

En spektralanalys av samspelet mellan *Artemia salina* och *Nannochloropsis salina* samt potentiella tillämpningar på algbloomning i Östersjön



Katedralskolan, Lund

Daniel Ekelund, Jacob Hertze Hansson och Hampus Serneke

Naturvetenskaplig specialisering - Experimentell biologi

Handledare: Karl-Niklas Hult

2020/2021

Abstract

Due to its meager biodiversity and heavy reliance on a few keystone species, The Baltic Sea is alarmingly susceptible to harmful trophic cascades as a result of environmental changes, such as disproportionate algal blooms caused by eutrophication and overfishing. Eutrophication as a cause of algal blooms has been largely studied and so the focal point of this study is to examine the relationship between algal blooms and overfishing, utilizing the microalgae *N. salina* and the brine shrimp *A. salina* as model species. As was hypothesized, a significant decrease in population of *N. salina*, as a function of the concentration of *A. salina*, was found through spectral analysis. The results reinforce the theories of top-down- and bottom-up-control as well as highlight the significance of overfishing as a major contributing factor to HABs (Harmful Algal Blooms). Furthermore, a method was developed to determine the respective concentrations of two distinct solutions, given only the spectral analysis of the two solutions combined. The accuracy of the method was tested on a multitude of combinations of different concentrations of beetroot juice and *N. salina*. The predictions yielded by the model were compared to the concentrations of the solutions, and proved to be statistically accurate with an error of 2.6%. In addition, the method was theorized to be able to determine the concentrations of an arbitrary number of solutions. As a result, the method was proposed as a way of measuring the population sizes of numerous species simultaneously in aquatic ecosystems.

1. Inledning

1.1 Bakgrundsteori

1.1.1 Artemia Salina

Artemia salina, i vardagligt tal kallad saltkräfta, är ett ryggradslöst djur tillhörande understammen crustacea, eller kräftdjur, och ordningen anostraca, som lever i salina inlandsvatten över alla världsdelar (1)(2)(3). Då *A. salina* har gröna alger som sin främsta födokälla (2), samt beskrivs vara en mycket god modellorganism för biologiska, inte minst ekologiska, tester som symboliserar ett större sammanhang (4), är det lämpligt att arten även i detta försök används som modellorganism för undersökandet av hur olika arter i Östersjön samverkar och bidrar till önskad algbloomning. *A. salina* är även tålig för en del toxiska substanser och kemikalier samt förändringar i salinitet (4), men där 35-40 ppt är det optimala för kläckning av dess cystor (5), som för övrigt har möjligheten att vid otillräckliga förhållanden gå in i en diapaus, fram tills miljön och förutsättningarna åter blir optimala (6).

1.1.2 Nannochloropsis Salina

Nannochloropsis salina är en grön mikroalg som tillhör släktet *Nannochloropsis*. Sedan 2015 klassificeras dock *N. salina* tillsammans med *N. gaditana* som typer av ett nytt släkte, *Microchloropsis* (7). *Nannochloropsis salina* kan därmed ses som synonym till *Microchloropsis salina* då båda namn fortfarande är godkända (8). För enkelhetens skull kommer dock arten att hänvisas till som *N. salina* härnäst. Arterna inom släktet *Nannochloropsis* varierar inom föredragen miljö och kan hittas i sötvatten, bräckt vatten och saltvatten. *N. salina* är klassificerad som en marin alg men tål dock förändringar i salinitet. Algen överlever i lösningar med salthalter mellan 20 och 50 ppt. *N. salina* har maximal tillväxt och produktion av bland annat protein vid en salthalt på 40 ppt men har en alltför hämmad tillväxt för att överleva i lösningar med salinitet mellan 0-10 ppt (9).

1.1.3 Östersjön

Östersjön är ett avgränsat havsområde av Atlanten med en salthalt på 2-3‰ vid ytvattnet. Havet är relativt ungt och var länge en insjö med sötvatten. Artomfånget i Östersjön är mycket fattigt då få arter har hunnit anpassa sig till förändringen från sjö till hav. Östersjön lider av allvarliga miljöproblem som övergödning, algbloomningar, bottendöd och överfiske (10).

1.1.3.1 Ekosystem - förändringar och förklaringar

Inom ekologin talar man om abiotiska (icke-levandes påverkan på natur och miljö) och biotiska (liv/levande påverkan) faktorerers samverkan med benämningen ekosystem. Ett ekosystem är ett mer eller mindre slutet ekologiskt system som omfattar allt levande samt deras levnadsområden (11), och som karakteriseras genom specifika energiflöden inom främst näringsvävar (i mindre fall endast näringskedjor) från primärproducenter till toppkonsumenter (12). Flödet sker genom trofinivåer där varje nivå utgörs av en eller flera olika arter, som var och en har sin plats i systemet beroende på hur dess samverkan med omgivningen ser ut. Denna samverkan kan vara mer eller mindre viktig, där arterna med allra störst vikt och påverkan utgör nyckelarter. Alla ingående arter bidrar dock till att systemets balans upprätthålls (13)(14).

Vanligast är att man pratar om två modeller och former av kontrollerande faktorer av denna balans: top-down- samt bottom-up-kontroll (15). Top-down-kontroll innebär att det är toppkonsumenter - predatorerna - som kontrollerar biomassan i nedre trofinivåer genom att dels direkt konsumera andra arter och därmed förändra deras populationsstorlekar, vilket i sin

tur indirekt påverkar nästkommande steg i näringsväven, samt dels att det under olika omständigheter sker en egen populationsminskning och därmed bildas ett minskat predationstryck, vilket får omvända följder jämfört med tidigare (14)(15). Bottom-up-kontroll börjar i motsatt ände och bygger på att populationsstorlekar samt biomassan i ett ekosystem både direkt och indirekt, likt top-down-kontrollen, regleras, men här av primärproducenterna (14)(15). De två reglagen anses vara en naturlig process som utvecklar och stabiliserar ekosystemet i den utsträckning som krävs (14). Under olika omständigheter, oftast till följd av någon yttre påverkan, kan denna balans, det vill säga det stabila energiflödet i näringsväven, rubbas och medföra delvis eller totalt kollapsade ekosystem med förändrade och nya ofta utarmade funktioner och en försämrad biologisk mångfald (12)(16). Större förändringar kring arter och deras påverkan i ett sådant scenario kallas för regimskiften, vilket kortfattat innebär att nya arter täcker upp för och ersätter de tidigare (17). Yttre faktorer som påverkar exempelvis marina ekosystemen kan utgöras av förändringar i vattenkvalitet, med salinitet och andel kemikalier, främst potentiella näringsämnen, i blickfånget och/eller aktivt borttagande av individer från populationer, exempelvis genom fiske (18).

Beroende på ekosystemets karaktär, det vill säga vilken sorts kontroll som råder och därmed vilka arter som är viktiga för bibehållen balans, kan påverkan leda till något som kallas för en trofisk kaskad (18)(19). En trofisk kaskad är ett händelseförlopp där en populationsförändring i en tongivande trofinivå, oftast en sådan som styr något av de nämnda kontrollkoncepten, förändras, vilket genom en dominoeffekt kan påverka så mycket som ett helt ekosystem (19). Värt att nämna är dock att en trofisk kaskad, i drastiska fall, även kan inträffa under naturliga förhållanden i ekosystem, det vill säga att det blir den faktiska reaktionen från något av naturens nämnda reglagesystem (12). Med andra ord har en trofisk kaskad med nödvändighet inte negativ innebörd, även om detta som tidigare nämnt ofta är en början till kollapsande ekosystem (12).

1.1.3.2 Algbloomning

Algbloomning är ett naturligt förekommande fenomen som innebär en kraftig ökning av planktonalger eller bakterier i stora vattensamlingar. Stora ansamlingar av främst kiselalger, dinoflagellater och cyanobakterier växer fram nära vattenytan där de har en god tillgång till solljus för fotosyntes. Algbloomningar är en del av det naturliga ekosystemet i många hav och sjöar och brukar försvinna när djurplankton äter upp dem. Dock har mänsklig påverkan lett till abnorma förhållanden mellan djur- och växtplankton i hav och sjöar och en ökning av giftiga och skadliga HABs (Harmful Algal Blooms) (20). Idag är algbloomning ett av de största problemen i världens hav och kostar miljontals årligen (21).

Flera naturliga faktorer påverkar algbloomning, som till exempel vindstyrka och temperatur och vid stilla vindar och höga temperaturer frodas algbloomningar. Den globala uppvärmningen har därför varit en bidragande faktor till att algbloomningar på senare år har vuxit ur kontroll (22)(23). Det finns många andra fall där mänsklig påverkan har bidragit till ökningen av algbloomningar, som till exempel övergödning. När en alltför stor mängd av näringsämnen, framför allt kväve och fosfor, tillförs till haven ökar tillväxten av alger kraftigt och rubbar ekosystemen i havet (24). Även överfiske leder till stora algbloomningar. När till exempel för stora mängder torsk fiskas upp från Östersjön ökar antalet småfisk, som torsken vanligtvis hade ätit. Ökningen av småfisk leder till minskningen av djurplankton, vilket i sin tur slutgiltigen leder till ökningen av växtplankton och därmed algbloomningar.

Vid extrema algbloomningar bildas ett tjockt lager av alger vid vattenytan och vattnet kan ofta missfärgas. Vissa algbloomningar kallas vardagligt för "red tides" då den extrema ansamlingen av röda alger färgar stora delar av havet rött. Andra algbloomningar, som främst består av cyanobakterier, bildar giftiga toxiner och bör därför undvikas av djur och människor (22). Algbloomningar är inte bara en hälsorisk utan kan även bidra till bland annat bottendöd.

Bottendöd är områden där stora algbloomingar, som slutligen dör, sjunker ner till botten och bryts ner. Under nedbrytningsprocessen förbrukar destruenterna stora mängder syre löst i vattnet och det skapas syrefattiga områden där fiskar och andra organismer inte kan överleva (25). Algbloomingar kan även blockera solljus från att nå ner i vattnet.

1.2 Syfte

Med en ökad oro för skadliga algbloomingar i bland annat Östersjön, delvis på grund av överfiske, förklarar genom top-down/bottom-up modellen, utfördes denna studie med det främsta syftet att kartlägga signifikansen av hur minskningen av organismer med alger som föda påverkar ökningen av algbloomingar. Ytterligare ett mål med studien var att ta fram en metod som, utifrån en enda spektralanalys av en homogen blandning bestående av två olika lösningar, entydigt kan bestämma de två lösningarnas respektive koncentrationer. En sådan metod utvecklades i syfte att enkelt kunna uppskatta populationsstorlekar hos arter i vattendrag.

1.3 Frågeställning

Hur påverkas koncentrationen *Nannochloropsis Salina* (mätt som styck per milliliter) av koncentrationen *Artemia Salina* (mätt som styck per milliliter) under konstant ljusflöde (5000 lm/m²), konstant temperatur (17,5 °C) efter 24 respektive 72 timmar?

1.4 Hypoteser

H₀: Populationen *Nannochloropsis Salina* som utsätts för *Artemia Salina* kommer INTE att skilja sig till antalet per milliliter från populationen *Nannochloropsis Salina* som inte utsätts för *Artemia salina*.

H₁: Populationen *Nannochloropsis Salina* som utsätts för *Artemia Salina* kommer att skilja sig till antalet per milliliter från populationen *Nannochloropsis Salina* som inte utsätts för *Artemia salina*.

2. Metod

2.1 Undersökning 1

2.1.1 Grundläggande förberedelser

För att följande undersökning ska kunna utföras på ett korrekt och strukturerat vis krävs specifika grundliga förberedelser. Denna preparering gäller främst ett odlande och därtill bibehållande av de två kulturerna och populationerna som krävs för i försöket, nämligen *N. salina* och *A. salina* (Populationen *A. salina* beräknades till 345 st/1000 µl genom stickprov). På så sätt förbereddes en näringslösning som skulle stå till grund för vardera kommande population. Näringslösningen till *N. salina* förbereddes genom att 100 ml destillerat vatten fördes över till en steriliserad bägare med en kapacitet på 250 ml. Till denna tillsattes 100 µl NaH₂PO₄, 50 µl vitaminer (Vitamin B₁, Vitamin B₁₂, Biotin), 100 µl spårmetaller (CuSO₄, ZnSO₄, Ma₂MoO₄, MnCl₂, CoCl₂), 100 µl NaNO₃ och 2,16 g havssalt. Havssaltet vägdes upp genom att det med en sked placerades i ett vågskepp på en kalibrerad våg (± 0,01 g) medan resterande ämnen tillsattes genom en mikropipett (100-1000 µl). Tillsatta ämnen löstes genom omrörande med en glasstav. Till lösningen tillsattes en startkultur alglösning innehållande vatten och *N. salina*. Lösningen placerades under en ljuskälla på 5000 lm/m² som försedde algerna med ett konstant ljusflöde. Lösningen tillhörande *A. salina* förbereddes genom att 1 liter destillerat vatten överfördes till en steriliserad bägare med en kapacitet på 5 liter. Med hjälp av samma våg, vågskepp och sked som tidigare mättes 35 g havssalt upp och

tillsattes sedan till vattnet. Saltet löstes upp genom omrörande med en glasstav. Till lösningen tillsattes $0,18 \pm 0,01$ g cystor av *A. salina*. Förberedelserna av båda kulturerna utfördes en vecka innan laborationstillfället. Andra mindre förberedande åtgärder som utfördes på dagen för utförandet av undersökningen var framtagande och steriliserande om så behövdes av nödvändigt material.

2.1.2 Genomförande

Försöket påbörjades med att 800 ml destillerat vatten och 28 g havssalt från Röda havet överfördes till en steriliserad bägare med kapacitet på 5 liter. Saltet löstes upp genom omrörning med en glasstav. Från saltlösningen tillfördes 45 ml i tre omgångar av 15 ml vardera till en steriliserad bägare med en kapacitet på 100 ml. Från lösningen med *A. salina* överfördes 15 ml till samma bägare. Lösningen blandades med en glasstav. Från den nya lösningen överfördes 15 ml till en ny steriliserad bägare, även den med en kapacitet på 100 ml. Från saltlösningen tillsattes till bägaren 45 ml i tre omgångar av 15 ml lösning. Processen upprepades ytterligare 3 gånger. Det skapades med andra ord en spädningsserie av lösningen med koncentrationerna 100%, 25%, 6,25%, 1,56% samt 0,391% av den ursprungliga lösningen *A. salina* (se tabell 1 i bilagorna). Från varje bägare från spädningsserien tillfördes 10 ml lösning till 5 unika bägare med en kapacitet på 100 ml, det vill säga 25 st totalt. Till varje bägare tillfördes 10 ml av den tidigare förberedda lösningen med *N. salina*. Ytterligare 5 bägare av samma typ fylldes med lösningen, men denna gången av 20 ml i två omgångar av 10 ml vardera. De här bägarna utgör kontrollgruppen. För att förtydliga har 5 olika försöksgrupper samt en kontrollgrupp innehållande 5 repetitioner skapats, där grupp nummer 1 utgörs av 100% ursprunglig lösning *A. salina*, nummer 2 av 25%, nummer 3 av 6,25%, nummer 4 av 1,56% och nummer 5 av 0,391%. Dessa grupper benämns som "koncentrationsgrupper". Samtliga uppmätningar av volymer gjordes med hjälp av vollpipetter ($15 \pm 0,1$ ml, $10 \pm 0,1$ ml) om inget annat nämndes. Observera att en och samma vollpipett endast användes för en viss lösning med en viss koncentration.

2.1.3 Spektrofotometrisk analys

Till en kyvett med längden 1 cm överfördes 2 ml 3,5%-saltvatten med hjälp av en mikropipett (100-1000 μ l) som användes som blankprov vid spektralanalys med en spektrofotometer. Med detta värde som grund upprepades föregående process för varje försöksgrupp samt för kontrollgruppen (från alla 5 repetitioner från varje försöksgrupp samt kontrollgruppen, det vill säga 30 st totalt). Samma kyvett som användes vid blankprovet användes för samtliga upprepningar. Efter varje försök hälldes de olika lösningarna tillbaka till respektive bägare. Bägarna placerades därefter under en ljuskälla på 5000 lm/m² och hela processen repeterades ytterligare två gånger, en gång efter 24 timmar samt en efter 72 timmar.

2.1.4 Sammanställning och bearbetning av data

Medelvärden och standardavvikelser för integralen av absorptionsen med avseende på våglängden i intervallet 675-685 nm för samtliga försök efter 24h och 72h togs fram i Excel. Ett stapeldiagram skapades också för att visualisera resultatet. Med Excel-tillägget "Data Analysis" utfördes även ett ANOVA-test över samtliga koncentrationsgrupper, och ett tvåsidigt homoskedastiskt Student's T-test utfördes över koncentrationsgrupp 1 och 5. Signifikansnivån bestämdes till $\sigma = 0.001$.

2.2 Undersökning 2: Den kvantitativa metoden

2.2.1 Insamling av data till metoden

Vår andra metod påbörjades med att 1600 ml destillerat vatten och 56 g havssalt från Röda havet överfördes till en steriliserad bägare med en kapacitet på 5 liter. Saltet löstes upp genom omrörning med en glasstav. Från lösningen med *N. salina* tillfördes 50 ml till en steriliserad bägare med en kapacitet på 100 ml genom två omgångar med 25 ml vardera. Från denna bägare överfördes 20 ml lösning till ytterligare en likartad bägare. Till samma bägare överfördes 30 ml saltlösning genom två omgångar av 15 ml. Lösningen i bägaren rördes om med hjälp av en glasstav. Från denna bägare överfördes sedan 20 ml till en ny likartad steriliserad bägare. Till denna tillsattes 30 ml saltlösning genom två omgångar med 15 ml lösning, och rördes därefter om med hjälp av en glasstav. Processen upprepades ytterligare 2 gånger, vilket skapade en spädningsserie av lösningen som minskade med 40% i varje steg, enligt följande: 100%, 40%, 16%, 6,4% och 2,56%. Ytterligare en liknande spädningsserie utfördes, men där lösningen späddes till 75% av tidigare lösning vid varje spädning. Detta gjordes på samma sätt som föregående, med skillnaden att det istället togs 90 ml lösning från tidigare bägare i varje steg och tillfördes 30 ml saltlösning. Detta skapade en spädningsserie med koncentrationerna 100%, 75%, 56,25%, 42,19% och 31,64% av den ursprungliga lösningen. I tillägg till detta utfördes ytterligare en spädningsserie som istället minskade till 25% av tidigare lösning vid varje spädning. Utförande var likt tidigare identiskt, med den enda skillnaden att det överfördes 10 ml lösning från tidigare bägare i varje steg samt att 30 ml saltlösning tillfördes i varje steg. Det bildades därmed en spädningsserie med koncentrationerna 100%, 25%, 6,25%, 1,56% samt 0,391% av den ursprungliga lösningen. Anledningen att mängden baslösning varierade mellan 50, 120 och 40 ml för varje spädningsserie var för att målet var att varje bägare efter spädning skulle uppmäta en volym på 30 ml, vilket skapades lättast med hjälp av denna metod. Spädningsserierna för 75% och 40% upprepades ytterligare en gång, men där lösningen utgjordes av koncentrerad rödbetsjuice istället för en *N. salina*. Ytterligare en spädningsserie för 25% skapades, men med en lösning med *A. salina*. Samtliga uppmätningar av volymer gjordes med hjälp av vollpipetter ($25 \pm 0,1$ ml, $20 \pm 0,1$ ml, $15 \pm 0,1$ ml, $10 \pm 0,1$ ml) om inget annat nämndes. Observera att en och samma vollpipett endast användes för en viss lösning med en viss koncentration. Av alla olika koncentrationer av varje lösning utfördes en spektralanalys, med samma metod som förklarades ovan.

2.2.2 Databehandling

De uppmätta absorptionskurvorna till de olika koncentrationerna av de olika lösningarna (inneållande *N. salina*, rödbetsjuice respektive *A. salina*) plottades i en tredimensionell graf med axlarna: våglängd, absorptions och koncentration. Graferna benämndes som de respektive lösningarnas "absorptionsrum", och dessa absorptionsrum visualiserades med Python-libraryt "matplotlib".

Integralen på absorptionsen med avseende på våglängden i intervallet 380-780nm beräknades för samtliga koncentrationer av de olika lösningarna, och för samtliga lösningar plottades den beräknade integralen i förhållande till lösningens koncentration. Den bäst anpassade linjen till grafen, utifrån den minsta kvadratmetoden, togs fram med Python-libraryt "Statsmodels", och determinationskoefficienten (R^2) samt p-värdet till korrelationen mellan variablerna beräknades. Detta gjordes för att etablera huruvida sambandet mellan en koncentrations lösning och dess ackumulerade absorptions var linjärt.

Därefter användes datan från absorptionsrummen för att träna den "kvantitativa metoden". Den kvantitativa metoden gick ut på att med en spektrofotometrisk analys, utifrån en homogen blandning av två olika lösningar med olika koncentrationer, entydigt bestämma de

respektive lösningarnas koncentrationer. Det grundläggande antagandet som gjordes var att då två lösningar blandas i förhållandet 1:1, kommer den resulterande absorbanskurvan för blandningen att vara lika med summan av de respektive absorbanskurvorna till de då 50% utspädda lösningarna. Med "summan" av två absorbanskurvor avses den absorbanskurva som för varje våglängd är sådan att absorbansen för våglängden är lika med summan av de två absorbanskurvornas respektive absorbans för våglängden. För en godtycklig våglängd ν gäller då att

$$A_{\nu} = f_{\nu}(x_1) + g_{\nu}(x_2)$$

där $f_{\nu}(x_1)$ respektive $g_{\nu}(x_2)$ avser absorbansen för våglängden ν för den första respektive andra absorbanskurvan och A_{ν} avser den resulterande absorbansen för ν .

För absorbansrummet till *N. salina* respektive rödbetsjuicen togs det sedan för varje våglängd fram en funktion f_{ν} respektive g_{ν} till absorbansen beroende av de respektive koncentrationerna x_{salina} och $x_{rödbeta}$. En regressionsanalys i "statsmodels" erhöll att de bäst anpassade funktionerna blev linjära och kunde skrivas på formen

$$\begin{aligned} f_{\nu}(x_{salina}) &= k_{salina, \nu} \cdot x_{salina} + m_{salina, \nu} \\ g_{\nu}(x_{rödbeta}) &= k_{rödbeta, \nu} \cdot x_{rödbeta} + m_{rödbeta, \nu} \end{aligned}$$

där konstanterna $k_{salina, \nu}$, $m_{salina, \nu}$, $k_{rödbeta, \nu}$, $m_{rödbeta, \nu}$ för varje ν bestämdes med den minsta kvadratmetoden. Enligt den förstnämnda satsen gällde då att

$$\begin{aligned} A_{\nu} &= k_{salina, \nu} \cdot x_{salina} + m_{salina, \nu} + k_{rödbeta, \nu} \cdot x_{rödbeta} + m_{rödbeta, \nu} \\ &\Leftrightarrow \\ x_{rödbeta} \cdot (k_{rödbeta, \nu} / k_{salina, \nu}) + x_{salina} &= (A_{\nu} - m_{salina, \nu} - m_{rödbeta, \nu}) / k_{salina, \nu} \\ &\Leftrightarrow \\ x_{rödbeta} \cdot p_{\nu} + x_{salina} &= q_{\nu} \end{aligned}$$

där konstanterna $p_{\nu} = k_{rödbeta, \nu} / k_{salina, \nu}$ och $q_{\nu} = (A_{\nu} - m_{salina, \nu} - m_{rödbeta, \nu}) / k_{salina, \nu}$. Då detta gällde för varje ν i det synliga ljusspektrat erhöles ekvationssystemet

$$\begin{aligned} x_{rödbeta} \cdot p_{380} + x_{salina} &= q_{380} \\ x_{rödbeta} \cdot p_{381} + x_{salina} &= q_{381} \\ x_{rödbeta} \cdot p_{382} + x_{salina} &= q_{382} \\ &\vdots \\ x_{rödbeta} \cdot p_{780} + x_{salina} &= q_{780} \end{aligned}$$

De bestämda värdena på p och q betraktades sedan som koordinater i ett koordinatsystem, och den bäst anpassade linjen till punkterna (p, q) togs fram med "statsmodels". $x_{rödbeta}$ blev

då linjens k -värde, och x_{salina} linjens m -värde. Det gick således att, utifrån en resulterande absorbanskurva bestående av de bestämda punkterna (ν, A_ν) , approximera koncentrationen x_{salina} respektive $x_{rödbeta}$.

För att undersöka huruvida denna metod fungerar i praktiken, undersöktes metodens förmåga att approximera koncentrationerna med ett experiment.

2.2.3 Test av den kvantitativa metoden

När detta färdigställdes användes spädningsserierna för 40% och 75%, omfattande både *N. salina* och rödbetsjuice, för att testa den kvantitativa metod vi utvecklade. Fyra rutnät i form av 25 steriliserade bägare med en kapacitet på 100 ml vardera ställdes upp i en 5x5-formation. Till varje bägare tillfördes 10 ml homogent blandad lösning med hjälp av en mikropipett (100-1000 μ l), detta från en "horisontell" och en "vertikal" spädningsserie. Metodiken här var att 5 ml från varje specifik koncentration från den "horisontella" spädningsserien fylldes i de fem bägarna i respektive koncentrations kolumn, samtidigt som ytterligare 5 ml från den "vertikala" spädningsserien överfördes till de fem bägarna i respektive koncentrations rad. Detta skapade med andra ord den homogent blandade lösningen. Begreppen "horisontell" och "vertikal" syftar till vilken sida av rutnätet spädningsserien utgår ifrån. Alla olika kombinationer av spädningsseriernas placering testades, därav antalet rutnät. Lösningarna i bägarna undersöktes därefter med en spektrofotometer och den kvantitativa metoden tillämpades på de erhållna absorbanskurvorna för att approximera lösningarnas koncentration av *N. salina* respektive rödbetsjuice. De äkta koncentrationerna beräknades sedan för varje bägare utifrån deras position i rutnätet. Därefter jämfördes de uppskattade koncentrationerna med de äkta koncentrationerna genom att först plotta de respektive storheterna i ett koordinatsystem och sedan ta fram den bäst anpassade linjen till punkterna. Den bäst anpassade linjen till grafen utifrån den minsta kvadratmetoden togs fram med "Statsmodels", och determinationskoefficienten samt p -värdet till korrelationen mellan variablerna beräknades. Det procentuella felet för den kvantitativa metoden plottades även i förhållande till koncentrationen *N. salina* och koncentrationen rödbetsjuice med "matplotlib".

2.3 Den kvantitativa metoden tillämpad på försöket i Undersökning 1

Slutligen tillämpades den kvantitativa metoden på resultaten från den första undersökningen för att bestämma de exakta koncentrationerna av *N. salina* respektive *A. salina* för samtliga försök. Koncentrationerna redovisades i ett spridningsdiagram. Medelvärde och standardavvikelsen på de uppskattade koncentrationerna beräknades sedan för varje koncentrationsgrupp. Det utfördes även ett ANOVA-test över samtliga koncentrationsgrupper, och ett tvåsidigt heteroskedastiskt Student's T-test utfördes över koncentrationsgrupp 1 och 5. Signifikansnivån bestämdes till $\sigma = 0.001$.

3. Resultat

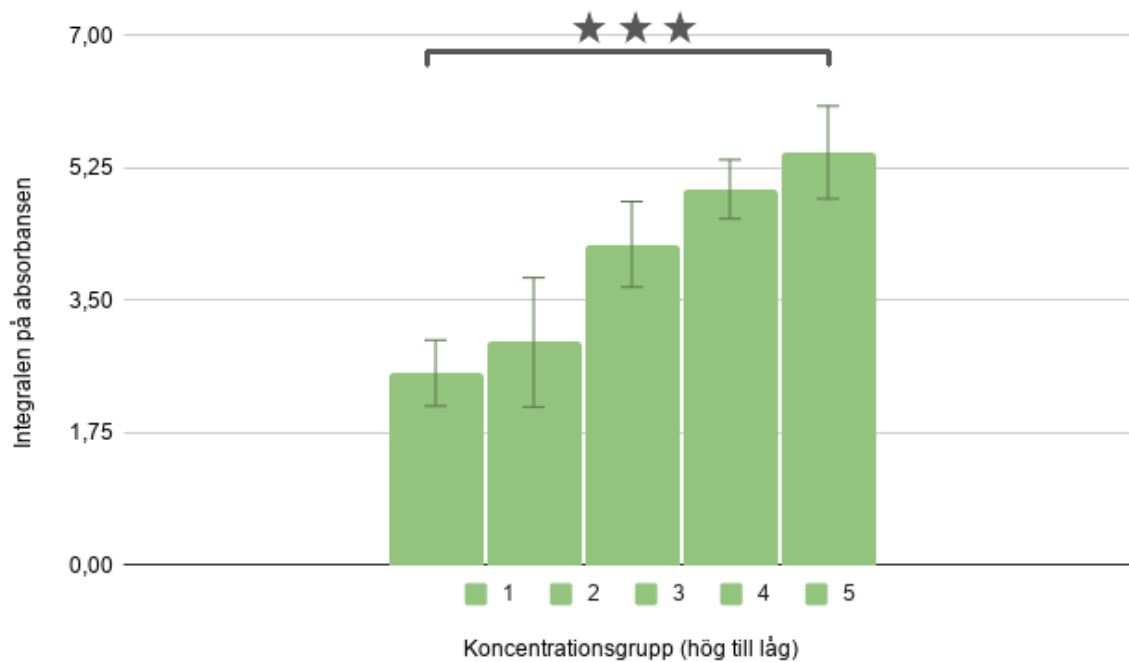
Tabell 1. Integralen på absorbansen med avseende på våglängden i intervallet 675-685nm efter 24h.

	Koncentrationsgrupp (<i>Artemia salina</i>)				
Försöks nr.	1 (hög)	2	3	4	5 (låg)
1	2,662	2,520	2,491	2,869	2,870
2	2,401	2,673	2,683	2,716	2,784
3	1,845	2,639	2,705	2,700	2,835
4	2,786	3,372	2,693	2,726	2,772
5	2,914	2,462	2,677	2,724	2,752
Medelvärde	2,522	2,734	2,650	2,747	2,803
Std. avv.	0,423	0,367	0,089	0,069	0,049
ANOVA	p = 0,478				

Tabell 2. Integralen på absorbansen med avseende på våglängden i intervallet 675-685 efter 72h.

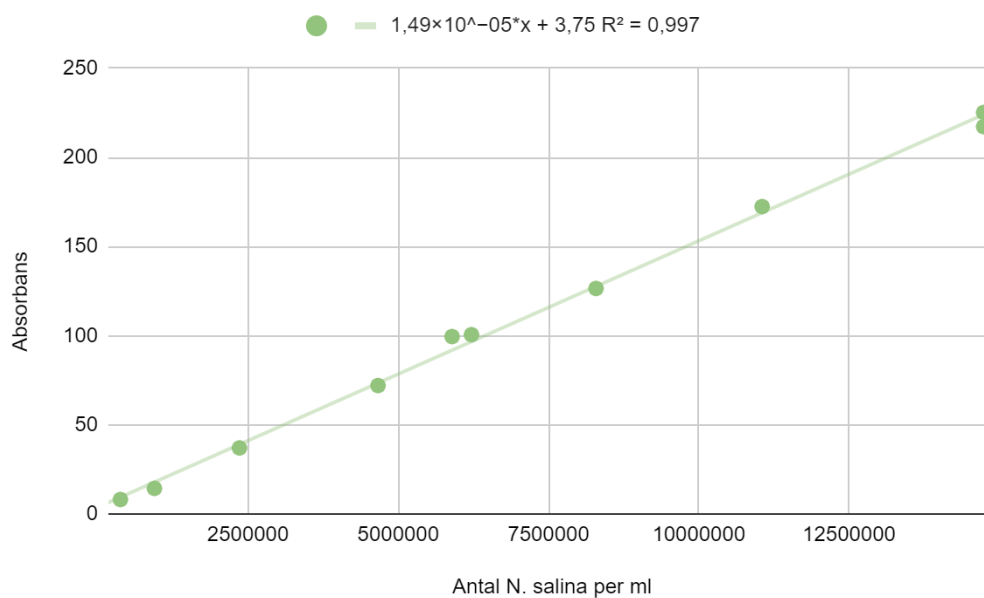
	Koncentrationsgrupp (<i>Artemia salina</i>)				
Försöks nr.	1 (hög)	2	3	4	5 (låg)
1	1,968	3,035	3,631	5,343	5,905
2	2,391	2,461	4,657	4,841	5,091
3	2,772	2,441	4,720	4,752	6,202
4	2,678	4,307	4,131	5,279	4,952
5	2,877	2,465	4,045	4,613	5,108
Medelvärde	2,537	2,942	4,237	4,966	5,452
Std. avv.	0,366	0,803	0,454	0,326	0,562
ANOVA	p = $2,56 \cdot 10^{-7}$				

Tabell 1 visar att medelvärdet på integralen på absorbansen i intervallet 675-685 nm strängt ökar då koncentrationen *A. salina* minskar efter 24h. Det framgår även att ANOVA-testet erhöill ett p-värde på 0,478. I tabell 2 framgår det att medelvärdet på integralen på absorbansen i intervallet 675-685 nm strängt ökar då koncentrationen *A. salina* minskar efter 72h. Det framgår även att ANOVA-testet erhöill ett p-värde på $2,56 \cdot 10^{-7}$. Det tvåsidiga oberoende homoskedastiska T-testet över koncentrationsgrupp 1 och 5 erhöill ett p-värde på $4,34 \cdot 10^{-5}$.



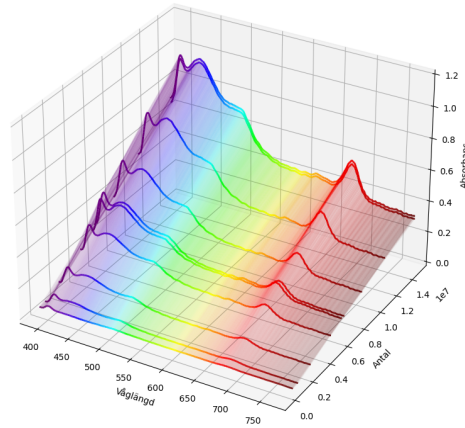
Figur 1. Integralen på absorbansen med avseende på våglängden i intervallet 675-685 nm efter 72h för respektive koncentrationsgrupp (från vänster till höger från går koncentrationen *A. salina* från hög till låg)

I figur 1 framgår det att medelvärdet på integralen på absorbansen i intervallet 675-685nm efter 72h är strängt växande med avseende på koncentrationsgruppens ordning. Standardavvikelseerna som felstaplarna representerar överlappar inte för koncentrationsgrupp 1 och 5.

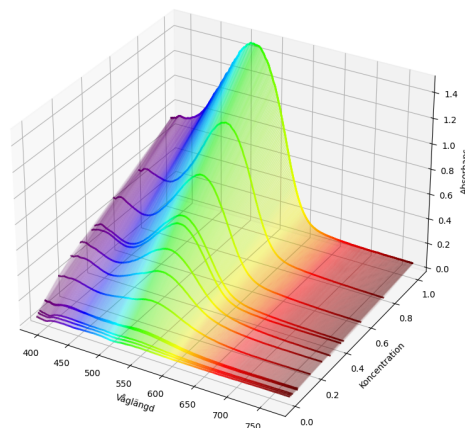


Figur 2. Integralen på absorbansen med avseende på våglängden i intervallet 380nm-780nm som en funktion av antalet *N. salina* per ml.

Figur 2 visar att det finns en positiv linjär korrelation mellan integralen på absorbansen med avseende på våglängden i intervallet 380nm-780nm för antalet *N. salina* per ml, med determinationskoefficienten (R^2) 0.997. Korrelationen har p-värdet $2.11 \cdot 10^{-11}$.

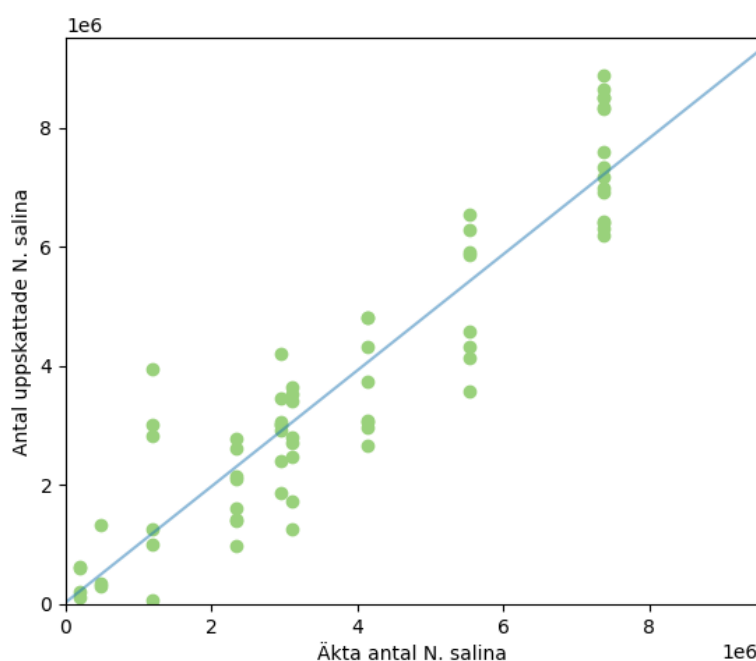


Figur 3. *N. salinas* absorbansrum (Absorbanskurvan som en funktion av antalet *N. salina* per ml)



Figur 4. Rödbetsjuicens absorbansrum (Absorbanskurvan som en funktion av andelen av rödbetsjuicens stamlösningens koncentration)

Figur 3 illustrerar att det finns ett positivt linjärt samband för *N. salinas* absorbanskurva och antalet *N. salina* per ml. Figur 4 visar att det finns ett positivt linjärt samband för rödbetsjuicens absorbanskurva och andelen av rödbetsjuicens koncentration i förhållande till koncentrationen för dess stamlösning.



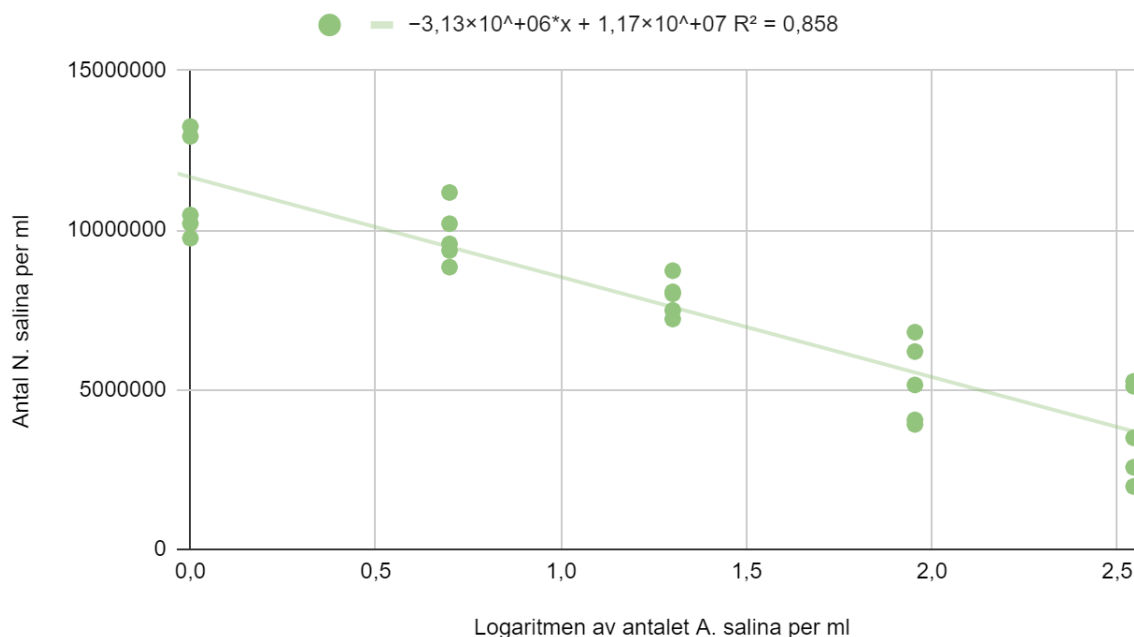
Figur 5. Den kvantitativa metodens uppskattade antal *N. salina* per ml som funktion av det faktiska antalet *N. salina*.

Figur 5 visar att det finns en positiv linjär korrelation mellan metodens uppskattade antal *N. salina* per ml och det äkta antalet *N. salina* per ml. Korrelation har en determinationskoefficient på 0.854 och ett p-värde på $2.69 \cdot 10^{-29}$. Den bäst anpassade linjen har ekvationen $f(x) = 0.974 \cdot x + 3,06 \cdot 10^{-4}$.

Tabell 3. Antalet uppskattade *N. salina* per ml efter 72h för respektive koncentrationsgrupp.

Försöks nr.	Antal <i>A. salina</i> per ml				
	350	90	20	5.0	1.0
1	5111180	6197144	8008634	11181851	12940362
2	5262552	4054373	8068832	9571582	10475399
3	1970516	3914381	8730060	9365433	13247653
4	3494880	6803262	7487783	10203642	9750573
5	2570254	5150416	7216716	8842995	10211077
Medelvärde	$3.7 \cdot 10^6$	$5.2 \cdot 10^6$	$7.9 \cdot 10^6$	$9.8 \cdot 10^6$	$11 \cdot 10^6$
Std. avv.	$1.5 \cdot 10^6$	$1.3 \cdot 10^6$	$5.8 \cdot 10^5$	$9.0 \cdot 10^6$	$1.6 \cdot 10^6$
ANOVA	p = 1,66E-08				

Tabell 3 visar att medelvärdet på antalet *N. salina* per ml strängt ökar då antalet *A. salina* per ml minskar, samt att standardavvikelse för koncentrationsgrupp 1 och 5 är sådana att medelvärdet för koncentrationsgrupp 5 subtraherat med dess standardavvikelse fortfarande är större än medelvärdet för koncentrationsgrupp 1 adderat med dess standardavvikelse. Det framgår även att ANOVA-testet erhölet ett p-värde på $1.67 \cdot 10^{-8}$. Det tvåsidiga oberoende heteroskedastiska T-testet över koncentrationsgrupp 1 och 5 erhölet ett p-värde på $5.85 \cdot 10^{-5}$.



Figur 6. Antalet *N. salina* per ml (approximerat av den kvantitativa) som funktion av logaritmen av antalet *A. salina* per ml efter 72h.

Figur 6 visar att det finns en negativ linjär korrelation mellan antalet *N. salina* per ml och logaritmen av antalet *A. salina* per ml. Korrelationen har determinationskoefficienten (R^2) 0.858 och p-värdet $1.59 \cdot 10^{-11}$.

4. Diskussion

Två undersökningar genomfördes för att undersöka huruvida en population med *Nannochloropsis Salina* som utsätts för *Artemia Salina* skiljer sig till antalet per milliliter från en population med *Nannochloropsis Salina* som inte utsätts för *Artemia salina*. Först ska vi utreda vilka slutsatser som går att dra från den första undersökningen. Därefter ska vi utvärdera giltigheten hos den kvantitativa metoden som utvecklades. Slutligen kommer vi att undersöka vilka slutsatser som går att dra efter att ha tillämpat den kvantitativa metoden på datan från den första undersökning.

4.1 Utvärdering av Undersökning 1

I tabell 1 framgår det att ANOVA-testet som utfördes på försöken efter 72h erhöll ett p-värde på $2.56 \cdot 10^{-7}$. Då p-värdet är mindre än den bestämda signifikansnivån ($\sigma = 0.001$), går det att med statistisk säkerhet konstatera att det finns en skillnad i absorbansen mellan de olika koncentrationsgrupperna i intervallet 675-685nm nm efter 72h. Denna utsaga stöds även av det faktum att T-testet som utfördes över den första koncentrationsgruppen och den femte koncentrationsgruppen erhöll p-värdet $4.34 \cdot 10^{-5}$, vilket också enligt den bestämda signifikansnivån är statistiskt signifikant. Därutöver minskar medelvärdet på integralen av absorbansen i intervallet då koncentrationen *A. salina* ökar, enligt figur 1. Däremot går det inte att konstatera huruvida populationen *N. Salina* har förändrats sinsemellan koncentrationsgrupperna. Detta beror på att även om integralen på absorbansen i intervallet har minskat, går det inte att urskilja om det är en minskning i populationen *N. Salina* eller *A. Salina* som har orsakat minskningen. Således är inte resultaten från den första

undersökningen, efter 72h, tillräckliga för att kunna förkasta nollhypotesen. Analogt gäller resonemanget även för undersökningen efter 24h.

4.2 Utvärdering av den kvantitativa metoden

Först och främst var en av den kvantitativa metodens förutsättningar att sambandet mellan absorbansen och koncentrationen för en given typ av lösning är linjärt. Resultatet som presenteras i figur 2 (samt figur 1 och 2 i bilagorna) visade att så var fallet, och att den linjära korrelationen var stark (med determinationskoefficienten 0,997) och mycket sannolik (med p-värdet $2.11 \cdot 10^{-11}$). Därutöver visar figur 5 att den bäst anpassade linjen till punkterna som representerar sambandet mellan de äkta antalet *N. salina* per ml och metodens uppskattade antal per ml hade ett k-värde på 0.974. Om metoden hade varit perfekt, hade linjen antagit k-värdet 1. K-värdet till linjen för metodens approximerade antal *N. salina* per ml avviker således endast med 2.6% från idealet, och då den linjära korrelationen var stark (med en determinationskoefficient på 0.854) och sannolik (med ett p-värde på $2.69 \cdot 10^{-29}$) går den kvantitativa metoden att betraktas som förhållandevis framgångsrik.

4.3 Utvärdering av den kvantitativa metoden tillämpad på försöket i Undersökning 1

I tabell 1 framgår det att ANOVA-testet som utfördes på försöken efter 72h erhöll ett p-värde på 0.478. Då p-värdet är större än den bestämda signifikansnivån ($\sigma = 0.001$) betraktas inte den sinsemellan skillnaden i absorbansen mellan koncentrationsgrupperna att vara statistiskt säker. Eftersom den kvantitativa metoden förutsätter att det finns en sådan statistiskt signifikant skillnad för att kunna bestämma huruvida det finns en skillnad i antalet *N. salina* per ml mellan två lösnigar, går det inte att med statistisk säkerhet förkasta nollhypotesen efter 24h.

I tabell 3 framgår det däremot att ANOVA-testet som utfördes över antalet uppskattade *N. salina* per ml efter 72h erhöll ett p-värde på $1.66 \cdot 10^{-8}$. Då p-värdet är mindre än den bestämda signifikansnivån, går det att med statistisk säkerhet konstatera att det finns en skillnad i antalet *N. salina* per ml mellan de olika koncentrationsgrupperna. Denna slutsats stöds även av det faktum att T-testet som utfördes över den första koncentrationsgruppen och den femte koncentrationsgruppen erhöll p-värdet $5.85 \cdot 10^{-5}$, vilket också enligt den bestämda signifikansnivån är statistiskt signifikant. Eftersom den kvantitativa metoden bedömdes vara trovärdig, går det således med statistisk säkerhet att förkasta nollhypotesen för försöket efter 72h. Därutöver går det utifrån figur 6 att konstatera att antalet *N. salina* per ml avtar strängt med avseende på antalet *A. salina* per ml, eftersom den logaritmiska funktionen är strängt växande och korrelationen mellan koncentrationen *N. salina* och logaritmen av koncentrationen *A. salina* mycket sannolikt är starkt negativt linjär (med p-värdet $1.59 \cdot 10^{-11}$ och determinationskoefficienten 0.858).

Sammanfattningsvis går det med statistisk säkerhet att dra slutsatsen att det efter 72h fanns en skillnad till antalet per ml mellan populationen *Nannochloropsis Salina* som utsattes för *Artemia Salina* och populationen *Nannochloropsis Salina* som inte utsattes för *Artemia salina*. Därutöver går det även att dra slutsatsen att antalet *N. salina* per ml minskade mer i försöken med ett högre antal *A. salina* per ml än de med ett lägre antal per ml. En rimlig förklaring till fenomenet är att *A. salina* konsumerar *N. salina* som föda. Denna slutsats stöds även av tidigare forskning (2).

4.4 Felkällor och förbättringar

A. salina är en organism som rör på sig förhållandevis mycket. Denna egenskap gör det problematiskt att mäta dess absorbanskurva i låga koncentrationer, då den ständigt förflyttar sig mellan olika skikt i lösningen samtidigt som spektrofotometern förutsätter att lösningen är statisk. Detta medför att spektralanalysen inte ger exakt samma absorbanskurva för en given lösning varje gång lösningen analyseras, utan det förekommer fluktuationer som beror på *A.*

salinas rörelse och position. Felkällan är slumpmässig och bidrar till en viss mätosäkerhet. Då den kvantitativa metoden är finkänslig och förutsätter att absorbanskurvan för en given art är konstant, försämrar detta metodens förmåga att korrekt uppskatta båda arters populationsstorlekar. Resultatet av felkällan är att spridningen på de uppskattade populationsstorlekarna ökar. En möjlig förbättring är att ersätta *A. salina* med en modellorganism som rör sig mindre.

Ytterligare en felkälla är att de *N. salina* som användes vid försöket hade en annan färg (normaliserad absorbanskurva) än de *N. salina* som användes för att träna modellen som den kvantitativa metoden utgår ifrån. Felet är systematiskt, och försämrar den kvantitativa metodens förmåga att uppskatta populationsstorlekarna då den inte hade en korrekt definition av det absorbansrum som försökets *N. salina* antog. Ett sätt att undvika felkällan är att träna modellen på exakt samma sats *N. salina* som också används i försöket.

Då modellen tränades för att uppskatta *A. salina* tränades den på en lösning som inte bara innehöll kläckta *A. salina*, utan även cystor. I det riktiga försöket hade däremot de flesta cystor kläckts vid mätningen efter 72h. Eftersom cystor och kläckta *A. salina* har olika absorbanskurvor, stämde modellens absorbansrum för *A. salina* inte överens med artens reella absorbansrum. Då modellen hade en felaktig definition av det absorbansrum som *A. salina* antog i försöket, försämrar dess förmåga att uppskatta populationsstorlekarna. En möjlig förbättringsmetod är att generalisera den kvantitativa metoden till att inte bara uppskatta två populationsstorlekar, utan ett godtyckligt antal. Detta är möjligt så länge antalet populationer som ska uppskattas är färre än eller lika med antalet våglängder som spektrofotometern mäter. Detta beror på att varje population utgör en variabel i varje ekvation som ingår i ett linjärt ekvationssystem, där antalet ekvationer som mest kan vara lika med antalet våglängder. Ett linjärt ekvationssystem med lika många obekanta variabler som icke-ekvivalenta och icke-kontradiktära ekvationer har alltid entydigt bestämda lösningar, och ett system med färre obekanta än ekvationer är alltid sådant att det med en regressionsanalys går att hitta en uppsättning lösningar som är sådana att de är bäst anpassade till systemet enligt en given förlustfunktion - i undersökningen är denne OLS. Det är alltså möjligt att utöka modellen till att innefatta ännu en dimension: cystans koncentration. Ett absorbansrum för cystan behöver isåfall också tas fram, på samma vis som absorbansrummen för *A. salina* och *N. salina* togs fram.

Ett problem med den kvantitativa metoden som används i undersökningen är däremot att det inte finns något som hindrar regressionsanalysen som utförs av "Statsmodels" att nå slutsatsen att den bäst anpassade trendlinjen enligt den minsta kvadratmetoden har ett negativt k-värde eller m-värde. Denna slutsats skulle göra resultatet absurt, eftersom den medför att någon av populationerna är negativ. För att förhindra att detta sker, bör en egen skräddarsydd implementering av regressionsanalysen göras - som utgår ifrån kravet att värdena måste vara positiva. Ett alternativ är att göra en fouriertransformation av den resulterande absorbanskurvan, och finna de positiva koefficienter till respektive fouriertransform av *N. salinas* respektive *A. salinas* absorbansrum som gör att deras summa blir lika med resultanten.

I figur 4 och 5 i bilagan framgår det att desto mindre storleken på storheten som den kvantitativa metoden ska uppskatta (densitet *N. salina* respektive andel rödbetsjuice) är, desto större blir det procentuella felet hos modellens uppskattning av storheten. Detta beror på den princip som framgår ur figur 3 och 4; då storheterna som undersöks minskar, absorberar de mindre ljus. Eftersom spektrofotometern har ett konstant mätfel då den mäter absorbansen för en given våglängd, kommer detta slumpmässiga mätfel procentuellt sett öka då absorbansen minskar. Det är alltså systematiskt så att det slumpmässiga felet ökar då populationerna minskar.

Ännu en felkälla till den första undersökningen var att bägarna inte hade något lock, vilket gjorde att ungefär hälften av vätskans volym avdunstade i samtliga bägare. Detta kunde tas hänsyn till i beräkningarna, men bägarna var inte identiska och hade olika baser, vilket gjorde att vattenytorna hade olika areor. Då avdunstningshastigheten är proportionell mot vattenytan, orsakade detta att olika bägare hade olika mycket volym vatten kvar efter en viss tid. Då populationerna *A. salina* och *N. salina* inte påverkades av avdunstningen medförde detta att densiteterna blev olika. Detta är alltså ett slumpmässigt fel, som ökar spridningen på mätvärden. En möjlig förbättring är att placera en tunn plastfilm över bägarna, vilket skulle hämma avdunstningen.

Ytterligare en felkälla är att bägare som tillhörde samma koncentrationsgrupp placerades intill varandra under försökets gång. Belysningen i försöket var centrerad till mitten av brickan som bägarna stod på, vilket resulterade i att de bägare som hamnade vid kanten (koncentrationsgrupp 1 och 5) fick mindre belysning. Då *N. salinas* tillväxt beror på intensiteten på det ljus som de utsätts för, bör bägarna som stod i kanten innehålla färre *N. salina* per ml än de bägare som stod mer centrerat. Ett förbättringsförslag är att omvandla denna systematiska felkälla till en slumpmässig felkälla genom att randomisera bägarnas position under belysningen.

4.5 Tillämpningsområden

Som resultaten tydligt visar finns minskar koncentrationen *Nannochloropsis salina* signifikant då koncentrationen *Artemia salina* ökar. Mer allmänt (med *N. salina* och *A. salina* betraktade som modellorganismer) betyder detta att en population fytoplankton (växtplankton) minskar när den utsätts för ett betestryck skapat av zooplankton. Vidare visar och stärker resultatet i stort den föregående framförda bakgrundsteorin. Vi ser på en generell nivå att en förändring i sammansättningen av en population, det vill säga antalet individer och därmed biomassan i en viss trofinivå i ett ekosystem och en näringsväv, bidrar till mer eller mindre drastiska förändringar för övriga arter, med andra ord mer eller mindre drastiska kaskadeffekter. Denna vetenskap som grund kan tillämpas för att försöka förklara både historiska och kommande förändringar i svenska utsatta vatten, där vi som tidigare nämnt fokuserar på Östersjön.

Östersjön anses som ett utsatt vatten av en rad olika anledningar. Först och främst är biodiversiteten relativt fattig, vilket får den direkta följden att det finns få nyckelarter (26). Detta leder till att balansen och systemets struktur, som upprätthålls av en samverkan av de två i bakgrundsteorin nämnda kontrollprinciperna, blir allt skörare (27). Med andra ord blir ekosystemet känsligare för trofiska kaskader än marina miljöer och ekosystem vars artdiversitet är högre (28). Det andra som gör Östersjön utsatt är dess exponering för näringsämnen, till vilket överflödigt algblooming följer, samt att fisketrycket länge varit mycket högt i området (28). Det sistnämnda har fått stora följder för ekosystemet. Fiskeindustrin är direkt fokuserad på topp-predatorerna i Östersjön, mer specifikt fiskarten torsk (*Gadus morhua*), som till följd av det som blivit överfiske närmast sig stämpeln utrotningsshotade (29). Då torsken var en nyckelart, det vill säga genom top-down-kontroll höll ekosystemet i balans, bildades det över tid både kaskadeffekter och regimskiften i Östersjön, där i dag sill och skarpsill istället dominerar (31). Kaskadeffekten fortplantar sig då abundansen - överflödet - av sill och skarpsill, det vill säga ekosystemets sekundärkonsumenter, bidrog till att populationen djurplankton reducerades kraftigt (32). Då de är primärkonsumenter minskar till följd av detta betestrycket på primärproducenterna, till vilket en ökad population och biomassa följer. Med andra ord omskakas hela ekosystemet av kaskadeffekten i fråga och bidrar till algblooming. Detta är som tidigare nämnt direkt visat i den utförda undersökningen, där ett minskande antal djurplankton, i vårt fall *A. salina*, bidrar

till att populationen växtplankton, här *N. salina*, i större utsträckning förblir densamma, det vill säga minskar mindre.

Faktumet att Östersjön utsätts för gödningsmedel bidrar även detta till att algblooming och därtill övergödning, men här genom miljöförändringar och att bottom-up-kontrollen rubbas (31). Allmängiltigt för alger är att de livnär sig på näringsämnen tillgängliga i deras levnadsområden, vilka främst utgörs av fosfor och kväve (31)(32). I dag sker stora utsläpp av näringsämnena, framför allt från växtnäring i jordbruk, men även från reningsverk, enskilda avlopp, trafik och industrier, som på grund av sina geografiska placeringar i avrinningsområdet runt Östersjön bidrar till en ökad koncentration i vattnet (32). Sådana ökningarna sker naturligt i Östersjöns ekosystem, men dagens utsläpp bidrar till en ökad effekt, vilket får negativa konsekvenser sett ur ekosystemets bevarandes perspektiv. Då näringsämnena, det vill säga algernas föda, ökar, minskar konkurrensen inom populationen. Detta får den direkta följden att populationen ökar; det sker en ökning av biomassa (33). Då ekosystemet delvis regleras genom bottom-up-kontroll följer relativt drastiska konsekvenser. Man skulle kunna tro att en sådan ökning av primärproducenter endast får följden av att den totala biomassan i hela ekosystemet ökar, då primärkonsumenterna får mer föda, vilket borde leda till att sekundärkonsumenterna får detsamma och så vidare (31). Faktum är dock att förändringen är för drastisk för ett sådant händelseförlopp. Dels hinner inte primärkonsumenterna med, det vill säga kan fysiskt varken öka i samma takt eller lika mycket, och dels, då ökningen av primärproducenterna är mycket kraftig, minskar även syrehalten i den lokala miljön, främst på botten (34). Detta är på grund av att den ökande mängden biomassa - organiska material - bryts ner av mikroorganismer genom processer som kräver syre (34). Om cirkulationen och därmed omrörningen är dålig kommer inget nytt syrerikt syre in, vilket gör att nedbrytningen tas över av andra mikroorganismer som inte kräver syre (35). Många av de anaerobt nedbrytande mikroorganismerna bildar vätesulfid som biprodukt, vilket för många av de resterande djuren och växterna i ekosystemet är farligt (35). Långvarig algblooming kan bidra till fullständigt syrefria bottnar, vilket förvärrar processen ytterligare. Då sekundärkonsumenterna här blir påverkade och minskar i population, minskar betestrycket vilket gör att primärproducenterna, algerna, återigen får en ökning i biomassa, och processen börjar om (34). Vi får på så sätt en ond cirkel som bryter balansen och förstör ekosystemet.

Samverkan mellan överfiske och algblooming är på så sätt mycket negativ för ekosystemet som helhet, då kontrollmetoderna och den balans de bidrar med rubbas från två håll. För att förtydliga har denna undersökning endast stärkt trovärdigheten för de här händelseförloppen. Ytterligare frågeställningar väcks dock då situationen undersöks. Vilken kontrollmetod och balansbidragande faktor är mest uttrycksfull i Östersjön, och därmed i vilken ände bör man börja? Kan man artificiellt, exempelvis med hjälp av introduktion av för området nya arter, förbättra situationen? Problem likt de här kan vid fortsatt undersökning med största sannolikhet besvaras, och därtill vara till stor hjälp för återställandet av ekosystemet.

Vidare kan även undersökning 1, med de två modellorganismerna, *A. salina* och *N. salina*, användas som modell för en del av ett helt ekosystem i större utsträckning än det gjorts inom detta arbete. För att utnyttja denna modell vidare, kan samspelet mellan dessa två modellorganismer undersökas då ytterligare en faktor introduceras/förändras. Genom att exempelvis ändra på vissa faktorer som pH-värde, salthalt, CO₂-halt, temperatur eller ljusstyrka, kan abiotiska faktorer påverka ekosystemet samt algbloomingar undersökas. Även tidigare kända värden för dessa faktorer i en vattenkropp (exempelvis Östersjön) kan tillämpas på modellen för att skapa en mer verklighetstrogen uppskattning av algbloomingens tillväxt för detta område.

Då den kvantitativa metoden i teorin inte är begränsad till att bara uppskatta populationstorlekarna hos två arter - utan kan göra det för ett i princip godtyckligt antal - kan den också vara effektiv när det kommer till att uppskatta populationstorlekarna för en myriad av arter som lever i ett akvatiskt ekosystem. Att kartlägga olika arters utbredning i olika områden är konstitutivt för biologin, och då denna metod endast kräver en enda spektralanalys av ett prov för att åstadkomma detta, bör metodens möjligheter såväl som begränsningar utforskas vidare.

5. Referenslista

- (1) Vanhaecke P, Tackaert W, Sorgeloos P. The biogeography of Artemia: an updated review. *Artemia Research and its Applications*. vol. 1. (1987)
- (2) Encyclopaedia Britannica. Brine Shrimp. (2021-04-15)
<https://www.britannica.com/animal/brine-shrimp#ref3495> (hämtad 2021-04-10)
- (3) *Nationalencyklopedin*. Saltkräfta.
<http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/saltkräfta> (hämtad 2021-04-10)
- (4) Yu J, Lu Y. Artemia spp. Model - A Well-Established Method for Rapidly Assessing the Toxicity on an Environmental Perspective. *MRA*. vol. 6, issue 2. (2018)
- (5) Brine Shrimp Direct. What are the guidelines for culturing brine shrimp.
<https://www.brineshrimpdirect.com/about-us/frequently-asked-questions/what-guidelines-culturing-brine-shrimp/> (hämtad 2021-04-10)
- (6) Saltlakebrineshrimp.com. About Brine Shrimp.
<https://saltlakebrineshrimp.com/about-brine-shrimp/> (hämtad 2021-04-10)
- (7) AlgaeBase. National University of Ireland, Galway; 1996- .Microchloropsis M.W.Fawley, I.Jameson & K.P.Fawley, 2015.
http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=51904 (hämtad 2021-04-18)
- (8) AlgaeBase. National University of Ireland, Galway; 1996- .Nannochloropsis salina D.J.Hibberd, 1981. http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=54555 (hämtad 2021-04-18)
- (9) Saseendran SK. Effect of Salinity and pH Ranges on the Growth and Biochemical Composition of Marine Microalga- Nannochloropsis salina. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*. (2018)
- (10) *Nationalencyklopedin*. Östersjön.
<http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/östersjön> (hämtad 2021-04-20)
- (11) *Nationalencyklopedin*. Ekosystem.
<http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/ekosystem> (hämtad 2021-04-17)
- (12) Scheffer M, Carpenter S, Foley JA, Folke C, Walker B. Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature*. (2001-10-11)
- (13) *Nationalencyklopedin*. Nyckelart.
<http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/nyckelart> (hämtad 2021-04-17)
- (14) Babu S. The top-down vs bottom-up control in an ecosystem. (2018-04-26)
<https://eco-intelligent.com/2018/04/26/the-top-down-vs-bottom-up-approach-in-an-ecosystem/>
- (15) Lyman CP, Llope M, Möllmann C, Helaouët P, Bayliss-Brown GA, Stenseth NC. Interaction between top-down and bottom-up control in marine food webs. *National Academy of Sciences*. (2017-02-06)
- (16) Holst M. Varför är rovfisken så viktig för Östersjön?. Balticsea.org.
<https://balticsea2020.org/images/Bilagor/Rovfisk.pdf> [PDF] (hämtad 2021-04-22)
- (17) Möllmann C, Müller-Karulis B, Kornilovs G, St John MA. Effects of climate and overfishing on zooplankton dynamics and ecosystem structure: regime shifts, trophic

- cascade, and feedback loops in a simple ecosystem. *ICES Journal of Marine Science*, vol. 65, issue 3. s 302–310. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsm197>. (april 2008)
- (18) Möllmann C, Müller-Karulis B, Kornilovs G, St John MA. Effects of climate and overfishing on zooplankton dynamics and ecosystem structure: regime shifts, trophic cascade, and feedback loops in a simple ecosystem. *ICES Journal of Marine Science*, vol. 65, issue 3. s 302–310. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsm197>. (april 2008)
- (19) Nationalencyklopedin. Trofisk kaskad. <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/trofisk-kaskad> (hämtad 2021-04-23)
- (20) National Oceanic and Atmospheric Administration, U.S. Department of Commerce. What is a harmful algal bloom? <https://www.noaa.gov/what-is-harmful-algal-bloom#:~:text=Harmful%20algal%20blooms%2C%20or%20HABs,be%20debilitating%20or%20even%20fatal>. (hämtad 2021-04-23)
- (21) Dobricic S, Pozzoli L, Sanseverino I, Conduto D, Lettieri T. Algal bloom and its economic impact. *Publications Office of the European Union*. (2016-05-11)
- (22) Nationalencyklopedin. Algblomning. <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/algblomning> (hämtad 2021-04-25)
- (23) Gobler CJ. Climate Change and Harmful Algal Blooms: Insights and perspective. *Harmful Algae*. vol. 91. (januari 2020)
- (24) Nationalencyklopedin. Övergödning. <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/övergödning> (hämtad 2021-04-25)
- (25) United States Environmental Protection Agency. The Effects: Dead Zones and Harmful Algal Blooms. <https://www.epa.gov/nutrientpollution/effects-dead-zones-and-harmful-algal-blooms> (senast uppdaterad 2017-03-10)
- (26) Sundberg A. Trofiska kaskader: Hur ålgräsängar och fiskpopulationer påverkar varandra [Examensarbete i biologi]. Uppsala, Uppsala Universitet. (2012)
- (27) Lynam CP, Llope M, Möllmann C, Helaouët P, Bayliss-Brown GA, Stenseth NC. Interaction between top-down and bottom-up control in marine food webs. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2017-02-21)
- (28) Möllmann C, Müller-Karulis B, Kornilovs G, St John MA. Effects of climate and overfishing on zooplankton dynamics and ecosystem structure: regime shifts, trophic cascade, and feedback loops in a simple ecosystem. *ICES Journal of Marine Science*, vol. 65, issue 3. s 302–310. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsm197>. (april 2008)
- (29) Svedäng H, Stål J, Sterner T, Cardinale M. Consequences of subpopulation on fisheries management: Cod (*Gadus morhua*) in the Kattegat and Öresund (North Sea). *Reviews in Fisheries science*. vol. 18, issue 2. (2010)
- (30) Almesjö L, Limén H. Fiskpopulationer i Svenska vatten. Hur påverkas de av övergödning och miljögifter. *Miljö- och jordbruksutskottet. Riksdagstryckeriet, Stockholm*. (2008)
- (31) Holst M. Varför är rovfisken så viktig för Östersjön?. [Balticsea.org. https://balticsea2020.org/images/Bilagor/Rovfisk.pdf](https://balticsea2020.org/images/Bilagor/Rovfisk.pdf) [PDF] (hämtad 2021-04-22)
- (32) World Wide Fund for Nature. Övergödning och Algblomning. [wwf.se. https://www.wwf.se/hav-och-fiske/ostersjon/overgodning-och-algblomning/](https://www.wwf.se/hav-och-fiske/ostersjon/overgodning-och-algblomning/) (hämtad 2021-05-01)
- (33) Hauxwell J, Cebrián J, Valiela I. Eelgrass *Zostera marina* loss in temperate estuaries: relationship to land-derived nitrogen loads and effect of light limitation imposed by algae. *Marine ecology progress series*. vol. 247. (februari 2003)

- (34) Diaz RJ, Rosenberg R. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*. vol. 321, issue 5891. (2008-08-15)
- (35) Levington J. *Marine biology: function, biodiversity, ecology*. 2:a upplagan. Oxford university press Inc. New York. (2001)