

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL

Matemaatika-loodusteaduskond

Okeanograafia õppetool

Anneliis Peterson

Miksotroofse dinoflagellaadi *Heterocapsa triquetra*
kasvudünaamika ja toitainete omastamine

Magistritöö

Juhendajad: nooremteadur Karin Ojamäe

vanemteadur Inga Lips

Tallinn, 2015

Deklareerin, et käesolev lõputöö on minu iseseisva töö tulemus ning kinnitan, et esitatud materjalide põhjal ei ole varem akadeemilist kraadi taotletud. Kinnitan, et antud töö koostamisel olen kõikide teiste autorite seisukohtadele, probleemipüstitustele, kogutud arvametele jmt viidanud.

Anneliis Peterson

Juhendajad: Karin Ojamäe
Inga Lips

Töö vastab magistritööle esitatavatele nõuetele.

Kaitsmiskomisjoni esimees:
Lubatud kaitsmisele

(nimi, allkiri, kuupäev)

Sisukord

1. Sissejuhatus.....	7
2. Läänemeri	9
2.1 Üldisloomustus	9
2.2 Läänemere ökoloogia	11
3. Dinoflagellaadid.....	12
3.1 Dinoflagellaatide raku ehitus.....	13
3.2 Dinoflagellaatide puhkefaasid	14
3.3 Dinoflagellaatide toitumisstrateegiad	15
3.4 <i>Heterocapsa triquetra</i>	18
3.5 Pinna-alused fütoplanktoni biomassi maksimumid ja vertikaalne migratsioon	20
3.6 Toitainete omastamine valguse puudumisel.....	21
4. Materjal ja meetodid	23
4.1 Eksperimendi ülesehitus ja kasvutingimused	23
4.2 Rakutiheduse ja fotosünteesiparameetrite mõõtmine	24
4.3 Toitainete analüüs.....	27
5. Tulemused.....	28
5.1 Rakukultuuride arvukuse ja kasvukiiruse dünaamika	28
5.2 Fotokeemiline aktiivsus.....	29
5.2.1 Maksimaalne fotosünteesi efektiivsus	29
5.2.2 Komplementaarsed fluorestsentsisaagised	30
5.2.3 Toitainete omastamine.....	31
6. Arutelu	33
6.1 Arvukus	34
6.2 Kultuuride maksimaalne fotosünteesi efektiivsus	34
6.3 Komplementaarsed fluorestsentsisaagised ϕ_{II} , ϕ_{NO} , ϕ_{NPQ}	35

6.4	Toitainete omastamine pimedas	37
7.	Kokkuvõte.....	39
8.	Summary	40
9.	Kasutatud kirjandus	41

Lühikokkuvõte

Miksotroofse dinoflagellaadi *Heterocapsa triquetra* kasvudünaamika ja toitainete omastamine

Läänemeres on sageli registreeritud fütoplanktoni klorofüll *a* pinna-aluseid maksimume. Üheks pinnaaluseid biomassi maksimume moodustavaks liigiks Soome lahes on vertikaalse migreerumisvõimega potentsiaalselt miksotroofne dinoflagellaat *Heterocapsa triquetra*. Katse eesmärk oli uurida *H. triquetra* kasvudünaamikat ja fotosünteesivõimekust erinevates toitainete tingimustes. Testiti hüpoteesi, et veesambas vertikaalselt migreeruv *H. triquetra* omastab mere sügavamates kihtides nutrikliini peal anorgaanilisi toitaineid ja seejärel rändab tagasi ülemisse toitainetevaesesse valgustatud veekihti, et rakusiseste toitainete varudele tuginedes fotosünteesida ja kasvada. Selleks lisati toitainetevaestes kultuuridesse toitaineid ning viidi rakud 48 h pimedasse, et kontrollida lisatud toitainete omastamise võimekust pimedas. Katse tulemustest selgus, et *H. triquetra* on võimeline pimedas omastama anorgaanilisi toitaineid, mis toetavad rakkude kasvu ning head füsioloogilist tervist ja fotosünteesivõimekust. *H. triquetra* on toitainetevaestes tingimustes suuteline üsna pikalt säilitama populatsiooni suurust ning head fotosünteesivõimekust. See võib olla üheks antud liigi domineerimise põhjuseks Soome lahe toitainetevaeses ülemises segunenud veekihi suve teises pooles.

Märksõnad: Dinoflagellaadid, *Heterocapsa triquetra*, lämmastiku limitatsioon, toitainete omastamine pimedas, fotosünteesi parameetrid, vertikaalne migratsioon.

Abstract

Growth dynamics and nutrient uptake in a mixotrophic dinoflagellate, *Heterocapsa triquetra*.

Sub-surface chlorophyll *a* maxima have been observed in the Baltic Sea frequently. The potentially mixotrophic dinoflagellate *Heterocapsa triquetra*, that is capable for vertical migration, is one of the sub-surface maxima forming species in the Gulf of Finland. The aim of this work was to investigate growth dynamics and nutrient uptake of *H. triquetra*. We tested the hypothesis that vertically migrating *H. triquetra* takes up inorganic nutrients above the nutricline and migrates back to the euphotic layer to photosynthesize and grow using intracellular nutrient stores. In order to study nutrient uptake, nutrient poor cultures were re-supplied with nutrients and placed in the darkness thereafter for 48 hours. Results show that *H. triquetra* is able to take up inorganic nutrients in the dark to support cell growth and good physiological health and capability for photosynthesis. *H. triquetra* was able to maintain the population size and good photosynthetic efficiency in nutrient poor conditions relatively long. That may explain why *H. triquetra* dominates the summer phytoplankton community in the nutrient-poor upper mixed water layer of the Gulf of Finland.

Keywords: Dinoflagellates, *Heterocapsa triquetra*, nitrogen limitation, nutrients uptake in dark, photosynthetic parameters, vertical migration.

1. Sissejuhatus

Fütoplanktoni jaotus veeökosüsteemides on nii horisontaalselt kui vertikaalselt väga heterogeenne. Horisontaalsed jaotused seostatakse mesomastaapsete hüdrofüüsikaliste protsessidega – pöörise ja frontidega (Kononen *et al.*, 1996), rannikumeres ka jõgede sissevoolu ja *upwelling*'u sündmustega (Talpsepp *et al.*, 1994). Fütoplanktoni vertikaalse jaotuse määrab kasvuks vajalike ressursside (valgus ja toitained) kättesaadavus, ärasöömise surve teiste organismide poolt, rakkude settimise kiirus, migratsioon (Fennel & Boss, 2003), aga ka valitsevad hüdrodünaamilised tingimused. Hüdrodünaamilisteks tingimusteks, mis võivad mängida olulist rolli klorofüll *a* maksimumi tekkimisel ja paiknemisel, on vertikaalne stratifikatsioon, vee segunemine ja hoovuste nihe (Lips *et al.*, 2010). Klorofüll *a* pinna-alused ja sügavad maksimumid tekivad Soome lahe suvistes tingimustes, kui veesammas on vertikaalselt kihistunud ning anorgaanilised toitained ülemises veekihi on ammendunud, kuid toitainetevarud on saadaval allpool sesoonset termokliini. Maksimumid asuvad enamasti termokliini alaosas, langedes kokku nutriikliini sügavusega (Lips *et al.*, 2010).

Pärast kevadõitsengut, mai keskel, on Soome lahes fütoplankton eufootselt kihist ära tarbinud kõik lahustunud anorgaanilise lämmastiku (DIN – *dissolved inorganic nitrogen*). Lahustunud anorgaaniline fosfor (DIP – *dissolved inorganic phosphate*) kasutatakse määramispiiri lähedase kontsentratsioonini mai lõpuks/juuni keskpaigaks, enne hilissuvis fütoplanktoni massvohamist, kui tavaliselt domineerivad koosluses õhulämmastikku (N₂) siduvad tsüanobakterid, mõnel aastal ka dinoflagellaat *H. triquetra* (Kononen *et al.*, 1996; HELCOM, 2002)

Upwelling'u sündmused loovad suvisele Soome lahe fütoplanktoni kooslusele erilised kasvutingimused. Sesoone termokliini alt tuuakse rannikumere *upwelling*'u sündmustega ülemistesse kihtidesse jahedat ning madala DIN:DIP sisaldusega vett (Laanemets *et al.*, 2004). Madal veetemperatuur küll pärsib tsüanobakterite vohamist (Kanoshina *et al.*, 2003), aga õhulämmastiku sidumise võime tõttu, saavutavad nad sellistes toitainete tingimustes teiste fütoplanktoni rühmade ees eelise. Suvises koosluses arvukalt esineval dinoflagellaadil *H. triquetra* arvatakse olema võime migreeruda sügavamasse nitriikliini kohale, täita rakusisesed toitainetevarud ning liikuda tagasi üles eufootilisse veekihti, et seal fotosünteesida (Fauchot *et al.*, 2005, Lips *et al.*, 2011). Ebasobivad hüdrodünaamilised tingimused nagu väga tugev vee segunemine pöörise tõttu (Fauchot *et al.*, 2005) ja intensiivne *upwelling*, mis paiskab rakud

veesambas laiali (Dugdale & Wilkerson, 1989), ei pruugi rakkude vertikaalset migratsiooni toetada.

Käesolevas töös isoleeriti suvisel ajal tugevalt stratifitseerunud (temperatuuri järgi) Soome lahest pinna-aluseid biomassi maksimume moodustav potentsiaalselt mikstroofne dinoflagellaat *Heterocapsa triquetra* (Ehrenberg) Stein. Magistritöö eesmärk oli uurida *H. triquetra* kasvudünaamikat ja fotosünteesivõimekust erinevates toitainete tingimustes. Töö käigus testiti hüpoteesi, mille kohaselt veesambas vertikaalselt migreeruv *H. triquetra* omastab mere sügavamates kihtides nutriklüüsi peal anorgaanilisi toitaineid ja rändab seejärel tagasi ülemisse toitainetevaasesse valgustatud veekihti, et rakusiseste toitainete varudele tuginedes fotosünteesida ja kasvada. Selleks kontrolliti kaudselt *H. triquetra* toitainete omastamist valguse puudumisel NO_3^- ja PO_4^{3-} sisalduse vähenemise kaudu kultuuris ning uuriti toitainete mõju rakkude füsioloogilisele seisundile ja fotosünteesi võimekusele. Eesmärgiks oli kvantifitseerida kui palju ja millises suhtes omastavad rakud toitaineid pimedas ning kuidas see mõjutab hilisemat *H. triquetra* füsioloogiat ja fotosünteesivõimekust. Täiendavalt püstitati hüpotees, et rakud poolduvad sisemiste varude arvelt keskmiselt vähemalt üks kord (st populatsiooni arvukus kahekordistub).

Magistritöö käsitleb fütoplanktoni võimekust oma positsiooni veesambas vertikaalselt muuta kui ökoloogilist strateegiat. Sellise strateegiaga organismide kasvuks peavad olema täidetud teatavad füsioloogilised ja biokeemilised eeldused, mida on käesolevas töös eksperimentaalselt kvantifitseeritud: võimekus valguse puudusel omastada toitaineid ja varieeruvates valgus- ja toitainete tingimustes säilitada hästi funktsioneeriv fotosünteesiapparaat. Füsioloogilised ja bioloogilised eeldused soosivad fütoplanktoniliikide kasvu ja ellujäämist erinevate hüdrograafiliste tingimuste korral.

2. Läänemeri

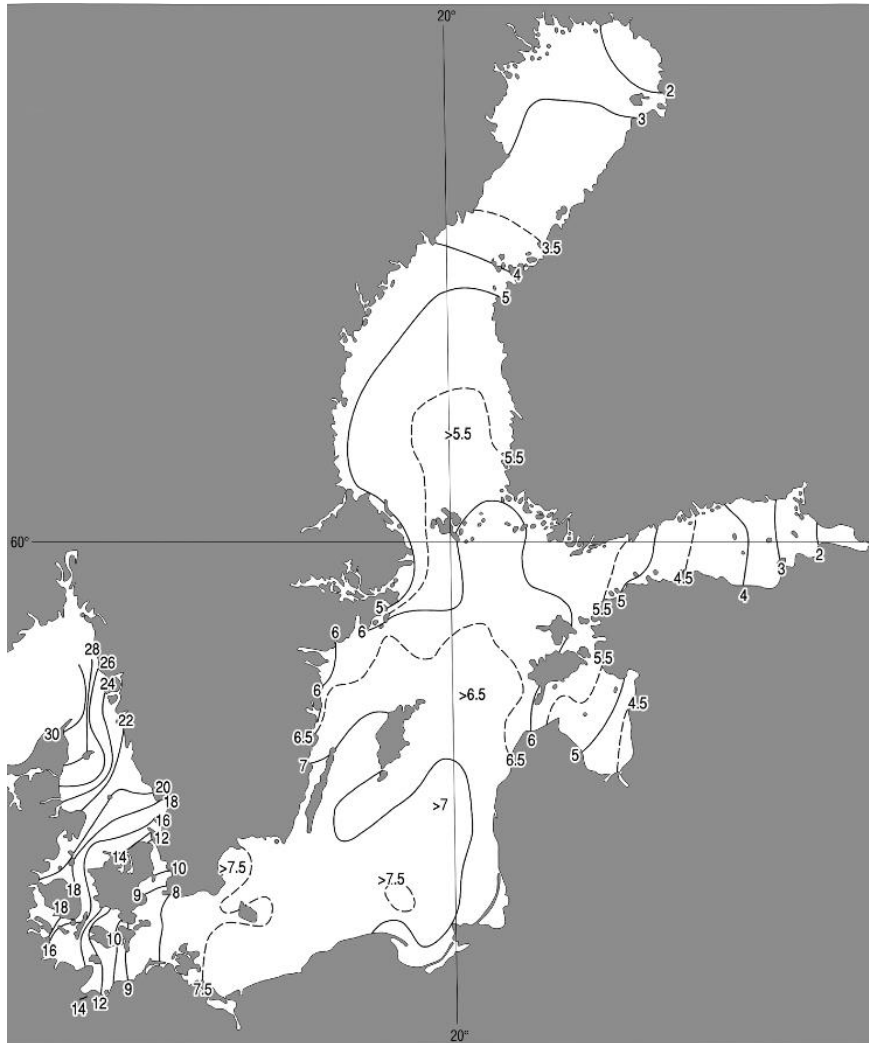
2.1 Üldiseloostus

Läänemere valgala hõlmab enda alla 1.74 miljonit km², ning sellel asub 14 riiki (Kuusisto *et al.*, 2008). Läänemere pindala koos Kattegati ja Taani väinadega on ligikaudu 415 000 km² ning maht 21 000 km³. Mere keskmiseks sügavuseks on 55 m, sügavaim koht on Landsortsi süvik - 459 m (Elken & Matthäus, 2008). Läänemeri on riimveeline veekogu.

Halva ühenduse tõttu Põhjamerega, läbi kitsaste ja madalate Taani väinade, saabub Läänemerre vähe soolast vett ning veevahetus on väga aeglane. Kattegati väinadest voolab mööda põhja soolane vesi sisse (keskmiselt 5 000 m³ s⁻¹) ja pinnakihis voolab magedam vesi välja. Vee viibeaeg on Läänemeres umbes 33 aastat (Meier *et al.*, 2004). Selline vee liikumine tingib nii horisontaalsete kui vertikaalsete soolsuse gradientide tekkimise, mis omakorda mõjutab elustiku liigilist varieerumist. Läänemerre sisenev vesi on enamasti soolsuse vahemikus 12-16 (suuremate soolase vee sissevoolu sündmuste ajal võib soolsuseks olla 22-25) (Elken & Matthäus, 2008). Halva veevahetuse tõttu on Läänemeri väga keskkonnatundlik veekogu. Jõgede kaudu jõuab merre palju antropogeense päritoluga toitained, soodustades eutrofeerumist, mis on olnud pikka aega üks Läänemere tõsisemaid keskkonnaprobleeme (HELCOM, 2009). Antropogeensed toitained ning muud saasteained püsivad pika vee viibeaja tõttu veekogus kaua. Suure hulga sademete ja jõgede sissevoolu tõttu jõuab Läänemerre palju magevett. Sademetest jõuab Läänemerre ligi 85% ning jõgede veevoolust umbes 80% (Omstedt & Axell, 2003), ülejäänud aurustub, imbub maapinda või jõuab mõnda teise veekogusse.

Soome lahe pindala on ligikaudu 29 600 km² ja selle maht on 1100 km³. Laht on umbes 400 km pikk ning 48-135 km lai (Bergström & Carlson, 1994). Soome lahe sügavus läänepoolses osas on 80-110 m, lahe idaosas vähem kui 30 m (Pavelson, 2005). Soome lahes on peamiselt kaks veevahetuse komponenti: magevee sissevool jõgedest ja soolase vee sissevool Läänemere avaosast (Alenius *et al.*, 1998). Jõgede kaudu suubub Soome lahte, peamiselt lahe idaosas, keskmiselt 3556 m³ s⁻¹ magevett (Bergström & Carlson, 1994). Magevee sissevool lahe idaosast ning soolase vee sissevool lääneosast tekitavad piki Soome lahte soolsuse gradiendi. Ülemise segunenud veekihi soolsus lahe idaosas on ~1, läänepoolses osas 6-7 (Pavelson, 2005).

Vee viibeag Soome lahes on umbes kaks aastat (HELCOM, 1990). Suviti on laht termiliselt kihistunud – sooja ülemist segunenud veekihti ja selle alla jäävat külma vahekihti eraldab termokliin, mille paksus on keskmiselt 14 m (Liblik, 2012) ja mille ulatuses temperatuur langeb 15-20 °C juurest termokliini ülemises osas kuni 2-4 °C termokliini alumises osas. Soolsuslik kihistumine on sesoonselt väiksema muutlikkusega. Soome lahe lääneosas esineb permanentne halokliin 60-80 m sügavusel ning lahe idaosas suureneb soolsus lineaarselt sügavusega (Pavelson, 2005).



Joonis 1: Läänemere pinnavee keskmine soolsus juulikuus (Bock, 1971).

Anorgaanilised (NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-}) toitained on pärast fütoplanktoni kevadõitsengut ülemises segunenud veekihis peaaegu ammendunud ning veesamba termiline stratifikatsioon takistab ülemise toitainetevaese ja termokliinialuse toitaineterikka kihi omavahelist segunemist. Tugeva vertikaalse kihistatuse tingimustes on *upwelling* üks tähtsamaid protsesse, mis toob sügavamate veekihtide toitaineterikka vee pinnakihtidesse (Lips *et al.*, 2009). Ülemise

segunenud veekihi toitainetmaksimum on talvel ning miinimum suvel (Lips *et al.*, 2011). Soome lahes asub nutrikliin (toitainete hüppekiht) keskmiselt 23 m sügavusel, varieerudes 14.5-35 m sügavuseni (Lips *et al.*, 2010).

2.2 Läänemere ökoloogia

Riimveelise tõttu esineb Läänemeres nii mageveelisi, merelisi kui riimveelisi liike. Üldiselt on riimveelised veekogud (soolsusega kuni 18 loetakse riimveeliseks veekoguks) liigivaesed, kuna sellise soolsuse vahemikuga on kohastunud vähesed liigid. Lisaks riimveelisele, loovad Läänemerest omapärase elukeskkonna osalise jääkatte moodustumine talvel, mis vähendab valgustingimusi, ning vähene sügavus. Soolsuse gradient Botnia lahest Läänemere lõunaosani ning Taani väinadest Läänemere idaosani on oluline loomastiku, taimestiku ning protistide levimise kriteerium, määrates liikide leviala piirid (Leppäkoski *et al.*, 2002; Lehtiniemi, 2008). Taani väinade piirkonnas on vesi peaaegu ookeanivee soolsusega, Botnia lahe põhjaosas ja Soome lahe idaosas aga lähedane mageveele (Joonis 1). Kõrgematel laiuskraadidel mõjutab Läänemere elustikku aastaegade vaheldumine — sesoonselt muutuvad nii temperatuur kui valgustingimused, millest sõltub kasvuperioodi pikkus ning primaarproduksioon (Lehtiniemi, 2008). Läänemerd koos Kattegatiga asustab vähemalt 6065 liiki, seal hulgas 1700 fütoplanktoni liiki. Kõige rohkem fütoplanktoni liike on Soome lahes, umbes 1500 (Ojaveer *et al.*, 2010). Toksilisi veeõitsenguid põhjustavaid liike on üle 60 (ICES, 2006). Ökosüsteem muutub liigivaesemaks põhja suunas. Mereliste liikide osakaal kahaneb Taani väinadest, Kattegatist ja Skagerrakist, Läänemere avaosa ja Botnia laheni (Leppäkoski *et al.*, 2002).

Kevadel, märtsis-aprillis, kui keskkonnatingimused muutuvad sobivaks, suureneb primaarproduksioon järsult, mille intensiivsuse määrab talvel veesambasse segatud toitainete hulk. Kevadõitsengu maksimaalsed biomassid saavutatakse tavaliselt pärast nõrga soolsusliku stratifikatsiooni kujunemist ja ülemise veekihi soojenemist. Kevadõitseng lõpeb kui nitraat- ja/või fosfaatioonid limiteerivad fütoplanktoni kasvu ülemises segunenud veekihis. Pärast õitsengut settib enamus tekkinud orgaanilisest materjalist eufootses kihist välja ning fütoplanktoni produktsioon väheneb oluliselt. Vähemal määral taastavad seda uuesti ringlusesse minevad ammoonium ja fosfaat, mis pärinevad surnud aine remineralisatsioonist. Toitainete ringlust reguleerivad temperatuur ning zooplanktoni ja bakterite metabolism, (Lehtiniemi, 2008) vabastades toitaineid nende elutegevuse laguprotsesside tulemusena.

Hilissuvel tõuseb primaarproduksioon dinoflagellaatide ja õhulämmastikku siduvate tsüanobakterite tõttu. Veesambas vertikaalselt migreeruvad dinoflagellaadid omastavad toitained veesamba sügavamatest kihtidest, kasutades neid ülemises toitainetevaeses veekihi produktsiooniks (Lips *et al.*, 2011). Suvised maksimaalsed biomassid saavutatakse soojade ja tuulevaiksete ilmade korral.

3. Dinoflagellaadid

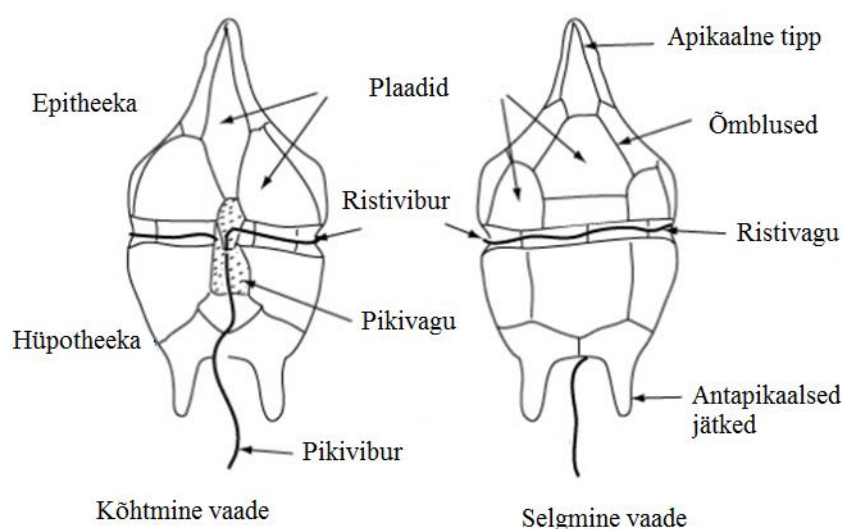
Dinoflagellaadid (Dinophyta) ehk vaguviburvetikad on alveolaatide superhõimkonda kuuluvad ainuraksed flagellaadid. Dinoflagellaatide liike on kokku umbes 2000 (van den Hoek *et al.*, 1995), enamik liike (90%) on merelised. Dinoflagellaadid on suuremas osas planktilised mikroorganismid, vähesed neist on bentilise eluviisiga. Umbes pooled liikidest on fotoautotroofsed ja pooled heterotroofsed, viimase paarikümne aasta jooksul on avastatud paljude liikide miksotroofsus (Hansen & Calado, 1999).

Dinoflagellaadid on levinud üle maailma, asustades nii polaar-, parasvöötme, kui ka troopilisi veekogusid (Hansen, 2011). Sobivates tingimustes (temperatuur, valgus, toidained) asustavad nad veekogusid aastaringselt. Parasvöötmes ei ole meri aastaegade vaheldumise tõttu neile kogu aasta jooksul kasvuks sobilik keskkond. Ebasobivate tingimuse üle elamiseks moodustavad nad puhkevorme ja langevad põhjasettesse.

Mitmed dinoflagellaadid toodavad toksine, kujutades massvohamiste ajal ohtu teistele vees elavatele organismidele ja inimestele. Inimesteni jõuavad toksiinid näiteks karploomade ja kalade söömisest. Enamik toksine on kõrgele temperatuurile vastupidavad neurotoksiinid, seega toidu valmistamisega ei vähene saastunud mereandide toksilisus. Inimeste ja teiste kõrgemate loomade haigestumist ning surmasid põhjustavad toksilised dinoflagellaatide liigid on näiteks: *Karenia brevis* (Rolton *et al.*, 2014), *Alexandrium tamarense*, *Alexandrium funndyense*, *Gymnodinium catenatum* (Bolch & de Salas, 2007; Zaccaroni & Scaravelli, 2008; Alpermann *et al.*, 2010). Läänemeres esinevad toksilistest dinoflagellaatide liikidest näiteks *Prorocentrum minimum* (Hajdu *et al.*, 2000) ja *Alexandrium ostenfeldii* (Sopanen *et al.*, 2011).

3.1 Dinoflagellaatide raku ehitus

Dinoflagellaatide rakusein on jaotunud paljudeks polügonaalseteks amfiesmaalseteks vesikuliteks (Dodge & Crawford, 1970; Sekida *et al.*, 2004), mis on alveolaatide rühma sünapomorfiiks. Kui vesikulid on täidetud tselluloosist plaatidega, nimetatakse rakuseina pantsriks või theekaks. Pantser jaguneb eesmiseks osaks – *epitheeka* ja tagumiseks osaks – *hypotheeka*, mida ühendab omavahel ristivagu (Joonis 2). Pantser koosneb pantsri plaatidest, mida ühendavad omavahel õmblused. Plaatide arvul, kujul ja asetusel rajaneb dinoflagellaatide süstemaatika (Lee, 2008).



Joonis 2: Dinoflagellaadi raku anatoomia kõhtmisel ja selgmisel poolel (Fensome *et al.*, 1996).

Enamikke dinoflagellaate iseloomustab kahe viburi olemasolu. Viburid asuvad neil spetsiaalsetes viburi vagudes – ristivaos ja pikivaos. Ristivagu kulgeb ringina ümber raku ja on risti raku pikiteljega. Pikivagu kulgeb raku kõhtmisel poolel, kas keskosast tagaosani või kogu raku ulatuses eesmisest osast tagaosani. Risti- ja pikivao ristumiskohas, dinoflagellaadi kõhtmisel poolel, asub viburite kinnitumiskoht (Lee, 1999). Enamasti tagab pikivibur raku edasiliikumise, ristivibur on keerdunud ja unduleerib, mis paneb raku liikuma ümber oma pikitelje ning annab ka veidi edasiliikuvat jõudu. Sellise viburite töö tulemusena on dinoflagellaatide ujumisteede heelikujuline (Fenchel, 2001).

Dinoflagelladid teeb unikaalseks nende suur tuum ehk dinokaarüon, mis võib enda alla võtta ligi kolmandiku rakust. Tuumas asub neil suur kogus DNAd, koguseliselt võib seda olla 5-10 korda rohkem kui teistel fütoplanktoni rühmadel (Sigeo, 1984; Barsanti & Gualtieri, 2006).

3.2 Dinoflagellaatide puhkefaasid

Dinoflagellaatidele on üldjuhul omane vahelduv elutsükkel, kus vegetatiivne elustaadium vaheldub puhkeraku ehk tsüsti omaga. Tsüstide moodustamiseni viib vähene valgus ja toitainete (fosfaat ja nitraat) defitsiit veesambas (Lee, 1999). Paljud dinoflagellaadid moodustavad oma elu jooksul puhkevorme, et üle elada ajutised eluks ebasoodsad tingimused (Dale, 1983; Ribeiro *et al.*, 2011).

Läänemere tingimustes, kus vahelduvad aastaajad ning peaaegu, et pool aastast on eluks ebasobiv, on tsüstide moodustamine möödapääsmatu. Talvel ei ole rakkude elutegevuseks piisavalt valgust. Suur osa õitsengut tekitavatest liikidest veedavad veesambas vaid mõned kuud, ülejäänud aasta on nad puhkeseisundis veekogu põhjasetetes (Pfiester & Anderson, 1987; Dale, 1993). Kevadel, kui keskkonnatingimused paranevad, liituvad rakud uuesti planktoniga. Fütoplanktoni vertikaalne jaotus veesambas sõltub peamiselt valguse ja toitainete kättesaadavusest (Lips *et al.*, 2010).

Terminit “tsüst” kasutatakse selleks, et kirjeldada liikumatuid bentiilise eluviisiga rakke, millel puuduvad viburid ja ujumisvõime (Olli, 2004). Dinoflagellaadid moodustavad kahte erinevat liiki tsüste – ajutisi tsüste ja tõeliseid puhketsüste. Ajutised tsüstid tekivad ebasoodsate keskkonnatingimuste või keskkonnašoki tagajärjel: mehhaaniline šokk, järsk temperatuuri, soolsuse või pH muutus, turbulents, toitainetevaene keskkond (Anderson *et al.*, 1995; Fistarol *et al.*, 2004; Olli, 2004; Anderson *et al.*, 2005). Ajutise tsüstina võib rakk olla veekogu põhjas pool tundi kuni päev. Pärast šokist toibumist avaneb rakumembraani kattev pelliikula ning rakk ujub väljudes amöboidselt edasi, moodustades varsti uue rakukesta. Ajutiste tsüstide korral on rakud haploidsed ning neis ei toimu eelnevat toitainete akumulatsiooni, see eristab neid tõelistest puhkeoleku tsüstidest (Anderson *et al.*, 1995).

Tõelised puhketsüstid on paksu kestaga ning vastupidavad, esinedes hooajaliselt looduslikes planktoni populatsioonides, tihti pärast massiivset õitsengut, kui keskkonnatingimused on muutunud ebasoodsaks (Anderson *et al.*, 1995). Tõelise tsüsti tekkimiseks moodustuvad gameedid, mis on vegetatiivsetest rakkudest natukene väiksemad, kiirema liikumisega ja tihti

vegetatiivsetest rakkudest morfoloogiliselt eristamatud. Gameet ühineb teise gameediga, moodustades diploidse planosügoodi, mis ujub mõned päevad planktonis, heidab seejärel ära oma viburid ning moodustab hüpnosügoodi ja vajub veekogu põhja (Anderson & Wall, 1978; Olli, 2004). Sobivates keskkonnatingimustes võivad need, tõelised puhkeolekus tsüstid, elus püsida maksimaalselt 5-10 aastat (Anderson *et al.*, 1995). Uuesti idanemiseks vajavad tsüstid paarikuulist perioodi, et valmida (Anderson, 1980). Tsüsti valmimisperiood on vajalik, et idanemine ei hakkaks vegetatiivse raku eluks ebasobival ajal. Valmimisperioodi järel algab rakkudel ooteperiood. Ooteperiood on etapp, kus rakk ootab idanemiseks teatud keskkonnasignaali, selleks võib olla temperatuuri tõus (Anderson & Morel, 1979), valgustugevuse suurenemine (Binder & Anderson, 1986) hapniku juurdepääs anaeroobsesse keskkonda (Keafer *et al.*, 1992).

3.3 Dinoflagellaatide toitumisstrateegiad

Uue rakumaterjali tootmiseks on vaja süsinikku, mida dinoflagellaadid omastavad kasutades erinevaid strateegiaid. Fotoautotroofid saavad süsinikku vees lahustunud süsihappegaasist ning selle transpordiks ja biosünteesiks vajalikeks keemilisteks ühenditeks vajaminev energia ammutatakse valgusenergiast fotosünteesi abil. Umbes pooltel dinoflagellaatidest puuduvad kloroplastid ja seetõttu ei ole nad võimelised fotosünteesima. Nad on obligatoorsed heterotroofid, saades süsiniku orgaanilistest süsinikuühenditest (lahustunud või osakeselisest orgaanilisest ainest) ja energia keemiliste ühendite oksüdeerimisest (Gaines & Elbrächter, 1987). Paljud fototroofsed liigid on võimelised osakeselist toitu neelama (fagotsütoos) ja neid nimetatakse heterotroofideks. Kõiki dinoflagellaate ei saa jaotada heterotroofideks või fototroofideks. Paljud liigid suudavad nii fotosünteesida kui heterotroofselt toituda – neid nimetatakse miksotroofideks (Sanders *et al.*, 1990; Jones, 1994; Stoecker, 1998; Tittel *et al.*, 2003). Mitmed dinoflagellaadid, kes moodustavad veeõitsenguid ja on arvatud siiani olema fotoautotroofsed, on miksotroofsed (Jeong *et al.*, 2005).

Miksotroofseid ainurakseid jagatakse troofsuse järgi neljaks (Jones, 1997): (i) ainuraksed, kelle peamine toitainete omastamise strateegia on heterotroofne ja fototroofiat kasutatakse vaid siis, kui saakorganismide arvukus piirab heterotroofset kasvu, näiteks *Ochromonas* spp. (Andersson *et al.*, 1989); (ii) fakultatiivsed fototroofid, kes valguse puudumisel toituvad fagotroofselt süsiniku ja energia saamiseks, nt. *Chrysochromulina brevifilum* (Jones *et al.*, 1993); (iii) fakultatiivsed fototroofid, kes toitainete saamiseks toituvad fagotroofselt, kui vees

ei ole piisavalt anorgaanilisi toitaineid, et käituda fototroofselt, nt. *Uroglena americana* (Kimura & Ishida, 1985), *Dinobryon sertularia* (Jones & Rees, 1994); (iv) fakultatiivsed fototroofid, kelle saagi p uidmise osakaal on väga madal, nad omastavad saaki vaid pikemajalise pimedaja perioodi ajal (Jones, 1997), näiteks mageveelised *Cryptomonas ovata* ja *Cryptomonas erosa* (Tranvik *et al.*, 1989).

Enamikul miksotroofsetel dinoflagellaatidel on püsivad kloroplastid, mõned liigid, näiteks *Amphidinium poecilochroum*, *Gymnodinium acidotum*, *Pfisteria piscicida*, *Dinophysis acuminata* suudavad mõnda aega säilitada saakorganismist omastatud kloroplaste (Fields & Rhodes, 1991; Burkholder *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2006). Dinoflagellaatide toitumismehhanismid ning saagi valik võivad olla väga erinevad.

Toitumismehhanismidest võib esineda näiteks terve saagi neelamine ehk fagotroofus (Hansen & Calado, 1999). See on laialt levinud kestata dinoflagellaatide perekondade seas, näiteks: *Gymnodinium*, *Gyrodinium*, *Noctiluca*, *Oxyrrhis* ja *Polykrikos* (Gaines & Elbrächter, 1987; Hansen, 1991b; Schnepf & Elbrächter, 1992). Saak omastatakse tavaliselt läbi pikivao. Mõnedel dinoflagellaatidel esineb toitumine "toitumistoru" kaudu (*tube feeding*), mille käigus imetakse saagi rakusisu välja (Hansen & Calado, 1999). Enne toidu allaneelamist saaklooma ts itoplasmat ei vedeldata, seetõttu võib mikroskoobis sageli näha saakorganismi organelle dinoflagellaadi toitevakuoolides. Taoline toitumismehhanism võib esineda kestata dinoflagellaatide perekondadel: *Amphidinium*, *Gymnodinium* ja *Gyrodinium* (Spero, 1982; Calado *et al.*, 1998; Larsen, 1988), kuid ka kestaga perekondadel: *Cryptocodinium*, *Dinophysis*, *Oxyphysis*, *Peridiniopsis* ja *Pfisteria* (Elbrächter, 1991; Hansen, 1991a; Jacobson & Andersen, 1994; Ucko *et al.*, 1997; Calado & Moestrup, 1997; Burkholder *et al.*, 1998). Rakuv aline seedimine (*pallium feeding*) esineb paljudel kestaga heterotroofsetel dinoflagellaatidel (näiteks *Protoperidinium* sp.) (Hansen & Calado, 1999). Need dinoflagellaadid kasutavad pseudopoodi, et ümbritseda ja seedida saaki *in situ* (Gaines & Taylor, 1984; Jacobson & Anderson, 1996). Pseudopoodi abil toitumine on teada ainult merelistel liikidel perekonnast *Protoperidinium* ja *Diplopsalis* (Hansen & Calado, 1999).

Dinoflagellaatide saagi seedimisele eelnevad selle p uidmine ja saagiga manipuleerimine. Olenevalt dinoflagellaadi ujumiskiirusest jaotatakse dinoflagellaate saagi „otsijateks“ ja saagi „varitsejateks“. Enamasti saagist kiiremini ujuvad dinoflagellaadid j alitavad saaki ja on saagi „otsijad“ ning saagist aeglasemini ujuvad dinoflagellaadid peavad saakorganismi varitsema ja l oksu p uidma (Hansen & Calado, 1999). Saaki otsivate dinoflagellaatide seas on kahte t uupi

jälitajaid, ühed piiravad oma saagi sisse ujudes ringjalt ümber raku (*Gyrodinium spirale* ja *G. dominans*) või sik-saki kujulise mustrina (*Protoperidinium* spp.) (Hansen, 1992; Jacobson & Anderson, 1996), teised (*Amphidinium crussum*, *A. poecilochroum*, *Frugilidium subglobosum*) kinnituvad oma saagile eelneva spetsiifilise ujumiskäitumiseta (Larsen, 1988; Hansen, 1991b; Skovgaard, 1996). Saagi „varitsejad“ on üldjuhul kiire ujumisvõimekusega ripsloomadest toituvad dinoflagellaadid (*Ceratium furca*, *Gymnodinium rubrum*, *G. sanguineum*, *Gyrodinium instriutum*, *G. puvillurdii*, *Oxyphysis oxytoxoides*) (Bursa, 1961; Bockstahler & Coats, 1993b; Jacobson & Andersen, 1994; Uchida *et al.*, 1997). Toksiline *Pfesteria piscicida*, kes sööb peale teiste protistide ka kalu, on ekstreemne näide sellest kategooriast. *P. piscicida* vabastab vette toksiine, mis surmab kala ja tungib seejärel amööbilaadselt kala kudedesse (Burkholder *et al.*, 1998).

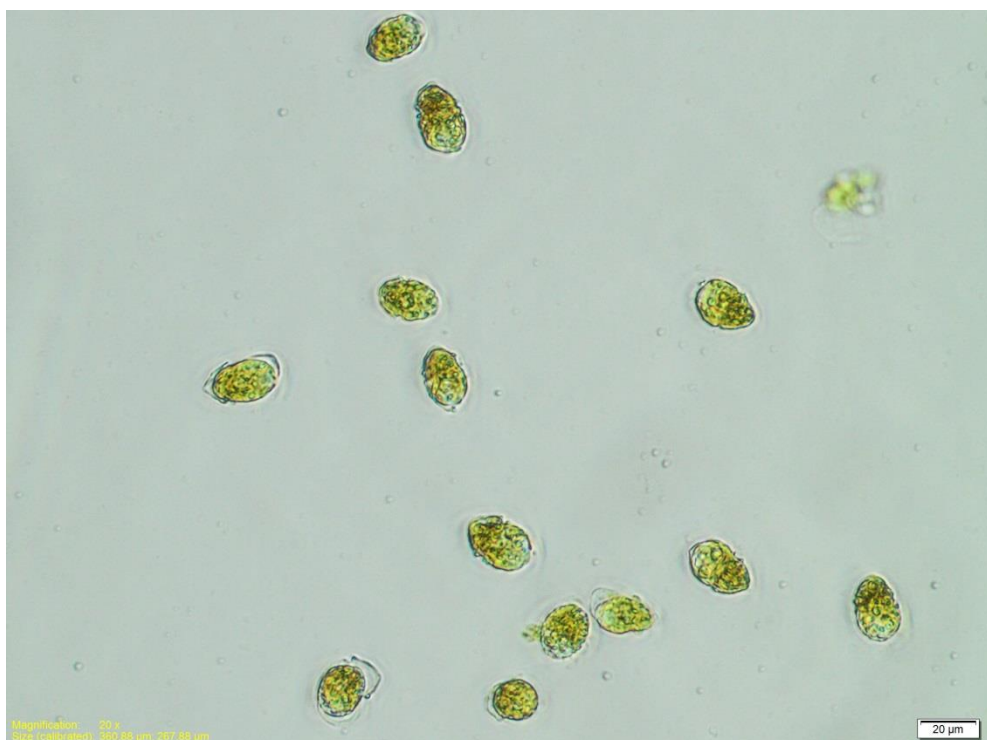
Mõned dinoflagellaadid (*Diplopsalis*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium*, *Perediniopsis*, *Protoperidinium* spp.) püüavad saaki filamendi heitmise abil, mis ühendab dinoflagellaadi oma toiduobjektiga (Hansen, 1992; Jacobson & Anderson, 1996; Calado & Moestrup, 1997). Filamendi pikkus ühtib üldiselt saaklooma suurusega ning on diameetrilt vähem kui 1 µm (Hansen & Calado, 1999). Sageli seedivad dinoflagellaadid enda suuruseid (Hansen *et al.*, 1994) või isegi suuremaid rakke (Skovgaard, 1996).

Miksotroofne eluviis nõuab panustamist nii fotosünteesi kui heterotroofsetesse rakusüsteemi osadesse (Tittel *et al.*, 2013). Arvatakse, et suuremate kulutuste tõttu on miksotroofid ja fakultatiivsed heterotroofid aeglasemad kasvajad võrreldes fotoautotroofidega (Rothhaupt, 1996). Mõnikord annab miksotroofne eluviis suured eelised fotoautotroofide ees. Anorgaaniliste toitainete ammendumise korral omastatakse orgaanilisi toitaineid või osakeselist toitu, milleks fotoautotroofid võimelised ei ole (Nygaard & Tobiesen, 1993) ning seetõttu võivad miksotroofid saavutada eelise anorgaaniliste toitainete vaestes tingimustes (Granéli & Carlsson, 1998). Miksotroofsed dinoflagellaadid suudavad omastada kuni 100% vajaminevast fosfori kogusest partikulaarset toitu omastades (Nygaard & Tobiesen, 1993). Dinoflagellaat *Gyrodinium sanguineum* suudab lämmastikuvaaes vee potentsiaalselt täita 15% oma lämmastikuvajadusest tarbides toidu ripsloomi (Bockstahler & Coats, 1993a). Kui fotosünteesi pole võimalik läbi viia sõltub miksotroofsete rakkude kasv saakorganismide kättesaadavusest. Miksotroofsus suurendab liikide püsimist koosluses varieeruvates keskkonnatingimustes.

3.4 *Heterocapsa triquetra*

Heterocapsa triquetra (Ehrenberg) Stein on mereline potentsiaalselt miksotroofne dinoflagellaat (Joonis 3). *H. triquetra* moodustab laiaulatuslikke veeõitsenguid ning arvatakse, et ta migreerub veesambas vertikaalselt (Kim *et al.*, 1990; Kononen *et al.*, 1999; Litaker *et al.*, 2002; Olli, 2004) *H. triquetra* ujumiskiiruseks turbulentses keskkonnas võib olla 0.5-0.75 m h⁻¹ (Anderson & Stolzenbach, 1985). Soome lahes on antud liigi vertikaalseks liikumise kiiruseks hinnatud kuni 1.6 m h⁻¹ (Lips *et al.*, 2011).

H. triquetra talub väga erinevaid soolsuseid (vahemikus 10-25) ja temperatuure ning on võimeline ellu jääma ka väga madalatel soolsustel nagu 3-5. Mõlemas soolsuse vahemikus moodustab dinoflagellaat veeõitsenguid ning võib domineerida kooslustes. Rakkude kasvu optimaalseks temperatuuri vahemikuks on 10-25 °C, kuid nad suudavad jääda ellu ka 5 °C juures ning kasvada 8 °C toitaineterikkas vees rohkem kui 30 päeva (Jeong *et al.*, 2013).



Joonis 3: Etanooliga fikseeritud *Heterocapsa triquetra* rakud kultuuris mikroskoobi all vaadatuna

H. triquetra massvohamised on Läänemeres tavaliselt suvel, kui veetemperatuur on vahemikus 10-20 °C ning kaovad augustis või septembris. Maksimaalseks biomassiks õitsengute korral võib olla 10 000-100 000 rakku ml⁻¹ (Lindholm & Nummelin, 1999; Olli, 2004; Berge *et al.*, 2012).

H. triquetra ei erita toksiine (Hansen, 1995), kuid tema põhjustatud veeõitsengud on väga tihedad ning tekitanud seeläbi nii ökoloogilisi kui majanduslikke kahjusid (Litaker *et al.*, 2002). Tihedad õitsengud halvendavad nii valguse, hapniku kui ka toitainete tingimusi ning mõjuvad sel moel negatiivselt ökosüsteemile. Õitsengud rannikualadel võivad kahjustada turismimajandust. *H. triquetra* massvohamise ajal on vee läbipaistvus halb ning see põhjustab kehvasid valgustingimusi teistele fotoautotroofidele ning kaladele. Secchi ketta sügavus *H. triquetra* õitsengu ajal võib olla alla meetri (Lindholm & Nummelin, 1999). Õitsenguperioodiga kaasneb vee pH tõus, mis võib ulatuda üle 9 kuna fütoplankton vähendab lahustunud CO₂ kontsentratsiooni vees. *H. triquetra* talub kõrget pH-d, isegi üle 9, kuid teistele, kõrget pH mittetaluvatele liikidele, võib selline elukeskkond muutuda ebasobivaks (Berge *et al.*, 2012).

Sellel dinoflagellaatide liigil on oluline roll populatsiooni säilitamise suutlikkuses madala toitainetekontsentratsiooni ja valgustugevusega keskkonnas (Legrand *et al.*, 1998; Olli, 2004). Anorgaaniliste toitainete madala kontsentratsiooni korral suudab *H. triquetra* toitaineid omastada nii lahustunud kui partikulaarsel kujul (Baek *et al.*, 2011) ning madalal valgustugevusel ja isegi valguse täielikul puudumisel (Legrand *et al.*, 1998).

H. triquetra võib lülituda saakorganismidest toitumisele kui anorgaanilised toitained või valgustingimused on keskkonnas kasvu limiteerivaks teguriks (Legrand *et al.*, 1998; Stoecker, 1999), tarbides toiduks näiteks flagellate suuruses 3 µm ja ränivetikaid suuruses 6 µm (Legrand *et al.*, 1998), maksimaalse diameetriga 12.1 µm (Jeong *et al.*, 2005). Saagi neelab *H. triquetra* pikivao kaudu (Jeong *et al.*, 2005).

Saakorganismide tarbimise hulk *H. triquetra* rakkudel sõltub valguse limitatsiooni pikkusest. Lühiajalise inkubeerimisperioodi (24 h) jooksul toitainete limitatsiooni tingimustes on näidatud, et saagi omastamise hulk pimedas ühe raku kohta on 0.28-0.38 rakku päevas, samal ajal valguses on mõõdetud madalam tulemus: 0.1-0.16 rakku päevas. Pikaajalise inkubeerimisperioodi (111 h) ajal on aga *H. triquetra* saagi omastamise määr pimedas madalam (0.21 rakku päevas), kui valguses (0.39 rakku päevas) (Legrand *et al.*, 1998). Antud tulemused kehtivad eeldusel, et pikemaajalise pimeperioodi jooksul vähenenud saagi omastamist ei mõjuta bakteriaalne ega keemiline riknemine inkubatsiooni käigus (Legrand *et al.*, 1998). Erinevate flagellaatide liikidega läbi viidud katsetes, kus uuriti saagi omastamist pimedas ja valguses, pole tulemustes kindlat seaduspärasust leitud. *Poteroochromonas malhamensis* puhul ei ole leitud, et valgusintensiivsus mõjutaks saagi omastamist ja rakkude

kasvu (Sanders *et al.*, 1990). Merelise *Ochromonas* sp. bakterite omastamine on väiksem madalamatel valgustingimustel (Keller *et al.*, 1994).

H. triquetra fagotroofne toitumine pimedas mängib olulist rolli keskkonnas, kus lühiajaliselt ei ole fotosünteesimiseks piisavalt valgust. Obligatoorse fototroofina ei suuda *H. triquetra* kasvada pimedas (Stoecker, 1999), kuid miksotroofne toitumine võib lühiajaliselt toetada rakkude kasvu (Jeong *et al.*, 2005).

3.5 Pinna-alused fütoplanktoni biomassi maksimumid ja vertikaalne migratsioon

Läänemeres on sageli registreeritud pinna-aluseid fütoplanktoni klorofüll *a* maksimume (Kononen *et al.*, 1998; Pavelson *et al.*, 1999; Kononen *et al.*, 2003). Tüüpilised nn „õhukeste kihtide“ paksused ulatuvad mõnest sentimeetrist kuni mõne meetrini. Kahekihiline hoovus, ajas ja ruumis varieeruv püknokliini sügavus, mesomastaapsed füüsikalised protsessid ning minimaalne turbulents segunemine on õhukeste kihtide moodustumiseks soodsad tingimused (Lund-Hansen *et al.*, 2006). Soome lahes on pinna-aluste klorofüll *a* maksimumide ja õhukeste kihtide tekke eelduseks vertikaalne stratifikatsioon, estuaari tüüpi voolamine (ülemises veekihis liigub vesi lahest välja ja sügavamates kihtides lahte sisse) ning tuuletekkelised mesomastaapsed vee liikumised (Liblik, 2012).

Soome lahes esinevad pinna-alused klorofüll *a* maksimumid suvises temperatuuri kihistumise tingimustes, kus ülemises segunenud veekihis on toitained ammendunud, kuid kõrged toitainetevarud on saadaval allpool sesoonsel termokliini. Klorofüll *a* maksimumid tekivad termokliini alaossa, langedes kokku nutrikliini ehk toitainete hüppekihi sügavusega, mis paikneb kesmiselt 23 m sügavusel. (Lips *et al.*, 2010).

Vertikaalne migratsioon on efektiivne ellujäämisstrateegia stratifitseerunud keskkonnas, kus valgus ja toitained on eraldatud füüsikaliste gradientidega (Lips & Lips, 2014). Vertikaalne migreerumisvõime võimaldab rakkudel pääseda ligi sügavamas veekihis asuvatele toitainetele või vältida päeval liiga intensiivset valguskiirgust veepinna lähedal (Cullen & Horrigan, 1981; Passow, 1991). Dinofalgellaatide ujumiskiirus sõltub liigist ja raku suurusest, varieerudes 150–500 $\mu\text{m s}^{-1}$. Teoreetiliselt tähendab see rakkude võimekust ujuda kuni 1.8 m h⁻¹ (Hand *et al.*, 1965). Sügavamas veekihis olevaid nitraatide varusid on peetud dinoflagellaatide *Alexandrium tamarense* (MacIntyre *et al.*, 1997), *Prorocentrum minimum* ja *Ceratium furca*

(Olsson & Granéli, 1991) öise migreerumise põhjuseks. *Gonyaulax catenata* (Passow, 1991) ja *Gymnodinium splendens* (Cullen & Horrigan, 1981) migreeruvad päeval sügavamatesse kihtidesse vältimaks liiga tugevat valgustugevust, mis pärsiks fotosünteesi (Fauchot *et al.*, 2005). Selline migreeruv käitumine võib olla kontrollitud fototaksise (liikumine valguse poole või valgusest eemale), geotaksise (orienteerumiseks kasutatakse Maa gravitatsiooni), ööpäevaste rütmide (päeva ja öö vaheldumine) või rakusisese toitainete sisalduse põhjal (Cullen & Horrigan, 1981; Passow, 1991; MacIntyre *et al.*, 1997).

H. triquetra on hea vertikaalne migreeruja (Olli, 2004). *H. triquetra* moodustab suvel Soome lahes pinna-aluseid biomassi maksimume 20-30 m sügavusel, jäädes nitrakliini peale (Lips & Lips, 2014). Nitrakliin asub Soome lahes fosfokliinist sügavamal, mistõttu oletatakse, et rakud migreeruvad just nitrakliinini, et omastada eelkõige lämmastikuühendeid, mis on ülemises segunenud veekihi kasvu limiteerivaks. Rakkude migratsioon võib olla bimodaalne. Osa *H. triquetra* populatsioonist migreerub keskpäevaks ülemistesse veekihtidesse tagasi, et fotosünteesida ja paljuneda, teine osa jääb sügavamatesse kihtidesse kauemaks (Lips *et al.*, 2011; Lips & Lips, 2014). Valguse puudumisel saavad rakud lämmastikuühendeid omastada nii kaua, kuni neil jätkub fotosünteesist saadud energiat, millest peab piisama ka pinnakihti tagasi ujumiseks. Neil ei ole põhjust kauemaks kui toitainetevarude täitmiseks pimedasse jääda. Rakud pääsevad eufootilisse kihti piirkondades, kus on nõrgem stratifikatsioon ning ei esine aktiivset vee segunemist (Lips & Lips, 2014). Selliseid soodsaid olusid mitte leides võivad rakud eufootilisse kihti mitte pääseda.

3.6 Toitainete omastamine valguse puudumisel

Fütoplankton vajab biomassi tootmiseks palju toitaineid, eriti tähtis on lämmastik, mis on Soome lahes peale kevadõitsengut fütoplanktoni kasvu limiteerivaks komponendiks. Arvatavasti on pimedas toitainete omastamise ja veesambas vertikaalselt migreerumise võime dinoflagellaatide põhjustatud õitsengute tekkimise ning püsimise eelduseks (Eppley *et al.*, 1968; Dortch & Maske, 1982; Lips & Lips, 2014). Teistes Läänemere basseinides, nagu Botnia lahes, võib limiteerivaks toitaineiks olla ka fosfaat.

Laboratoorsed uuringud on näidanud, et nitraadi (NO_3^-) omastamine pimedas toetab dinoflagellaatide kasvu: *Gymnodinium splendens* (Cullen & Horrigan, 1981), *Prorocentrum minimum*, *P. micans*, *Ceratium furca* (Olsson & Granéli, 1991), *Alexandrium tamarense* (MacIntyre *et al.*, 1997). Dinoflagellaatide võimekus pimedas nitraati omastada varieerub

olenevalt liigist. Mõned dinoflagellaadid on võimelised pimedas omastama nitraati vaid peale lühiajalist lämmastikunälga (Paasche *et al.*, 1984; Cullen, 1985), aga liikidel näiteks *Gyrodinium aureolum* ja *Gymnodinium galatheanum* puudub peaaegu täielikult võimekus pimedas nitraati omastada (Paasche *et al.*, 1984). Nitraadi assimilatsioon öösel sõltub süsivesikute hulgast. Süsivesikud akumulieruvad toitainete lõppemise korral või liiga tugeva valgusintensiivsuse puhul. Süsivesikuid lagundatakse kui puudub valgus, CO₂ või kui paraneb toitainete kättesaadavus (Olli, 1997).

4. Materjal ja meetodid

4.1 Eksperimendi ülesehitus ja kasvutingimused

H. triquetra rakud isoleeriti Soome lahest 2012. aasta juulis ja valmistati mitteamneiline monokultuur, mida kasvatati filtreeritud ja autoklaavitud mereveest valmistatud modifitseeritud f/2 söötmes (Guillard & Ryther, 1962), mida tähistatakse T2 (Spilling *et al.*, 2011). Kultuure säilitati kontrollitud kasvutingimustes temperatuuril 15 °C, valgustugevusel 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ning valguse:pimeduse tsükkel oli 16:8 h. Eksperiment viidi läbi samades tingimustes kui ei ole öeldud teisiti. Kümme päeva enne eksperimendi algust inokuleeriti väike kogus kultuuri (1-2 ml) kahte 250 ml Erlenmeyeri kolbi, mis olid eeltäidetud 120 ml ulatuses steriilse mereveega. Kolbidesse lisati fosfaati arvutuslikult 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ning 24 $\mu\text{mol L}^{-1}$ nitraati, mikroelemente ja vitamiine lisati nitraadiga samas koguses. Fosfaati lisati liias (N:P = 4) kuna sooviti vältida fosfaadi limitatsiooni teket kultuurides.

Katse alguses lisati *H. triquetra* kultuuri inokulum kolme 500 ml Erlenmeyeri kolbi, mis täideti seejärel filtreeritud ning autoklaavitud mereveega, saavutades rakkude arvukuse 820 rakku ml^{-1} . Kultuure lahjendati ühel korral, katse teisel päeval, steriilse ja toitainetevaese mereveega, et vältida eksponentsiaalse kasvu järel võimalikku lahustunud CO₂ limitatsiooni (ja sellest tulenevalt pH tõusu). Rakkude arvukus eelistati hoida alla 1000 raku ml^{-1} , kuna sellise tiheduse juures püsis kultuuride pH looduslikule mereveele sarnases vahemikus (7.7-8.2), mis lubas eeldada, et rakkudel on piisav juurdepääs lahustunud süsihappegaasile. Katse kuuendal päeval kui rakud olid jõudnud statsionaarsesse kasvufaasi, jaotati kultuurid kuude 500 ml kolbi, igasse mõõdeti 230 ml (± 2.5 ml) kultuuri. Enne kolbidesse jaotamist valati rakukultuurid kokku 3 L anumasse, et ühtlustada rakutihedused. Kolm kultuuri säilitati ülal kirjeldatud kasvutingimuste juures kuni katse lõpuni, ülejäänud kolm määsiti fooliumisse ning neile lisati toitaineterikast kasvusöödet. Selleks valmistati kahekordselt lahjendatud T2 sööde ja seejärel lisati 1.59 ml söödet kultuuridele: fosfaadi lõppkontsentratsioon oli 0.124 $\mu\text{mol L}^{-1}$, nitraadil 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (N:P=16). Seejärel inkubeeriti kultuure pimedas 4 °C juures 48 h, misjärel viidi kultuurid tagasi 15 °C ja valgustugevuse 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juurde (Joonis 4). Peaaegu igapäevaselt kontrolliti kultuuride pH-d (pH-meeter Mettler Toledo SevenEassey), mida vajadusel reguleeriti 1M HCl lahusega ning võeti proove rakkude arvukuse ja fotosünteesi parameetrite mõõtmiseks. Katse lõpetati kui rakukultuurid olid jõudnud surmefaasi, ehk nende kasvukiirus oli negatiivne enam kui ühel päeval.



Joonis 4: *H. triquetra* kultuurid. Esireas eksperimendi kestel toitainete poolt limiteeritud kultuurid, tagareas toitainetega rikastatud kultuurid, mis on hetk tagasi pimedast esialgsetesse kasvutingimustesse tagasi toodud.

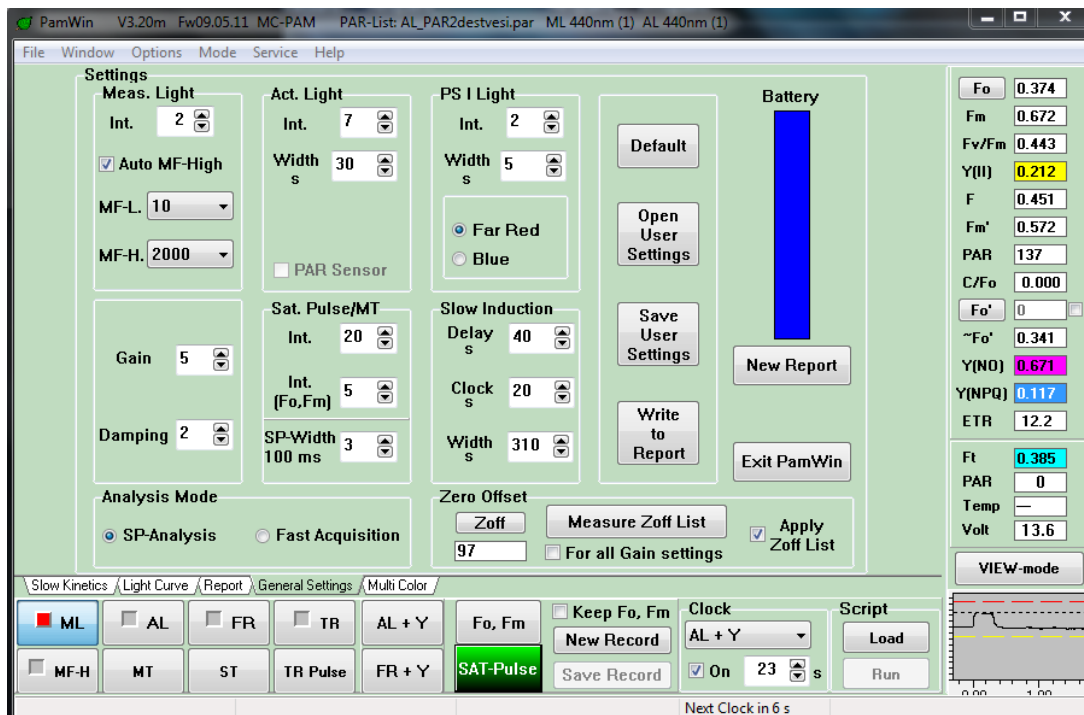
4.2 Rakutiheduse ja fotosünteesiparameetrite mõõtmine

Rakutiheduse loendamiseks pipeteeriti kultuuridest 1-3 ml proovi 20 ml plastikviaalidesse. Rakkude lugemise lihtsustamiseks lahjendati vajadusel proove steriilse mereveega. Proovid fikseeriti Lugol'i lahusega, fikseeritud proovi hulk oli 3 ml. Rakkude loendamiseks kasutati Sedgewick Rafter loenduskambrit, mille maht on 1 ml. Kultuuride kasvukiirus arvutati võrrandiga 1:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{N_{t_1}}{N_{t_0}}\right)}{\Delta t} \quad (1)$$

kus μ on kasvukiirus (päevas), N_{t_0} rakkude algkontsentratsioon, N_{t_1} rakkude arvukus ajahetkel t_1 , $\Delta t = t_1 - t_0$ on aeg (päevades).

Fotosünteesiparameetrite mõõtmiseks kasutati MULTI-COLOR-PAM fluoromeetrit (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Saksamaa) (Joonis 5).



Joonis 5: MULTI-COLOR-PAM fluoromeeteri programmiaken.

Enne mõõtmiste alustamist jälgiti, et nõrgale pulseerivale valgusele ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 440 nm) eksponeeritud rakkude fluorestsentsi signaal reaajas (F_t), mis on proovi tihedusest sõltuv, oleks $\sim 0.02-0.03$. Selline väärtuste vahemik saadi pilootmõõtmiste käigus, et selgitada minimaalne arvukus, mille juures fluoromeeter detekteeriks signaali. Sobiva F_t väärtuse saamiseks lahendati vajadusel proovi steriilse toitainetevaese mereveega või muudeti instrumendi tundlikkuse astet. Kõikidel replikaatidel mõõdeti fotosünteesi fluorestsentsi parameetreid kolm korda.

Analüüsiks pipeteeriti kvartsküvetti 1.5 ml kultuuri, mida seejärel hoiti 10-20 min pimedas (fooliumisse mässituna) 15°C juures. Pimeadaptatsioon on eeltingimus minimaalse fluorestsentsi (F_0) mõõtmiseks. Seejärel pandi küvetti magneetiline segaja, vältimaks rakkude settimist küveti põhja ning proov asetati fluoromeetrisse. Fluorestsentsi parameetrid mõõdeti pärast taustafluorestsentsi maha arvutamist, mis oli eelnevalt mõõdetud steriliseeritud mereveest.

Maksimaalne fotosünteesi efektiivsus pimeadapteeritud kultuuris (F_v/F_m) saadi eksponeerides proovi esmalt 30 sekundit nõrgale pulseerivale valgusele ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 440 nm), mis on piisavalt nõrk, et mitte redutseerida PSII elektronaksepteoreid, aga võimaldab detekteerida minimaalse fluorestsentsi (F_0). Seejärel rakendati lühike PSII reaktsioonitsentreid küllastav valgusimpulss (300 ms , $5710 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 440 nm) ja mõõdeti fluorestsentsi maksimum (F_m).

Neid parameetreid mõõdeti kolm korda umbes 30 sekundiliste intervallide järel, lastes küllastavate impulsside vahel PSII reaktsioonitsentritel reoksüdeeruda. F_v/F_m arvutati valemiga 2 (Kitajima & Butler, 1975):

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m} \quad (2)$$

Võrrand (2) kirjeldab potentsiaalset fotosünteesivõimekust kui PSII reaktsioonitsentrid on oksüdeeritud. Seda parameetrit kasutatakse fütoplanktoni füsioloogilise seisundi hindamisel. Fluorestsentsi maksimumi (F_m) ja miinimumi (F_0) erinevus on muutuv fluorestsents (F_v).

Fotosünteesi efektiivsuse leidmiseks valgusele adapteeritud kultuurides eksponeeriti rakud 30 sekundiks pidevale valgusele ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 440 nm). Selle aja jooksul stabiliseerus F , mis näitab, et sel valgustugevusel saavutati stabiilne elektronvoog. Seejärel rakendati PSII reaktsioonitsentreid küllastav valgusimpulss (300 ms, $5710 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 440 nm) ja saadi maksimaalne fluorestsentsi saagis (F_m') valgusele adapteeritud rakkudel. Fotosünteesi efektiivsus valgusele adapteeritud kultuuris arvutati valemiga (Genty *et al.*, 1989):

$$\varphi_{II} = \frac{F_v'}{F_m'} = \frac{F_m' - F_0'}{F_m'} \quad (3)$$

Võrrand (3) näitab proportsiooni neelatud valgusenergiast, mida kasutati fotosünteetilisteks reaktsioonideks.

Fluorestsentsi mittefotokeemiline kustumus (φ_{NPQ}) on proportsioon neelatud valgusenergiast, mis rakutöö reguleerimise tulemusena valgust püüdvate antennide tasandil läheb soojuskadudeks. See arvutati valemiga (Genty *et al.*, 1996):

$$\varphi_{NPQ} = \frac{F}{F'_m} - \frac{F}{F_m} \quad (4)$$

Fluorestsentsi ja soojuskadude proportsioon neelatud valgusenergiast PSII reaktsioonitsentrite tasandil, mille hulka rakk aktiivselt reguleerida ei saa, tähistati φ_{NO} ja arvutati valemiga (Genty *et al.*, 1996):

$$\varphi_{NO} = \frac{F}{F_m} \quad (5)$$

φ_{II} , φ_{NPQ} ja φ_{NO} on komplementaarsed saagised, mille summa on 1:

$$\varphi_{II} + \varphi_{NPQ} + \varphi_{NO} = 1 \quad (6)$$

4.3 Toitainete analüüs

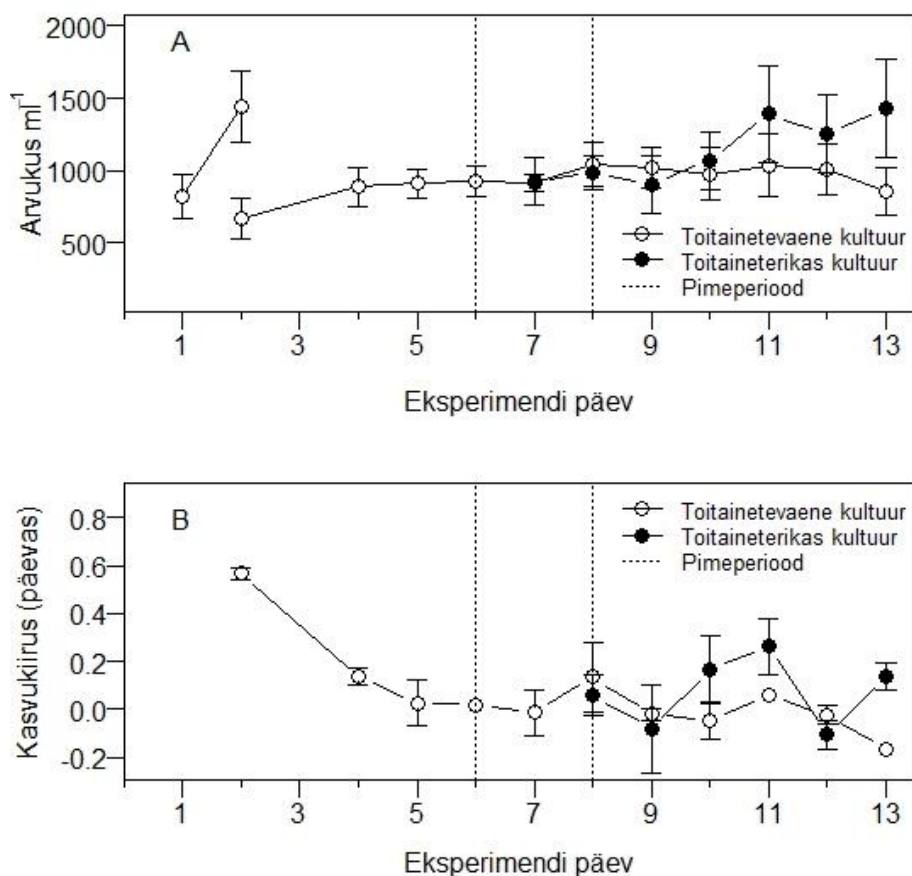
Anorgaaniliste toitainete, nitraadi + nitriti (NO_x) ja fosfaadi, analüüsideks võeti rakukultuuridest proove eksperimendi jooksul kokku kuuel korral: katse alguses, enne ja pärast lahjendusi, pärast toitainete lisamist, pärast 48 h pimeinkubatsiooni ja katse lõpus. Lisaks võeti proove katses kasutatud autoklaavitud toiteineteveaesest veest. Proovid koguti 10 ml Falcon tuubidesse ning sügavkülmutati $-20\text{ }^\circ\text{C}$ juures kuni analüüsides läbiviimiseni. Toitainete analüüsid viidi läbi vastavalt ISO 15681-1 meetodile NO_x mõõtmiseks, kasutades toitainete automaatanalüsaatorit Lachat QuikChem 8500 Series 2 (Lachat Instruments, Hach Company). Määramispiir PO_4^{3-} ja NO_3^- määramisel oli vastavalt 0.06 ja $0.07\ \mu\text{mol L}^{-1}$.

5. Tulemused

5.1 Rakukultuuride arvukuse ja kasvukiiruse dünaamika

Toitainetevaestes kultuurides peatus rakkude kasv ootuspäraselt pärast eksperimendi kolmandat päeva, jäädes arvukuse 900-1000 rakku ml^{-1} juurde (Joonis 6A). Rakkude kasvukiirus langes ja jäi eksperimendi viiendast päevast nulli ümber (Joonis 6B).

Toitaineterikaste kultuuride arvukus pärast pimedas inkubeerimist kasvas alates eksperimendi kümnendast päevast, so kaks ööpäeva pärast pimeinkubatsioonaja lõppu, 31.6%. Kahe kultuuri arvukused ei olnud statistiliselt oluliselt erinevad (t-test, $p = 0.144$, $n = 21$). Toitaineterikaste kultuuride maksimaalne kasvukiirus jäi ~ 0.2 (päevas) juurde (Joonis 6B).

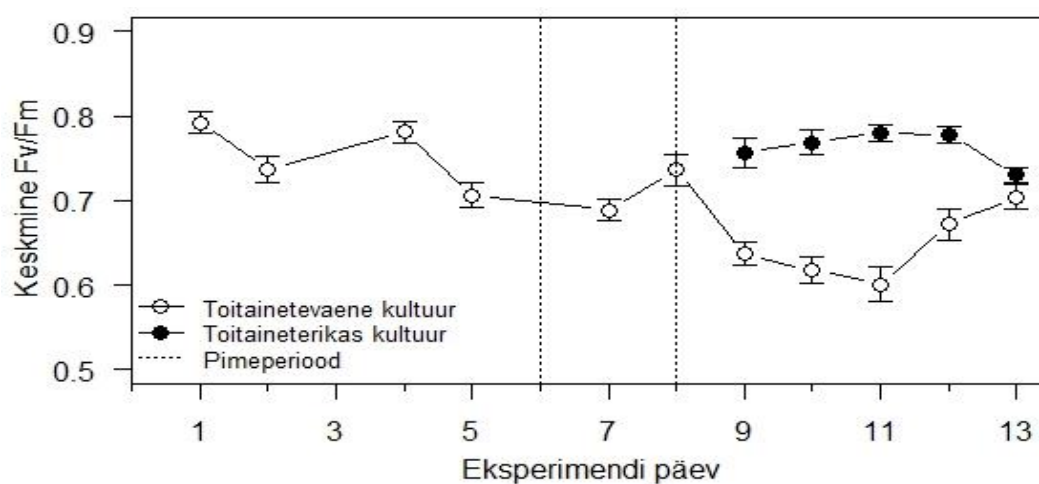


Joonis 6: *Heterocapsa triquetra* arvukus (A) ja kasvukiirus (B) toitainetevaestes ja -rikastes kultuurides eksperimendi kestel. Sümbolid tähistavad triplikaatide keskmiseid. Veapiirid näitavad keskväärtuse standardviga ($n=3$).

5.2 Fotokeemiline aktiivsus

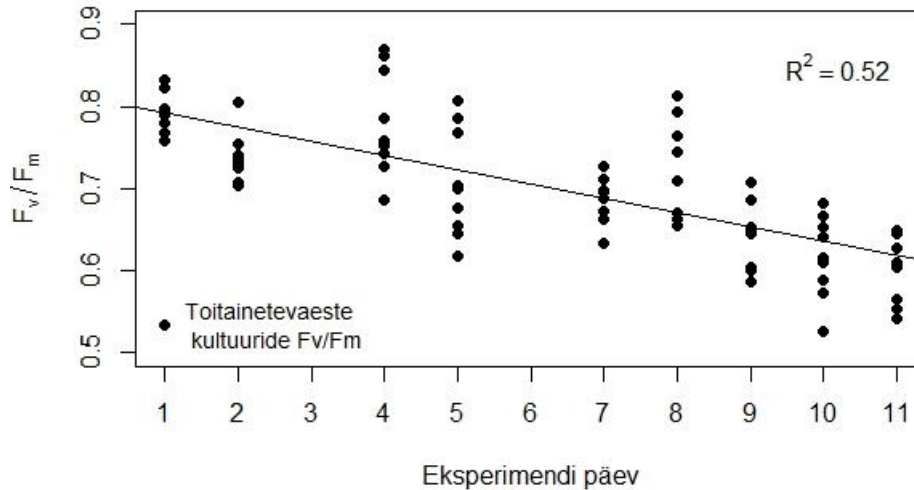
5.2.1 Maksimaalne fotosünteesi efektiivsus

Maksimaalne fotosünteesi efektiivsus (F_v/F_m) langes toitainetevaestes kultuurides kuni eksperimendi 11. päevani, kahanedes 0.8st 0.6ni (Joonis 7), näidates rakkude maksimaalse fotosünteesi võimekuse vähenemist ehk järjest enamate reaktsioonitsentrite töövõimetuks muutumist. Toitainetevaeste kultuuride F_v/F_m vähenes ajas (Joonis 8; Regressioonanalüüs, $R^2 = 0.52$, $p = 1.77 \cdot 10^{-14}$). Katse kahel viimasel päeval tõusis toitainetevaestes kultuurides F_v/F_m väärtuseni 0.7, mis viitab töökorras reaktsioonitsentrite osakaalu tõusule ning raku fotosünteesi aparraadi üldisele paranemisele. Toitainetevaeste kultuuride F_v/F_m ja kasvukiiruse vahel statistiliselt olulist korrelatsiooni ei leitud (Pearsoni korrelatsiooni analüüs, $R = 0.32$, $p = 0.07$, $n = 33$).



Joonis 7: *Heterocapsa triquetra* toitainetevaeste ja -rikaste kultuuride fotosünteesi efektiivsus. Sümbolid tähistavad triplikaatide keskmiseid. Veapiirid näitavad keskväärtuse standardviga ($n = 3$).

Toitaineterikaste kultuuride F_v/F_m saavutas pärast pimeinkubatsiooni suurema stabiilsuse ning väärtused jäid 0.75-0.8 juurde, näidates toitainetevaestest kultuuridest paremat füsioloogilist seisundit eksperimendi teises pooles. Kahe kultuuri F_v/F_m väärtused olid statistiliselt oluliselt erinevad (t-test, $p = 2.57 \cdot 10^{-9}$, $n = 45$).



Joonis 8: Toitainetevaeste kultuuride F_v/F_m ajas, mida saab kirjeldada võrrandiga $F_v/F_m = 0.81 \cdot \text{aeg} - 0.02$.

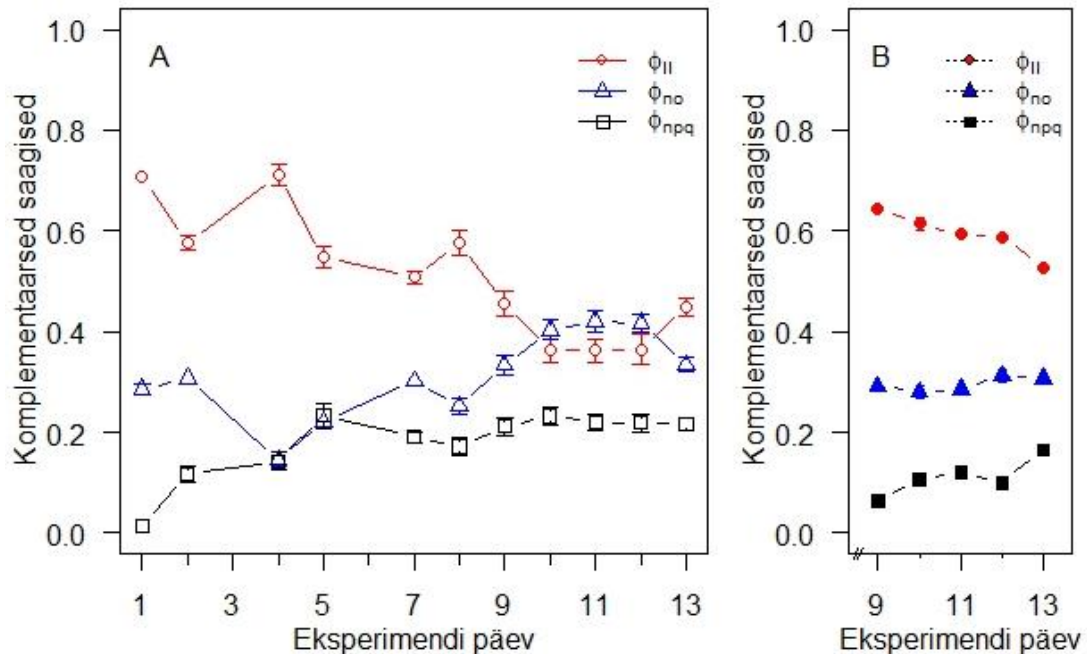
5.2.2 Komplementaarsed fluorestsentsisaagised

Komplementaarsete fluorestsentsisaagiste dünaamika toitainetevaestel kultuuridel oli eksperimendi esimeses pooles suhteliselt ebastabiilne (järsud muutused ϕ_{II} ja ϕ_{NO} parameetritel). Eksperimendi teises pooles on nende dünaamika stabiilsem, kuid toimunud on fotoregulatiivne muutus. ϕ_{II} langes eksperimendi jooksul langenud F_v/F_m tõttu (järjest suurem osa reaktsioonitsentritest muutus töövõimetuks) ja suurenenud ϕ_{NPQ} ja ϕ_{NO} tõttu.

Kui eksperimendi alguses kasutasid rakud 60–70% neelatud energias fotosünteetilisteks reaktsioonideks (ϕ_{II}), siis eksperimendi lõpus oli selleks vaid 40%. Eksperimendi lõpus süvenevas toitainetstressis, kadus kõige suurem osa neelatud energias soojuseks ja fluorestsentsiks (ϕ_{NPQ} ja ϕ_{NO}). Umbes 45% neelatud valgusenergiast eraldus reaktsioonitsentrite tasandil (ϕ_{NO}), väiksem osa neelatud energias eraldus valgust püüdvate pigmentide antennitasandilt (ϕ_{NPQ}), olles eksperimendi esimestel päevadel 0.1 ja viimastel päevadel 0.2.

Komplementaarsete fluorestsentsisaagiste dünaamika toitaineterikastel kultuuridel oli märkimisväärselt stabiilsem kui enne toitainete lisamist katse esimeses pooles. Pimeinkubatsiooni järel kasutati ~60% neelatud valgusenergiast fotosünteetilisteks reaktsioonideks (ϕ_{II}), katse lõpus langes see ~40-50% juurde. ϕ_{NPQ} oli pärast pimeinkubatsiooni vahemikus 0.06-0.17, seevastu ϕ_{II} langes komplementaarselt 11%

vahemikus 0.64-0.53 katse lõpus. ϕ_{II} langus ja komplementaarne ϕ_{NPQ} tõus tähendab, et üha suurenev osa neelatud energiast suunati soojusenergiaks ja vähenev osa fotosünteetilisteks reaktsioonideks. ϕ_{NO} väärtused püsisid ~ 0.3 juures pimeinkubatsiooni lõpust kuni katse viimase päevani.



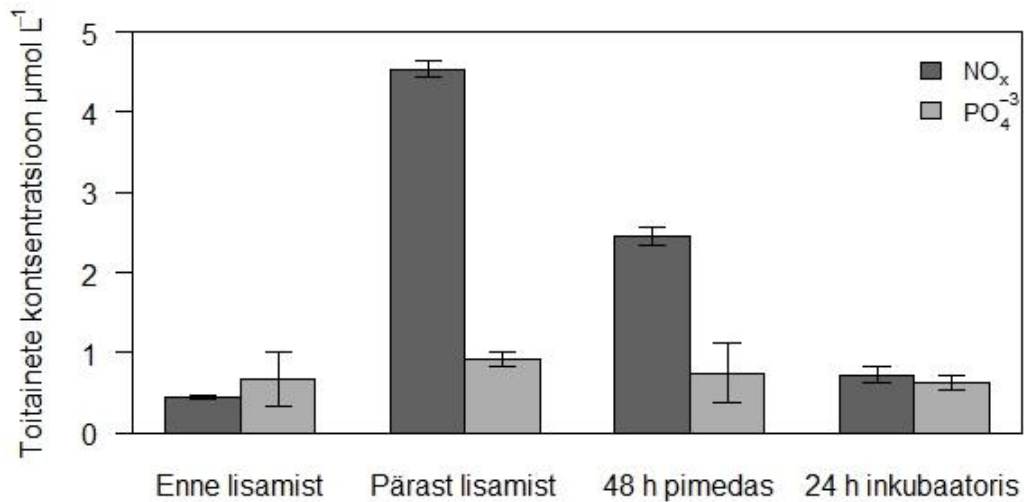
Joonis 9: *Heterocapsa triquetra* toitainetevaeste (A) ja toitaineterikaste kultuuride (B) komplementaarsed fotosünteesi fluorestsentsi parameetrid: efektiivne fotosünteesi efektiivsus (ϕ_{II}), reguleeritav mittefotokeemiline energia kustutus (ϕ_{NPQ}) ja mittereguleeritav mittefotokeemiline energia kustutus (ϕ_{NO}). Sümbolid tähistavad triplikaatide keskmiseid. Veapiirid näitavad keskväärtuse standardviga ($n = 3$).

5.2.3 Toitainete omastamine

Enne toitainete lisamist katse kuuendal päeval oli kultuurides $0.44 \mu\text{mol L}^{-1}$ nitraati ning $0.67 \mu\text{mol L}^{-1}$ fosfaati (Joonis 10).

Katse kuuendal päeval rikastati enne pimedasse viimist pooled kultuurid toitainetega. Toitainete lisamise järel oli kolbides $4.53 \mu\text{mol L}^{-1}$ nitraati ja $0.91 \mu\text{mol L}^{-1}$ fosfaati. 48 h pimeinkubatsiooni järel vähenes oluliselt nitraadi sisaldus kultuuris (Joonis 10). Nitraati omastati pimeperioodi jooksul triplikaatide keskmisena $2.08 \mu\text{mol L}^{-1}$, fosfaati $0.15 \mu\text{mol L}^{-1}$. Pärast pimeperioodi mõõdeti toitainete sisaldust uuesti 24 h möödumisel inkubaatoris, kus oli valguse:pimeduse tsüklil (16:8 h) ning valgustugevus $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mille jooksul oli

kolme replikaadi keskmisena omastatud $1.69 \mu\text{mol L}^{-1}$ nitraati ja $0.14 \mu\text{mol L}^{-1}$ fosfaati. Nitraati ja fosfaati omastas *H. triquetra* nii pimedas kui valges üsna sarnases suhtes, vastavalt 13:1 ja 12:1.



Joonis 10: Toitainete (NO_x, PO₄³⁻) sisaldus toitaineterikastes kultuurides enne toitainete lisamist ja pimedasse viimist, pärast toitainete lisamist pimedasse viies, pärast 48 h pimedas ning pärast seda, kui kultuurid olid olnud 24 h inkubaatoris (valge:pime tsüklil 16:8, valgustugevus $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Tulbad tähistavad triplikaatide keskmiseid. Veapiirid näitavad keskväärtuse standardviga (n=3).

Toitainetevaestes kultuuridesse ei lisatud katse lõpuni toitaineid, ometi näitasid viimasel päeval võetud toitainete analüüsid NO_x sisalduseks triplikaatide keskmisena $1.32 \mu\text{mol L}^{-1}$, ehk NO_x kontsentratsioon katse lõpuks toitainetevaestes kultuurides tõusis kolmekordseks.

6. Arutelu

Töö peamiseks eesmärgiks oli näidata, et dinoflagellaat *Heterocapsa triquetra* suudab pimedas omastada toitaineid ning sisemiste toitainete varude abil paljuneda ning parandada oma füsioloogilist seisundit ja fotosünteesivõimekust. Katses selgus, et *H. triquetra* on võimeline pimedas anorgaanilisi toitaineid omastama, mille tulemusena paranes maksimaalne fotosünteesi efektiivsus (F_v/F_m) ning säilis kõrge efektiivne fotosünteesi efektiivsus (ϕ_{II}) võrreldes toitainete lisamise eelse perioodiga.

Katse tulemused näitasid, et *H. triquetra* suudab säilitada populatsiooni suurust ja head fotosünteesivõimekust suhteliselt pikka aega pärast toitainete lõppemist vees. Sellised tulemused lubavad eeldada, et suvisel ajal ülemises segunenud veekihi esinev *H. triquetra* võib taluda hästi toitainetevaeseid tingimusi, kuni kasvuks sobilike tingimuste paranemiseni. Selle tõestuseks on Soome lahe ülemises toitainetevaeses segunenud veekihi registreeritud 2009. aastal kõrgeid klorofüll *a* sisaldused, kui koosluses domineerisid tsüanobakterid ja *H. triquetra* (Lips *et al.*, 2011). Öitsengud kestsid üle ühe nädala, langeses põhimõtteliselt kokku magistritöö katse pikkusega.

Pärast 48 h toitaineterikast pimeinkubatsiooni ei tõusnud uue valgusperioodi alguses rakkude kasvukiirus. Populatsiooni kasvu mõõdeti alles 72 h pärast pimeinkubatsiooni lõppu, mille üheks põhjuseks võib olla see, et toitainete mõju realiseerumine rakujagunemisena võib dinoflagellaatidel olla pikem protsess, mille tulemused on näha paari päevase viibega. Samal ajal oluliselt paranenud fotosünteesi efektiivsused (nii F_v/F_m kui ka ϕ_{II}) võrreldes toitainetevaeste kultuuridega, olid mõõdetavad juba järgmisel päeval pärast pimeinkubatsiooni lõppu. Tõenäoliselt kasutati sisemisi toitainete varusid kohe uute fotosünteesiks vajalike biomolekulide sünteesimiseks ja raku füsioloogia parandamiseks.

Nitraati ja fosfaati omastas *H. triquetra* nii pimedas kui valges sarnases suhtes. Rakud ei omastanud 48 h pimeperioodi jooksul toitaineid täielikult ära, seega kumbki element ei jäänud omastamist limiteerima, küll aga võis kultuuri söötmesse väike kogus järgi jäänud toitaineid mõjutada edasist kasvu järgnenud valgusperioodi vältel. Eksperimendi viimasel, 13. päeval, mõõdeti seni kogu aeg toitainete näljas olnud kultuurides oodatust kõrgemad nitraadi ja fosfaadi kontsentratsioonid, mille mõju võis avalduda ka fotofüsioloogia paranemises. Selle põhjuseks võiks olla vananevas kultuuris surnud rakkude poolt vette lekitatud toitained, mis toetasid elujõulisemate rakkude füsioloogiat.

6.1 Arvukus

Pärast eksperimendi teisel päeval tehtud lahjendust, mille eesmärgiks oli viia rakkude arvukus ~1000 rakku ml⁻¹ piirdesse, ei esinenud toitainetevaestes kultuurides enam rakkude arvukuses olulisi muutusi kuni katse lõpuni. Tõenäoliselt limiteeris rakkude kasvu madal NO_x kontsentratsioon. Magistritöö tulemused toetavad seda, et *H. triquetra* suudab fototroofina (lisaks potentsiaalsele mikstroofsusele) üle elada ebasobiva kasvuperioodi, mis võib olla ka tema domineerimise põhjuseks hilissuvistes õitsengutes. Populatsiooni püsimisele võis kaasa aidata toitainetevaestes kultuurides rakkude suuruse vähenemine (andmeid käesolevas töös esitatud ei ole), mis on omane oligotroofsetele veeökosüsteemidele (Rhee, 1978; Suttle & Harrison, 1988) ning võis olla potentsiaalne kohastumus üle elamaks mineraaltoitainetevaene periood.

Pimedas omastatud NO₃⁻ toetab mitmete dinoflagellaatide kasvu valguses (MacIntyre *et al.*, 1997). *H. triquetra* toitaineterikastes kultuurides oli kahel eksperimendi päeval pärast pimeperioodi positiivne kasvukiirus. Katses lisatud toitainete hulk oli piisav, et teoreetiliselt olnuks võimalik kultuuride arvukuse tõus 100% lühikese perioodi (2-3 päeva) jooksul, realselt kasvas populatsioon alates kümnendast katse päevast 31.6%. Arvukuse tõusu ei pruukinud põhjustada üksnes pimedas omastatud toitained, see võis olla tingitud ka pärast pimeinkubatsiooni valguses omastatud toitainete hulgast. Eeldatust madalam populatsiooni kasv võib olla seletatav erinevate põhjustega. Kasvu võis limiteerida liiga madal vees lahustunud CO₂ kontsentratsioon või tundsid rakud puudust mõnest mikroelemendist.

6.2 Kultuuride maksimaalne fotosünteesi efektiivsus

Fütoplanktoni rakkudele on olulised makrotoitained (näiteks nitraat ja fosfaat), mis on vajalikud rakkude kasvuks, ning piisav kogus rauda, mis on vajalik fotosünteesiaparaadi korrashoiuks (Mackey *et al.*, 2008). Rauda ja makrotoitainete limitatsioon tekitab füsioloogilist stressi. Pidev toitainetstress, kui muud kultiveerimise tingimused (valgus, temperatuur, lahustunud süsihappegaas) on optimaalsed (Parkhill *et al.*, 2001), avaldab mõju fotosünteesivõimekusele, mille heaks indikaatoriks on F_v/F_m . Madalaid F_v/F_m väärtusi võib seostada N ja/või P vaegusega ning toitainete lisamine võib viia kõrgemate F_v/F_m väärtusteni (Rattan *et al.*, 2012).

H. triquetra fotosünteesi efektiivsus (F_v/F_m) vahemikus 0.6-0.8 (Joonis 7) viitab rakkude potentsiaalselt hästi funktsioneerivale fotosünteesi aparaadile ja rakkude heale füsioloogilisele seisundile nii toitainetevaestes kui –rikastes kultuurides (Falkowski & Raven, 2007). Sarnase tulemusteni on jõudnud MacIntyre *et al.*, (1997) toitainete poolt limiteeritud *Alexandrium tamarense* poolkemostaatkultuurides. Oletatakse, et lämmastikunälja ajal on (ülearune) lämmastik (N) varutud CO₂ siduvasse ensüümi RUBISCO ja sealt on võimalik N mobiliseerida mujale lämmastikku vajavatesse funktsioonidesse, näiteks fotosünteesi aparaadi töösse, mis võib olla kõrge F_v/F_m põhjuseks (Geider *et al.*, 1998).

Lämmastiku limitatsiooni ajal toitainetevaestes kultuurides F_v/F_m langes (kuni katse 11 päevani), aga mitte kriitiliselt madalale tasemele. F_v/F_m tõus alates katse 11. päevast võis olla tingitud vananevas kultuuris rakkude poolt vette lekitatud toitainetest, mis parandasid teiste rakkude fotosünteesivõimekust. Lämmastikulimitatsioonist tingitud F_v/F_m vähenemist on dokumenteeritud ka teistel fütoplanktoni liikidel: *Phaeodactylum tricornutum* (Geider *et al.*, 1993), *Dunaliella tertiolecta* (Berges *et al.*, 1996; Geider *et al.*, 1998), *Thalassiosira weissflogii* (Berges *et al.*, 1996).

Toitaineterikaste kultuuride F_v/F_m väärtused olid kohe pimeinkubatsiooni lõppedes kõrgemad kui toitainetevaestel kultuuridel, mis tähendab, et pimedas omastatud toitained toetasid püsivat kõrget F_v/F_m ja seega rakkude head füsioloogilist tervist. Lämmastiku lisamise järel omastati NO₃⁻ tõenäoliselt kohe, et säilitada kõrge F_v/F_m . F_v/F_m reageerimine nii toitainete limitatsioonile kui nende lisamisele näitab, et F_v/F_m saab kasutada toitainete limitatsiooni diagnostikuna (Falkowski & Raven, 2007). Katse tulemused F_v/F_m kohta toitaineterikastes ja -vaestes kultuurides toetavad varem kirjanduses avaldatud tulemusi. Harilikult iseloomustab toitainetenäljas kultuuride F_v/F_m väärtusi vahemik 0.3-0.4 (Berges *et al.*, 1996; Lippemeier, *et al.*, 2003; Young & Beardall, 2003) ning toitaineterikastel kultuuridel püsisid vahemikus 0.5-0.7 (Berges *et al.*, 1996; Lippemeier, *et al.*, 2003; Young & Beardall, 2003). Üldlevinud arvamusele, et F_v/F_m on hea indikaator toitainete limitatsiooni diagnostikas, leidub ka vastupidiseid arvamusi (Parkhill, 2001).

6.3 Komplementaarsed fluorestsentsisaagised ϕ_{II} , ϕ_{NO} , ϕ_{NPQ}

Rakkude poolt neelatud valgusenergia on kolm võimalikku teekonda. Neelatud energia võidakse ära kasutada fotosünteesilisteks reaktsioonideks (ϕ_{II}) või eraldatakse soojusena antenni (ϕ_{NPQ}) või soojuse ja fluorestsentsina reaktsioonitsentrite (ϕ_{NPQ}) tasandil. Katses jälgiti

antud parameetrite (ϕ_{II} , ϕ_{NO} , ϕ_{NPQ}) käitumist toitainetevaestes ja –rikastes *H. triquetra* kultuurides.

Lämmastiku limitatsioon võib mõjutada mitmeid fütoplanktoni protesse, näiteks fotosünteesi, ja valkude sünteesi (Berges *et al.*, 1996; Jansen *et al.*, 1996). Fotosüntees võib olla mõjutatud näiteks energia kogumise efektiivsuse vähenemise kaudu, mille põhjuseks on klorofüll *a* vähenemine (klorofüll *a* sisaldab lämmastikku). Samuti vähendab N-limitatsioon valkude sünteesi, mis mõjutab fotosüsteem I (PSI) ja fotosüsteem II (PSII) reaktsioonitsentrite valkude sisaldust, viies lõpuks fotokeemilise energia muundamise suutlikkuse vähenemisele. Lämmastikustressi korral on raku võime parandada fotosüsteemikahjustusi vähenenud (lämmastik on vajalik valguga D1 sünteesiks *de novo*), seega D1 kahjustused suurenevad ning ϕ_{II} saagikus väheneb (Prezelin & Matlick, 1986; Kolber *et al.*, 1988). D1 on PSII reaktsioonitsentritega seotud valk, mis aitab parandada fotoinhibeeritud reaktsioonitsentreid. Valguga D1 kiire ringluse tõttu arvatakse PSII olevat rohkem mõjutatud lämmastiku limitatsioonist kui PSI, mille valgud on stabiilsemad (Berges *et al.*, 1996).

Käesolevas töös mõjutab lämmastiku limitatsioon toitainetevaeste kultuuride komplementaarseid fluorestsentsisaagised. Ebastabiilsed fluorestsentsi parameetrid katse esimeses pooles võivad viidata juba algavale fotosünteesistressile. ϕ_{II} langus ja komplementaarne ϕ_{NO} ja ϕ_{NPQ} tõus on indikatsioon reaktsioonitsentrite kahjustustest – neelatud energiat kasutatakse vähem süsiniku sidumiseks ja toitainete assimilatsiooniks (biomolekulide sünteesiks). Suurem osa neelatud energiast “raisatakse” soojuse ja fluorestsentsina. Suurenev soojuse eraldumine stressi tingimustes on fütoplanktoni normaalne reaktsioon kui kättesaadavatest ressurssidest ei piisa et utiliseerida pigmentidele langevat valgust. Soojuse eraldamine aitab vältida fotokahjustusi, mis äärmistel juhtudel võib viia pigmentide pleekimiseni ja raku surmani. Soojuse eraldumise taga on erinevad protsessid ja seetõttu eristatakse peamiselt kahte liiki energia mittefotokeemilist kustumist: ϕ_{NO} ja ϕ_{NPQ} . Harilikult iseloomustab heas füsioloogilises seisundis kultuuri ϕ_{NPQ} , mis on kõrgem kui ϕ_{NO} , mis tähendab, et suurem osa soojusest eraldatakse valgust püüdvate fotosünteesipigmentide antenni tasandil. Viimase päeva kõrgeim ϕ_{II} ja vähenenud ϕ_{NO} väärtuse põhjuseks toitainetevaestes kultuurides võib olla vananevas kultuuris surnud rakkude poolt vette lekitatud toitained, mis parandasid elus rakkude fotosünteesivõimekust. Selle tõestuseks võib pidada eksperimendi viimasel päeval mõõdetud oodatust kõrgemaid nitraadi ja fosfaadi kontsentratsioone. Mingeid kindlaid oletusi ühe mõõtmispäeva alusel siiski teha ei saa.

6.4 Toitainete omastamine pimedas

Pimedasse viidud toitaineterikkad *H. triquetra* kultuurid omastasid 48 h pimefaasi ajal 2.08 $\mu\text{mol L}^{-1}$ nitraati ning fosfaati vastavalt 0.15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Joonis 10). Eelnevalt kirjanduses avaldatud tööd dinoflagellaatide toitainete (eriti nitraadi) omastamise kohta pimedas annavad vastakaid tulemusi nii erinevate kui samade liikide seas. *Heterocapsa niei* (Loeblich III) Morrill & Loeblich III) omab pimedas limiteeritud võimekust omastada ja redutseerida nitraati (Hersey & Swift, 1976). Cullen (1985) on näidanud, et nitraadiküllases koguses kasvanud *Heterocapsa niei* omastab pimedas 60% vähem nitraati, kui valges. Õitsengus, kus domineeris *Gymnodinium splendens*, moodustas pimedas omastatud nitraadikogus keskmiselt 69% valges omastatud kogusest (Dortch & Maske, 1982). Käesoleva töö tulemused näitasid, et *H. triquetra* omastas pimedas nitraati 46% (48 h jooksul) olemasolevast kogusest ning valges (24 h jooksul) 37.2 %. Kuna pimeperiood ja valges toitainete omastamisel mõõdetud periood on erineva pikkusega ei saa kindlalt väita, kas *H. triquetra* omastas rohkem toitaineid pimedas või valges, kuid kuna toitainete omastamine pimedas on energiakulukam kui valges, siis võib eeldada, et *H. triquetra* omastas valges ühe päeva kohta rohkem toitaineid kui pimedas. Arvestades pimedas omastatud nitraadi hulka ühe päeva kohta ja eeldades lineaarset toitainete omastamist, moodustas pimedas omastatud nitraatide hulk ligikaudu 62% valges omastatud nitraatide kogusest, langedes kokku kirjanduses eelnevalt avaldatud tulemustega.

Nitraati ja fosfaati omastas *H. triquetra* nii pimedas kui valges üsna sarnases suhtes (13:1 ja 12:1). Tulemused ei võimalda öelda, millises suhtes nitraat ja fosfaat biomolekulidesse assimileeriti, aga N:P omastamise suhe, mis on <16, näitab, et lämmastikku omastati vähem kui Redfieldi suhe eeldab. Fütoplanktoni rakud assimileerivad C:N:P keskmiselt suhtes 106:16:1 (Redfieldi suhe) kui ükski element pole limiteerivaks teguriks (John & Flynn, 2000), seetõttu veekogus, kus N:P suhe on näiteks 30 viib see P limitatsioonini ning kui N:P suhe on näiteks 5, tekib N limitatsioon (Beardall *et al.*, 2001).

Rakud assimileerisid suhtes <16, mis on Redfieldi suhtest (Geider & Roche, 2002) veidi madalamad, toetades siiski seni kirjanduses publitseeritud, kus on ka näidatud, et see suhe pole alati konstantne (Falkowski, 2000). Laboris kultiveeritud fütoplanktoniliigi korral võib omastatud N:P suhe varieeruda 5:1 kuni 15:1 (Ryther & Dunstan, 1971), suurenedes *Alexandrium tamarense* kultuuris eriti ekstreemse toitainete imitatsiooni korral kuni 20:1 (Nalewajko & Lean, 1980).

Ekspõrimendi viimasel, 13. pæeval mõõdeti seni toitainetenåljas olnud kultuurides oodatust kõrgemad nitraadi ja fosfaadi kontsentratsioonid, mille mõju avaldus ka rakkude fotofüsioloogia paranemises (F_v/F_m tõus 60% juurest peaaegu 70%ni) aga ei jõudnud realiseeruda rakkude arvukuse muutuses enne eksperimendi lõppu. Esitame hüpoteesi, et vananevas kultuuris lekitasid surevad rakud vette toitaineid, mis toetasid elujõulisemate rakkude füsioloogiat.

Tõestatud *H. triquetra* võimekus omastada pimedas anorgaanilisi toitaineid toetab töö hüpoteesi, et veesambas vertikaalselt migreeruv *H. triquetra* võib omastada mere sügavamatest kihtidest anorgaanilisi toitaineid ning rännata seejärel tagasi ülemisse valgustatud toitainetevaesesse veekihti, et rakusiseste toitainete varude abil fotosünteesida ja kasvada. Soome lahes on ülemises segunenud ja valgustatud veekihis limiteerivaks toitaineks nitraat, mistõttu peaksid rakud sügavamatesse veekihtidesse migreerudes omastama just nitraati. Selline tulemus toetab (Lips & Lips, 2014) uuringuid, kus näidati et *H. triquetra* moodustab pinna-aluseid biomassi maksimume, mis asuvad nitrakliini peal ning kus pinna-alused maksimumid võivad esineda nõdalaid.

7. Kokkuvõte

Läänemeres on sageli registreeritud fütoplanktoni klorofüll *a* pinna-aluseid maksimume. Soome lahes esinevad pinna-alused klorofüll *a* maksimumid suvistes tingimustes, kus vesi on temperatuuri järgi kihistunud ning ülemises segunenud veekihis on toitained ammendunud, kuid kõrged toitainetevarud on saadaval allpool sesoonset termokliini. Vertikaalne migreerumisvõime võimaldab rakkudel pääseda ligi sügavamas veekihis asuvatele toitainetele. Vertikaalset migratsiooni võib pidada efektiivseks ellujäämisstrateegiaks stratifitseerunud keskkonnas, kus valgus ja toitained on eraldatud füüsikaliste gradientidega.

Kirjanduses on näidatud, et miksotroofne dinoflagellaat *Heterocapsa triquetra* on võimeline vertikaalseks migratsiooniks. Soome lahes moodustab *H. triquetra* pinnaaluseid biomassi maksimume ~20 m sügavusel, jäädes nitrakliini peale. Kuna nitrakliin asub Soome lahe fosfokliinist sügavamal, siis eeldatakse, et rakud migreeruvad sinna, et omastada lämmastikuühendeid, mis on pealmises veekihis kasvu limiteerivaks komponendiks. Kui anorgaanilised toitained või madalad valgustingimused on kasvu limiteerivad, siis on *H. triquetra* rakkudel miksotroofina potentsiaal lülituda ümber saakorganismidest toitumisele.

Magistritöö täitis katse alguses püstitatud hüpoteesi – *H. triquetra* on võimeline omastama pimedas toitaineid, mis aitasid säilitada rakkude head füsioloogilist tervist ning tõsta populatsiooni arvukust. Sellised tulemused lubavad arvata, et vertikaalselt migreeruv *H. triquetra* omastab mere sügavamates kihtides nutrikliini peal anorgaanilisi toitaineid ja seejärel migreerub tagasi ülemisse toitainetevaesesse valgustatud veekihti, et rakusiseste toitainete varudele tuginedes fotosünteesida ja kasvada.

Toitainetevaeste kultuuride muutumatu arvukus ning rakkude head füsioloogilist tervist näitavad F_v/F_m väärtused lubavad oletada, et *H. triquetra* suudab säilitada populatsiooni suurust ja head fotosünteesivõimekust veel suhteliselt pikka aega pärast toitainete lõppemist vees. Sellised tulemused lubavad eeldada, et suvisel ajal ülemises segunenud veekihis esinev *H. triquetra* võib taluda hästi toitainetevaeseid tingimusi, kuni kasvuks sobilike tingimuste paranemiseni. See võib olla põhjuseks, miks *H. triquetra* on toitainetevaeses vees võimeline moodustama laiaulatuslikke ja pikaajalisi õitsenguid koos õhulämmastikku (N_2) siduvate tsüanobakteritega. Eelnevalt pole töö autorile teadaolevalt dokumenteeritud dinoflagellaadi *H. triquetra* toitainete omastamise võimet valguse puudumisel, mistõttu käesolev töö on märkimisväärse tähtsusega ning aitab kaasa Läänemere ökosüsteemi dünaamika mõistmisel.

8. Summary

The sub-surface chlorophyll *a* maxima have been observed in the Baltic Sea frequently. Sub-surface Chl *a* maxima appear in the Gulf of Finland during summer, when water is stratified by temperature and the upper layer of the gulf is depleted of nutrients, while below the seasonal thermocline high nutrient reserves exist. The ability to migrate vertically allows phytoplankton cells to access nutrients located in deeper layers. Vertical migration can be regarded as an effective survival strategy in stratified environments, where light and nutrients are separated by physical gradients.

This thesis is focused on a potentially mixotrophic dinoflagellate, *Heterocapsa triquetra*, which has previously been shown to migrate vertically in the Gulf of Finland. *H. triquetra* forms sub-surface maxima at a depth of ~20 m, accumulating above the nitracline. Nitracline is located deeper than pycnocline in the Gulf of Finland, so it has been suggested that the cells migrate exactly to nitracline to absorb nitrogen compounds that are growth-limiting factors in the upper layer. *H. triquetra* as a potential mixotroph may take up particulate food when the lack of inorganic nutrients or poor lighting conditions starts to limit phototrophic cell growth.

Master's Thesis answers the hypothesis proposed at the beginning of the experiment. The experiment showed that *H. triquetra* is able to take up inorganic nutrients in the dark, which supports cell growth and good physiological health. These results indicate that vertically migrating *H. triquetra* acquires inorganic nutrients above the nutricline and travels back to the euphotic zone to photosynthesize and grow using intracellular nutrient stores. Constant cell count and high F_v/F_m values in nutrient poor cultures indicate that cells were in a good physiological health. Thus, *H. triquetra* may tolerate nutrient poor conditions in the upper mixed layer during the summer until suitable conditions for growth are met. This may be the reason why *H. triquetra* is capable of forming long-lasting blooms in nutrient-poor waters and co-dominate in the phytoplankton community with nitrogen-fixing cyanobacteria. The novelty of this work relies on that nutrient uptake in darkness by *H. triquetra* cells has not been previously shown so far.

9. Kasutatud kirjandus

- Alenius, P., Myrberg, K., Nekrasov, A., 1998. The physical oceanography of the Gulf of Finland: a review. *Boreal Environment. Research.* **3**, 97-125.
- Alpermann, T. J., Tillmann, U., Beszteri, B., Cembella, A. D., John, U. 2010. Phenotypic variation and genotypic diversity in a planktonic population of the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Journal of Phycology.* **46**(1), 18–32.
- Anderson, D. M. & Wall, D. 1978. Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarensis* and *Gonyaulax excavata* in initiating toxic dinoflagellate blooms. *Journal of Phycology.* **14**(2), 224–234.
- Anderson, D. M & Morel, F. M. M. 1979. The seeding of two red tide blooms by the germination of benthic *Gonyaulax tamarensis* hypnocysts. *Estuarine and Coastal Marine Science.* **8**(3), 279-293.
- Anderson, D. M. 1980. Effects on temperature conditioning on development and germination of *Gonyaulax tamarensis* (Dinophyceae) hypnozygotes. *Journal of Phycology.* **16**(2), 166-172.
- Anderson, D. M., Stolzenbach, K. D. 1985. Selective retention of two dinoflagellates in a well-mixed estuarine embayment: the importance of diel vertical migration and surface avoidance. *Marine Ecology Progress Series.* **25**(1), 39-50.
- Anderson, D. M., Fukuyo, Y., Matsuoka, K. 1995. Cyst methodologies. In Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D., Enevoldsen, H.O. (ed), *Manual of Harmful Marine Microalgae*. UNESCO.
- Anderson, D. M., Stock, C. A., Keafer, B. A., Nelson, A. B., Thompson, B., McGillicuddy, D. J. Jr., Keller, M., Matrai, P. A., Martin, J. 2005. *Alexandrium fundyense* cyst dynamics in the Gulf of Maine. *Deep-Sea Research II.* **52**(19-21), 2522–2542.
- Andersson, A., Falk, S., Samuelsson, G, Hagström, Å. 1989. Nutritional characteristics of a mixotrophic nanoflagellate, *Ochromonas* sp. *Microbial Ecology.* **17**(3), 251-262.

Baek, S. H., Ki, J. S., Katano, T., You, K., Park, B. S., Shin, H. H., Shin, K., Kim, Y. O., Han, M-S. 2011. Dense winter bloom of the dinoflagellate *Heterocapsa triquetra* below the thick surface ice of brackish Lake Shihwa, Korea. 2011. *Phycological Research*. **59**(4), 273–285.

Barsanti, L. & Gualtieri, P. (ed). 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Taylor & Francis Group.

Beardall, J., Young, E., Roberts, S. 2001. Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. *Aquatic Sciences*. **63**(1), 44-69.

Berge, T., Daugbjerg, N., Hansen, P. J. 2012. Isolation and cultivation of microalgae select for low growth rate and tolerance to high pH. *Harmful Algae*. **20**, 101-110.

Berges, J. A., Charlebois, D. O., Mauzerall, D. C., Falkowski, P, G. 1996. Differential effects of nitrogen limitation on photosynthetic efficiency of Photosystem I and II in microalgae. *Plant Physiology*. **110**(2), 689-696.

Bergström, S. & Carlsson, B. 1994. River runoff to the Baltic Sea: 1950-1990. *Ambio*. **23**, 280-287.

Binder, B. J. & Anderson, D. M. 1986. Green light-mediated photomorphogenesis in a dinoflagellate resting cyst. *Nature*. **322**, 659-661.

Bock, K. H., 1971. Monatskarten des Salzgehalten der Ostsee, dargestellt für verschiedene Tiefenhorizonte [Monthly salinity maps of the Baltic Sea for different depths]. *Deutsche Hydrographische Zeitschrift, Ergänzungshäft Reihe B*. **12**, 1-147.

Bockstahler, K. R., Coats, D. W. 1993a. Grazing of the mixotrophic dinoflagellate *Gymnodinium-sanguineum* on ciliate populations of Chesapeake Bay. *Marine Biology*. **116**(3), 477-487.

Bockstahler, K. R. & Coats, D. W. 1993b. Spatial and temporal aspects of mixotrophy in Chesapeake Bay dinoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **40**(1), 49-60.

- Bolch, C. J. S. & de Salas, M. F. 2007. A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium "tamarensis complex"* to Australasia. *Harmful Algae*. **6**(4), 465–485.
- Burkholder, J. M., Glasgow, H. B., Lewitus, A. J. 1998. Physiological ecology of *Pfiesteria piscicida* with general comments on “ambush- predator” dinoflagellates. In: Anderson, D. M., Cembella, A. D, Hallegraeff, G. M. (ed), *Physiology of Harmful Algal Blooms*. 175-191.
- Bursa, A. S. 1961. The Annual oceanographic cycle at Igloolik in the Canadian Arctic II. The phytoplankton. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. **18**(4), 563-615.
- Calado, A. J. & Moestrup, Ø. 1997. Feeding in *Peridiniopsis berolinensis* (Dinophyceae): new observations on tube feeding by an omnivorous, heterotrophic dinoflagellate. *Phycologia*. **36**(1), 47-59.
- Calado, A. J., Craveiro, S. C., Moestrup, Ø. 1998. Taxonomy and ultrastructure of a freshwater, heterotrophic *Amphidinium* (Dinophyceae) that feeds on unicellular protists. *Journal of Phycology*. **34**(3), 536-554.
- Cullen, J. J. & Horrigan, S. G. 1981. Effects of nitrate on the diurnal vertical migration, carbon to nitrogen ratio, and the photosynthetic capacity of the dinoflagellate *Gymnodinium splendens*. *Marine Biology*. **62**(2-3), 81–89.
- Cullen, J. J. 1985. Diel vertical migration by dinoflagellates: roles of carbohydrate metabolism and behavioural flexibility. In: Rankin, M. A., Checkley, D., Cullen, J., Kitting, C., Thomas, P. Austin (ed), *Migration: Mechanisms and Adaptive Significance. Contribution in Marine Science*. 135-152.
- Dale, B. 1983. Dinoflagellate resting cysts: ‘benthic plankton’. In: Fryxell, G. A. (ed.), *Survival Strategies of the Algae*. Cambridge University Press, Cambridge. 69–136.
- Dale, B. 1993. The cyst-motile stage relationships of the dinoflagellates *Diplopelta symmetrica* and *Diplopsalopsis latipeltata*. *European Journal of Phycology*. **28**(2), 129-137.
- Dodge, J. D. & Crawford, R. M. 1970. A survey of thecal fine structure in the Dinophyceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **63**(1), 53–67.

- Dortch, Q. & Maske, H. 1982. Dark uptake of nitrate and nitrate reductase activity of a red-tide population off Peru. *Marine Ecology – Progress Series*. **9**, 299-303.
- Dugdale, R. C. & Wilkerson, F. P. 1989. New production in the upwelling center at Point Conception, California: temporal and spatial patterns. *Deep-Sea Research*. **36**(7), 985-1007.
- Elbrächter, M. 1991. Faeces production by dinoflagellates and other small flagellates. *Marine Microbial Food Webs*. **5**(2), 189-204.
- Elken, J. & Matthäus, W. 2008. A Annexes. In: Bolle, H. J., Menenti, M., Rasool, I. (ed), *Assessment of Climate Change for the Baltic Sea Basin*. Springer. 379-386.
- Eppley, R. W., Holm-Hansen, O., Strickland, J. D. H. 1968. Some observations on the vertical migration of dinoflagellates. *Journal of Phycology*. **4**(4), 333-340.
- Falkowski, P. G., 2000. Rationalizing elemental ratios in unicellular algae. *Journal of Phycology*. **36**, 3–6.
- Falkowski, P. G. & Raven, J. A. 2007. The photosynthetic light reactions. In: Falkowski, P. G. & Raven, J. A. (ed), *Aquatic photosynthesis. 2nd ed.* Oxfordshire, Princeton University Press: 81-117.
- Fauchot, J., Levasseur, M., Roy, S. 2005. Daytime and nighttime vertical migrations of *Alexandrium tamarense* in the St. Lawrence estuary (Canada). *Marine Ecology Progress Series*. **296**, 241-250.
- Fenchel, T. 2001. How dinoflagellates swim. *Protist*. **152**(4), 329–338.
- Fennel, K. & Boss, E. 2003. Subsurface maxima of phytoplankton and chlorophyll: steady-state solutions from a simple model. *Limnology and Oceanography*. **48**(4), 1521-1534.
- Fensome, R. A., Gocht, H., Williams, G. L. 1996. The eisenack catalog of fossil Dinoflagellates. *New Series*. **4**, 2009-2548.
- Fields, S. D. & Rhodes, R. G. 1991. Ingestion and retention of *Chroomonas* spp. (Cryptophyceae) by *Gymnodinium acidotum* (Dinophyceae). *Journal of Phycology*. **27**(4), 525-529.

- Fistarol, G. O., Legrand, C., Rengeford, K., Granéli, E. 2004. Temporary cyst formation in phytoplankton: a response to allelopathic competitors? *Environmental Microbiology*. **6**(8), 791–798.
- Gaines, G. & Taylor, F. J. R. 1984. Extracellular digestion in marine dinoflagellates. *Journal of Plankton Research*. **6**(6), 1057-1061.
- Gaines, G. & Elbrachter, M. 1987. Heterotrophic nutrition. In: Taylor, E J. R. (ed), *The Biology of Dinoflagellates*. Blackwell Scientific Publ. Oxford. 224-268.
- Geider, R. J., La Roche, J. L., Greene, R. M., Olaizola, M. 1993. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum-tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *Journal of Phycology*. **29**(6), 755–766
- Geider, R. J., MacIntyre, H. L., Graziano, L. M., McKay, R. M. L. 1998. Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation. *European Journal of Phycology*. **33**(4), 315–332.
- Geider, R. J. & La Roche, J. 2002. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*. **37**(1), 1-17.
- Genty, B., Briantais, J. M., & Baker, N. R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. **990**(1), 87–92.
- Genty, B., Harbinson, J., Cailly, A. L. & Rizza, F. 1996. Fate of excitation at PS II in leaves: the non-photochemical side. Presented at: *The Third BBSRC Robert Hill Symposium on Photosynthesis*, March 31 to April 3, 1996, University of Sheffield, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Western Bank, Sheffield, UK, Abstrakt P28
- Granéli, E & Carlsson, P. 1998. The Ecological Significance of Phagotrophy in Photosynthetic Flagellates. In. Abderson, D. M., Cembella, A. D., Hallegraeff, G. M (ed), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer. 539-557.

- Guillard, R. R. & Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian journal of microbiology*. **8**(2), 229-239.
- Hajdu, S., Edler, L., Olenina, I., Witek, B. 2000. Spreading and establishment of the potentially toxic dinoflagellate *Prorocentrum minimum* in the Baltic Sea. *International Review of Hydrobiology*. **85**(5-6), 561-575.
- Hand, W. G., Collard, P. A., Davenport, D. 1965. The effects of temperature and salinity change on swimming rate in the dinoflagellates *Gonyaulax* and *Gyrodinium*. *Biological Bulletin*. **128**(1), 90-101.
- Hansen, P. J. 1991a. Dinophysis - a planktonic dinoflagellate genus which can act both as a prey and a predator of a ciliate. *Marine Ecology Progress Series*. **69**, 201-204.
- Hansen, P. J. 1991b. Quantitative importance and trophic role of heterotrophic dinoflagellates in a coastal pelagic food web. *Marine Ecology Progress Series*. **73**, 253-261.
- Hansen, P. J. 1992. Prey size selection, feeding rates and growth dynamics of heterotrophic dinoflagellates with special emphasis on *Gyrodinium spirale*. *Marine Biology*. **114**(2), 327-334.
- Hansen, B., Bjørnsen, P. K., Hansen, P. J. 1994. The size ratio between planktonic predators and their prey. *Limnology and Oceanography*. **39**(2), 395-403.
- Hansen, P. J. 1995. Growth and grazing response of a ciliate feeding on the red tide dinoflagellate *Gyrodinium aureolum* in monoculture and in mixture with a non-toxic alga. *Marine Ecology Progress Series*. **121**, 65-72.
- Hansen, P. J. & Calado, A. J. 1999. Phagotrophic mechanisms and prey selection in free-living dinoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **46**(4), 382-389.
- Hansen, P. L. 2011. The role of photosynthesis and food uptake for the growth of marine mixotrophic dinoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **58**(3), 203-214.
- HELCOM. 1990. Second periodic assessment of the state of the marine environment of the Baltic Sea, 1984.-1988; Background Document. *Baltic Sea Environment Proceedings*, **35B**.

HELCOM. 2002. Environment of the Baltic Sea area 1994–1998; background document. *Baltic Sea Environment Proceeding*. **82B**, 1–215.

HELCOM. 2009. Eutrophication in the Baltic Sea – An integrated thematic assessment of the effects of nutrient enrichment in the Baltic Sea region. **115B**, 152.

Hersey, R. L. & Swift, E. 1976. Nitrate reductase activity of *Amphidinium cartei* and *Cachoninaniei* (Dinophyceae) in batch culture: diel periodicity and effects of light intensity and ammonia. *Journal of Phycology*. **12**(1), 36-44.

ICES. 2006. Report of the ICES-IOC-SCOR Working Group on GEOHAB Implementation in the Baltic (WGGIB). ICES CM 2006/BCC:06. Copenhagen: ICES

Jacobson, D. M. & Andersen, R. A. 1994. The discovery of mixotrophy in photosynthetic species of *Dinophysis* (Dinophyceae): light and electron microscopical observations of food vacuoles in *Dinophysis acuminata*, *D. norvegica* and two heterotrophic dinophysoid dinoflagellates. *Phycologia*. **33**(2), 97-110.

Jacobson, D. M. & Anderson, D. M. 1996. Widespread phagocytosis of ciliates and other protists by marine mixotrophic and heterotrophic thecate dinoflagellates. *Journal of Phycology*. **32**(2), 279-285.

Jansen, M. A. K., Greenberg, B. M., Edelman, M., Matto, A. K., Gaba, V. 1996. Accelerated degradation of the D2 protein of Photosystem II under ultraviolet radiation. *Photochemistry and Photobiology*. **63**(6), 814–817.

Jeong, H. J., Du Yoo, Y., Park, J. Y., Song, J. Y., Kim, S. T., Lee, S. H., Kim, K. Y., Yih, W. H. 2005. Feeding by phototrophic red-tide dinoflagellates: five species newly revealed and six species previously known to be mixotrophic. *Aquatic Microbial Ecology*. **40**(2), 133-150.

Jeong, H. J., Yoo, Y. D., Lee, K. H., Kim, T. H., Seong, K. A., Kang, N. S., Lee, S. Y., Kim, J. S., Kim, S., Yih, W. H. 2013. Red tides in Masan Bay, Korea in 2004–2005: I. Daily variations in the abundance of red-tide organisms and environmental factors. *Harmful Algae*. **30**(1), 75–88.

Jones, H. L. J, Leadbeater, B. S. C., Green, J. C. 1993. Mixotrophy in marine species of *Chrysochromulina* (Prymnesiophyceae): ingestion and digestion of a small green flagellate. *Journal of the Marine biological Association of the UK*. **73**(2), 283-296.

- Jones, R. I. 1994. Mixotrophy in planktonic protists as a spectrum of nutritional strategies. *Marine Microbial Food Webs*. **8**, 87–96.
- Jones, R. I. & Rees, S. 1994. Influence of temperature and light on particle ingestion by the freshwater phytoflagellate *Dinobryon*. *Archiv für Hydrobiologie*. **132**(2), 203–211.
- Jones, H. L. J. 1997. A classification of mixotrophic protists based on their behaviour. *Freshwater Biology*. **37**(1), 35–43.
- Keafer, B. A., Buesseler, K. O., Anderson, D. M. 1992. Burial of living dinoflagellate cysts in estuarine and near shore sediments. *Marine Micropaleontology*. **20**(2), 147–161.
- Keller, M. D., Shapiro, L. P., Haugen, E. M., Cucci, T. L., Sherr, E. B., Sherr, B. F. 1994. Phagotrophy of fluorescently labeled bacteria by an oceanic phytoplankton. *Microbial Ecology*. **28**(1), 39-52.
- Kim, H-G., Park, J-S., Lee, S-G. 1990. Coastal algal blooms caused by the cyst-forming Dinoflagellates. *Bulletin of the Korean Fisheries Society*. **23**(6), 468-474.
- Kimura, B. & Ishida, Y. 1985. Photophagotrophy in *Uroglena americana*, Chrysophyceae. *Japanese journal of Limnology*. **46**(4), 315-318.
- Kitajima, M. & Butler, W. L. 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta*. **376**(1), 105-115.
- Kolber, Z., Zehr, J., Falkowski, P. 1988. Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II. *Plant Physiology*. **88**(3), 923-929.
- Kononen, K., Kuparinen, J., Mäkelä, K., Laanemets, J., Pavelson, J., Nömmann, S. 1996. Initiation of cyanobacterial blooms in a frontal region at the entrance of the Gulf of Finland, Baltic Sea. *Limnology and Oceanography*. **41**(1), 98–112.
- Kononen, K., Hällfors, S., Kokkonen, M., Kuosa, H., Laanemets, J., Pavelson, J., Autio, R. 1998. Development of a subsurface chlorophyll maximum at the entrance to the Gulf of Finland, Baltic Sea. *Limnology and Oceanography*. **43**(6), 1089-1106.

- Kononen, K., Huttunen, M., Kanoshina, I., Laanemets, J., Moisander, P., Pavelson, J. 1999. Spatial and temporal variability of a dinoflagellate-cyanobacterium community under a complex hydrodynamical influence: a case study at the entrance to the Gulf of Finland. *Marine Ecology Progress Series*. **186**, 43-57.
- Kononen, K., Huttunen, M., Hällfors, S., Gentien, P., Lunven, M., Huttula, T., Laanemets, J., Lilover, M-J., Pavelson, J., Stips, A. 2003. Development of a deep chlorophyll maximum of *Heterocapsa triquetra* Ehrenb. at the entrance to the Gulf of Finland. *Limnology and Oceanography*. **48**(2), 594-607.
- Kanoshina, I., Lips, U., Leppänen, J-M. 2003. The influence of weather conditions (temperature and wind) on cyanobacterial bloom development in the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Harmful Algae* 2. **2**(1), 29-41.
- Kuusisto, E., Vuglinsky, V., Heino, R. 2008. Hydrology and Land Surfaces. In. Bolle, H. J., Menenti, M., Rasool, I. (ed), *Assessment of climate change for the Baltic Sea basin*. Springer. 392-398.
- Laanemets, J., Kononen, K., Pavelson, J., Poutanen, E. L. 2004. Vertical location of seasonal nutriclines in the western Gulf of Finland. *Journal of Marine Systems*. **52**(1-4), 1–13.
- Larsen, J. 1988. An ultrastructural study of *Amphidinium poecilochroum* (Dinophyceae), a phagotrophic dinoflagellate feeding on small species of cryptophytes. *Phycologia*. **27**(3), 366-377.
- Lee, R. E. (ed). 1999. *Phycology: 3rd Edition*. Cambridge University Press. 307-353.
- Lee, R.E. (ed). 2008. *Phycology: 4th Edition*. Cambridge University Press. 262-303.
- Legrand, C., Granéli, E., Carlsson, P. 1998. Induced phagotrophy in the photosynthetic Dinoflagellate *Heterocapsa triquetra*. *Aquatic Microbial Ecology*. **15**, 65-75.
- Lehtiniemi, M. 2008. Marine Ecosystem. In. Bolle, H. J., Menenti, M., Rasool, I. (ed), *Assessment of Climate Change for the Baltic Sea Basin*. Springer. 408-411.
- Leppäkoski, E., Gollasch, S., Gruszka, P., Ojaveer, H., Olenin, S., Panov, V. 2002. The Baltic sea of invaders. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **59**(7), 1175-1188.

- Liblik, T. 2012. Variability of thermohaline structure in the Gulf of Finland in summer. PhD-thesis. Marine Systems Institute, Tallinn University of Technology.
- Lindholm, T & Nummelin, C. 1999. Red tide of the dinoflagellate *Heterocapsa triquetra* (Dinophyta) in a ferry-mixed coastal inlet. *Hydrobiologia*. **135**, 245–251.
- Lippemeier, S., Frampton, D. M. F., Blackburn, S. I., Geier, S. C., Negri, A. P. 2003. Influence of phosphorus limitation on toxicity and photosynthesis of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) monitored by in-line detection of variable chlorophyll fluorescence. *Journal of Phycology*, **39**(2), 320–331.
- Lips, I., Lips, U., Liblik, T. 2009. Consequences of coastal upwelling events on physical and chemical patterns in the central Gulf of Finland (Baltic Sea). *Continental Shelf Research*. **29**(15), 1836-1847.
- Lips, U., Lips, I., Liblik, T., Kuvaldina, N. 2010. Processes responsible for the formation and maintenance of sub-surface chlorophyll maxima in the Gulf of Finland. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. **88**(3), 339-349.
- Lips, U., Lips, I., Liblik, T., Kikas, V., Altoja, K., Buhhalko, N., Rünk, N. 2011. Vertical dynamics of summer phytoplankton in a stratified estuary (Gulf of Finland, Baltic Sea). *Ocean Dynamics*. **61**(7), 903–915.
- Lips, U & Lips, I. 2014. Bimodal distribution patterns of motile phytoplankton in relation to physical processes and stratification (Gulf of Finland, Baltic Sea). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. **101**, 107-119.
- Litaker, R. W., Tester, P. A., Duke, C. S., Kenney, B. E., Pinckney, J. L. and Ramus, J. 2002. Seasonal niche strategy of the bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa triquetra*. *Marine Ecology Progress Series*. **232**, 45–62.
- Lund-Hansen, L. C., Ayala P. C. A., Reglero, A. F. 2006. Bio-optical properties and development of a sub-surface chlorophyll maxima (SCM) in southwest Kattegat, Baltic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. **68**(1-2), 372-378.
- MacIntyre, J. G., Cullen, J. J., Cembella, A. D. 1997. Vertical migration, nutrition and toxicity in the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Marine Ecology Progress Series*. **148**, 201–216.

- Mackey, K. R. M., Paytan, A., Grossman, A. R., Bailey, S. 2008. A photosynthetic strategy for coping in a high-light, low-nutrient environment. *Limnology and Oceanography*. **53**(3), 900-913.
- Meier, H. E. M., Döscher, R., Broman, B., Piechura, J. 2004. The major Baltic inflow in January 2003 and preconditioning by smaller inflows in summer-autumn 2002: A model study. *Oceanologia*, **46**(4), 557-579.
- Nalewajako, C. & Lean, D. R. S. 1980. Phosphorus. In: Morris, I. (ed), *The Physiological Ecology of Phytoplankton*. Blackwell Scientific, Oxford. 235–258.
- Nygaard, K & Tobiesen, A. 1993. Bacterivory in algae: A survival strategy during nutrient limitation. *Limnology & Oceanography*. **38**(2), 273-279.
- Ojaveer, H., Jaanus, A., MacKenzie, B. R., Martin, G., Olenin, S., Radziejewska, T., Telesh, I., Zettler, M.L., Zaiko, A. 2010. Status of biodiversity in the Baltic Sea. *Plos One*. **5**, 9.
- Olli, K. 1997. Evolutionary life-strategies of autotrophic planktonic micro-organisms in the Baltic Sea. PhD-thesis. Tartu University.
- Olli, K. 2004. Temporary cyst formation of *Heterocapsa triquetra* (Dinophyceae) in natural populations. *Marine Biology*. **145**(1), 1–8.
- Olsson, P. & Granéli, E. 1991. Observations on diurnal vertical migration and phased cell division for three coexisting marine dinoflagellates. *Journal of Plankton Research*. **13**, 1313–1324.
- Omstedt, A. & Axell, L. B. 2003. Modeling the variations of salinity and temperature in the large Gulfs of the Baltic Sea. *Continental Shelf Research*. **23**(3-4), 265-294.
- Paasche, E., Bryceson, I., Tangen, K. 1984. Interspecific variation in dark nitrogen uptake by dinoflagellates. *Journal of Phycology*. **20**(3), 394-401.
- Park, M. G., Kim, S., Kim, H. S., Myung, G., Kang, Y. G., Yih, W. 2006. First successful culture of the marine dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Aquatic Microbial Ecology*. **45**(2), 101-106.
- 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**(4), 517-529.

- Passow, U. 1991. Vertical migration of *Gonyaulax catenata* and *Mesodinium rubrum*. *Marine Biology*. **110**(3), 455–463.
- Pavelson, J., Kononen, K., Laanemets, J. 1999. Chlorophyll distribution patchiness caused by hydrodynamical processes: a case study in the Baltic Sea. *ICES journal of Marine Science*. **56**, 87-99.
- Pavelson, J. 2005. Mesoscale physical processes and the related impacts on the summer nutrient fields and phytoplankton blooms in the western Gulf of Finland. PhD-thesis. Marine Systems Institute, Tallinn University of Technology.
- Pfiester, L. A. & Anderson, D. M. 1987. Dinoflagellate reproduction. In: Taylor, F. J. R. (ed) *The Biology of Dinoflagellates*. Botanical Monographs. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 611-648.
- Prezelin, B. B., Matlick, H. A. 1986. Photosystem II photoinhibition and altered kinetics of photosynthesis during nutrient-dependent high light photoadaptation in *Gonyaulax polyedra*. *Marine Biology*. **93**(1), 1-12.
- Rattan, K. J., Taylor, W. D., Smith, R. E. H. 2012. Nutrient status of phytoplankton across a trophic gradient in Lake Erie: evidence from new fluorescence methods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **69**(1), 94–111.
- Rhee, G-Y. 1978. Effect of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition and nitrate uptake. *Limnology and Oceanography*. **23**(1), 10-25.
- Ribeiro, S., Berge, T., Lundholm, N., Andersen, T.J., Abrantes, F., Ellegaard, M. 2011. Phytoplankton growth after a century of dormancy illuminates past resilience to catastrophic darkness. *Nature Communications*. **2**, 311.
- Rolton, A., Vignier, J., Soudant, P., Shumway, S. E., Bricelj, M., Volety, A. K. 2014. Effects of the red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*, on early development of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and northern quahog *Mercenaria mercenaria*. *Aquatic Toxicology*. **155**, 199–206.
- Rothhaupt, K. O. 1996. Laboratory experiments with a mixotrophic Chrysophyte and obligately phagotrophic and phototrophic competitors. *Ecology*. **77**(3), 716–724.

- Ryther, J. H. & Dunstan, W. M. 1971. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment. *Science*, **171**(3975), 1008–1013.
- Sanders, R. W., Porter, K. G., Caron, D. A. 1990. Relationship between phototrophy and phagotrophy in the mixotrophic chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis*. *Microbial Ecology*. **19**(1), 97-109.
- Schnepf, E. & Elbrächter, M. 1992. Nutritional strategies in dinoflagellates. A review with emphasis on cell biological aspects. *European Journal of Protistology*. **28**(1), 3-24.
- Sekida, S., Horiguachi, T., Okuda, K. 2004. Development of thecal plates and pellicle in the dinoflagellate *Scrippsiella hexapraecingula* (Peridinales, Dinophyceae) elucidated by changes in stainability of the associated membranes. *European Journal of Phycology*. **39**(1), 105-114.
- Sigee, D. C. 1984. Structural DNA and genetically active DNA in dinoflagellate chromosomes. *Biosystems*. **16**(3-4), 203-210.
- Skovgaard, A. 1996. Engulfment of *Ceratium* spp. (Dinophyceae) by the thecate photosynthetic dinoflagellate *Fragilidium subglobosum*. *Phycologia*. **35**(6), 490-499.
- Sopanen, S., Setälä, O., Piiparinen, J., Erler, K., Kremp, A. 2011. The toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* promotes incapacitation of the calanoid copepods *Eurytemora affinis* and *Acartia bifilosa* from the northern Baltic Sea. *Journal of Plankton Research*. **33**(10), 1564-1573.
- Spero, H. J. 1982. Phagotrophy in *Gymnodinium fungiforme* (Pyrrhophyta): the peduncle as an organelle of ingestion. *Journal of Phycology*. **18**(3), 356- 360.
- Spilling, K., Seppälä, J., Tamminen, T. 2011. Inducing autoflocculation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* through CO₂ regulation. *Journal of Applied Phycology*. **23**(6), 959–966.
- Stoecker, D. K. 1998. Conceptual models of mixotrophy in planktonic protists and some ecological and evolutionary implications. *European Journal of Protistology*. **34**(3), 281–290.
- Stoecker, D. K. 1999. Mixotrophy among dinoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **46**(4), 397–401.

- Suttle, C. A. & Harrison, P. J. 1988. Ammonium and phosphate uptake rates, N:P supply ratios, and evidence for N and P limitation in some oligotrophic lakes. *Limnology and Oceanography*. **33**(2), 186-202.
- Zaccaroni, A. & Scaravelli, D. 2008. Toxicity of sea algal toxins to humans and animals. In: Evangelista, V., Barsanti, B., Frassanito, A. M., Passarelli, V., Gualtieri, P. (ed), *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*. Springer. 91-158.
- Talpsepp, L., Nõges, T., Raid, T., Kõuts, T. 1994. Hydrophysical and hydrobiological processes in the Gulf of Finland in summer 1987: characterization and relationship. *Continental Shelf Research*. **14**(7-8), 749-763.
- Tittel, J., Bissinger, V., Zippel, B., Gaedke, U., Bell, E., Lorke, A., Kamjunke, N. 2003. Mixotrophs combine resource use to outcompete specialists: Implications for aquatic food webs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**(22), 12776 – 12781.
- Tranvik, L. J., Porter, K. G., Sieburth, J. M. 1989. Occurrence of bacterivory in *Cryptomonas*, a common freshwater phytoplankter. *Oecologia*. **78**(4), 473–476.
- Uchida, T., Kamiyama, T., Matsuyama, Y. 1997. Predation by a photosynthetic dinoflagellate *Gyrodinium instriatum* on loricated ciliates. *Journal of Plankton Research*. **19**(5), 603-608.
- Ucko, M., Elbrächter, M., Schnepf, E. 1997. A *Cryptocodinium cohnii* - like dinoflagellate feeding *myzocytotically* on the unicellular red alga *Porphyridium* sp. *European Journal of Phycology*. **32**(2), 133-140.
- van den Hoek, C., Mann, D. G., Jahns, H. M. 1995. *Algae. An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge. 1-623.
- Young, E. B. & Beardall, J. 2003. Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. *Journal of Phycology*. **39**(5), 897-905.