeer (100 µm filamentlengde)	384168	49066 9	521336	90773 8	623938	62999 5	346740	53667 0	561544	74667 1	363459	42356 9	641398	77884 0	550640	94395 4
Andre	0	0	2556	0	6058	0	2453	19167	0	0	0	7863	12828	33101	7496	23365
<i>Ceratium fusus</i>	380	1520	420	2280	1120	1720	1360	640	1000	3940	2080	440	800	1120	480	2160

10 Vedlegg D Biovolum

Tabell 11: Gjennomsnittlige biovolum for ulike tellekategorier med standardfeil (SE).

n = antall individer.

Gruppe	Inndeling beregning volum	for av	Biovolum (μm^3)	SE %	n	μgC
Ciliater	Rund 10-20		1045,61	9,49	33	0,00019867
	Rund 20-40		8268,24	9,93	32	0,00157097
	Rund >40		66096,40	6,39	30	0,01255832
	Kjegle 10-20		518,71	8,34	30	9,8556E-05
	Kjegle 20-40		3141,62	6,48	30	0,00059691
	Kjegle >40		18774,54	9,90	40	0,00356716
	<i>Myrionecta</i> sp. 10-20		304,24	9,76	30	5,7805E-05
<i>Myriconecta</i> sp. 20-40		2375,29	6,28	30	0,0004513	
	Veldig stor ciliat		27135,60	9,74	30	0,00515576
Dinoflagellater, nakne	«Lang» 10-20		209,51	7,49	30	0,00010172
	«Lang» 20-40		1139,70	9,60	45	0,00043803
	«Lang» > 40		8237,30*	9,49	58	0,00241723
	«Kompakt» 10-20		725,29	6,20	30	0,00029657
	«Kompakt» 20-40		3237,47	8,93	30	0,00107894
	«Kompakt» > 40		52039,78	9,65	48	0,01188311
Dinoflagellater, thekate	<i>Ceratium fusus</i>		38521,53	8,60	30	0,00916366
	<i>Ceratium</i> «type 1»		47218,48	9,43	30	0,01092573
	<i>Ceratium</i> «type 2»		115531,80	7,09	30	0,02366913
	<i>Dinophysis</i> sp.		30631,51	9,51	41	0,00751753
	<i>Prorocentrum</i> sp.		18316,91	3,36	30	0,00482108
	Thekat		7608,99*	9,35	83	0,0022571
	Dinoflagellat, ikke ident.					
Diatomeer	<i>Rhizosolenia</i>		10218,14	9,49	30	0,00340621
	<i>Chaetoceros</i>		895,41*	8,15	56	0,00024808
	<i>Thaleosiorisa</i>		3263,36*	7,34	32	0,00124618
	<i>Lepticylindricus</i>		1410,06	9,84	48	0,00035841
	Diatome, ikke ident.		4087,18*	9,68	64	0,00151949
Dichthyoa		2420,13	5,64	30	0,00081328	
Dråpeform	10-20 μm		148,15	8,17	30	7,3847E-05
	20-40 μm		348,34	9,36	21	0,00015377
Nanoplankton < 10 μm	«Runde»		53,52	9,32	60	3,0915E-05
	Filamenter (per 100 μm lengde)		694,95	7,02	30	0,00020204

* 10 % av største og minste celler ble tatt bort før beregning av biovolum

Virkingen av økte næringssaltutslipp fra akvakultur på strukturen av planteplanktonsamfunnet.

Masteroppgave Maren Løken

11 Vedlegg E Ciliater

Tabell 12: Biomasse ($\mu\text{g C L}^{-1}$) til tre grupper av ciliater i 8 ulike mesokosmer på dag 6, 10 og 16, samt i nullprøven.

Dag 0	Ciliater 10-20 μm	1,00							
	Ciliater 20-40 μm	6,44							
	Ciliate > 40 μm	5,77							
	Sum	13,21							
	Meokosme	M1B	M2	M3A	M4	M5A	M6	M7A	M8
Dag 6	Ciliater 10-20 μm	1,59	0,99	0,88	1,09	0,22	0,78	1,82	0,45
	Ciliater 20-40 μm	7,87	6,09	9,82	6,91	8,08	8,86	10,50	4,57
	Ciliate > 40 μm	6,31	3,81	3,73	3,63	8,73	3,55	5,56	1,60
	Sum	15,76	10,89	14,42	11,63	17,03	13,20	17,89	6,62
Dag 10	Ciliater 10-20 μm	0,56	1,15	0,04	1,16	0,62	1,06	0,69	1,15
	Ciliater 20-40 μm	6,62	4,75	3,27	5,45	4,89	8,67	3,47	4,54
	Ciliate > 40 μm	3,53	1,98	1,97	2,57	2,72	3,67	2,47	3,36
	Sum	10,72	7,88	5,28	9,19	8,22	13,41	6,63	9,05
Dag 16	Ciliater 10-20 μm	0,50	0,61	0,48	0,06	0,38	0,32	0,13	0,43
	Ciliater 20-40 μm	6,23	4,71	5,09	4,17	3,69	5,18	5,43	11,67
	Ciliate > 40 μm	7,22	5,01	7,07	3,99	4,49	6,05	6,58	7,77
	Sum	13,95	10,33	12,64	8,22	8,56	11,54	12,15	19,87

12 Vedlegg F Kvanteutbytte i fotosystem II

Tabell 13: Tabellen viser kvanteutbytte i fotosystem II ($\phi\text{PSII}_{\text{max}}$) i alle mesokosmer for ulike dager.

	Mesokosme											
	1A ^[1]	1B	2	3A	3B	4	5A	5B	6	7A	7B	8
Dag 0 ^[2]	0,56*	0,56*	0,56*	0,56*	0,56*	0,56*	0,56*	0,56*	0,56*	0,56*	0,56*	0,56*
Dag 2	0,55*	0,60*	0,39*	0,61*	0,48*	0,28*	0,30*	0,12*	0,14*	0,31*	0,40*	0,49*
Dag 4	0,55*	0,57*	0,61*	0,57*	0,63*	0,58*	0,61*	0,68*	0,63*	0,60*	0,61*	0,70*
Dag 6	0,63*	0,63*	0,63*	0,65*	0,63*	0,63*	0,64*	0,64*	0,65*	0,68*	0,62*	0,67*
Dag 8	0,48*	0,53*	0,50*	0,48*	0,64*	0,60*	0,54*	0,59*	0,66*	0,67*	0,64*	0,70*
Dag 10	0,44*	0,43*	0,63*	0,56*	0,54*	0,51*	0,45*	0,30*	0,63*	0,42	0,51*	0,59
Dag 12	0,59*	0,60*	0,67*	0,65*	0,66*	0,60*	0,64*	0,64*	0,63	0,61	0,69	0,60
Dag 14	0,55	0,52*	0,60*	0,32*	0,62*	0,52*	0,62*	0,49*	0,50	0,59	0,55	0,68
Dag 16	-	0,68*	0,52*	0,70*	0,71*	0,70*	0,69*	0,65*	0,67	0,65	0,66	0,65
Dag 18	-	0,62	0,62*	0,61	0,65	0,63	0,64	0,64*	0,69	0,70	0,62	0,64
Dag 20	-	0,46	0,65*	0,55	0,49	0,68	0,69	0,55*	0,66*	0,68	0,52	0,62

^[1] For Mesokosme 1A ble siste måling utført dag 14. Dag 14 ble vannprøven tatt fra mesokosmens overflate (ikke integrert)

^[2] Verdien er målt fra nullprøve, tatt i Hopavågen (0-10 m) før mesokosmene ble fylt

* Prøven ble oppkonsentrert før måling.

13 Vedlegg G Pigmentkonsentrasjoner av zeaxhating og klorofyll *b*

Tabell 14: Konsentrasjon av zeaxanthin ($\mu\text{g L}^{-1}$) i de ulike mesokosmene for ulik tid. Dag 0 ble prøven tatt utenfor mesokosmene.

	D06M1AR1	D06M1BR1	D06M2R1	D06M3AR1	D06M3BR1	D06M4R1	D06M5AR1	D06M5BR1	D06M6R1	D06M7AR1	D06M7BR1	D06M8R1
0	spor											
6	0,070	0,061	spor	spor	spor	spor	0,047	0,046	0,045	0,054	0,088	0,074
10	spor	spor	0,023	spor	spor	spor	0,030	spor	spor	spor	spor	spor
12	0,030	0,027	0,030	spor	spor	spor	0,027	0,028	spor	spor	spor	0,027
16	spor	spor	spor	0,030	spor	spor	spor	0,047	spor	spor	spor	spor
18	spor	spor	spor	spor	0,028	spor	spor	0,029	spor	spor	spor	spor

Tabell 15: Konsentrasjon av klorofyll *b* ($\mu\text{g L}^{-1}$) i de ulike mesokosmene for ulik tid. Dag 0 ble prøven tatt utenfor mesokosmene.

	D06M1AR1	D06M1BR1	D06M2R1	D06M3AR1	D06M3BR1	D06M4R1	D06M5AR1	D06M5BR1	D06M6R1	D06M7AR1	D06M7BR1	D06M8R1
0	0,232	0,232	0,232	0,232	0,232	0,232	0,232	0,232	0,232	0,232	0,232	0,232
6	0,133	0,154	0,129	0,156	0,094	0,106	0,111	0,130	0,143	0,129	0,191	0,112
10	spor	spor	spor	spor	spor	spor	spor	spor	spor	spor	spor	spor
12	spor	0,040	0,042	0,051	spor	spor	spor	0,041	0,039	spor	spor	spor
16	spor	0,043	0,078	0,037	spor	spor	spor	spor	spor	spor	0,059	0,236
18	spor	0,091	spor	spor	spor	spor	spor	0,062	0,047	spor	spor	0,073