

**Pro gradu – tutkielma**

**Ravinteiden vaikutus vesikirpun (*Daphnia longispina*)  
loisintaan Mekkojärvellä**

**Outi Kaski**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Hydrobiologia ja limnologia

31.5.2010

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Hydrobiologia ja limnologia

KASKI OUTI, L.M.: Ravinteiden vaikutus vesikirpun (*Daphnia longispina*) loisintaan Mekkojärvellä.

Pro gradu: 35 s.

Työn ohjaajat: FT Katja Pulkkinen, FM Sanni Aalto

Tarkastajat: Prof. Jouni Taskinen, FT Katja Pulkkinen

Toukokuu 2010

---

Hakusanat: ravinnemanipulaatio, mesokosmos, loinen, ravintoverkko, humusjärvi, bakteeriplankton, mikrosporidi

## TIIVISTELMÄ

Voimakkaasti humuksisessa Mekkojärvässä *Daphnia longispina* hallitsee järven eläinplanktonia läpi kesän. *Daphnioiden* kasvu hidastuu loppukesää kohti kasviplanktonin määrän vähetessä, ja ravinnosta jopa 73 % koostuu bakteeriplanktonista, jonka katsotaan olevan heikompi ravinnonlähde *Daphnioille*. Isännän ravitsemuksen laadulla voi olla joko positiivisia tai negatiivisia vaikutuksia vesikirpun loisintaan ja sen runsauteen. Lammin Mekkojärvellä selvitettiin ravinnelisäyksen välillistä vaikutusta vesikirppujen loisintaan kuuden viikon mittaisessa ravinnemanipulaatiokokeessa kuudessa mesokosmoksessa kesällä 2008. Kolme mesokosmosta sai viikottaisen epäorgaanisen typpi- ja fosforilisäyksen ja kolme allasta toimi kontrolleina. Ravinnelisäys kaksinkertaisti epäorgaanisen fosforin määrän vedessä, fosforin ja epäorgaanisen typen suhde lisäyksessä oli 1:10. *a*-Klorofylli sekä bakteeriplanktonin biomassa ja tiheys eivät eronneet käsittelyiden välillä. Vesikirppujen yksilötiheys ei poikennut eri käsittelyissä, mutta *D. longispinan* keskikoko oli suurempi ravinnekäsittelyissä altaissa. Vesikirpuilla esiintyi neljää eri loisilajia kokeen aikana: ulkoloinen *Vorticella* sp., mikrosporidit *Larssonia obtusa* ja USGP (Unknown Small Gut Parasite) sekä ameebamainen ULGP (Unknown Large Gut Parasite). USGP:n epidemia kasvoi kokeen aikana ja sen infektioprosentit erosivat tilastollisesti merkitsevästi käsittelyjen välillä kokeen lopussa ollen suuremmat ravinnekäsittelyissä altaissa. Muiden loisten esiintyminen oli satunnaista tai niissä ei havaittu eroja eri käsittelyiden välillä. USGP -loisen runsastuminen johtui mahdollisesti siitä, että *Daphnia longispinan* ravinto-olosuhteet olivat paremmat ravinnekäsittelyissä altaissa. Tätä tukee se, että *Daphnioiden* kasvu ei hidastunut loppukesällä, kuten aiemmissa tutkimuksissa on havaittu.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Science

Department of Biological and Environmental Science  
Hydrobiology and limnology

KASKI OUTI, L.M.: The effect of nutrient addition on waterflea (*Daphnia longispina*) parasites in Lake Mekkojärvi

Master of Science Thesis: 35 p.

Supervisors: PhD Katja Pulkkinen, MSc Sanni Aalto

Inspectors: Prof. Jouni Taskinen, PhD Katja Pulkkinen

May 2010

---

Key Words: nutrient manipulation, mesocosm experiment, parasite, aquatic food web, humic lake, bacterioplankton, microsporidian

## ABSTRACT

Waterflea (*Daphnia longispina*) dominates the zooplankton during summer time in the highly humic Lake Mekkojärvi. The growth of the waterfleas slows down at the end of the summer. At this time phytoplankton abundance decreases, and the diet of *Daphnia* may contain even 73 % bacterioplankton. Bacterioplankton is known to have poor dietary value for *Daphnia*. In host-parasite interactions, quality of host's diet might have either positive or negative impacts on prevalence and abundance of parasites. The indirect effect of nutrient addition on parasitism in the waterfleas of the Lake Mekkojärvi was studied in experimental enclosures during six weeks in the summer of 2008. Inorganic nitrogen and phosphorus were added weekly to three mesocosms. Other three mesocosms acted as controls. The added phosphorous doubled the natural concentration in the water, the ratio of phosphorous to nitrogen in the addition was 1:10. Neither *a*-chlorophyll nor bacterioplankton biomass and density differed in the two treatments. The density of the waterfleas in the whole water column of the mesocosms did not differ significantly between the treatments. At the end of the experiment, the mean size of *D. longispina* was larger than in the beginning of the experiment in the nutrient treated enclosures, but not in the control enclosures. Four species of parasites were found to infect *Daphnia longispina*: epibiont *Vorticella* sp., microsporidian *Larssonia obtusa*, an unidentified microsporidian USGP (Unknown Small Gut Parasite), and an unidentified amoebalike ULGP (Unknown Large Gut Parasite). The epidemics of USGP increased during the experiment, and the prevalence of infection was significantly higher in nutrient treated hosts than in control hosts at the end of the experiment. The prevalence of the other parasites was occasional, or no differences were observed between the treatments. The increased prevalence of USGP was potentially caused by the improvement in the diet of *Daphnia longispina*, since the mean size of *Daphnia* did not decrease in the enclosures towards the end of the summer, as has been detected in earlier studies in the lake.

# Sisältö

<b>1. JOHDANTO .....</b>	<b>5</b>
1.1 Vesikirput ( <i>Daphnia longispina</i> ) planktisessa ravintoverkossa .....	5
1.2 Tutkimuksen tarkoitus .....	5
<b>2. TUTKIMUKSEN TAUSTAA .....</b>	<b>5</b>
2.1 <i>Daphnia</i> -vesikirput .....	5
2.1.1 <i>Daphnian</i> stoikiometria .....	6
2.1.2 <i>Daphnia</i> ja loiset .....	6
2.2 Humusjärvet .....	7
<b>3. AINEISTO JA MENETELMÄT .....</b>	<b>8</b>
3.1 Tutkimusalue .....	8
3.2 Koeasetelma .....	8
3.3 Näytteenotto ja ravinteiden lisäys .....	9
3.4 Näytteiden käsittely ja analysointi .....	10
3.4.1 Fysikaalis-limnologiset muuttujat .....	10
3.4.2 Bakteeriplanktonin määrittäminen .....	11
3.4.3 <i>Daphnia longispinan</i> yksilötiheyden ja keskipituuden määrittäminen .....	11
3.4.4 Loisten määrittäminen .....	12
3.5 Tilastokäsittelyt .....	12
<b>4. TULOKSET .....</b>	<b>12</b>
4.1 Fysikaalis-limnologiset muuttujat .....	12
4.1.1 Fysikaaliset muuttujat .....	12
4.1.3 a-Klorofylli .....	15
4.2 Bakteeriplankton .....	16
4.3 <i>Daphnian</i> yksilötiheys ja keskipituus .....	20
4.4 <i>Daphnia longispinan</i> loiset .....	24
4.4.1 Ulkoloiset .....	25
4.4.2 Mikrosporidit .....	25
4.4.3 Luokittelemattomat loiset .....	25
<b>5. TULOSTEN TARKASTELUA.....</b>	<b>28</b>
5.1 Ravinteet ja tuottajat .....	28
5.2 <i>Daphnia longispina</i> ja loiset .....	29
5.3 Yhteenveto .....	31
<b>Kiitokset .....</b>	<b>32</b>
<b>Kirjallisuus.....</b>	<b>32</b>
<b>Liitteet .....</b>	<b>34</b>

## 1. JOHDANTO

### 1.1 Vesikirput (*Daphnia longispina*) planktisessa ravintoverkossa

Kaikkialla makeissa vesissä esiintyy planktisia vesikirppuja, joista tunnetaan yli sata lajia. Ne ovat tärkeimpiä kasviplanktonin laiduntajia ja keskeinen osa ylempien tasojen, kuten kalojen, ruokavaliota akvaattisissa ravintoverkoissa. Yksilökoko vaihtelee 0,5 – 6 mm:n välillä. *Daphnia* -vesikirput lisääntyvät yleensä synnyttämällä eläviä poikasia partenogeneettisesti, mutta tarvittaessa muodostavat hyvin säilyviä lepomunia suvullisesti. Vesikirppupopulaatio kasvaa ja katoaa nopeasti elinolosuhteista riippuen.

Vesikirpuille optimaalisen ravinnon tulee sisältää runsaasti fosforia (P), typpeä (N) sekä välttämättömiä rasvahappoja. Yleensä ravinto koostuu kasviplanktonista ja joskus bakteeriplanktonista, joka sisältää paljon fosforia, mutta vähän rasvahappoja. Hyvä ravinto takaa yksilön normaalin somaattisen kasvun sekä runsaan jälkeläistuotannon. Heikon ravinnon aiheuttamalla stressillä voi olla yhteyksiä edellä mainittujen asioiden heikentymisen lisäksi heikentyneeseen immuunipuolustuskykyyn.

Vesikirpuilla, kuten muillakin eläimillä, on loisia, jotka jaetaan ulko- ja sisäloisiin. Alkueläimet, kuten ripsieläimet, tarttuvat usein vesikirpun ulkopintaan, ja kilpailevat isännän kanssa ravinnosta. Sisäloisista tunnetaan eri bakteereja ja mikrosporideja, jotka loisivat joko suolen soluissa tai isännän koko ruumiissa. Loisinnan tiedetään vaikuttavan *Daphnian* kasvuun ja lisääntymismenestymiseen. On mahdollista, että loisinta vaikuttaa myös *Daphnian* ravinnonottoon ja erityykseen sekä yhdessä populaatiodynamiikan muutosten kanssa ravinteiden kulkuun akvaattisessa ravintoverkossa.

### 1.2 Tutkimuksen tarkoitus

Tavoitteena oli selvittää aiheuttaako ravinteiden lisääminen Mekkojärveen muutoksia *Daphnia* -vesikirppujen loisten esiintymisessä ja runsaudessa. Ravinteiden lisäyksen oletettiin muuttavan *Daphnioille* tarjolla olevan ravinnon laatua, joka voi välillisesti isännän hyvinvoinnin kautta vaikuttaa loisten kasvuun ja leviämiseen. Kokeessa selvitettiin vaikuttaako ravinnelisäys altaiden bakteeriplanktonin biomassaan ja tiheyteen sekä kasviplanktonin biomassaan eri vesikerroksissa kokeen aikana. Lisäksi tutkittiin, vaikuttaako ravinteiden manipulointi välillisesti vesikirppujen (*Daphnia longispina*) populaatiotiheyteen ja yksilökokoon ravinnemanipulaatiokokeen kuluessa eri vesikerroksissa. Lisäksi tahdottiin selvittää, onko isännän hyvinvointi loisinnalta suojaava vai sitä edesauttava tekijä. Vesikirppujen loisintaa selvitettiin määrittämällä loislajit, loisittujen yksilöiden osuudet tai lukumäärät eri käsittelyissä sekä infektioprosentit. Edellä mainittuja muuttujia verrattiin eri käsittelyjen isäntien kesken.

Pro gradu -työni on osa monivuotista Suomen Akatemian rahoittamaa tutkimusprojektia, jonka aiheena on loisten merkitys planktisissa ravintoverkoissa. Projektia johtaa professori Kalevi Salonen. Projektin tutkijat FT Katja Pulkkinen ja tohtorikoulutettava FM Sanni Aalto toimivat työni ohjaajina. Pro gradu -tutkimukseni käsittelee ravinteiden mahdollista vaikutusta *Daphnia longispina* -vesikirpun loisintaan Lammin Mekkojärvellä.

## 2. TUTKIMUKSEN TAUSTAA

### 2.1 *Daphnia* -vesikirput

Järviekosysteemeissä *Daphnia* -vesikirput ovat tärkeitä vuorovaikutusten välittäjiä ravintoverkon tasojen välillä (Elser & Urabe 1999, Hart 2002). Ne suodattavat ravintonsa

antenoillaan muodostamansa vedenvirtauksen avulla erityisten setaen kautta ruuansulatusjärjestelmäänsä. Ravinto koostuu yleisimmin kasviplanktonista. Ravintopartikkelit ovat kooltaan noin 1–50 µm:n välillä koostuen osittain myös bakteeriplanktonista. Yksilön ravinnonsaanti on suoraan verrannollinen ravinnon konsentraatioon suodatettavassa vedessä (Ebert 2005).

### 2.1.1 *Daphnian* stoikiometria

Kuluttajat ovat varsin homeostaattisia ravinnetaseiden suhteen, vaikka ravinnon ravinneoostumus vaihtelisi suuresti (Sterner & Elser 2002). Optimaalisen ravinnon puute voi aiheuttaa tiettyjen ravintoaineiden puutoksia ja on siten merkityksellinen yksilön hyvinvoinnille. Ravinnon ravinneoostumus voi suoraan rajoittaa kuluttajien yksilönkasvua ja populaatiodynamiikkaa. *Daphnias* tarvitsevat runsaasti fosforia sisältävää (matala C:P -suhde) ravintoa ylläpitääkseen kasvua ja lisääntymistä (Kilham ym. 1997, DeMott & Gulati 1999, Elser ym. 2001). Kasviplankton sisältää välttämättömiä rasvahappoja, joiden puutteen on, fosforin lisäksi, todettu vaikuttavan rajoittavasti *Daphnian* somaattiseen kasvuun ja lisääntymiseen (Ravet & Brett 2006). Kuluttajien ja tuottajien välillä vallitsee yleensä epätasapaino ravinteiden suhteen (Elser ym. 2000). Tuottajien fosfori- ja typpipitoisuudet ovat yleensä 5–10 kertaa alemmat kuin kuluttajien, ja vaihtelu ravinnesuhteissa kertaluokkaa suurempi (Elser ym. 2000). Luonnossa kuluttajat joutuvat useasti tilanteeseen, missä ne joutuvat syömään enemmän ravintoa kuin mitä ne tarvitsevat energian puolesta, saadakseen riittävästi fosforia ja typpeä (Urabe ym. 1997, 2002, Acharya ym. 2004). Bakteerien C:P -suhde on matalampi kuin yleisesti kasviplanktonilla, mikä vaikuttaa bakteerien tärkeyteen ravinnekierrossa akvaattisessa ympäristössä (Hessen & Andersen 1990).

On havaittu, että ravinnon laatu vaikuttaa *Daphnian* käyttäytymiseen: ravinnon ollessa huonoa *Daphnioiden* suodatusnopeus kasvaa (Plath & Boersma 2001). Ravinnon laadun muutos voi muuttaa *Daphnian* vertikaalivaelluskäyttäytymistä. Populaatiotasolla heikentynyt ravintotilanne voi pienentää populaatiokokoa ja altistaa erilaisille infektioille immuunipuolustuksen heikentymisen ja käyttäytymisen muuttumisen seurauksena (Ebert 2005).

### 2.1.2 *Daphnia* ja loiset

*Daphnia* -vesikirpuilla esiintyy useita erilaisia loisia. Ne voivat infektoida suurenkin osan isäntäpopulaatiosta (Ebert 2005). Loiset varastavat resursseja, joita isäntä muutoin hyödyntäisi omaan kasvuunsa ja jälkeläistuotantoonsa (Hall ym. 2009). Loisten on todettu alentavan *Daphnian* lisääntymismenestystä ja eloonjäätymiä. Ne myös vaikuttavat *Daphnian* populaatiodynamiikkaan kasvattaen kannan vaihtelua ja populaatiokoon muutoksia (Pulkkinen & Ebert 2006).

Isännän ravinnon tiedetään vaikuttavan loisinfektioiden esiintymiseen, kestävyyskykyyn ja runsauteen (Frost ym. 2008a). Ravinteiden puutteellisuus voi hyödyttää loisia heikentämällä isännän immuunipuolustustoimintaa tai se voi hyödyttää isäntää rajoittamalla loisten kasvua ja lisääntymistä (Frost ym. 2008a). Ravintoresurssien laatu vaikuttaa vahvasti tautidynamiikkaan; epidemiat voivat saada alkunsa, kun ruuan laatu isännällä on liian heikko tai liian hyvä. Eri loislajeilla on erilaiset mekanismit ja vasteet isännän ravintotilanteeseen (Hall ym. 2009).

Voidaan ajatella, että heikon ravinnon aiheuttaman suodatusnopeuden kasvun seurauksena vesikirput altistuvat suuremmalle määrälle loisten tarttuvista asteista, jolloin infektion todennäköisyys kasvaa. Toisaalta, mikäli Mekkojärven loisten infektiosteet vapautuvat veteen ja painuvat pohjalle muissa tutkimuksissa havaitun ilmiön mukaan (Frank

1996, Ebert 2005), voi syvällä oleilu altistaa enemmän loisille. Tällä hetkellä ei ole tietoa Mekkojärvellä esiintyvien loisten leviämismekanismeista. Mikäli ravinnekäsittely voimistaa kasviplanktonituotantoa, ravinnekäsitteltyjen alaiden vesikirput laiduntavat suuremman osan ajasta epilimnionissa, jolloin altistumisaika loisinfektioille lyhenee. Suodatusnopeus hidastuu runsaan ravintokonsentraation seurauksena ja infektiosteiden sisäänotto vähenee.

Heikko ravinto on stressitekijä, mikä voi heikentää isännän immuunipuolustuskykyä ja johtaa yksilössä loisten kasvuun ja transmissioasteiden kehittymiseen (Frost ym. 2008b). Loispopulaation tasapaino koostuu siirtymäasteiden ja kasvun määrästä sekä poistumisen runsaudesta isännän kuolemisen kautta (Andersson 1978, 1979, Andersson & May 1978). Jos isännän stressillä on vahvempi vaikutus loisten poistumiseen kuin kasvuun ja siirtymiseen, voi infektioprosentti pienentyä (Pulkkinen & Ebert 2004). Monet selkärangattomien loiset ovat vahvasti riippuvaisia isännän biomassasta ja resursseista (Ebert 2005). Näin ollen selkärangattoman isännän stressillä voi olla voimakkaampi negatiivinen vaikutus loisten kasvuun ja eloonjääntiin, ja siten tärkeämpi rooli loispopulaation koon määrittämisessä (Pulkkinen & Ebert 2004). Isännän hyvällä ravintotilanteella ja kunnolla voi olla vastaavasti suotuisat vaikutukset loisten kasvulle (Ebert 2005).

Hall ym. (2009) totesivat manipulaatiokokeessaan *Daphnian* ruuan laadun parantuksessa syntyvyyden kasvavan samoin kuin sieni-infektion sporituotannon lisääntyvän. Samassa tutkimuksessa havaittiin uusien tartuntojen kuitenkin vähentyneen, mikä osaltaan katalysoi sieniepidemian päättymistä. Havaittiin, että laadukasta ravintoa saaneet isännät kuolivat nopeammin ja tuottivat enemmän loisten infektiosteita kuin heikompaan ravintoon saaneet yksilöt. Loisinfektiot itsessään vaikuttavat isännän kudosten ravinnepitoisuuksiin eli stoikiometriaan (Frost ym. 2008b). Kokeessa havaittiin, että isännän P-, N- ja C -pitoisuudet olivat riippuvaisia paitsi ruuan laadusta, myös loisinfektioista ja taudin asteesta. Infektoituneilla isännillä fosforipitoisuus oli pienempi ja hiilipitoisuus suurempi kuin terveillä yksilöillä ravinnosta riippumatta. Kudosten tyypipitoisuus väheni käytettäessä fosforipitoista ruokaa, kun taas fosforirajoitteista ruokaa saaneiden tyypipitoisuus kasvoi infektoiduissa yksilöissä (Frost ym. 2008b). Loisinta vaikuttaa näin ollen akvaattisen ravintoverkon ravinteiden kiertoon.

## 2.2 Humusjärvet

Korkea liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuus, heikko valoympäristö ja matalat epäorgaanisen typen ja fosforin pitoisuudet kuvaavat hyvin pohjoisen lauhkean vyöhykkeen humusjärviä (Jansson ym. 1996). Humusjärvien perustuotanto on usein ravinteiden ja valon rajoittamaa. Humusjärvien kokonaistuotanto perustuu vahvasti heterotrofiaan, jossa bakteerit hyödyntävät liuennutta orgaanista hiiltä energian lähteitään (Tranvik 1989, Moran & Hodson 1990). Tällainen kasvuympäristö on soveliaampi bakteeri- kuin kasviplanktonille. Bakteerit kilpailevat tehokkaasti epäorgaanisista ravinteista, minkä vuoksi ne rajoittavat runsaana esiintyessään kasviplanktonin kasvua (Jansson 1993). Onkin havaittu, että humusjärvissä bakteerituotannon määrä voi olla suurempi kuin kasviplanktonituotannon (Salonen 1981). Humusjärvissä on enemmän bakteeriplanktonia suhteessa kasviplanktoniin kuin oligotrofisissa järvissä (Nurnberg & Shaw 1998). Lisäksi Ramberg (1979) ja Salonen & Jokinen (1988) ovat todenneet humusjärvien kasviplanktoniyhteisöjen koostuvan enemmän mikсотrofisista lajeista kuin muun tyyppisten järvien yhteisöjen. Humusjärvien liuenneen orgaanisen hiilen merkitys ravintoverkoissa on vahvempi kuin muuntyyppisissä järvissä, mutta sen kaikkia toimintamekanismeja ei tunneta vielä erityisen tarkasti.

Humusjärvissä tehdyissä ravinnemanipulaatiokokeissa on havaittu, että fosforin ja typen lisääminen kasvattaa kasviplanktonin biomassaa ja muuttaa lajikoostumusta. Typpi

rajoittaa usein kasviplanktonin kasvua ja fosfori bakteeriplanktonin kasvua (Jansson ym. 2001). Bakteeribiomassaan ravinnelisäykset ovat vaikuttaneet vaihtelevasti. Niissä humusjärvisissä, joissa liuenneen orgaanisen hiilen (DOC) määrä on korkea (yli 15 mg L<sup>-1</sup>), bakteeribiomassassa tai lajistossa ei havaittu muutosta ravinnelisäyksen jälkeen. (Jansson ym. 2001) Humusjärvisissä, joissa liuenneen orgaanisen hiilen määrä on pienempi, on havaittu ravinnelisäyksen lisäävän bakteeribiomassaa (Hessen ym. 1994, Jansson ym. 1996).

### 3. AINEISTO JA MENETELMÄT

#### 3.1 Tutkimusalue

Mekkojärvi on pieni, matala ja tummavetinen järvi (pinta-ala 0,35 ha, keskisyvyys 3 m), joka sijaitsee Hämeessä Evon alueella lähellä Helsingin yliopiston Lammin biologista asemaa (Salonen & Lehtovaara 1992). Järvi on voimakkaasti lämpötila- ja happikerrostunut. Tuottava kerros on syvyydeltään 0,5–1 m. Syvemmät kerrokset ovat hapettomia. Myös järven ravinteet ovat kerrostuneet. Kokonaisfosforin määrä epilimnionissa on 10–15 µg P L<sup>-1</sup> ja hypolimnionissa 25–35 µg P L<sup>-1</sup>. Kokonaistypen määrä on vastaavasti 500–1000 µg N L<sup>-1</sup> ja 800–1100 µg N L<sup>-1</sup>. Mekkojärven liuenneen orgaanisen hiilen (DOC) pitoisuus on erityisen korkea (20–45 mg L<sup>-1</sup>) (Taipale 2007).

Mekkojärvellä kasviplanktonin tuotannon määrä on suurimmillaan toukokuussa ja laskee loppukesää kohti. Fotosynteettisten bakteerien biomassan on havaittu olevan suurimmillaan heinäkuun puolella välissä, jonka jälkeen se laskee. Bakteeribiomassa on määrältään satakertainen suhteessa levän biomassa (Ojala & Salonen 2001). *Daphnia longispina* esiintyy Mekkojärvessä hyvin runsaana läpi kesän ja hallitsee eläinplanktonbiomassaa lähes kokonaan (Salonen & Lehtovaara 1992). Mekkojärvellä anoksisen kerroksen bakteerit, jotka koostuvat joko heterotrofisista ja metaania hapettavista bakteereista sekä viherrikkibakteereista, muodostavat jopa 73 % *Daphnia longispinan* ravinnosta (Kankaala 1988, Taipale 2007). On havaittu, että Mekkojärvellä *Daphnian* kasvu hidastuu loppukesää kohti, koska kasviplanktonin määrän vähetessä ne käyttävät enemmän bakteereita ravinnokseen (Ojala ym. 1995). Lukuun ottamatta hyvin nuoria haukia (*Esox lucius*), järvessä ei esiinny planktonia syöviä kaloja. Siten *Daphnian* tärkeimmät saalistajat ovat *Chaoborus* -lajien toukat sekä *Nononecta* -lajit (Salonen & Lehtovaara 1992).

#### 3.2 Koeasetelma

Tutkimuksen kenttäkokeet tehtiin Mekkojärvellä 14.7.–18.8.2008. Kokonaisuudessaan koe kesti kuusi viikkoa. Tutkielmassani käytän tuloksia kolmelta näytteenotokerralta: alkutilanteesta (14.7.), kahden viikon kuluttua (28.7.) sekä lopputilanteesta (18.8.).

Mekkojärven keskelle asennettiin lauttakehikko, johon laitettiin kuusi mesokosmista (halkaisija 2 m, korkeus 4 m). Mesokosmokset laskettiin paikoilleen varovasti muutamaa päivää ennen kokeen alkua säilyttäen järven luonnollinen lämpötila- ja ravinnekerrostuneisuus, ja ne ulottuivat pohjasedimenttiin saakka (Kuva 1). Eläinplanktonin konsentraatiot mesokosmoksissa tarkistettiin ottamalla noutimella (halkaisija 5,7 cm, korkeus 164 cm) kokoomanäyte, jonka kolmesta osituksesta laskettiin *Daphnia longispina* -vesikirppujen lukumäärät. Lukumäärien jakautumisessa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja altaiden välillä (p>0.05).

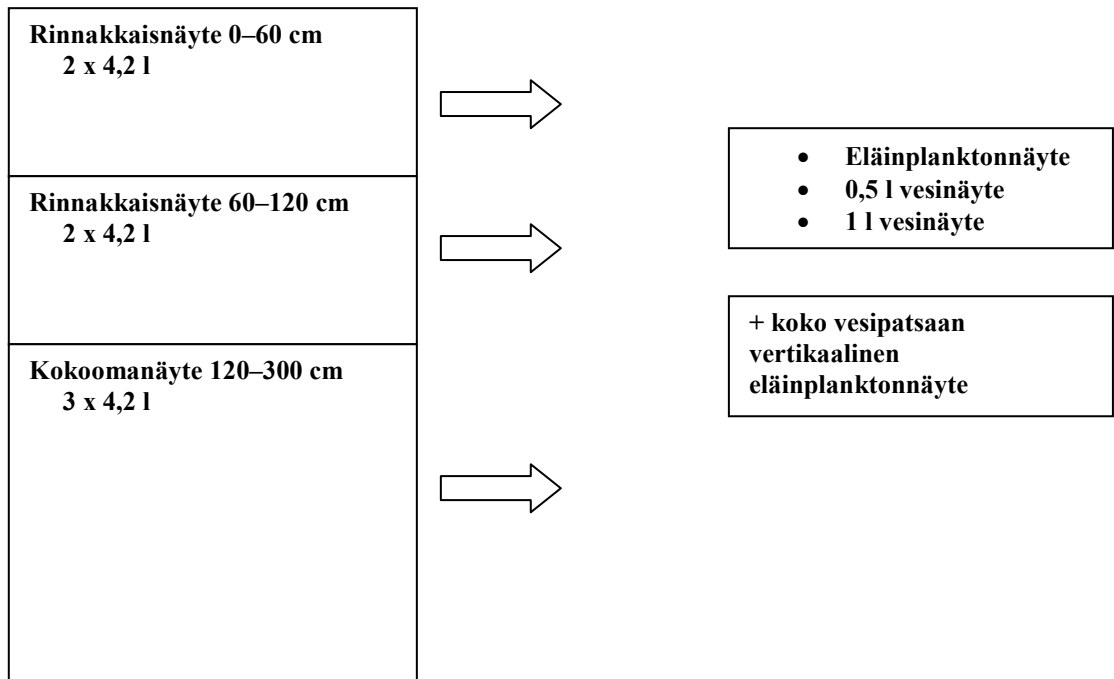




Kuva 1. Mesokosmosten asettaminen lauttakehikoihin ravinnemanipulaatiokoetta varten. Kuva, S. Aalto.

### 3.3 Näytteenotto ja ravinteiden lisäys

Näytteenotto tapahtui kerran viikossa maanantaisin kuuden viikon ajan. Näytteet otettiin kolmesta eri näytteenottosyvyydestä: epi-, meta- ja hypolimnionista (kts. Kuva 2). Epilimnionista (0–60 cm) ja metalimnionista (60–120 cm) otettiin kaksi rinnakkaista näytettä ja hypolimnionista 120–300 cm) kokoomanäyte. Noutimena käytettiin Limnos-näytteenotinta (korkeus 60 cm, tilavuus 4,2 l). Vesinäytteet suodatettiin eläinplanktonhaavin läpi (verkon tiheys 100  $\mu\text{m}$ ) saaviin. Haaviin jäänyt eläinplanktonnäyte talletettiin 0,5 litran pulloon. Saavista otettiin litran vesinäyte fysikaalis-limnologisia analyysejä varten, sekä yksi puolen litran vesinäyte epäorgaanisten ravinteiden määrittämiseksi. Lopuksi haavittiin (100  $\mu\text{m}$  planktonhaavi) pystysuunnassa koko vesipatsaasta noin 200 yksilön eläinplanktonnäyte loisten analysointia varten. Näytepullot pakattiin jäähdettyihin kylmälaukuihin kuljetuksen ajaksi. Tämän jälkeen mitattiin yhdestä mesokosmoksen näytestä lämpötila ( $^{\circ}\text{C}$ ), happi ( $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ ) ja hapen kylläisyys ( $\text{O}_2 \%$ ) kenttämittarilla neljästä eri syvyydestä (0 m, 0,5 m, 1 m ja 2 m).



Kuva 2. Manipulaatiokokeen viikottainen näytteenotto.

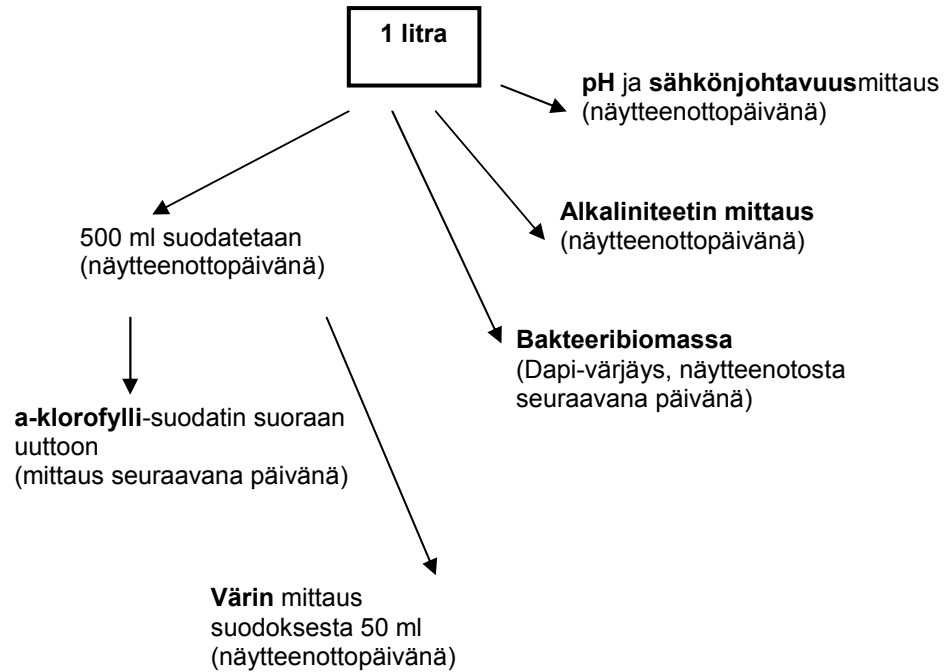
Ravinteiden lisäys tapahtui näytteenoton jälkeen. Mekkojärven veden epäorgaanisen fosforin pitoisuus kaksinkertaistettiin fosforilisäyksellä ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $10 \mu\text{mol P L}^{-1}$ ) kolmessa mesokosmoksessa. Epäorgaanista typpeä ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$   $100 \mu\text{mol N L}^{-1}$ ) lisättiin kymmenkertaistesti fosforiin nähden (1:10). Kolme mesokosmosta toimi kontrolleina. Ravinneliuokset valmistettiin liitteen 1 mukaan.

### 3.4 Näytteiden käsittely ja analysointi

Näytteet käsiteltiin Lammin biologisella asemalla vesilaboratoriossa sekä mikroskopointitiloissa. Puolen litran vesinäyte pakastettiin näytteenoton jälkeen ja siitä määritettiin kokeen loputtua kokonaisfosforin ja typen määrät. Litran vesinäyte jatkokäsiteltiin laboratoriossa näytteenottopäivänä (Kuva 3).

#### 3.4.1 Fysikaalis-limnologiset muuttujat

Kummastakin käsittelystä mitattiin näytteenottopäivänä pH, sähkönjohtavuus, alkaliniteetti ja väri laboratoriossa ravinnelisäyksen mahdollisesti aiheuttamien muutosten havaitsemiseksi. *a*-Klorofylli määritettiin jokaisesta mesokosmoksesta. Yhden litran vesinäytteistä suodatettiin 500 ml suodattimen (GF/F) läpi ja suodattimesta määritettiin *a*-klorofylli etanoliuuttoa käyttäen (Liite 3). Suodoksesta mitattiin väri (50 ml) spektrofotometrillä (A420). Loput suodoksesta pakastettiin 0,5 litran pulloissa myöhempää fosforin ja typen määrittystä varten. Suodattamattomasta näytevedestä mitattiin pH, sähkönjohtokyky ja alkaliniteetti Suomen standardisoimisliiton ohjeiden mukaisesti (<http://www.sfs.fi/en>).



Kuva 3. Litran vesinäytteen jatkokäsittely laboratoriossa.

#### 3.4.2 Bakteeriplanktonin määrittäminen

Bakteeribiomassan laskemiseksi otettiin 10 ml suodattamatonta vesinäytettä foliolla päällystettyihin tuikepulloihin. Näyte kestävästi säilytetään näytteenottopäivänä lisäämällä pulloon ruiskusuodattimen läpi 2 ml suodatettua (0,2 µm) formaliniiniliuosta (10 %) ja jätettiin jääkaappiin odottamaan seuraavan päivän DAPI-värjäystä. Näytteet värjättiin DAPI:lla liitteen 2 mukaisesti.

DAPI-värjättyt bakteerisuodattimet kuvattiin epifluoresenssimikroskoopiin (Olympus B X60, 100 x okulaari, UV-filtteri) kiinnitetyllä kameralla (Olympus U-CMAD3) ja bakteerit laskettiin Analysis-ohjelmalla. Jokaisesta preparaatista otettiin 20 kuvaa, joista valittiin laskentoihin 10 tarkinta. Jokaisesta kuvasta laskettiin yksittäisten bakteerien halkaisija ja pinta-ala, joiden avulla voitiin laskea bakteerien tiheys (yks. m<sup>-3</sup>) ja biomassa (mg C m<sup>-3</sup>) (Tulonen ym. 2000).

#### 3.4.3 *Daphnia longispina* yksilötiheyden ja keskipituuden määrittäminen

Kvantitatiivisiin eläinplanktonnäytteisiin lisättiin etanolia (94 % EtOH) kestäväntä varten siten, että kokonaistilavuudesta 30 % oli eläinplanktonnäytettä ja 70 % kestäväntä liuosta. Samalla osa *Daphnia*ista poimittiin loisnäytteisiin, mikä huomioitiin myöhemmin lasketuissa tuloksissa.

Kvantitatiiviset näytteet laskettiin käyttäen preparointimikroskooppia (Leica L2, 3 x suurennos tai Olympus SZX9, 40 x suurennos). Eri eläinplanktonlajien yksilömäärät laskettiin ja vähintään 100 *Daphnia longispina* -yksilöä mitattiin. Mitta otettiin preparointimikroskoopin mittajanalla pääläestä piikin tyveen saakka ja saadut arvot muutettiin myöhemmin millimetreiksi muuntokertoimen avulla. Samalla *Daphnia longispina* munien ja poikasten lukumäärät laskettiin.

### 3.4.4 Loisten määrittäminen

Loislajisto sekä loisten lukumäärä määritettiin elävistä *D. longispinoista* näytteenottoa seuraavien kolmen päivän aikana. Kustakin haavinäytteestä poimittiin 50 suurta vesikirppua, joista 10 yksilöä poimittiin kerralla objektilasille. Yksilöt mitattiin ja niiden poikaset laskettiin preparointimikroskoopilla (Leica L2). Lisäksi mahdolliset ulkoloiset ja loisten aiheuttamat ulkonäkömuutokset kirjattiin muistiin. Tämän jälkeen eläimistä preparoitiin suoli erilleen kahdella ohuella neulalla ja asetettiin peitinlasi näytteen päälle. Näytteet analysoitiin välittömästi valomikroskoopilla (Leitz Biomed) 400-kertaisella suurennoksella käyttäen faasikontrastia ja loislajit sekä niiden lukumäärät laskettiin. Loisnäytteiden käsittely satunnaistettiin niin, että tutkijalle selvisi näytteen alkuperä kaikkien näytteiden määrittämisen jälkeen.

### 3.5 Tilastokäsittelyt

Vesikirppupopulaation tiheyden ja keskipituuden, bakteeriplanktonin tiheyden ja biomassan, loisten keskimääräisten yksilömäärien ja infektioprosentin sekä fysikaalis-limnologisten mittaustulosten tilastollisissa analysoinnissa käytettiin ensisijaisesti toistomittaus-ANOVAa. Testillä tarkasteltiin viikon aikajakson ja käsittelyn yhteisvaikutusta. Näytteenottokertoja oli kolme, joten aineistosta tehtiin myös kontrastointeja, joissa verrattiin seuraavia viikkoja alkutilanteeseen huomioiden käsittelyn ja ajankohdan yhteisvaikutus (kontrast = [simple]). Koska alkutilanteen oletetaan olevan sama kaikissa tilanteissa, käsittelyn tilastollisesti merkitsevä päävaikutus ei itsessään ole osoitus ravinnelisyksen vaikutuksesta, vaan on tarkasteltava ajan (viikon) ja käsittelyn yhdysvaikutuksen merkitsevyyttä (Potvin ym. 1990). Mikäli kovarianssimatriisin sirkulaarisuusoletus ei toteutunut, käytettiin Greenhouse-Geisser- tai Huynh-Feldt -korjattuja F-arvoja. Testioletuksena oleva varianssien homogeenisuus testattiin Levenen testillä sekä aineiston normaalius kuvaajien avulla. Mikäli toistomittaus-ANOVA:n oletukset eivät olleet voimassa, tehtiin muuttujamuunnoksia (eksponentiaalimuunnos tai log-muunnos). Mikäli varianssien yhtä suuruus ei toteutunut muunnosten jälkeenkään, testin merkitsevyyttä tulkittaessa otettiin huomioon, että 1. tyypin virheen riski hylätä nollahypoteesi silloinkin, kun se on oikea, kasvaa. (Ranta ym. 1992). Kyseiset tapaukset on huomioitu tulososiossa erikseen, mikäli testitulokset hylkää nollahypoteesin. Kaikkien testien ja muunnosten tekemisessä käytettiin SPSS -tilasto-ohjelmaa (versio 15.0).

## 4. TULOKSET

### 4.1 Fysikaalis-limnologiset muuttujat

#### 4.1.1 Fysikaaliset muuttujat

Pintaveden lämpötila oli korkeimmillaan toisena mittausajankohtana ja laski kokeen lopussa jo alle 16 °C:n. Hapen konsentraatiossa ei tapahtunut suuria muutoksia kokeen kuluessa (Taulukko 1). pH oli hiukan korkeampi kontrollialtaassa kuin ravinnekäsittelyn saaneissa altaassa. Sähkönjohtavuus laski kokeen aikana sekä kontrolli- että ravinnekäsittelyssä altaassa. Väriarvo oli ravinnerikastetussa altaassa alussa hiukan korkeampi kuin kontrollialtaassa, mutta ero tasoittui kokeen aikana. Alkaliniteetti kasvoi hiukan molemissa altaissa kokeen aikana.

Taulukko 1. Lämpötila, happi ja hapen kylläisyys (= ka 0 m ja 0,5 m) sekä pH, sähkönjohtavuus, väri ja alkaliniteetti epilimnionissa (0–60 cm) yhdessä kontrolli- ja yhdessä ravinnekäsitellyssä altaassa kolmena eri ajankohtana.

	14.7.		28.7.		18.8.	
	kontrolli	ravinteet	kontrolli	ravinteet	kontrolli	ravinteet
lämpötila (°C)		18,5		19,2		15,9
happi (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )		4,3		4,2		5
hapen kyl. (O <sub>2</sub> %)		46,9		46,2		51,6
pH	5,2	5,3	6,2	5,7	6,1	5,8
sähkönjohtavuus (µS cm <sup>-1</sup> )	39,1	42,9	38,8	39,7	36,9	39,6
väri (mg Pt L <sup>-1</sup> )	0,13	0,16	0,16	0,16	0,14	0,15
alkaliniteetti (mmol L <sup>-1</sup> )	0,037	0,044	0,054	0,048	0,058	0,06

#### 4.1.2 Fosfori ja typpi

Kokonaisfosforin (tot P) pitoisuudet olivat kokeen alussa noin 18 µg L<sup>-1</sup> molemmissa käsittelyissä. Pitoisuudet kolminkertaistuivat seuraavan kahden viikon kuluessa ja lähtivät laskuun kokeen loppua kohti käsittelystä riippumatta. Kokonaisfosforin pitoisuudet eivät eronneet käsittelyiden välillä eri ajankohtina epilimnionissa (0-60 cm) (toistomittausANOVA, käsittelyjen väliset vaikutukset, F=0.65, p=0.52) (Taulukko 2). Pitoisuuksien erot käsittelyjen välillä eivät poikenneet kahden viikon jälkeen (28.7.) tilastollisesti merkitsevästi alkutilanteesta (14.7.) (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, F=1.00, p=0.37), niin kuin tilanne kokeen lopussa (18.8.) ei myöskään eronnut alkutilanteesta (F=0.46, p=0.54).

Fosfaattifosforin (P/PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) konsentraatio oli kokeen alussa hiukan korkeampi ravinnekäsitellyissä altaissa (noin 1,5 µg L<sup>-1</sup>). Pitoisuus kasvoi molemmissa kaksi – kolminkertaiseksi kokeen aikana. Kontrollikäsittelyn pitoisuudet laskivat kokeen loppua kohti, mutta ravinnekäsitellyissä altaissa pitoisuus kasvoi hiukan verrattuna tilanteeseen kahden viikon jälkeen (Taulukko 2). Fosfaattifosfori epilimnionissa ei eronnut eri käsittelyissä eri ajankohtina (toistomittaus-ANOVA, käsittelyjen väliset vaikutukset, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, F=0.81, p=0.43). Pitoisuuksien erot käsittelyjen välillä eivät poikenneet kahden viikon jälkeen (28.7.) tilastollisesti merkitsevästi alkutilanteesta (14.7.) (käsittelyjen sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, F=0.09, p=0.79). Kokeen lopussa (18.8.) pitoisuuksien erot kuitenkin poikkesivat tilastollisesti merkitsevästi alkutilanteesta eri käsittelyissä (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, F=9.14, p=0.04) fosfaattifosforin ollessa lähes kaksinkertainen ravinnerikastetussa käsittelyssä.

Kokonaistypen (tot N) konsentraatiot olivat lähtötilannetta suuremmat kahden viikon kuluttua molemmissa käsittelyissä (Taulukko 2). Kokeen lopussa pitoisuus laski lähtötasolle kontrollissa, mutta ravinnekäsittelyn pitoisuudet säilyivät lähes toisen viikon tasolla. Kokonaistypen pitoisuudet epilimnionissa erosivat käsittelyjen välillä eri ajankohtina (toistomittaus-ANOVA, käsittelyjen väliset vaikutukset, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, F=5.32, p=0.03). Pitoisuuksien erot käsittelyjen välillä kahden viikon jälkeen (28.7.) eivät poikenneet tilastollisesti merkitsevästi alkutilanteesta (14.7.) (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, F=3.74, p=0.13), mutta lopputilanne (18.8.) erosi alkutilanteesta tilastollisesti merkitsevästi (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, F=8.14, p=0.05) niin, että pitoisuus oli ravinnekäsitellyssä suurempi.

Ammonium-ionien (N/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) pitoisuudet lähes kolminkertaistuivat molemmissa käsittelyissä kahden viikon kuluessa. Kokeen lopussa konsentraatio laski hiukan kontrolleilla,

mutta kasvoi ravinnekäsittelyssä niin, että se oli kaksinkertainen kontrolliin verrattuna (Taulukko 2). Ammonium-ionien konsentraatio epilimnionissa ei eronnut käsittelyjen välillä eri ajankohtina (toistomittaus-ANOVA, käsittelyjen väliset vaikutukset, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus,  $F=2.49$ ,  $p=0.14$ ). Pitoisuuksien erot käsittelyjen välillä kahden viikon jälkeen (28.7.) eivät poikenneet tilastollisesti merkitsevästi alkutilanteesta (14.7.) (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus,  $F=0.04$ ,  $p=0.85$ ), eikä myöskään kokeen lopussa (18.8.) ( $F=4.41$ ,  $p=0.10$ ).

Nitraatti- ja nitriitti-ionien ( $\text{N}/\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ) pitoisuudet kokeessa poikkesivat selvästi eri käsittelyissä. Alkutilanteessa kontrollin konsentraatio oli suurempi kuin ravinnekäsittelyyn. Kahden viikon kuluttua kontrollin pitoisuus laski kolmanneksen, mutta ravinnekäsittelyssä pitoisuus kaksinkertaistui. Kokeen lopussa kontrollin pitoisuus oli laskenut lähtötasolle, mutta ravinnekäsittelyyn pitoisuus oli lähes kuusinkertainen lähtötasoon nähden. Nitraatti- ja nitriitti-ionien pitoisuudet erosivat käsittelyiden välillä eri ajankohtina (toistomittaus-ANOVA, käsittelyjen väliset vaikutukset, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus,  $F=33.56$ ,  $p<0.00$ ). Verrattaessa tilannetta kahden viikon kuluttua (28.7.) alkutilanteeseen, käsittelyiden välinen ero oli tilastollisesti merkitsevä (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus,  $F=11.69$ ,  $p=0.03$ ); samoin kuin lopputilanne (18.8.) ( $F=67.87$ ,  $p<0.00$ ).

Typen rikastuksen seuraukset näkyivät manipulaatiokokeessa selvempinä eroina kuin fosforin lisäykset. Kokonaistypen pitoisuudet olivat suuremmat ravinnekäsittelyissä altaissa kokeen lopussa ja nitraatti- ja nitriittipitoisuudet moninkertaistuivat ravinnekäsittelyissä altaissa. Kokonaisfosforipitoisuudet eivät eronneet käsittelyissä, mutta epäorgaanisen fosforin pitoisuus oli kokeen lopussa suurempi ravinnekäsittelyissä altaissa. Ravinnepitoisuudet meta- ja hypolimnionissa eivät osoittaneet voimakkaita muutoksia eri käsittelyiden välillä lukuun ottamatta epäorgaanista tyyppiä, jonka pitoisuudet kasvoivat ravinnekäsittelyssä (Taulukot 3 ja 4). Tässä tutkielmassa ei testattu kyseisiä tuloksia tilastotestein pro gradu -aineiston rajaamisen takia.

Taulukko 2. Ravinnepitoisuuksien keskiarvo ( $\bar{x}$ ) ja keskiarvon keskivirhe ( $SE$ ) epilimnionissa kolmena eri ajankohtana.

EPILIMNION	14.7.				28.7.				18.8.			
	kontrolli		ravinteet		kontrolli		ravinteet		kontrolli		ravinteet	
	ka	SE	ka	SE	ka	SE	ka	SE	ka	SE	ka	SE
tot P ( $\mu\text{g P L}^{-1}$ )	18,0	1,2	18,7	0,3	67,0	2,6	64,3	4,1	16,7	0,7	23,3	1,2
tot N ( $\mu\text{g N L}^{-1}$ )	684,0	45,5	669,7	13,4	919,3	18,0	892,0	31,3	697,3	11,4	859,0	18,1
$\text{P}/\text{PO}_4^{3-}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1,3	0,3	1,7	0,3	4,0	2,5	5,0	1,0	2,7	0,3	5,7	0,9
$\text{N}/\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	13,7	2,0	17,7	7,2	53,0	12,6	60,0	10,1	49,0	17,4	100,7	10,2
$\text{N}/\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	41,0	7,6	26,3	0,7	27,3	1,3	71,3	14,2	40,7	6,2	151,0	8,0

Taulukko 3. Ravinnepitoisuuksien keskiarvo (ka) ja keskiarvon keskivirhe (SE) metalimnionissa kolmena eri ajankohtana.

METALIMNION	14.7.				28.7.				18.8.			
	kontrolli		ravinteet		kontrolli		ravinteet		kontrolli		ravinteet	
	ka	SE	ka	SE	ka	SE	ka	SE	ka	SE	ka	SE
tot P ( $\mu\text{g P L}^{-1}$ )	24,0	0,6	24,3	1,9	21,7	0,9	25,3	2,7	64,3	5,2	58,0	8,5
tot N ( $\mu\text{g N L}^{-1}$ )	660,7	27,1	656,0	10,0	745,3	7,9	790,0	18,5	993,7	38,5	942,0	54,7
P/PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	3,7	0,9	5,3	1,3	10,0	3,6	9,0	2,6	4,0	1,0	10,3	1,3
N/NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	11,0	1,2	19,7	10,7	65,7	6,3	73,3	17,4	50,7	19,1	116,3	8,7
N/NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	27,7	0,3	27,0	0,6	29,7	0,9	47,0	7,2	31,7	3,5	99,0	3,1

Taulukko 4. Ravinnepitoisuuksien keskiarvo (ka) ja keskiarvon keskivirhe (SE) hypolimnionissa kolmena eri ajankohtana.

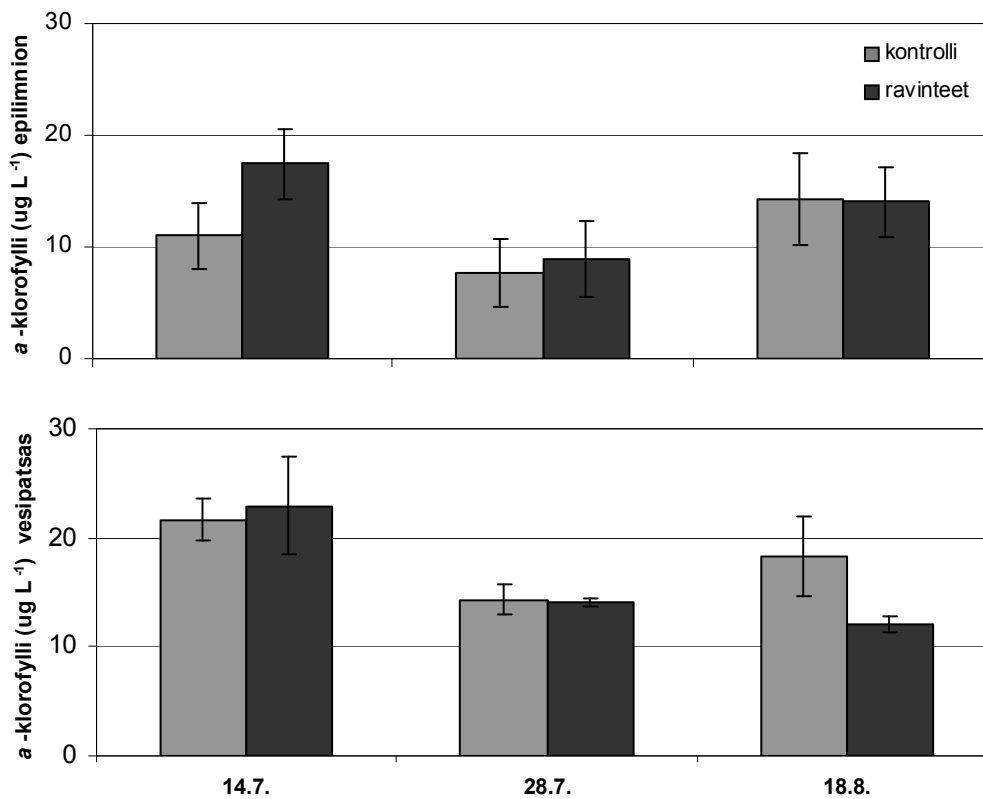
HYPOLIMNION	14.7.				28.7.				18.8.			
	kontrolli		ravinteet		kontrolli		ravinteet		kontrolli		ravinteet	
	ka	SE	ka	SE	ka	SE	ka	SE	ka	SE	ka	SE
tot P ( $\mu\text{g P L}^{-1}$ )	67,0	2,6	64,3	4,1	67,3	4,3	68,7	6,7	18,0	1,5	25,3	1,5
tot N ( $\mu\text{g N L}^{-1}$ )	919,3	18,0	892,0	31,3	1025,0	35,5	1021,3	45,8	716,7	18,8	854,7	15,3
P/PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	26,0	0,0	26,0	2,0	24,3	2,8	26,0	5,3	21,7	1,8	26,7	3,2
N/NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	212,7	8,8	199,0	21,7	201,7	28,2	199,0	39,8	237,0	25,5	205,7	38,9
N/NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	23,7	0,9	22,3	0,3	23,3	1,5	25,0	1,7	22,7	0,9	42,3	3,2

#### 4.1.3 a-Klorofylli

Epilimnionin klorofyllipitoisuus oli kokeen alussa hiukan korkeampi ravinnekäsittelyissä altaissa kuin kontrollialtaissa. Käsittelyjen klorofyllipitoisuudet käyttäytyivät samalla tavalla molemmissa altaissa laskien alkutilanteesta seuraavaan näytteenottoon ja taas kasvamalla hiukan kokeen loppuun mennessä (Kuvaaja 1a). Koko vesipatsaan klorofyllipitoisuus mukaili edellä mainittua trendiä kontrollikäsittelyssä, mutta ravinnekäsittelyssä pitoisuus pieneni kokeen kuluessa (Kuvaaja 1b). *a*-Klorofyllin pitoisuudet epilimnionissa, metalimnionissa, hypolimnionissa ja koko vesipatsaassa eivät eronneet eri käsittelyiden välillä eri ajankohtina (toistomittaus-ANOVA, käsittelyjen väliset vaikutukset, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, epilimnion,  $F=0.39$ ,  $p=0.69$ ; metalimnion,  $F=0.01$ ,  $p=0.93$ ; hypolimnion,  $F=2.05$ ,  $p=0.19$ ; koko vesipatsas,  $F=1.21$ ,  $p=0.35$ ). Pitoisuuksien erot käsittelyjen välillä kahden viikon jälkeen (28.7.) eivät poikenneet tilastollisesti merkitsevästi alkutilanteesta (14.7.) (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, epilimnion,  $F=0.60$ ,  $p=0.48$ ; metalimnion,  $F=0.01$ ,  $p=0.92$ ; hypolimnion,  $F=0.02$ ,  $p=0.90$ ; koko vesipatsas,  $F=0.04$ ,  $p=0.85$ ). Kokeen lopussa (18.8) pitoisuuksien erot eivät poikenneet tilastollisesti merkitsevästi alkutilanteesta (14.7.) (käsittelyn sisäinen kontrasti, ANOVA, epilimnion,  $F=0.50$ ,  $p=0.52$ ; metalimnion,  $F=0.01$ ,  $p=0.92$ ; hypolimnion,  $F=3.44$ ,  $p=0.14$ ; koko vesipatsas,  $F=1.17$ ,  $p=0.34$ ).

Ravinnekäsittely ei vaikuttanut *a*-klorofylli -pitoisuuksiin. Veden *a*-klorofylli -pitoisuus oli pienin epilimnionissa, ja kasvoi pohjaa kohti. Tämä johtui mahdollisesti siitä, että käytetty analysointimenetelmä mittaa myös bakteeriplanktonin tuottamaa *d*-klorofylliä, jonka määrittämiseen käytetty aallonpituus on osittain sama kuin *a*-klorofyllin. Tähän viittaa

se, että koko vesipatsaan klorofyllipitoisuudet olivat korkeammat kuin pelkän epilimnionin (Kuvaajat 1a ja 1b).



Kuvaajat 1a ja 1b. *a*-Klorofyllin keskiarvo  $\pm$  SE epilimnionissa ja koko vesipatsaassa kolmena eri mittausajankohtana.

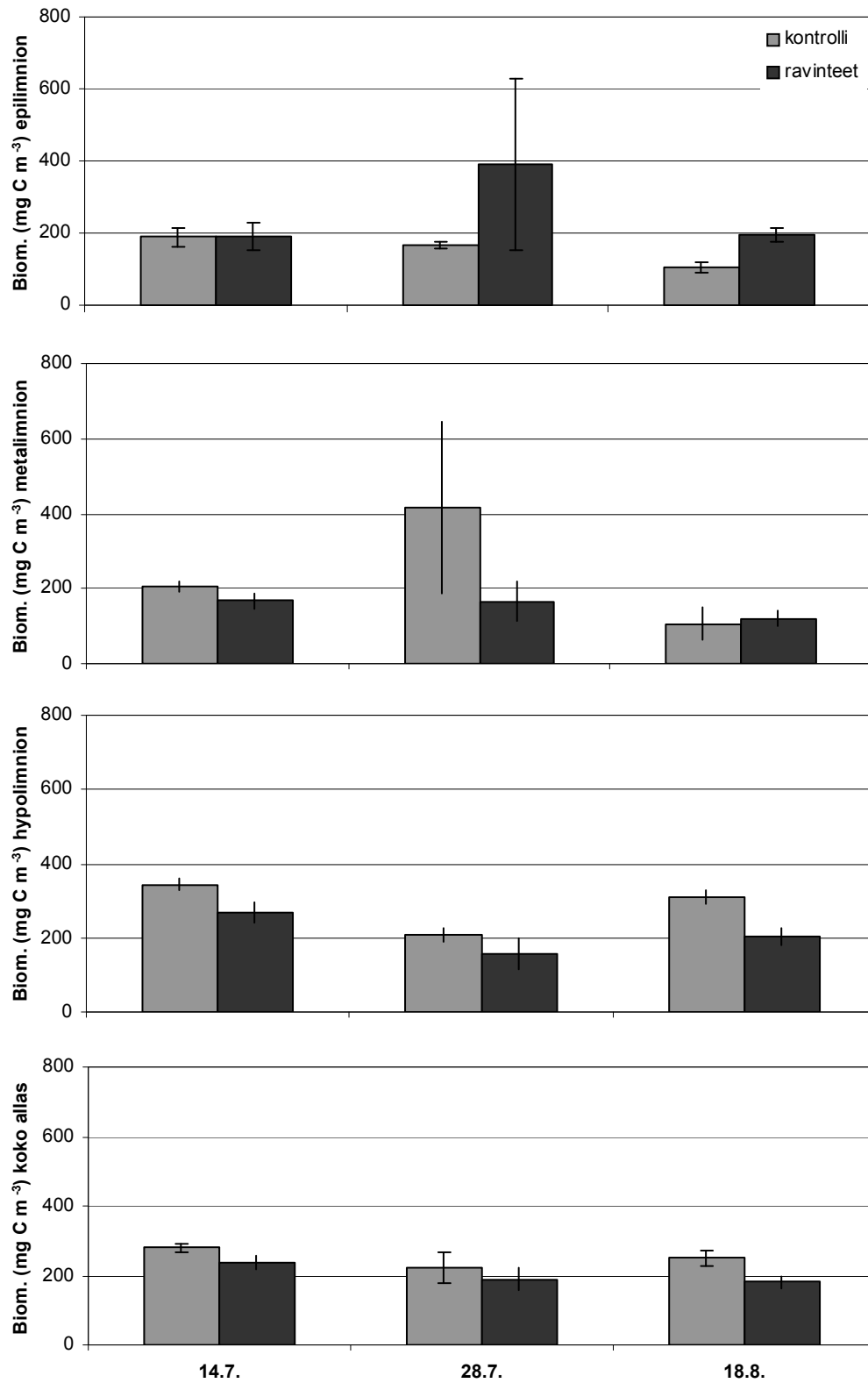
## 4.2 Bakteriplankton

Ravinnelisäys ei muuttanut bakteriplanktonin biomassaa tai tiheyttä tilastollisesti merkitsevästi. Bakteriplanktonin biomassat epilimnionissa, metalimnionissa, hypolimnionissa ja koko vesipatsaassa eivät eronneet käsittelyiden välillä eri ajankohtina (toistomittaus-ANOVA, käsittelyjen väliset vaikutukset, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, epilimnion,  $F=0.34$ ,  $p=0.73$  (kuvaaja 2a); metalimnion, log-muunnetut arvot,  $F=1.21$ ,  $p=0.34$  (kuvaaja 2b); hypolimnion,  $F=0.52$ ,  $p=0.62$  (kuvaaja 2c); koko vesipatsas,  $F=0.24$ ,  $p=0.65$ ) (kuvaaja 2d). Biomassat eri käsittelyissä kahden viikon kuluttua (28.7.) eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi alkutilanteesta (14.7.) (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, epilimnion,  $F=0.38$ ,  $p=0.57$ ; metalimnion,  $F=0.66$ ,  $p=0.48$ ; hypolimnion,  $F=0.19$ ,  $p=0.69$ ; koko vesipatsas,  $F=0.02$ ,  $p=0.89$ ). Kokeen lopussa (18.8.) yhdysvaikutus ei eronnut alkutilanteesta tilastollisesti merkitsevästi (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, epilimnion,  $F=1.00$ ,  $p=0.37$ ; metalimnion  $F=2.09$ ,  $p=0.24$ ; hypolimnion  $F=0.28$ ,  $p=0.62$ ; koko vesipatsas  $F=0.30$ ,  $p=0.61$ ).

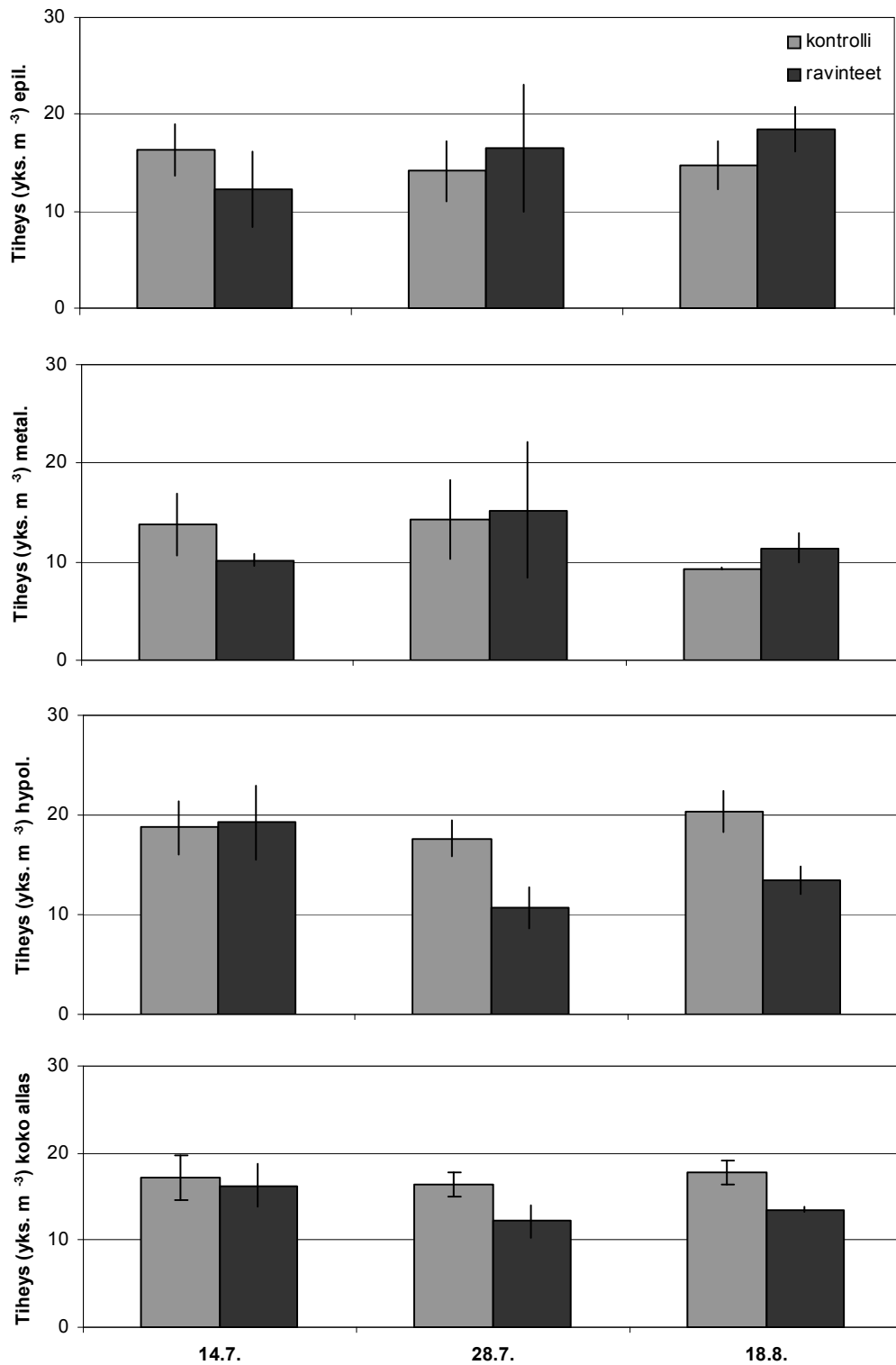
Bakteriplanktonin tiheydet eivät muuttuneet kokeen aikana eri käsittelyissä. Bakteriplanktonin tiheydet epi-, meta-, ja hypolimnionissa sekä koko vesipatsaassa eivät eronneet käsittelyiden välillä eri ajankohtina (toistomittaus-ANOVA, käsittelyjen väliset vaikutukset, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, epilimnion  $F=0.11$ ,  $p=0.90$  (kuvaaja 3a); meta-



limnion  $F=0.70$ ,  $p=0.48$  (kuvaaja 3b); hypolimnion  $F=1.47$ ,  $p=0.29$  (kuvaaja 3c); koko vesipatsas  $F=0.35$ ,  $p=0.61$  (kuvaaja 3d). Tiheydet eri käsittelyissä kahden viikon kuluttua (28.7.) eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi alkutilanteesta (14.7.) (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, epilimnion  $F=0.01$ ,  $p=0.93$ ; metalimnion  $F=0.69$ ,  $p=0.45$ ; hypolimnion  $F=6.17$ ,  $p=0.07$ ; koko vesipatsas  $F=0.02$ ,  $p=0.89$ ). Kokeen lopussa (18.8.) yhdysvaikutus ei eronnut alkutilanteesta tilastollisesti merkitsevästi (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, epilimnion  $F=0.42$ ,  $p=0.55$ ; metalimnion  $F=4.56$ ,  $p=0.10$ ; hypolimnion  $F=2.95$ ,  $p=0.16$ ; koko vesipatsas  $F=0.30$ ,  $p=0.61$ ).



Kuvaajat 2a, 2b, 2c ja 2d. Bakteeriplanktonin biomassa ( $\text{mg C m}^{-3}$ )  $\pm$  SE epilimnionissa, metalimnionissa, hypolimnionissa ja koko altaassa kolmena eri ajankohtana.  $n(\text{koe})=3$ ,  $n(\text{kontrolli})=3$ .



Kuvaajat 3a, 3b, 3c ja 3d. Bakteeriplanktonin tiheys (yüks. m<sup>-3</sup>) ± SE epilimnionissa, metalimnionissa, hypolimnionissa ja koko altaassa kolmena eri ajankohtana. n(koe)=3, n(kontrolli)=3.

### 4.3 *Daphnian* yksilötiheys ja keskipituus

Vesikirppujen yksilötiheys oli kokeen alussa yhtäläinen eri käsittelyissä (noin 10000 yks. m<sup>-3</sup>). Epilimnionissa näistä oli lähes puolet ja vain noin tuhat (yks. m<sup>-3</sup>) hypolimnionissa. Kahden viikon kuluttua tiheys kontrollikäsittelyssä pieneni epilimnionissa ja ravinnekäsittelyssä kasvoi hiukan (Kuvaaja 4a). Kokeen loppuun mennessä kontrollikäsittelyn yksilötiheydet olivat kasvaneet kolmanneksella, kun taas ravinnekäsittelyssä tiheydet olivat romahtaneet alle puoleen lähtötilanteesta. Metalimnionissa tiheydet eivät juuri muuttuneet kokeen aikana, ja ne olivat hyvin samankaltaiset molemmissa käsittelyissä (Kuvaaja 4b). Suurin ero yksilötiheyksissä tapahtui kokeen aikana hypolimnionissa, jonka yksilötiheys kasvoi lähes viisinkertaiseksi ravinnekäsittelyssä kontrollin pysyessä lähes alkutilanteessa (Kuvaaja 4c).

*Daphnia*-populaatioiden tiheyksien keskiarvot epilimnionissa, metalimnionissa ja koko vesipatsaassa eivät poikenneet käsittelyiden välillä eri ajankohtina (toistomittaus-ANOVA, käsittelyjen väliset vaikutukset, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, epilimnion F=3.00, p=0.11; metalimnion F=0.00, p=0.98; koko vesipatsas F=1.52, p=0.28). Populaatiotiheyksien erot kahden viikon jälkeen (28.7.) eivät poikenneet tilastollisesti merkitsevästi alkutilanteesta (14.7.) (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, epilimnion F=0.89, p=0.40; metalimnion F=0.00, p=0.97; koko vesipatsas F=0.59, p=0.48). Kokeen lopussa (18.8.) kontrollipopulaatioiden tiheys oli epilimnionissa suurempi kuin kokeen alussa ja ravinnekäsittelyjen populaatioiden tiheys alhaisempi kuin kokeen alussa, mutta yhdysvaikutus ei ollut tilastollisesti merkitsevä todennäköisesti suuren hajonnan vuoksi (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, epilimnion F=2.61, p=0.18), kuten ei myöskään metalimnionissa tai koko vesipatsaassa (metalimnion F=0.01, p=0.92; koko vesipatsas F=1.08, p=0.36).

Kokeen lopussa ravinnekäsittelyn hypolimnionin yksilötiheys oli yli neljä kertaa suurempi kuin kontrollin tai kokeen lähtötilanteen yksilötiheys. Hajonta ravinnekäsittelyissä altaissa kasvoi kokeen kuluessa moninkertaiseksi kontrolliin verrattuna. *Daphnian* tiheyden keskiarvot hypolimnionissa käsittelyjen välillä erosivat eri ajankohtina (toistomittaus-ANOVA, käsittelyjen väliset vaikutukset, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, F=10.90, p=0.01). Tiheydet eri käsittelyissä kahden viikon kuluttua (28.7.) eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi alkutilanteesta (14.7.) (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, F=0.60, p=0.49). Lopputilanne (18.8) erosi alkutilanteesta tilastollisesti merkitsevästi (käsittelyn välinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, F=12.83, p=0.02).

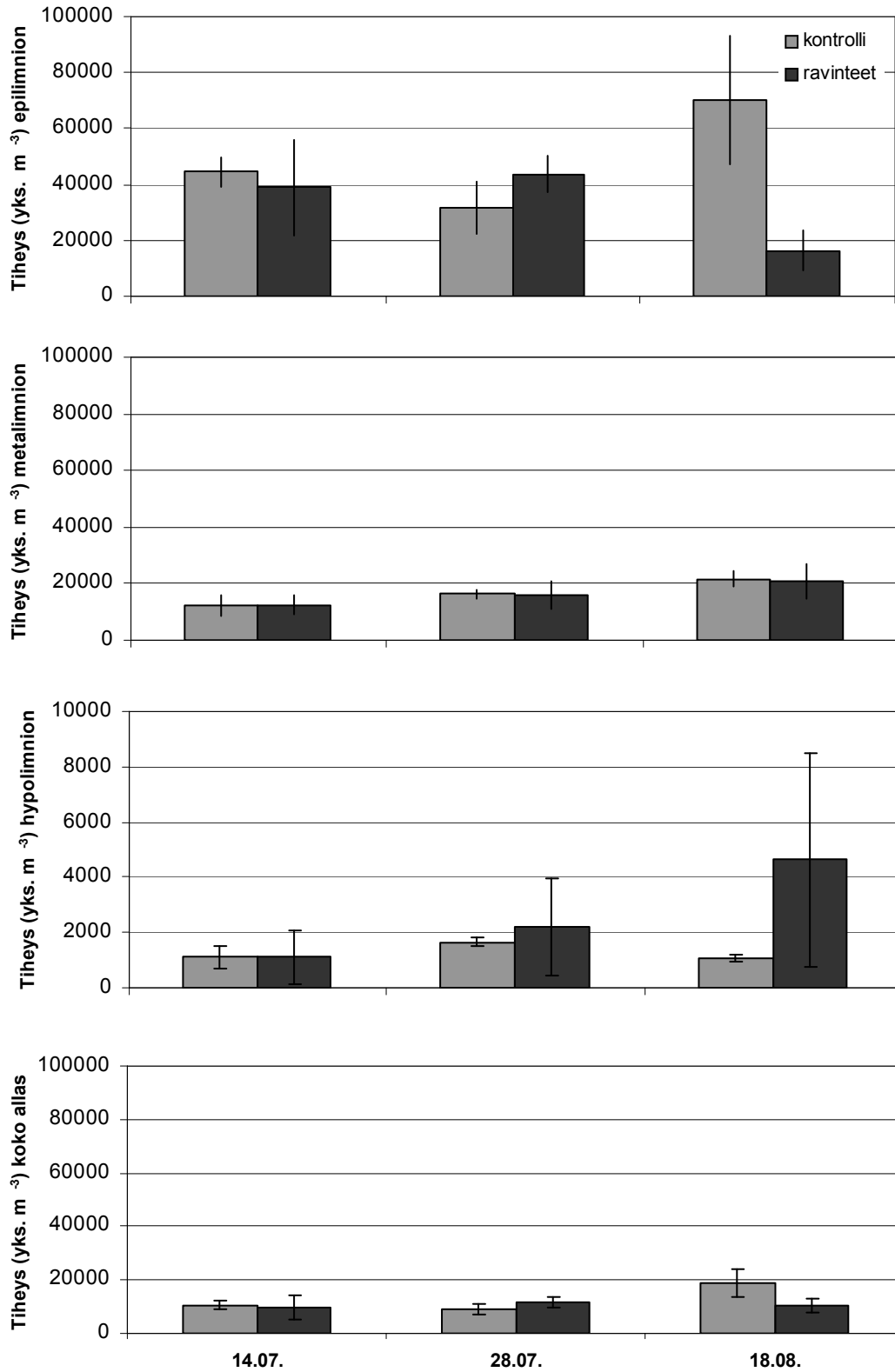
Kahden viikon kuluttua kokeen alusta koko altaan tiheydet eri käsittelyissä olivat lähes lähtötasolla ja kokeen loppuun mennessä tiheydet lähes kaksinkertaistuivat kontrollikäsittelyssä (Kuvaaja 4d). Ravinnekäsittelyn yksilötiheys oli kokeen lopussa alkutilanteen kaltainen. Pro gradu -työn rajaamisen vuoksi tässä ei käsitellä muutoksia *Daphnioiden* lisääntymisessä.

Epilimnionissa olleiden vesikirppujen keskipituus oli sama (noin 1,1 mm) molemmissa käsittelyissä (Kuvaaja 5a). Kahden viikon kuluttua kontrollin keskikoko oli kasvanut vain hiukan ja ravinnekäsittelyn keskikoko taas oli pienentynyt saman verran. Kokeen lopussa tilanne oli muuttunut kontrollin keskipituuden pienentyessä lähelle 0,8 mm:ä, kun taas ravinnekäsittelyn pituus pysyi ennallaan. Epilimnionin yksilöiden keskipituus eri käsittelyissä erosi merkitsevästi eri ajankohtina (toistomittaus-ANOVA, käsittelyjen väliset vaikutukset, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, F=5.21, p=0.04). Keskipituudet eri käsittelyissä kahden viikon kuluttua (28.7.) eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi alkutilanteesta (14.7.) (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus,

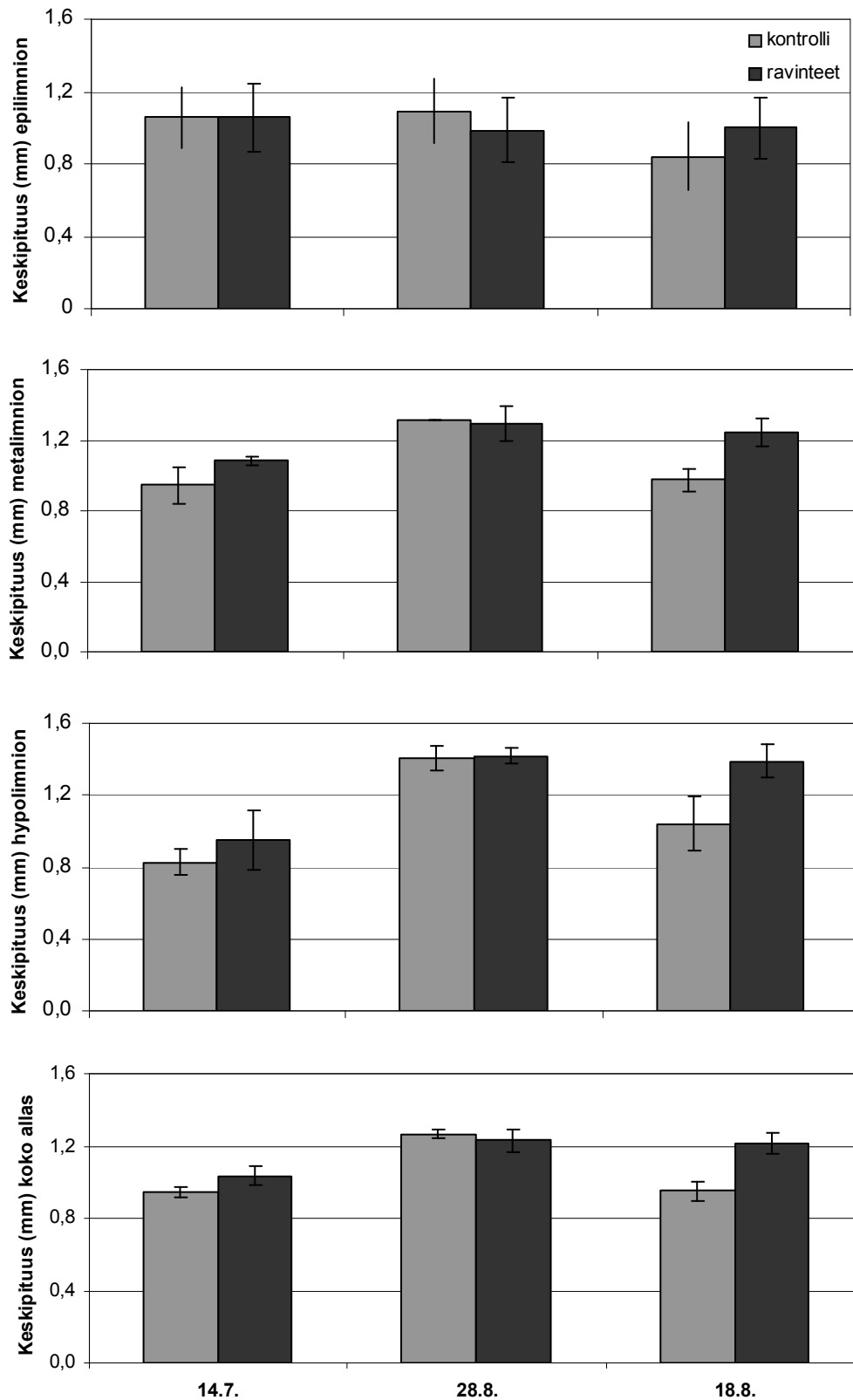
F=1.71, p=0.26). Kokeen lopussa ravinnekäsittelyn saaneissa altaissa yksilöiden keskipituudet olivat hieman suuremmat kuin kontrollialtaissa, mutta tilanne ei myöskään eronnut alkuhetkestä tilastollisesti merkitsevästi (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, F=2.18, p=0.21).

Kontrollialtaiden alemmissa vesikerroksissa pituus kasvoi kokeen alkutilanteesta pienentyen lähes lähtötasolle kokeen lopussa (Kuvaajat 5b, 5c). Ravinnekäsittelyssä keskipituus kasvoi kahden viikon kuluessa kontrollin tavoin (1,3 mm:n), mutta säilyi samana kokeen loppuun saakka. *Daphnian* keskipituudet meta- ja hypolimnionissa sekä koko vesipatsaassa eivät eronneet käsittelyiden välillä eri ajankohtina (toistomittaus-ANOVA, käsittelyjen väliset vaikutukset, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, metalimnion F=1.74, p=0.24; hypolimnion F=4.18, p=0.07); koko vesipatsas F=4.18, p=0.06. Keskipituudet eri käsittelyissä kahden viikon kuluttua (28.7.) eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi alkutilanteesta (14.7.) (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, metalimnion F=0.65, p=0.47; hypolimnion F=1.08, p=0.36; koko vesipatsas F=1.08, p=0.36). Kokeen lopussa (18.8.) yhdysvaikutus ei eronnut alkutilanteesta tilastollisesti merkitsevästi (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus, metalimnion F=2.15, p=0.22; hypolimnion F=3.05, p=0.16; koko vesipatsas F=3.05, p=0.16).

Ravinnekäsittelyn saaneissa altaissa yksilön keskipituus oli hieman suurempi kuin kontrollialtaissa kokeen lopussa (Kuvaaja 5d). *D. longispinan* keskipituuden kasvun Mekkojärvellä normaaliolosuhteissa odotettiin tyrehtyvän loppukesällä, mikä toteutui kontrollialtaissa. Ravinnekäsittelyssä altaissa keskipituus ei näyttänyt laskevan, vaikka ero ei ollutkaan tilastollisesti merkitsevä. Tämä voisi kuitenkin osoittaa, että ravinnekäsittely paransi *D. longispinan* kasvuolosuhteita.



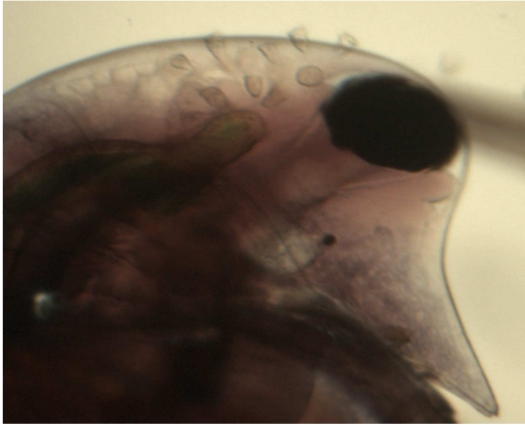
Kuvaajat 4a, 4b, 4c ja 4d. *Daphnia* yksilötiheyden (yüks. m<sup>-3</sup>) keskiarvot ± SE epilimnionissa, metalimnionissa, hypolimnionissa ja koko altaassa kokeen alussa 14.7., välillä 28.7. sekä kokeen lopussa 18.8. ravinnerikastetuissa ja kontrollialtaissa. n(koe)=3, n(kontrolli)=3. HUOM! Hypolimnionin kuvaajan y-akselin mitta-asteikko kertaluokkaa pienempi kuin muissa kuvaajissa.



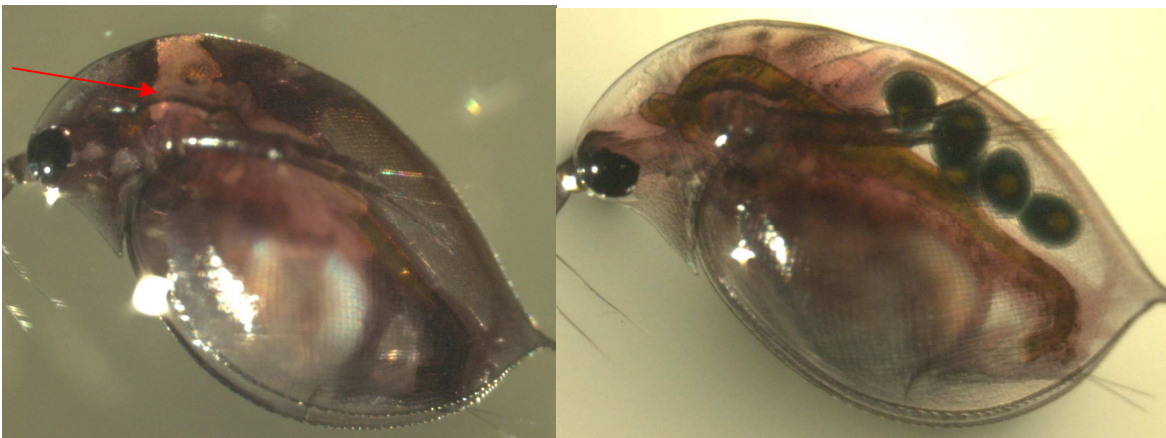
Kuvaajat 5a, 5b, 5c ja 5d. *Daphnia* keskipituuksien (mm) keskiarvot  $\pm$  SE epilimnionissa, metalimnionissa, hypolimnionissa ja koko altaassa kokeen alussa 14.7., välillä 28.7. sekä kokeen lopussa 18.8. ravinnerikastetuissa ja kontrollialtaissa.  $n(\text{koe})=3$ ,  $n(\text{kontrolli})=3$ .

#### 4.4 *Daphnia longispinana* loiset

Mekkojärven *Daphnia longispinana* löytyi tutkimusjakson aikana neljää eri loislajia. Ciliaatit (*Vorticella* sp.) ovat epibiontteja, jotka kiinnittyvät karapaksin ulkopintaan, yleisesti niskan alueelle (Kuva 4). *Larssonina* sp. on mikrosporidi, jonka aiheuttamat infektiot näkyivät harmaana massana karapaksin sisällä alkaen usein niskan alueelta (Kuvat 5a ja 5b). Mikäli yksilö oli erittäin pahasti infektoitunut, koko karapaksin saattoi täyttää harmaa massa. *Daphnioiden* suolesta löytyi kahta eri loislajia. Toinen lajeista oli tuntematon mikrosporidi, jota kutsutaan tässä nimellä USGP (Unknown Small Gut Parasite, Kuva 6a). USGP esiintyi suolen epiteelisolujen sisällä ja sen sporien lukumäärä soluissa vaihteli. Toinen laji oli ameebamainen, pitkulainen, noin 20 µm pitkä loinen, jota kutsutaan tässä nimellä ULGP (Unknown Large Gut Parasite, Kuva 6b). *Larssonialla* loisittujen vesikirppujen lukumäärä laskettiin, muista loisista laskettiin myös loisten lukumäärä, paitsi USGP:n tapauksessa laskettiin USGP:n infektoimien solujen lukumäärät.

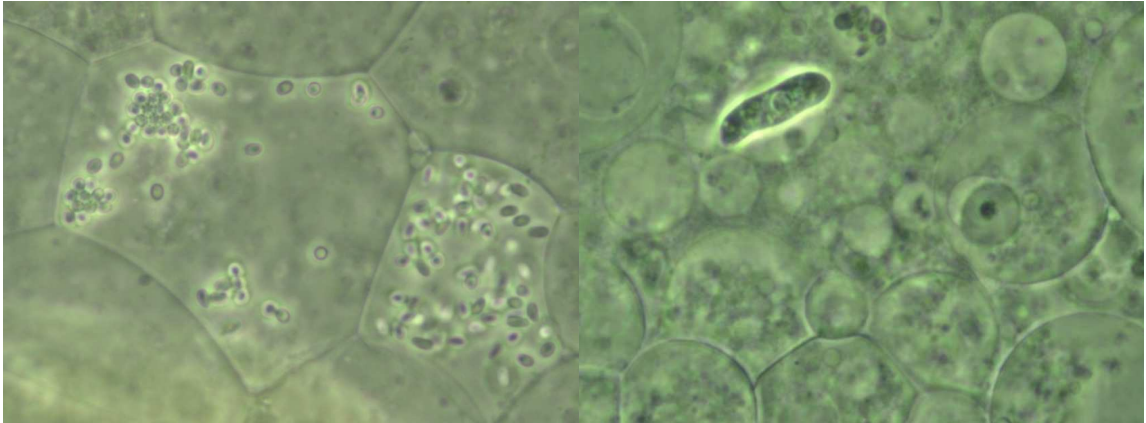


Kuva 4. Ciliaatit kiinnittyneinä karapaksin ulkopintaan niskan ja pään seudulla. Kuva K. Pulkkinen.



Kuvat 5a ja 5b. Vasemmalla *Larssonina* -infektion aiheuttama vaalea muutos yksilön niskassa. Oikealla terve *Daphnia* -yksilö. Kuvat K. Pulkkinen.





Kuvat 6a ja 6b. Mikroskooppikuva suolen epiteelisoluista. Vasemmalla kaksi USGP:n infektoimaa solua. Sporit ovat hyvin erotettavissa. Oikealla pintasolukkojen lomassa näkyy matomainen ULGP-loinen. Kuvat yhdistetty kahdesta eri kuvasta. Kuvat K. Pulkkinen.

#### 4.4.1 Ulkoloiset

*Daphnia longispinalla* esiintyi ciliaatteja (*Vorticella* sp.) kokeen aikana vain kerran yhdessä kolmesta ravinnekäsittelyaltaasta. Massaesiintymä ilmeni heinäkuun lopulla toisella koeviikolla. Loisittujen *Daphnioiden* osuus ravinnekäsittelyn saaneessa koeryhmässä oli tällöin 25 % (Kuvaaja 6d).

#### 4.4.2 Mikrosporidit

*Larssonia obtusa* -mikrosporidia esiintyi vain ensimmäisellä näytteenotokerralla. *Larssonialla* loisittujen *Daphnioiden* prosenttiosuudet kokeen alussa olivat hyvin pieniä, kontrolliryhmällä 4 % ja ravinnekäsittelyllä 5 % (Kuvaaja 6a).

USGP-loista (Unknown Small Gut Parasite) esiintyi molemmissa ryhmissä koko kokeen ajan (Kuvaaja 6c). USGP-epidemia voimistui kokeen aikana. Loisittujen epiteelisolujen lukumäärien keskiarvot eivät eronneet eri käsittelyiden välillä eri ajankohtina toisistaan (toistomittaus-ANOVA, käsittelyjen väliset vaihtelut, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus,  $F=0.19$ ,  $p=0.78$ ). Verrattaessa kahden viikon jälkeistä (28.7.) tilannetta lähtötilanteeseen, käsittelyjen väliset erot eivät olleet tilastollisesti merkitsevät (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus,  $F=0.36$ ,  $p=0.58$ ), eikä kokeen lopputilanne (18.8.) eronnut lähtötilanteesta (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus,  $F=0.40$ ,  $p=0.56$ ).

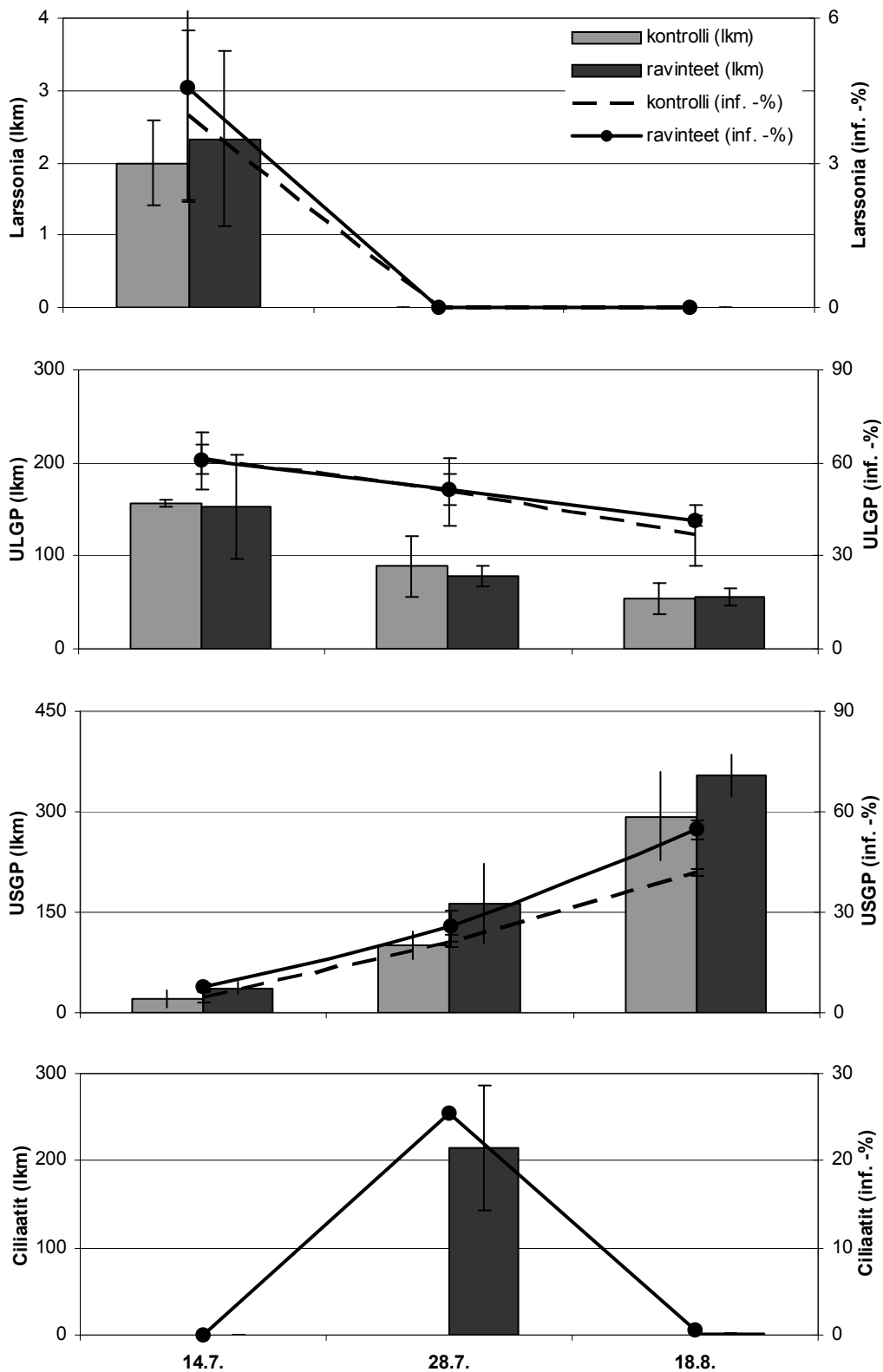
USGP:llä loisittujen *Daphnioiden* osuus kasvoi kokeen alusta loppua kohti 8:sta 55 %:iin ravinnekäsittelyssä ryhmässä. Kontrolliryhmässä ilmiö oli samansuuntainen (5 – 42 %). Infektioprosentit eivät eronneet eri käsittelyissä eri ajankohtina (toistomittaus-ANOVA, käsittelyjen väliset vaihtelut, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus,  $F=2,75$ ,  $p=0,14$ ). Kahden viikon kuluttua (28.7.) infektioprosentit eivät eronneet eri käsittelyissä alkutilanteesta (14.7.) tilastollisesti merkitsevästi (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus,  $F=0.11$ ,  $p=0.76$ ). Kokeen lopussa (18.8.) yhdysvaikutus erosi alkutilanteesta tilastollisesti merkitsevästi (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus,  $F=7.72$ ,  $p=0.05$ ) niin, että ravinnekäsittelyn infektioprosentti oli suurempi kuin kontrollin.

#### 4.4.3 Luokittelemattomat loiset

ULGP-loista (Unknown Large Gut Parasite) esiintyi molemmissa ryhmissä koko kokeen ajan. Loisten määrä väheni kesän kuluessa molemmissa ryhmissä. Loisten lukumää-

rien keskiarvot eri käsittelyissä eri ajankohtina eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi (toistomittaus-ANOVA, käsittelyjen väliset vaihtelut, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus,  $F=0.02$ ,  $p=0.96$ ) (Kuvaaja 6b). Verrattaessa tilannetta kahden viikon kuluttua (28.7.) alkutilanteeseen (14.7.), käsittelyiden välinen ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus,  $F=0.01$ ,  $p=0.93$ ), niin kuin ei myöskään kokeen loppua (18.8.) verrattaessa lähtötilanteeseen ( $F=0.01$ ,  $p=0.92$ ).

Kokeen alussa loisittujen *Daphnioiden* osuus eri käsittelyissä oli sama, 61 %. Kokeen aikana epidemia heikkeni ja infektioprosentit pienenevät kontrollissa 37 %:iin ja ravinnekäsittelyssä 41 %:iin. ULGP:llä loisittujen vesikirppujen infektioprosentit eri käsittelyissä kokeen aikana eivät eronneet merkitsevästi toisistaan (toistomittaus-ANOVA, käsittelyjen väliset vaihtelut, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus,  $F=0.72$ ,  $p=0.90$ ). Verrattaessa toista näytteenottoa (28.7) alkutilanteeseen, erot eivät olleet tilastollisesti merkitsevät (käsittelyn sisäinen kontrastointi, ANOVA, ajan ja käsittelyn yhteisvaikutus,  $F=0.01$   $p=0.94$ ), eikä lopputilannetta (18.8.) verrattaessa alkutilanteeseen ( $F=0.26$ ,  $p=0.64$ ).



Kuvaajat 6a, 6b, 6c ja 6d. Loisten (*Larssonia obtusa*, ULGP, USGP ja Ciliaatti *Vorticella* sp.) lukumäärät tai loisittujen yksilöiden osuudet  $\pm$  SE kontrolli- ja ravinnelisätyissä altaissa kolmena eri ajankohtana, sekä infektio prosentti eri käsittelyissä  $\pm$  SE.  $n(\text{koe})=150$ ,  $n(\text{kontrolli})=150$  *Daphnia*-yksilöä.

## 5. TULOSTEN TARKASTELUA

### 5.1 Ravinteet ja tuottajat

Aikaisemmissa tutkimuksissa Salonen ym. (1988) ovat todenneet, että typpi ja fosfori yhdessä rajoittavat Mekkojärven perustuotantoa. Kokeen lopussa epäorgaaniset ravinteet rikastuivat veteen mutta merkittävää muutosta ei havaittu kasviplanktonin (*a*-klorofylli) ja bakteeriplanktonin runsastumisessa. Tuloksen perusteella voidaan arvioida jonkin muun tekijän kuin epäorgaanisten ravinteiden saatavuuden rajoittaneen perustuotantoa Mekkojärvässä.

Sestonin kokonaistypen määrä oli suurempi ravinnekäsittelyissä altaissa, minkä perusteella voidaan ajatella myös tuottajien typpipitoisuuden olevan korkeampi. Toisaalta sestonin kokonaistypen suurempi määrä saattaa johtua myös veden epäorgaanisten ravinteiden rikastumisesta ravinnekäsittelyissä altaissa. Kokonaisfosforipitoisuudet eivät eronneet kokeessa mutta epäorgaanisen fosforin pitoisuudet kasvoivat ravinnekäsittelyissä altaissa kokeen loppuun mennessä. Ravinnekäsittelyjen altaiden epäorgaanisten ravinteiden kerääntyminen veteen kokeen lopussa ilmensi perustuotannon olleen tällöin ravinteista riippumatonta. Liuenneen orgaanisen aineen merkitys on ilmeisen suuri humusjärvien ravintoverkoissa. On todennäköistä, että osa epäorgaanisista ravinteista sitoutui humusyhdisteisiin ja puskuroi ravinnelisäyksen vaikutusta perustuottajissa.

Tulosten mukaan *a*-klorofylliä on vähiten epilimnionissa, mikä on vastoin aiempaa tutkimustietoa Mekkojärven kasviplanktonista. Konsentraatiot kasvoivat eri vesikerroksissa syvyys-suuntaan samalla tavalla kuin bakteeribiomassa Mekkojärvässä. Valoisa yhteyttämiskerros heikkenee syvemmälle mentäessä, Salosen & Lehtosen (1992) mukaan, erityisen nopeasti hyvin tummavetisessä Mekkojärvässä. Tulos johtui todennäköisesti siitä, että saadut mittaustulokset sisältävät tuntemattoman määrän *d*-bakteeriklorofylliä. Jatkossa kyseistä *a*-klorofyllin mittausta tulisi tarkentaa tai käyttää eri määrittämenetelmää.

Epilimnionin klorofyllipitoisuudet eivät eronneet eri käsittelyissä, mikä ilmensi kasviplanktonmäärän pysyneen ennallaan ravinnelisäyksistä huolimatta. Ravinnekäsittelyaltaissa pitoisuudet tasoittuivat kokeen aikana kontrollin tasolle, sillä lähtötaso oli ravinnekäsittelyillä vähän korkeampi (Kuvaaja 1a). Kasviplanktonin kasvua on voinut rajoittaa bakteeribiomassan kasvu, koska bakteerit ovat vahvempia ravinnekilpailijoita mm. Janssonin (1993) mukaan. Toisaalta pienentynyt klorofyllikonsentraatio voi johtua eläinplanktonin voimakkaammasta laiduntamispaineesta ravinnekäsittelyissä altaissa. Jälkimmäiseen viittaa suurempi vesikirppujen koko ravinnekäsittelyissä kuin kontrollialtaissa, joskin ero ei ole tilastollisesti merkitsevä. Toisaalta kontrollikäsittelyssä yksilötiheys oli suurempi. Vesikirppujen laidunnustehokkuus on suoraan riippuvainen yksilön kokoon nähden (Ebert 2005).

Epilimnionin bakteeriplanktonin biomassa ja tiheys suurenevät hiukan käsittelyissä altaissa (Kuvaajat 2a ja 3a), mutta erot eivät olleet missään vertailussa tilastollisesti merkitseviä. Epilimnionin *a*-klorofylli -pitoisuuksissa ei ollut vastaavaa kehitystä havaittavissa, mikä voi tukea aikaisempaa Janssonin (1993) havaintoa bakteerien paremmasta kilpailukyvästä. Kuten aikaisemmissa kokeissa Jansson ym. (2001) ovat todenneet, bakteeribiomassassa ja lajistossa ei havaittu ravinnelisäyksen jälkeistä eroa niissä humusjärävissä, joiden liunneen orgaanisen hiilen (DOC) määrä oli yli 15 mg L<sup>-1</sup>. Mekkojärven DOC -pitoisuus on vähintään 20 mg L<sup>-1</sup>, joten kokeen tulokset ovat linjassa Janssonin ym. (2001) tulosten kanssa. Eräissä muissa ravinnemanipulaatiokokeissa (Hessen ym. 1994, Jansson ym. 1996) on saatu viitteitä bakteeriplanktonin ravinnerajoittuneisuudesta, mutta näissä tutkimuksissa järvien DOC -pitoisuudet olivat paljon Mekkojärveä pienemmät. Jär-

vissä, joiden DOC-pitoisuus on korkea, esiintyy pääenergianlähteenään humusaineita käyttävää bakteeriplanktonia. Mekkojärven kokeen tulokset tukevat siten Janssonin ym. (2001) käsitystä siitä, että muut tekijät kuin ravinteiden saatavuus rajoittavat bakteeriplanktonin kasvua korkeissa DOC-pitoisuuksissa. Samassa tutkimuksessa pohdittiin orgaanisen hiilen mahdollisuutta rajoittavana tekijänä.

Suuri vaihtelu bakteeriplanktonin biomassassa altaiden välillä kokeen toisella näytteenottokerralla (28.7.), ravinnekäsitellyillä epilimnionissa ja kontrolleilla metalimnionissa, johtuneen luonnollisista tekijöistä kuten tällöin ajoittuneesta voimakkaasta sateesta. Bakteeriplanktonnäytteitä analysoidessa kuvauksen ja laskennan epätarkkuudet lisäsivät tuloksien virhettä. Olisi mielenkiintoista perehtyä epilimnionin bakteeriplanktonin biomassaan luotettavalla ja tasalaatuisella menetelmällä, jolloin voitaisiin saada varmuus, oliko viittaus hienoiseen biomassan ja tiheyden kasvuun ravinnekäsitellyissä altaissa todellinen. Nykyisten tuloksien luotettavuutta olisi mahdollista testata kuvaamalla kaikki näytteet uudelleen samalla kertaa, sillä suurin virhetekijä oli näytteen kuvaus ja muutokset kameran automaattitarkennuksessa. Toisaalta DAPI-väjäyksessä tapahtunut epätasainen bakteerien jakautuminen filterille on mahdollista, ja voi vaikuttaa näin biomassan ja tiheyden tuloksiin huolimatta hajontaa pienentävästä kuvausmenetelmästä (kts. 3.4.2).

Aikaisemmat ravinnemanipulaatiokokeet (Jansson ym. 1993, 1996, 2001) on tehty järvissä tai mesokosmoksissa, joiden DOC -pitoisuudet olivat huomattavasti alhaisemmat (enintään noin  $15 \text{ mg L}^{-1}$ ) kuin Mekkojärven pitoisuudet. Janssonin aikaisemmassa (1996) ravinnemanipulaatiokokeessa kasviplankton runsastui typenlisäyksen seurauksena. Mekkojärven manipulaatiokokeen ravinnelisäykset olivat melko pienet verrattuna Järvisen & Salosen (1998) tekemiin ravinnelisäyskokeisiin. Janssonin ym. (1993, 1996, 2001) käyttämät ravinnelisäykset olivat pienemmät kuin Järvisen & Salosen (1998) kokeessa käytetyt lisäykset. Salosen ym. (2005) mukaan Mekkojärven kasviplanktonin perustuotanto pystyy selittämään vain noin 20 % epilimnionin hengityksestä. Heyran & Lundgren (1988) ovat osoittaneet, että kasviplanktonin fosforinkäyttö oli vähäisempää humusjärvissä kuin muun tyyppisissä järvissä, mikä johtuneen fosforin heikosta saatavuudesta tai muista rajoittavista tekijöistä (Jansson ym. 2001). Nämä tekijät yhdessä suuren DOC -pitoisuuden kanssa voivat selittää kesällä 2008 saatuja tuloksia. Olisi mielenkiintoista tehdä ravinnelisäyskokeita suhteuttamalla ravinteiden määrä järven DOC -pitoisuuteen tai suorittaa koe uudelleen reilusti suuremmilla ravinnelisäyksillä. Millaisia muutoksia tuottajien runsauksissa tapahtuisi?

## 5.2 *Daphnia longispina* ja loiset

Ojala ym. (1995) ovat todenneet *Daphnian* kasvun hidastuvan loppukesää kohti Mekkojärvessä kasviplanktonmäärän vähetessä. Tämä ilmiö oli havaittavissa kontrolleilla (Kuvaaja 2d), kun taas ravinnekäsitelyjen kasvu ei taantunut. Tulokset perustuvat yksilöiden keskipituuteen, eikä siinä huomioitu mm. poikasten osuutta. Mahdolliset muutokset populaatiodynamiikassa, kuten lisääntymisessä, voivat vaikuttaa harhauttavasti tuloksia tarkastellessa. Toisaalta, tulos voi johtua siitä, että ravinnelisäys paransi *Daphnioiden* ravinnon laatua.

*Daphnian* populaatiotiheyksistä eri kerroksissa voidaan arvioida vertikaalikäyttämisen muutoksia eri käsittelyissä. Kokeen lopussa ravinnekäsitellyt viihtyivät runsaampana hypolimnionissa (noin kaksi kertaa runsaammin kuin kontrollissa), vaikka kontrollien yksilötiheydet koko vesipatsaassa olivat suuremmat. Vertikaalivaellus alempiin vesikerroksiin on todettu liittyvän predaatiolta suojautumiseen tai ravinnon saatavuuden lisäämiseen (Ebert 2005). Muun muassa Taipale ym. (2007) ovat todenneet Mekkojärven *Daphnioiden* ravinnon koostuvan bakteeriperäisestä hiilestä jopa 65 – 86 %:sesti lisääntyen syksyä

kohti. Ravinnelisäys on voinut vaikuttaa fototrofisten bakteerien runsastumiseen hypolimnionissa aivan meta- ja hypolimnionin rajapinnassa (Jansson ym. 2001), mikä selittäisi *Daphnioiden* runsauden alemmassa vesikerroksessa. Toisaalta eläinplanktonnäytteissä toisinaan runsaana esiintyneet *Chaoboruksen* toukat herättivät kysymyksiä siitä, mitä vaikutuksia niillä on ollut *D. longispinaan*. Toukkien runsaussuhteita ei tässä pro gradu -työssä tutkittu, joten ei ole mahdollista sanoa, oliko käyttäytymismuutos esimerkiksi ravinnekäsitteltyissä altaissa voimakkaammalta predaatiolta suojautumista vai muusta syystä johtuvaa. Miten toukat vaikuttivat vesikirppujen tiheyteen ja keskipituuteen valikoivan saalistuksensa takia? Vaikuttiko ravinnelisäys vesikirppujen kautta toukkien menestymiseen niin, että kokeen lopussa niitä oli runsaammin ravinnekäsitteltyissä altaissa? Tässä pro gradu -työssä ei myöskään tutkittu kasviplanktonlajistoa eikä sen muutosta. On mahdollista, että kasviplanktonin lajikoostumus epilimnionissa muuttui kooltaan tai muodoltaan vesikirpuille epäedulliseen suuntaan, ja ne ottivat kokeen lopussa ravintonsa syvemmistä vesikerroksista.

Loisten menestymiseen vaikuttaa mm. infektioasteiden määrä altistumisessa, sekä lämpötila (Ebert 2008). Loisepidemian päättymiseen vaikuttavat isäntäpopulaation tiheyden pieneneminen, kehittynyt immunitetti, ympäristön muutos, kuten lämpötila, ja nopea isännän resistenssin evoluutio infektiota vastaan (Duffy ym. 2009). Kokeessamme ilmenneet *Larssonian*-infektiot loppuivat ensimmäisen näytteenoton jälkeen. On todennäköistä, että epidemiahuippu oli aikaisemmin ja havaitsimme vain epidemian rippeitä. Ilmiö oli selvästi manipulaatiosta riippumatonta; epidemia oli ilmennyt edellisenä vuonna kesä-heinäkuussa (Pulkinen & Aalto, julkaisematon).

Aiemmassa tutkimuksessa on todettu, että *Daphnioiden* populaatiotiheys korreloi negatiivisesti sisäloisten esiintymisen ja positiivisesti ulkoloisten runsauden kanssa (Decaestecker ym. 2005). Ulkoloisia esiintyi *Daphnioilla* kokeen aikana vain kerran. Sen sijaan sisäloiset, USGP ja ULGP, esiintyivät koko kokeen ajan. Kokeen lopussa ravinnekäsitteltyjen altaiden yksilötiheys oli puolta pienempi kuin kontrollialtaiden, keskipituus oli suurempi (vaikka ei tilastollisesti merkitsevästi) ja USGP -loisen infektioprosentti oli merkittävästi suurempi. Ero kontrollialtaisiin voi johtua siitä, että loinen vaikuttaa *Daphnioiden* lisääntymiseen ja sitä kautta populaatiotiheyteen. Tämä vastaa Decaestecker ym. (2005) aiempia tuloksia. USGP -epidemia kasvoi kokeen aikana, ja voidaan olettaa, mikäli koetta olisi jatkettu pitempään, että mielenkiintoisia muutoksia isännän populaatiodinamiikassa ja loisten esiintymisessä olisi voinut tapahtua. USGP:n infektioprosentit noudattivat ravinnekäsitteltyissä altaissa samaa trendiä *Daphnian* keskipituuksien kanssa, infektioprosentti suureni keskipituuden kasvaessa. Koko lisää infektioiden todennäköisyyttä (Vidtmann 1993, Stirnadel & Ebert 1997) elinajan ja kasvavan siivilöidyn vesimäärän johdosta. Toisaalta, suuremmat yksilöt ovat voineet altistua enemmän infektioiden tarttumisasteille eri vesikerroksissa oleilusta riippuen, tai loiset ovat hyötäneet isännän resursseista eikä isännän resistenssi infektiota vastaan ole vielä ehtinyt kehittyä. Pitemmällä tutkimusjaksolla ravinnekäsitteltyjen isäntien keskipituus olisi voinut pienentyä voimakkaamman loisepidemian seurauksena. Ravinnekäsitteltyjen isäntien kontrollia hiukan suurempi keskipituus on voinut johtua myös altaiden pienemmästä yksilötiheydestä ravintokilpailuun viitaten. Poikasten vaikutus keskipitokseen on myös hyvin todennäköinen, mutta tässä pro gradu -työssä ei perehdytty tähän asiaan.

Kontrollialtaiden isäntien keskipituus pieneni hiukan kokeen loppuun mennessä, mutta USGP-infektioprosentti kasvoi siitä huolimatta. Ebertin (2008) mukaan vesikirppujen loiseinfektiot ovat pysyviä. Kontrollialtaan kasvava infektio herätti kysymyksiä USGP:n epidemiologiasta. Onko kerran saatu infektio etenevä vai tulevatko uusia epiteelisoluja infektoivat tartunta-asteet aina ruuan mukana? Leviävätkö mikrosporidit horisontaalisesti

vai vertikaalisesti? Kontrollialtaan yksilötiheys kasvoi kokeen loppua kohti, vaikka keskipituus laski kokeen lopussa edelliseltä näytteenottokerralta. Jos *Daphnioiden* kasvanut yksilötiheys selittäisi epidemian kiihtymistä kontrollialtaissa, mikä aiheutti epidemian kiihtymisen yksilötiheydeltään harventuneissa ravinnekäsittelyaltaissa? Toisaalta vertikaalivaellus takaa infektiosteiden vastaanottamisen, vaikka sporit vapautuisivat veteen vasta isännän kuoleman jälkeen. Epidemiaa kiihdyttävänä tekijänä on voinut olla myös *Chaoborus* -toukkien predaatio Cáceresin ym. (2009) mukaan. Loisilla voi olla myös välttämättömiä väli-isäntiä, kuten *Larssonia obtusalla* todennäköisesti on (Pulkkinen & Aalto, julkaisematon). Toistaiseksi USGP- ja ULGP-loiset eivät ole tarttuneet *Daphnia* -yksilöstä toiseen laboratorionkokeissa (Pulkkinen & Aalto, julkaisematon). Loisen elinkaaresta ja tartuntamekanismeista tarvitaan paljon lisää tietoa.

ULGP:n taksonominen asema on vielä täysin tuntematon, mahdollisesti se ei edes ole loinen. Näin ollen tämän oletetun loisen vuorovaikutuksesta *Daphnia* -isännän ja sen ravinnon laadun välillä ei voida juurikaan tehdä johtopäätöksiä.

### 5.3 Yhteenveto

Aikaisempaa tutkimustietoa ravinnelisäyskokeista, joissa veden liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuudet ovat jopa yli 40 (mg L<sup>-1</sup>) niin kuin Mekkojärvässä, ei ole saatavilla. Humusjärvien perustuotanto on voimakkaasti mikrobilinkkien varassa. Orgaanisen hiilen pitoisuuden kasvaessa heterotrofisuuden merkitys ravintoverkoissa myös vahvistuu. Voimakkaasti humuksisessa järvässä muut kuin ravinteet rajoittavat kasvua. Tämä saattoi ilmetä jo nyt kokeemme lopussa, jolloin epäorgaaniset ravinteet rikastuivat veteen selkeästi ravinnekäsittelyissä altaissa, mutta eroa kasvi- ja bakteeriplanktonissa ei ollut havaittavissa.

*Daphnia longispina* -yksilöiden suurempi koko ravinnekäsittelyissä altaissa verrattuna kontrollialtaisiin kokeen lopussa voi johtua siitä, että ravinnekäsittely paransi *Daphnian* ravinnon laatua. Keskeinen tutkimusongelma oli, hyötyykö loinen isännän hyvinvoinnista vai onko hyvinvoivan isännän immuunipuolustus tehokkaampi infektiota vastaan taistellessa. USGP-loisen infektioprosentit olivat suuremmat ravinnekäsittelyissä altaissa. Myös loisten runsaus yksilöä kohti oli suurempi, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Nämä tulokset tukevat käsitystä siitä, että loinen hyötyy isännän hyvinvoinnista (kun isännällä matalat C:N ja C:P suhteet). Mikäli manipulaatiokoe olisi kestänyt kauemmin, epidemioiden kulkua olisi ollut mahdollista seurata alusta loppuun saakka, mikä olisi voinut antaa enemmän tietoa kahden tuntemattoman loislajin, USGP:n ja ULGP:n vuorovaikutuksista *Daphnia* -isäntien kanssa. Suurempi ravinnelisäys olisi myös saattanut aiheuttaa selvempiä muutoksia järven perustuottajissa ja edelleen *Daphnia* -populaatiossa ja tuottaa selkeämmin tulkittavia tuloksia.

Humusjärven ravintoverkot ovat haastavia tutkittavia moninaisuudessaan ja poikkeavuudessaan muun tyyppisistä järvistä. Mekkojärvi oli sopiva tutkimusjärvi, koska se tunnetaan niin hyvin. Toisaalta järvi on poikkeuksellisen humuksinen ja ravinteiden siirtymistä planktisissa ravintoverkoissa on hankala soveltaa yleisimpiin, vähemmän humuksisiin pohjoisen, lauhkean vyöhykkeen järviin. Loisinnan merkitys ravinteiden kulussa on mielenkiintoinen ja spesifinen aihealue. Tällä tutkimuksella saatiin pientä näyttöä siitä, että tuntemattoman mikrosporidin epidemian kehittyessä loiset hyötyivät isännän käytävissä olevista resursseista. Mikäli tutkimus olisi jatkunut, olisiko tilanne jatkunut edelleen loisen hyödyksi? Tutkimuksen tulokset herättivät liudan lisäkysymyksiä ja uusien tutkimusten aiheita.

## KIITOKSET

Suurimmat ja lämpimimmät kiitokseni kuuluvat erinomaisille ohjaajilleni FT Katja Pulkkiselle ja FM Sanni Aallolle sekä lisäksi FT Kalevi Saloselle. Kiitän Lammin biologisen aseman henkilökuntaa asiantuntevasta avusta ja iloisesta työilmapiiristä kokeen aikana. Lisäksi kiitän läheisiäni saamastani tuesta tätä pro gradu -tutkielmaa työstäessäni.

## KIRJALLISUUS

- Acharya K., Kyle M. & Elser J.J. 2004. Effects of stoichiometric dietary mixing on *Daphnia* growth and reproduction. *Oecologia*, 138: 333-340.
- Anderson, R.M. 1979. The influence of parasitic infection on the dynamics of host population growth. Teoksessa: Anderson R.M., Turner B. D. & Taylor L. R. (toim.), *Population dynamics*, Blackwell Scientific, Oxford, 245–281 s
- Anderson R. M. 1978. The regulation of host population growth by parasitic species. *Parasitology*, 76: 119–157.
- Anderson R.M. & May R.M. 1978. Regulation and stability of host–parasite population interactions. I. Regulatory processes. *Journal of Animal Ecology*, 47: 219–247.
- Cáceres C.E., Knight C.J. & Hall S.R. 2009. Predator-spreaders: Predation can enhance parasite success in a planktonic host-planktonic system. *Ecology*, 90: 2850-2858.
- Decaestecker E., Declerck S., De Meester L. & Ebert D. 2005. Ecological implications of parasites in natural *Daphnia* populations. *Oecologia*, 144:382-390.
- DeMott W.R. & Gulati R.D. 1999. Phosphorous limitation in *Daphnia*: Evidence from a long term study of three hypereutrophic Dutch lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 44: 1557-1564.
- Duffy M.A., Hall S.R., Cáceres C.E. & Ives A.R. 2009. Rapid evolution, seasonality, and the termination of parasite epidemics. *Ecology*, 90: 1441-1448.
- Ebert, D. 2005. *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia* [Internet]. Bethesda (MD). National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 1-22 s
- Ebert D. 2008. Host-parasite coevolution. Insights from *Daphnia*-parasite model system. *Curr. Opin. Microbiol.*, 11:290-301.
- Elser J.J., Fagan W.F., Denno R.F., Dobberfuhl D.R., Folarin A., Huberty A., Interlandi S., Kilham S. S., McCauley E., Schulz K.L., Siemann E.H. & Sterner R.W. 2000. Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. *Nature*, 408: 578-580.
- Elser J.J., Hayakawa K., Urabe J. 2001. Nutrient limitation reduces food quality for zooplankton: *Daphnia* response to seston phosphorous enrichment. *Ecology*, 82: 898-903.
- Elser J.J. & Urabe J. 1999. The stoichiometry of consumer -driven nutrient recycling: theory, observations, and consequences. *Ecology*, 80: 735-751.
- Frank S.A. 1996. Models of Parasite Virulence. *The Quarterly Review of Biology*, 71: 37-78.
- Frost P.C., Paul C., Ebert D. & Smith V.H. 2008a. Responses of a bacterial pathogen to phosphorus limitation of its aquatic invertebrate host. *Ecology*, 89: 313-318.
- Frost P.C., Ebert D. & Smith V.H. 2008b. Bacterial infection changes the elemental composition of *Daphnia magna*. *Journal of Animal Ecology*, 77: 1265-1272.
- Hall S.R., Knight C.J., Becker C.R., Duffy M.A., Tessier A.J. & Cáceres C.E. 2009. Quality matters: Resource quality for hosts and the timing of epidemics. *Ecology letters*, 12: 118-128.



- Hart D.R. 2002. Intraguild predation, invertebrate predators, and trophic cascades in lake food webs. *Journal of Theoretical Biology*, 218: 111-128.
- Hessen D.O. & Andersen T. 1990. Bacteria as a source of phosphorus for zooplankton. *Hydrobiologia*, 206: 217-223.
- Hessen D.O., Nygaard K., Salonen K. & Vahatalo A. 1994. The effect of substrate stoichiometry on microbial activity and carbon degradation in humic Lakes. *Environment international*, 20: 67-76.
- Jansson M. 1993. Uptake, exchange, and excretion of orthophosphate in phosphate-starved *Scenedesmus-Quadricauda* and *Pseudomonas K7*. *Limnol. Oceanogr.*, 38: 1162-1178.
- Jansson M., Bergstrom A.K., Drakare S. & Blomqvist P. 2001. Nutrient limitation of bacterioplankton and phytoplankton in humic lakes in northern Sweden. *Freshwater Biology*, 46: 653-666.
- Jansson M., Blomqvist P., Jonsson A. & Bergstrom A.K. 1996. Nutrient limitation of bacterioplankton, autotrophic and mixotrophic phytoplankton, and heterotrophic nanoflagellates in Lake Ortrasket. *Limnol. Oceanogr.* 41: 1552-1559.
- Kankaala P. 1988. The Relative importance of algae and bacteria as food for *Daphnia longispina* (Cladocera) in a Polyhumic Lake. *Freshwater Biology*, 19: 285-296.
- Kilham S.S., Kreeger D.A., Goulden C.E. & Lynn S.G. 1997. Effects of algal food quality on fecundity and population growth rates of *Daphnia*. *Freshwater biology*, 38: 639-647.
- Minchella D.J. and Scott M.E. 1991. Parasitism: A cryptic determinant of animal community structure. *Trends in Ecology and Evolution*, 6: 250-254.
- Moran M.A. & Hodson R.E. 1990. Bacterial production on humic and nonhumic components of dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.*, 35:1744-1756.
- Nurnberg G.K. & Shaw M. 1998. Productivity of clear and humic lakes: nutrients, phytoplankton, bacteria. *Hydrobiologia*, 382: 97-112.
- Ojala A. & Salonen K. 2001. Productivity of *Daphnia longispina* in a highly humic boreal lake. *Journal of Plankton Research*, 23: 1207-1215.
- Ojala A., Kankaala P., Kairesalo T. & Salonen K. 1995. Growth of *Daphnia longispina* in a polyhumic lake under various availabilities of algal, bacterial and detrital food. *Hydrobiologia*, 315: 119-134.
- Pace M.L., Cole J.J., Carpenter S.R. & F. K.J. 1999. Trophic cascades revealed in diverse ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 483-488.
- Plath K. & Boersma M. 2001. Mineral limitation of zooplankton: Stoichiometric constraints and optimal foraging. *Ecology*, 82: 1260-1269.
- Potvin C., Lechowicz M.J. & Tardif S. 1990. The statistical analysis of ecophysiological response curves obtained from experiments involving repeated measures. *Ecology*, 71: 1389-1400.
- Pulkkinen K. & Ebert D. 2006. Persistence of host and parasite populations subject to experimental size-selective removal. *Oecologia*, 149: 72-80.
- Pulkkinen K. & Ebert D. 2004. Host starvation decreases parasite load and mean host size in experimental populations. *Ecology*, 85: 823-833.
- Quinn, G. & Keough, M. 2002. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University Press, Cambridge. 150-223 s
- Ramberg L. 1979. Relationships between phytoplankton and light climate in two Swedish forest lakes. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.*, 64: 479-782.

- Ranta, E., Rita, H. & Kouki, J. 1992. *Biometria. Tilastotiedettä ekologeille*. Yliopistopaino, Helsinki, 316-318 s
- Ravet J.L. & Brett, M.T. 2006. Phytoplankton essential fatty acid and phosphorous content constrains on *Daphnia* somatic growth and reproduction. *Limnol. Oceanogr.*, 51: 2438-2452.
- Salonen K., Hammar T., Kuuppo P., Smolander U. & Ojala A. 2005. Robust parameters confirm predominance of heterotrophic processes in the plankton of a highly humic pond. *Hydrobiologia*, 543: 181-189.
- Salonen K. & Jokinen S. 1988. Flagellate grazing on bacteria in a small dystrophic lake. *Hydrobiologia*, 161: 203-209.
- Salonen K. & Lehtovaara A. 1992. Migrations on haemoglobin-rich *Daphnia longispina* in a small, steeply stratified, humic lake with an anoxic hypolimnion. *Hydrobiologia*, 229: 271-288.
- Seidendorf B., Meier N., Petrussek A., Boersma M., Streit B. & Schwenk K. 2010. Sensitivity of *Daphnia* species to phosphorous-deficient diets. *Oecologia*, 162:349-357.
- Sterner, R.W. & Elser, J.J. 2002. *Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Stirnadel H.A. & Ebert, D. 1997. Prevalence, host specificity and impact on host fecundity of microparasites and epibionts in three sympatric *Daphnia* species. *J. Anim. Ecol.* 66: 212-222.
- Taipale, S. 2007. *Bacterial-mediated terrestrial carbon in the foodweb of humic lakes*. Väitöskirja. Jyväskylän yliopisto, Bio- ja ympäristötieteiden laitos. 61 s
- Taipale S., Kankaala P., Tirola M. & Jones R.I. 2007. Whole-lake  $DI^{13}C$  additions reveal seasonal shifts between multiple food source contribution to zooplankton diet. *Ecology*, 89: 461-474.
- Tranvik, L.J. 1989. *Bacterioplankton in humic lakes*. Väitöskirja, Lundin yliopisto. 104 s
- Tulonen T., Kankaala, P., Arvola, L. & Ojala A. 2000. Growth and production of bakterioplankton in a deep mesohumic boreal lake. *Archiv für Hydrobiologie*, 147: 311-325.
- Urabe J., Clasen J. & Sterner R.W. 1997. Phosphorous limitation of *Daphnia* growth: Is it real? *Limnol. Oceanogr.*, 42: 1436-1443.
- Urabe J., Elser J.J., Kyle M. Yoshida T., Sekino T. & Kawabata Z. 2002. Herbivorous animals can mitigate unfavorable ratios of energy and material supplies by enhancing nutrient recycling. *Ecology Letters*, 5: 177-185.
- Vidtmann S.S. 1993. The peculiarities of prevalence of microsporidium *Larssonia daphniae* in the natural *Daphnia pulex* population. *Ekologija*, 1: 61-69.
- <http://www.sfs.fi/en> (13.7.2008)

## LIITTEET

### Liite 1. Ravinneliuoksen valmistaminen

Ravinteet olivat kiinteänä jauheena ja rakeina. Aineet punnittiin laboratoriossa analyysivaa'alla. Ammoniumnitraattia punnittiin 0,53859g, kaliumdihydroksidifosfaattia 0,08282g, jotka liuotettiin 1 litraan tislattua vettä erillisissä lasipulloissa. Lisäyksellä luonnollinen epäorgaaninen fosforipitoisuus kaksinkertaistui ja typpipitoisuus kymmenkertaistui. Pullojen sisältö kaadettiin mahdollisimman tasaisesti koko mesokosoksen pinnalle. Ensimmäinen ravinnelisäys tehtiin 14.7.2008 näytteenoton jälkeen.

## Liite 2. Bakteeriplanktonin DAPI-värjäys

Näytteiden käsittelyssä oli varottava suoraa valoa, joten värjäys tapahtui hämärässä tilassa. Suodatussuppilo ja sintteri huuhdottiin etanolilla sekä autoklavoidulla vedellä sekä lisäksi suppilo jokaisen näytteen välissä. Alustasuodattimena käytettiin selluloosanitraattifilteriä, joka asetettiin sintterille ja kostutettiin PBS:llä. Sen jälkeen asetettiin puhtailla pinseteillä musta polykarbonaattifilteri kiiltävä puoli ylöspäin, lisättiin PBS:ä ja imettiin liika kosteus pois vakuumpumpulla. Suppilo kiinnitettiin sintterin päälle klemmarilla. Pipetoitiin 5 ml PBS:ä ja 1 ml näytettä suppiloon, jonka jälkeen imettiin 3 ml suodattimen läpi pois. DAPI-väriä (1 µg/ml) lisättiin 5 µl ja heilutettiin laitteistoa varovasti, jotta aine sekoittuu, sekä jätettiin värjäytymään vähintään 10 minuutiksi foliolla peitettynä. Tämän jälkeen suppilo imettiin kuivaksi, huuhdottiin filteri 2 ml:ssa PBS:ä ja jätettiin pumppu päälle siksi aikaa, kun polykarbonaattifilteri poistettiin pinseteillä hivenen ilmassa heiluttaen petrimaljalle. Filterin päälle laitettiin välipaperi sekä nostettiin valoa varoen jääkaappiin jatkotoimenpiteitä odottamaan. DAPI-väriaine säilytettiin jääkappissa.

Objektilasit, joille filterit siirrettiin, oli huuhdottu etanolilla ja kuivattu paperilla. Jokaiseen objektilasiin merkittiin näyte ja päiväys. Filteri nostettiin pinseteillä edelleen kiiltävä puoli ylöspäin ja lisättiin tippa Citifluor/Vectashield-immersioöljyseosta (1:4). Peitinlasi asetettiin päälle ja painettiin varovasti nurinpäin, jolloin öljy levisi tasaisesti koko filterille. Valmiit preparaattit pakastettiin analysointia varten. Säilytys tapahtui pahvikansioissa.

Immersionöljyseos valmistettiin pieneen muoviputkeen mittaamalla (1:4) Citifluor- ja Vectashield-öljyjä. Putkea ravistettiin nesteiden sekoittumiseksi. Öljyseos säilytettiin jääkaapissa.

## Liite 3. Fysikaalis-limnologiset muuttujat

Suodattamattomasta näytevedestä mitattiin pH ja sähkönjohtokyky omilla laboratoriomittareillaan. pH mitattiin ensimmäiseksi. Alkaliniteetin määrittäminen tapahtui automaattisen (DL 53) titraattorin avulla. Titraattorin elektrodit huuhdottiin tislattulla vedellä jokaisen näytteen (80 ml) välissä. *a*-klorofyllisuodattimet (Whatman GF/F 50 mm) uutettiin 20 ml:ssa 94 % etanolia (EtOH) tuikepulloissa jääkaapissa yön yli. Seuraavana päivänä *a*-klorofylliuutos sarjasuodatettiin filterin (Whatman GF/C 25 mm) läpi. Sarjasuodatuksessa käytettiin painepumpulla toimivaa suodatinta, johon asetettiin samalla kertaa 12 näytettä. Laite nopeutti huomattavasti klorofyllin analysointia. Suodoksesta mitattiin spektrofotometrillä aallonpituudet A665 ja A750, joista laskettiin *a*-klorofyllipitoisuus.