



TARTU ÜLIKOOL



**KÕRGPUHTA PUNASE PIGMENDI FÜKOERÜTRIINI ERALDAMISEKS
PERSPEKTIIVSE VETIKALIIGI *Ceramium tenuicorne*
KASVATAMISTEHNOLGOOGIA VÄLJATÖÖTAMINE**

**Euroopa Merendus- ja Kalandusfondi (EMKF) rakenduskava 2014-2020
meede 2.1 “Vesiviljeluse innovatsioonitoetus”**

Lõpparuanne
(projekti viitenumber 821020790008)

Toetuse saaja: Tartu Ülikool
Aruande koostajad: Tiina Paalme (TÜ Eesti mereinstituut)
Liina Pajusalu (TÜ Eesti mereinstituut)

Detsember 2022

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	3
1. Punavetikas <i>Ceramium tenuicorne</i> ja kultiveerimiseks sobivad keskkonnatingimused	5
1.1. Pigmentide koosseis.....	6
1.2. <i>C. tenuicorne</i> paljunemisbioloogia	6
1.3. Soolsus	7
1.4. Valgusnõudlus	7
1.5. <i>Ceramium tenuicorne</i> süsiniku omastamise strateegiad	7
2. Kasutatud meetodid	9
2.1. <i>Ceramium tenuicorne</i> primaarproduktiooni mõõtmine.....	9
2.2 Toitainete sisalduse määramine katsevees ja vetikas	9
2.3 Fükoerütriini, allofükotsüaniini ja klorofüllü üldsisalduse määramine punavetikas <i>Ceramium tenuicorne</i>	10
3. Kultiveerimissüsteem	11
4. Tulemused.....	14
4.1. Valgustingimuste mõju <i>C. tenuicorne</i> pigmentide sisaldusele ja produktioonile	14
4.1.1. 2021-2022 sügis-talve katseseeria	14
4.1.2. 2022 kevad-suve katseseeria.....	19
4.2. pH mõju <i>C. tenuicorne</i> pigmentide sisaldusele ja produktioonile	27
4.3. Toitainete mõju <i>C. tenuicorne</i> pigmentide sisaldusele ja produktioonile	32
4.4. Metoodilised soovitused <i>Ceramium tenuicorne</i> kasvatamiseks kunstlikes tingimustes	36
4.5. Hinnang välja töötatud <i>Ceramium tenuicorne</i> kasvatamistehnoloogiale ja selle edasi arendamise võimalused.....	37
5. Summary.....	40
6. KASUTATUD KIRJANDUS	41

SISSEJUHATUS

Punavetikates sisalduvat punast pigmentainet fükooerütriini võib lugeda üheks suurima väärtusega biomolekuliks. Kõrgpuhtal kujul leiab fükooerütriin laialdast kasutamist fluorestsentsvärvainena erinevates meditsiinidiagnostika ja biokeemia valdkondades, selle turuhind võib küündida 200 EUR suurusjärku 1 mg puhta aine kohta. Kõrgpuhtale kujule viimata saab fükooerütriini (nn toorpigmentina) kasutada aga loodusliku värvainena toituaine- ja kosmeetikatööstuses. Toorpigmenti turuhind on aga analüütilise puhtusega pigmenti omast kordades madalam.

Analüütilise puhtusega fükooerütriini saab suhteliselt lihtsate tehniliste võtetega eraldada punavetikast *Ceramium tenuicorne*. Nimetatud vetika biomassis sisaldub fükooerütriini ka märkimisväärselt suurtes kogustes – üle 1% vetika kuivmassist (Saluri et al., 2020). Fükooerütriini sisaldub arvestavates kogustes ka teises Eesti rannikumeres kasvavas punavetikaliigis *Furcellaria lumbricalis*, mille biomassis on punase pigmenti sisaldus maksimaalselt ~0,6% vetika kuivmassist, aga kõrgpuhtal kujul on seda *F. lumbricalis* baasil saada keeruline (ja energiamahukas) vetikas esinevate teiste lisandite tõttu (Saluri et al., 2019). Seetõttu sobib *F. lumbricalis* pigem toituainetööstuse kvaliteediga punaste pigmentide tootmiseks, analüütilise puhtusega fükooerütriini preparaate selle biomassi baasil valmistada ei ole kulutõhus. Sellest tulenevalt on Eesti rannikumeres leiduvatest punavetikatest kõrgpuhta fükooerütriini saamise toormena kõige perspektiivsem liik punavetikas *C. tenuicorne*, mis aga paraku ei ole Läänemeres töenduslikes mahtudes kogutav (biomass esineb hajutatult ja sageli segus teiste vetikaliikidega ning puudub vastav kogumis/püügitehnoloogia).

Läänemere eripärast (sh madal soolsus, aastaajast sõltuvalt suured kõikumised valgustingimustes ja veetemperatuuris) tingitud lühike vetikate kasvuperiood väljendub ka nende madalas kasvukiiruses. Sellest tingitult ei ole suurvetikate kultiveerimine (vetikafarmid) meie regioonis levinud, kuna see on kulukas ja kultiveeritud vetika biomassile lisaväärtust andmata ei oleks meie vesiviljelusettevõtted kindlasti võimelised konkureerima pikkade traditsioonidega vetikakasvatajatega, nt Aasia ja Lõuna-Ameerika riikidega. Üheks lahenduseks on vetikate kultiveerimine maismaal. Maismaal kontrollitud keskkonningimustes vetikate kultiveerimise eelised, puudused ja võimalikud lahendused on esitatud tabelis 1.

Tabel 1. Maismaal vetikate kultiveerimise eelised ja puudused (Barbier, 2019).

EELISED	PUUDUSED	LAHENDUSED
Kõrge saagikus ja aastaringne toodang	Vaba ruumi olemasolu vajadus	Renoveerida vähekasutatud ehitised rannikualadel (nt kalakasvatuse mahutid)
Lihne saaki koristada	Kõrged infrastruktuurikulud	Taastuenergia kasutamine
Kontrollitud kasvutingimused	Kõrged tegevuskulud	Arendada biomassi lisandväärtusega turgude jaoks (nt toit, kosmeetika, tervisetooted)
Kõrgekvaliteetne biomass	Väiksem oskusteave tootmisprotokollidest	Edendada uuringuid seotult kaubandusliku tähtsusega liikide tootmisega
Võimalus kohandada biomassi keemilist koostist.		

Kuna fükooerütriini tootmise seisukohast on oluline ka biomassi puhtus (st see ei tohi lisandina sisaldada teisi vetikaliike), on kultiveerimine selle vetika biomassi väärimdamise seisukohast tõenäoliselt ainsaks võimaluseks. Tegevuse käigus töötatakse välja meetodika, mis võimaldab punavetikat *C. tenuicorne* kasvatada monokultuuris kunstlikes optimeeritud ja kontrollitud kasvutingimustes, et tagada vetika biomassi kvaliteet, mis võimaldaks vetikast kõrgpuhta fükooerütriini eraldamist võimalikult kõrge saagisega. Sobiva kasvatamistehnoloogia väljatöötamine võimaldaks *C. tenuicorne* biomassi kasutada kõrgpuhaste punaste pigmentide toormena, mis leiaksid kasutust meditsiinidiagnostikas fluorestseeruvate värvainetena (sh Eesti haiglates olev diagnostika aparatuur, mis vajab rutiinseks töötamiseks fükooerütriini kulutarvikuna).

Projekti eesmärgiks oli välja töötada spetsiaalne kultiveerimismetoodika, mis sobiks punavetika *Ceramium tenuicorne* kasvatamiseks liigile optimaalsetes kunstlikes kasvutingimustes ja mis

- 1) võimaldaks kasvatatud biomassi väärimdamist, s.o kõrgpuhta fükooerütriini eraldamiseks vajaliku kvaliteedi saavutamist (võimalikult kõrge fükooerütriini saagis)
- 2) tõstaks juurdekasvu kiirust nt võrreldes looduslikes kooslustes kasvava vetikaga;
- 3) võimaldaks välja töötatud meetodikat edasi arendada ja kohandada vastavalt nõudlusele suuremate mahtude järele.

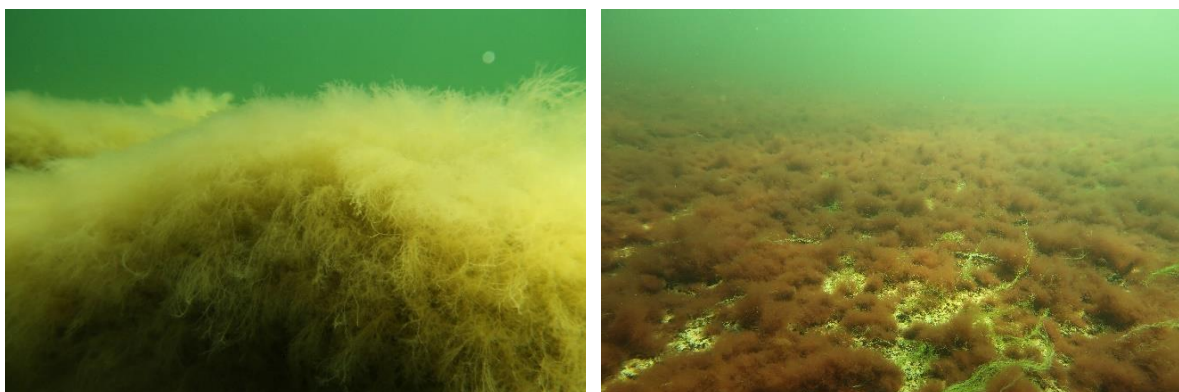
1. Punavetikas *Ceramium tenuicorne* ja kultiveerimiseks sobivad keskkonnatingimused

Niitjas vetikas *Ceramium tenuicorne* (Kützing) Wæern on üks kõige laialt levinumaid punavetika liike Läänemeres (Nielsen et al., 1995), mis kasvab nii kinnitunult kõvale substraadile kui epifüüdina teistel suurvetikatel (nt agarikul *Furcellaria lumbricalis* ja põisadrul *Fucus vesiculosus*) või moodustab lahtiseid triivivaid vetikamatte (Bergström, et al., 2003; Bergström & Kautsky, 2005).

Ceramiumi tallusel on väikestest rakkudest koosnev koorekiht, mis esineb vaid ribadena ümbritsetes vöötaolist telgniidirakkude ühinemiskohti (sõlmi). Tema tallus jätab lülilise mulje kuna koorekiht sõlmedes on intensiivselt värvunud ja sõlmede vahelised koorekihita osad on värvusetud (Trei, 1991). Palja silmaga vaatlemisel meenutab *Ceramiumi* tallus peenikesi pärlikeesi (joonis 1.1).



Joonis 1.1. *Ceramium tenuicorne*



Joonis 1.2. *Ceramium tenuicorne* Küdema laht 13.05.2021 ja Vilsandi 2021. a august (fotod Kaire Kaljurand)

Punavetika talluse mõõtmed ja värvus võivad varieeruda suurtes piirides erinevates kasvukohatingimustes, enamasti roosast tumepunaseni (joonis 1.2). Läänemere põhjaosas on vetikatalluse pikkuskasvu mõõdetud vahemikus 2–8 cm (Bäck & Likolammi, 2004).

1.1. Pigmentide koosseis

Pigmentide koosseis punavetikates väljendab fükoerütriini ja klorofüll *a* suhe, mis on pöördvõrdelises seoses valgusintensiivsusega (Ramus et al., 1976a; Ramus et al., 1976b). Pigmentide, eriti punaste pigmentide sisaldus vetikatalluses sõltub ka lämmastiku sisaldusest (Bird et al., 1982; Lapointe, 1981). Lämmastikuga kasvukeskkonna rikastamine tõstab vetikate klorofüll *a* ja fükoerütriini sisaldust (Rico & Fernández, 1996; Neish et al., 1977; Amano & Noda, 1987; Hiroyuki et al., 2002; Chaloub et al., 2015).

Läänemere põhjaosas läbi viidud uuring näitas, et *Ceramiumi* talluses on kõige rikkalikum pigment fükoerütriin (70%), klorofüll *a* sisaldus on ~20% ja fükotsüaniini ~10% (Bäck & Likolammi, 2004). Märkimisväärselt suurtes kogustes sisaldub fükoerütriini ka *Ceramiumi* kuivmassis üle 1% (Saluri et al., 2020). Bäck & Likolammi (2004) uuring näitas, et fükoerütriini sisaldus oli *Ceramiumi* biomassis kõrgeim jaanuaris kui on ka kõrgemad ammooniumi ja nitraatide kontsentratsioonid merevees ning madalam valgusintensiivsus. Kõige madalam fükoerütriini sisaldus uuritud punavetikas mõõdeti hiliskevadel (mais) ja suve keskel kui toitainete kontsentratsioonid on palju madalamad ja valgusintensiivsus on kõrge. Seega, lämmastikuga kasvukeskkonna rikastamine ja madalate valgusintensiivsuse tasemetega kasutamine kunstlikes kasvutingimustes peaks suurendama fükoerütriini sisaldust vetikas.

1.2. *C. tenuicorne* paljunemisbioloogia

Ceramium tenuicorne paljuneb riimveelises Läänemeres eelkõige mittesugulisel (vegetatiivsete “Gobi monosporangiumidega”) teel, kuigi vähesel määral on võimeline paljunema ka sugulisel teel (isomorfne *Polysiphonia*-tüüpi arengutsükkel) (Rueness et al., 2002; Bergström et al., 2003; Bergström, 2005). Punavetikatele klassist Florideophyceae, sh liigile *C. tenuicorne*, on iseloomulik kolmeefaasiline elutsükkel: gametofüüt (haploidne suguline faas), tetrasporofüüt (iseseisev diploidne faas) ja karposporofüüt s.o diploidne faas, mis sõltub emasest gametofüüdist (Bergström, 2005). Välivaatlused on näidanud, et *Ceramium* on võimeline sugulisel teel paljunema, kui soolsus on vähemalt 4 psu (Bergström et al., 2003). *C. tenuicorne* võib aga paljuneda ka vanade basaalsete talluse osade regeneratsiooni teel ja eraldunud vegetatiivsete talluse fragmentide uuesti kinnitumisega sobivale substraadile



(Bergström et al., 2003, Bäck ja Likolammi, 2004). Viimati nimetatud vegetatiivne paljunemisviis on iseloomulik Läänemere põhja osas (sh Eesti rannikumeres) kasvavatele *C. tenuicorne* populatsioonidele (Bäck ja Likolammi, 2004). *C. tenuicorne* võime vegetatiivselt paljuneda on eelduseks ka liigi edukaks kasutamiseks vesiviljeluses, kuna ei ole vaja teha märkimisväärseid lisakulutusi vetikate paljundamiseks.

1.3. Soolsus

Laborikatsetes on näidatud, et Läänemerest pärit punavetikas *C. tenuicorne* on võimeline kasvama väga laias soolsusvahemikus 1–24 psu (Bergström et al., 2003). Üldiselt peetakse nimetatud vetika soolsuse alumiseks taluvuspiiriks 2–3 psu (Nielsen et al., 1995). *Ceramiumi* optimaalne kasvu vahemik korreleerub tema kasvu piirkonna soolsuse režiimiga (Bergström et al., 2003), mis viitab kohalike ökotüüpide olemasolule Läänemere erinevates piirkondades (Bergström & Kautsky, 2005). Katsetes on näidatud, et Botnia lahest (4 psu) pärit *Ceramium* talub paremini väga madalat soolsust võrreldes sama liigiga, mis on pärit Läänemere avaosast (7 psu) (Bergström & Kautsky, 2005). Nimetatud punavetika kultiveerimiskatses on soovitatav valida soolsuse tase vastavalt vetikamaterjali kogumiskoha soolsusele.

1.4. Valgusnõudlus

Punavetikas *C. tenuicorne* kasvab Eesti rannikumeres veepiirist kuni 18–20 meetri sügavuseni (Trei, 1991). Läänemere põhjaosas võib *C. tenuicorne* leida kasvamas aastaringselt, mis näitab, et vetikas on hästi kohastunud varieeruvate valgustingimustega. Vaatamata kesistele talvistele valgustingimustele on *Ceramium* võimeline kasvama üle talve, kõige arvukamalt leiab teda talvel 6 meetri sügavusel. Bäck ja Likolammi (2004) andmetel suudab *Ceramium* ellu jääda ka jää all peaaegu täielikus pimeduses, samal ajal suureneb pigmentide kontsentratsioon tema talluses. Suurem osa aastasest biomassi juurdekasvust leiab aga aset varasuvel ja suve keskel (Bäck & Likolammi, 2004). Suvel kasvab vetikas peamiselt epifüüdina teistel suurvetikatel (nt agarikul *F. lumbricalis* ja põisadrul *F. vesiculosus*) 0,5–6 meetri sügavusel (Bäck & Likolammi, 2004). Kevadel leidub punavetikat kõige arvukamalt 3 meetri sügavusel.

1.5 *Ceramium tenuicorne* süsiniku omastamise strateegiad

Makrovetikate hulgas on kolme erinevat tüüpi süsiniku vormide kasutajat: ainult HCO_3^- kasutajad, ainult CO_2 kasutajad ja vetikad, kes kasutavad mõlemat vormi HCO_3^- ja CO_2



fotosünteesi käigus. Suuremal osal uuritud makrovetikatel on olemas süsiniku kontsentreerimise mehhanism (CO_2 concentrating mechanism – CCM) ning nad kasutavad fotosünteesi käigus süsinikuallikana peamiselt HCO_3^- (Koch et al. 2013), mille kontsentratsioon on merevees palju kõrgem võrreldes lahustunud CO_2 -ga. Siiski HCO_3^- aktiivne omastamine kasutades CCM-i on energiakulukas ning vetikad eelistavad võimalusel kasutada vees lahustunud CO_2 fotosünteesi käigus, mis pääseb raku ka energiat kulutamata – difusiooni teel (Raven et al. 2014). Teaduskirjandusest on teada, et umbes 35% uuritud punavetikatel puudub süsiniku kontsentreerimise mehhanism üldse ning nad kasutavad ainult CO_2 fotosünteesi käigus (Raven et al. 2005).

Kuigi punavetikal *C. tenuicorne* on olemas süsiniku kontsentreerimise mehhanism ja võime kasutada fotosünteesi käigus mõlemat süsiniku vormi: HCO_3^- ja CO_2 , on vetikas võimeline maha reguleerima HCO_3^- kasutamise juhul, kui vees on piisavalt CO_2 saadaval.

Meie varasemad uuringud on näidanud, et CO_2 sisalduse tõus merevees soodustab *C. tenuicorne* fotosünteesilist aktiivsust ja seeläbi ka tema kasvukiirust (Albert et al. 2020). Võib järeldada, et *C. tenuicorne* eelistab võimalusel kasutada süsiniku vormidest CO_2 fotosünteesi käigus ning kasvukeskkonna rikastamine CO_2 -ga suurendab *C. tenuicorne* biomassi.

2. Kasutatud meetodid

2.1. *Ceramium tenuicorne* primaarproduksiooni mõõtmine

C. tenuicorne primaarproduksiooni (neto fotosünteesi) mõõtmiseks inkubeeriti vetikat lühiajalistes katsetes (1-2 tundi), mille käigus manipuleeriti erinevate pH, toitainete ja valguse tasemetega. *C. tenuicorne* netofotosünteesi (NP) mõõdeti hapniku meetodil. Selleks inkubeeriti umbes 0,5 g (kuivkaal) vetikamaterjali 600 ml katseveega täidetud klaaspudelites, mis paigutati horisontaalselt akvaariumi põhja ca 0,2 m sügavusele (joonis 2.11). Pärast inkubeerimist eemaldati vetikad klaaspudelitest ning kuivatati 60°C juures vähemalt 48 h saavutamaks konstantse kuivkaalu. Netoprimaarproduksioon ($\text{mg O}_2 \text{ g}_{\text{kuivkaal}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) arvutati lahustunud hapniku kontsentratsioonide erinevuste järgi katse- ja kontrollpudelites (Paalme, 2005). Lahustunud hapniku kontsentratsioonid inkubatsioonipudelites mõõdeti METTLER TOLEDO Optiox sensoriga kasutades standardmeetodit EVS-EN ISO 5814.



Joonis 2.1.1. Netofotosünteesi mõõtmine

2.2 Toitainete sisalduse määramine katsevees ja vetikas

Eksperimentide käigus kogutud veeproovid analüüsiti Tartu Ülikooli Eesti mereinstituudi merebioloogia osakonna hüdrokeemia laboris, mis on Eesti Akrediteerimiskeskuse poolt akrediteeritud katselabor registreerimisnumbriga L179. Katsete käigus kogutud veeproovid sügavkülmutati hilisemaks laboratoorseks analüüsiks. Toitainete kontsentratsioonid (üldlämmastik ($\text{N}_{\text{üld}}$), üldfosfor ($\text{P}_{\text{üld}}$), fosfaadid ($\text{PO}_4\text{-P}$) ja nitritid+nitraadid ($\text{NO}_3+\text{NO}_2\text{-N}$) ($\mu\text{mol l}^{-1}$) mõõdeti laboris automaatanalüsaatoriga Skalar San++ (Skalar Analytic B.V., Breda, The Netherlands) kasutades EVS-EN ISO 11905-1, EVS-EN ISO15681-2, EVS-EN ISO 16264 ja EVS-EN ISO 13395 standardmeetodeid. Ammooniumlämmastik ($\text{NH}_4\text{-N}$) ($\mu\text{mol l}^{-1}$)



mõõdeti manuaalselt kasutades AQUAMATE Thermo Spectronic (Instrument Serial number AQA 151408) spektrofotomeetrit ja Grasshoff et al. (1999) ning HELCOMi juhendeid. Ammooniumi määramine teostati vahetult pärast proovide võtmist või proovid fikseeriti ja säilitati pimedas ning analüüsiti 7 päeva jooksul.

Üldlämmastiku ja -fosfori sisalduste määramiseks *C. tenuicorne* talluses kuivatati vetikad 60°C juures ning uhmerdati peeneks massiks. Umbes 50 mg (kuivkaal) vetika kaalutisele lisati 50mL oksüdanti (kaaliumperoksodisulfaat, boorhape, naatriumhüdroksiid). Saadud lahus autoklaaviti 30 minutit 120°C juures rõhul 200kPa. Edasine üldlämmastiku ja -fosfori analüüs viidi läbi analoogselt veekeemia analüüsidega (lahjendused 1:100 ja 2:100).

2.3 Fükoeütriini, allofükotsüaniini ja klorofüllü üldsisalduse määramine punavetikas *Ceramium tenuicorne*

Fükoeütriini, allofükotsüaniinid ja klorofüll *a* sisaldus määrati Tallinna ülikooli loodus- ja terviseteaduste instituudi laboratooriumis.

Pigmentide analüüsimiseks kasutati külmuivatatud punavetika *Ceramium tenuicorne* krüogeenselt jahvatatud proove. Pigmentainete sisaldused (%) lõpptulemustes esitati vetika kuivmassi suhtes.

Fükobiliproteiinide ekstraktsioon punavetikast ja kvantifitseerimine:

Jahvatatud vetikamassist valmistati 0,5 % suspensioon 50 mM tsitraatpuhveris (pH 6,0), mis sisaldas ka 0,025% naatriumasiidi. Suspensioon segati pimedas 20 °C juures 24 h. Seejärel filtriti suspensiooni 0,45 µm RC-süstlafiltriga otse analüüsiks kasutatavasse vialli.

Fükobiliproteiinide kvantifitseerimiseks kasutati suuruseraldus-vedelikkromatograafiat ja diiodrividetektorit. Analüüs teostati 20 °C juures. Mobiilse faasina kasutati 300 mM NaCl, 50 mM fosfaatpuhvrit (pH 6,5) voolukiirusel 0,7 ml/min. Fükoeütriini analüüsimisel kasutati 5 µl sisestusruumalat, allofükotsüaniini puhul oli see 100 µl.

Fükobiliproteiinide sisalduste määramiseks vajalik kaliibrimine teostati Sigma-Aldrich R-fükoeütriini (52412) ja allofükotsüaniini (A7472) standardainetega.

Klorofüllü ekstraktsioon punavetikast ja kvantifitseerimine:

Jahvatatud vetikamassist valmistati 1% suspensioonid etanoolis (96%). Suspensioone segati pimedas 3 tundi 25°C juures loksutil 1000 pööret/min. Tahkete vetikatükkide eemaldamiseks tsentrifuugiti suspensiooni 2 minutit pööretel 13 000 x g 25°C juures. Selge lahus valati

PMMA-st poolmikroküveti ($d=1$ cm) ja registreeriti spektrofotomeetriga neelduvusspekter. Klorofüllü kvantifitseerimiseks kasutati valemit: **Chl-Total**: $24,1209 \cdot A_{632} + 11,2884 \cdot A_{649} + 3,7620 \cdot A_{665} + 5,8338 \cdot A_{696}$, kus A on neelduvus vastaval lainepikkusel (R.J. RITCHIE. 2008. *Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents*. PHOTOSYNTHETICA 46 (1): 115-126).

3. Kultiveerimissüsteem

Ceramium tenuicorne kasvatamine viidi läbi sise tingimustes TÜ Eesti mereinstituudi laohoones (Kassi 4, Tallinn).

Kultiveerimissüsteem koosneb üheksast laoriulitele paigutatud metallsõrestikuga toetatud klaasplastist nn jahutusmahutist ($1,1 \times 0,5$ m), milles paiknevad igas kolm 25 l ($40 \times 25 \times 20$ cm) klaasist akvaariumi (joonis 3.1). Takistamaks vetikate kerkimist pinnale ja sellest tingitud osalist kuivamist on kasvuakvaariumid kaetud spetsiaalsete võrkudega, mis asuvad ca 5 cm veepiirist all pool (joonis 3.2).



Joonis 3.1. Akvaariumid õhukiviga

Akvaariumites kasutati kunstlikult valmistatud merevett, lisades kraanivette meresoolasid, lämmastikühendeid: naatriumnitraati (NaNO_3) ja ammoniumkloriidi (NH_4Cl) ja fosfaatsoolasid: kaaliumdivesinikfosfaati (KH_2PO_4).



Joonis 3.2. Akvaariumid vetikate pinnale kerkimist takistavate võrkudega

Jahutusmahutid on täidetud veega, mida pumbatakse (pump AQUAMEDIC OCEAN RUNNER) pidevalt läbi jahuti (AQUAMEDIC TITAN), et tagada akvaariumites kindel veetemperatuur (joonis 3.3). Iga akvaariumi põhjale on paigutatud õhupumbaga (AQUANOVA, 200 l/h) ühendatud painduv õhukivi (90 cm), mis õhutab akvaariumi katseperioodil ööpäevaringselt (joonis 3.1).



Joonis 3.3 Jahutusmahutid ja AQUAMEDIC jahutid

Kultiveerimissüsteemi mahutite valgustamiseks kasutatakse reguleeritava valgusspektri ja valgusintensiivsusega LED lampe (Aqualight, multispektraalne, joonis 3.4). Lampide kõrgust akvaariumi kohal on võimalik reguleerida kinnitustrosside abil. Iga akvaariumi kohal paikneb 1 LED lamp, s.o kokku kolm lampi mahuti kohta, koguvõimsusega 500 W. LED lambid on ühendatud taimeriga, et reguleerida vastavalt vajadusele valgusperioodi kestust (valguspäeva pikkust).



Joonis 3.4. Akvaariumide valgustamine LED lampidega

pH ja süsihappegaasi sisalduse reguleerimiseks kasutati kolmes mahutis spetsiaalset süsteemi (joonis 3.5). Veekogudes ja ka akvaariumites on peamiseks pH lühiajalise muutlikkuse põhjustajaks lahustunud süsihappegaas, mida kasutatakse taimede poolt fotosünteesiks ja mis tekib kõikide veorganismide hingamisel. Stabiilse ja optimaalse pH taseme säilitamiseks ja taimede produktsiooniks vajaliku CO₂ taseme hoidmiseks kasutatakse nii akvaariumites kui muudes kontrollitud akvakultuurides CO₂ automaatse lisamise süsteeme. Süsteem koosneb pH-andurist, kontrolleriist, solenoidklapist, CO₂ balloonist ja difuuserist. Kontrolleriis määratakse maksimaalne pH-tase, kui andur mõõdab akvaariumis määratud kõrgema tasemega pH, avab kontrolleri solenoidklapi. Klapi avanedes lahustatakse balloonist tulev süsihappegaas difuuseri kaudu akvaariumi vette. Lisanduv CO₂ põhjustab akvaariumis pH taseme languse, kui tase on jõudnud alla kontrolleriis määratud näidu, sulgeb kontrolleri klapi ja CO₂ juurdevool peatub.



Joonis 3.5. pH ja süsihappegaasi sisalduse reguleerimine

4. Tulemused

Optimaalsete kultiveerimistingimuste väljaselgitamiseks, mis tagaks *Ceramium tenuicorne* kõrge pigmentide, s. o fükoerütriini sisalduse ja ka biomassi juurdekasvu, viidi läbi kokku 5 erinevat katseseeriat, kus manipuleeriti vastavalt valguse, temperatuuri, pH (CO₂ sisaldus) või toitainete sisaldusega:

I katseseeria 24.05.2021–28.07.2021

temperatuur 10, 15 ja 20 °C, PAR 20–90 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (14:10), soolsus 6,4 psu

II katseseeria 31.08.2021–18.10.2021

temperatuur 10 ja 15 °C, PAR 20–90 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12:12), soolsus 7,5 psu

III katseseeria 04.11.2021–22.02.2022

temperatuur 10 °C, PAR 20–90 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (8:16), soolsus 7,5 psu

IV katseseeria 13.04.2022 – 04.05.2022

temperatuur 10 °C, PAR 20–60 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (14:10), soolsus 7,5 psu, pH 7,7; 8,0 ja 8,3;

V katseseeria 06.05.2022 – 07.07.2022

temperatuur 10 °C, PAR 30–400 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (14:10), soolsus 7,5 psu, pH 7,7; 8,0 ja 8,3;
NH₄ 0,7 ja 1,4 $\mu\text{mool/l}$, NO₃ 0,7 ja 1,4 $\mu\text{mool/l}$ ja PO₄ 0,15 $\mu\text{mool/l}$

Aruandes on esitatud eksperimentide käigus saadud olulisemad tulemused, mille põhjal selgitati välja sobivaimad *C. tenuicorne* kultiveerimistingimused, mis tagaks eelkõige punase pigmendi fükoerütriini kõrge sisalduse punavetikas.

4.1. Valgustingimuste mõju *C. tenuicorne* pigmentide sisaldusele ja produktsioonile

4.1.1. 2021-2022 sügis-talve katseseeria

2021-2022 sügis-talvel (04.11.2021–22.02.2022) viidi läbi *C. tenuicorne* kasvatamiskatsed kolme erineva valgusintensiivsuse juures – PAR (fotosünteesiliselt aktiivne kiirus) vastavalt 20, 90 ja 60 (sinine valgus) $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Toetudes katseseeriastest I ja II saadud tulemustele, kus põhirõhk oli sobiva kasvutemperatuuri leidmisel (10, 15 ja 20 °C), viidi katsed läbi temperatuuri 10 °C juures, et tagada vetikate hea füsioloogiline seisund ja vältida vetika lagunemisprotsesside käivitumist võimalikult pikal katseperioodil.

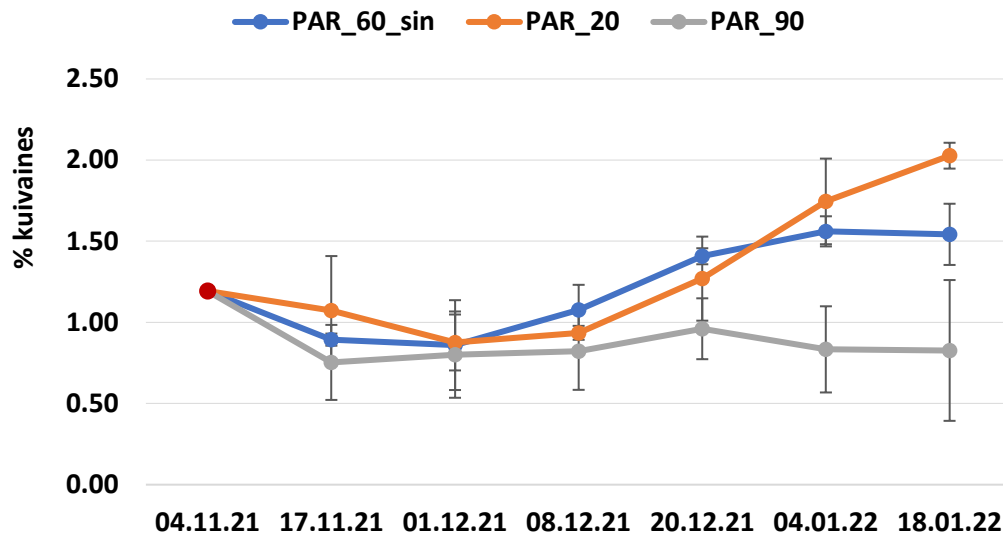
Katsetes kasutatud vetikas koguti Vilsandi rannikumerest 03.11.2022 läbiviidud välitööde käigus sukeldujate poolt 4 m sügavuselt (joonis 4.1.1.1)



Joonis 4.1.1.1. *Ceramium tenuicorne* kogumine, Vilsandi 2021 (fotod Kaire Kaljurand)

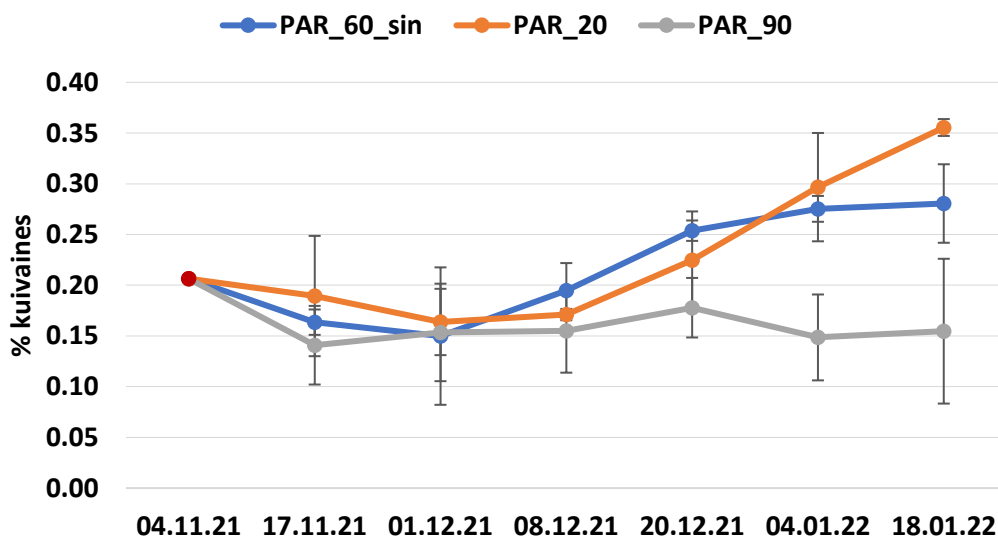
Katseperioodi vältel koguti reeglina üks kord nädalas vetikaproovid pigmentide analüüsiks. Fükoeütriini, allofükotsüaniinid ja klorofüll *a* sisaldus määrati Tallinna ülikooli loodus- ja terviseteaduste instituudi laboratooriumis.

Joonisel 4.1.1.2 on esitatud fükoeütriini sisalduse muutused erinevate PAR väärtuste juures. Tulemuste statistiline analüüs näitas, et valgustingimustel on oluline mõju fükoeütriini sisaldusele (ANOVA, $F=13,161$, $p<0,005$). Statistiliselt oluliseks osutus ka ajafaktor (ANOVA, $F=8,190$, $p<0,005$) – kõrgeimad fükoeütriini sisaldused määrati katseperioodi lõpus. Maksimaalne fükoeütriini sisaldus 2,0% kuivainest määrati madala valgusintensiivsuse (20 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures). *C. tenuicorne* fükoeütriini sisaldus tõusis nimetatud valgusintensiivsuse juures katseperioodi lõpuks 1,7 korda võrreldes vetika pigmendi sisaldusega (1,19% kuivainest) katse alguses, aga võrreldes madalaima keskmise sisaldusega (0,88 % kuivainest; määratud 01.12.21) kuni 2,4 korda. Suhteliselt kõrge (samas ei leitud statistiliselt olulist erinevust PAR 20 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures läbi viidud mõõtmistest, Tukey HSD $p=0,3855$) oli fükoeütriini sisaldus ka PAR 60 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (kasutati sinist valgust): maksimaalne sisaldus ca 1,8% *C. tenuicorne* kuivainest (1,5 kordne sisalduse tõus võrreldes sisaldusega algmaterjalis). PAR 90 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures langes fükoeütriini sisaldus võrreldes algse sisaldusega märkimisväärselt juba katseperioodi alguses ja erines olulisest madalamate PAR väärtuste juures mõõdetud tulemustest (Tukey HSD test $p<0,0005$).

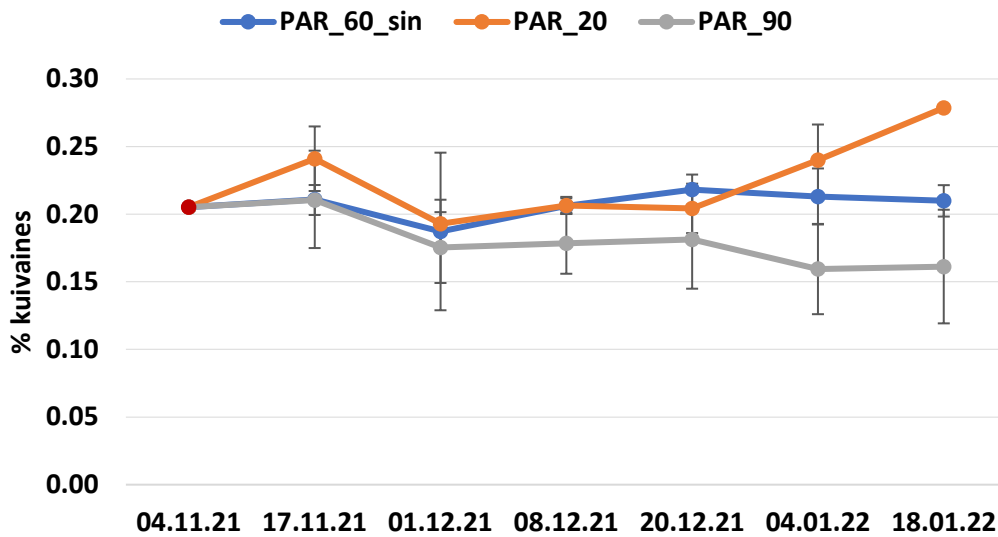


Joonis 4.1.1.2 . Fükoeerütriini sisalduse (keskmine \pm standardhälve) muutused *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel erinevate valgustingimuste juures

Sarnaselt *C. tenuicorne* fükoeerütriini sisaldusele mõjutasid valgustingimused ka allofükotsüaniini (ANOVA, $F=10,371$, $p<0,005$) ja fotosünteesi seisukohalt esmase tähtsusega pigmendi klorofüll *a* (ANOVA, $F=9,834$, $p<0,005$) sisaldust vetikas (joonised 4.1.1.3 ja 4.1.1.4).

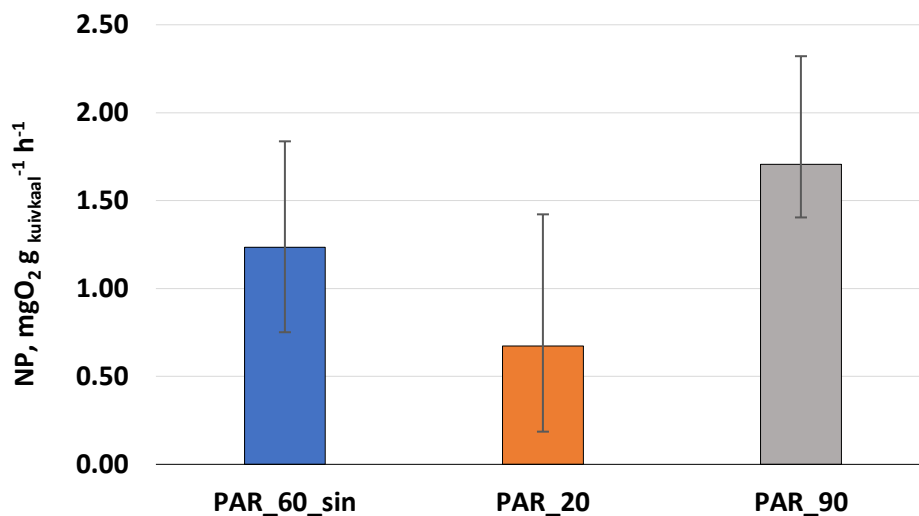


Joonis 4.1.1.3. Allofükotsüaniini sisalduse (keskmine \pm standardhälve) muutused *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel erinevate valgustingimuste juures

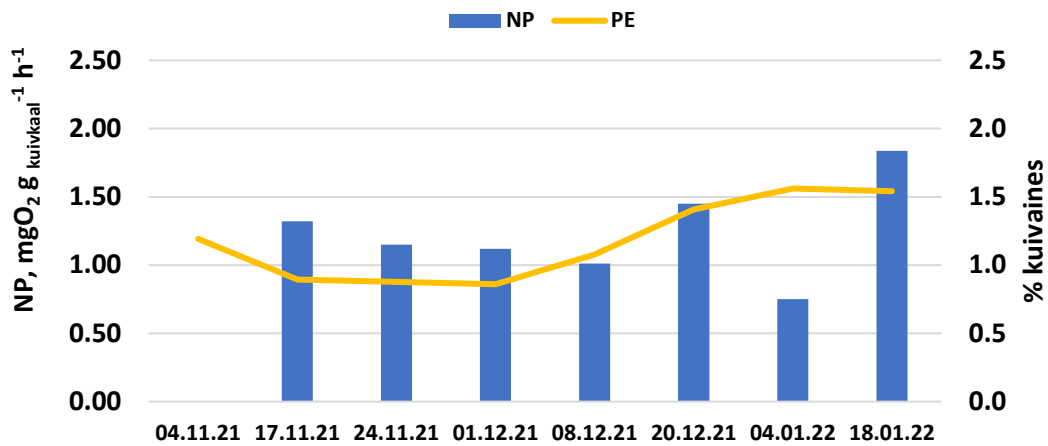


Joonis 4.1.1.4. Klorofüll *a* sisalduse (keskmine ± standardhälve) muutused *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel erinevate valgustingimuste juures

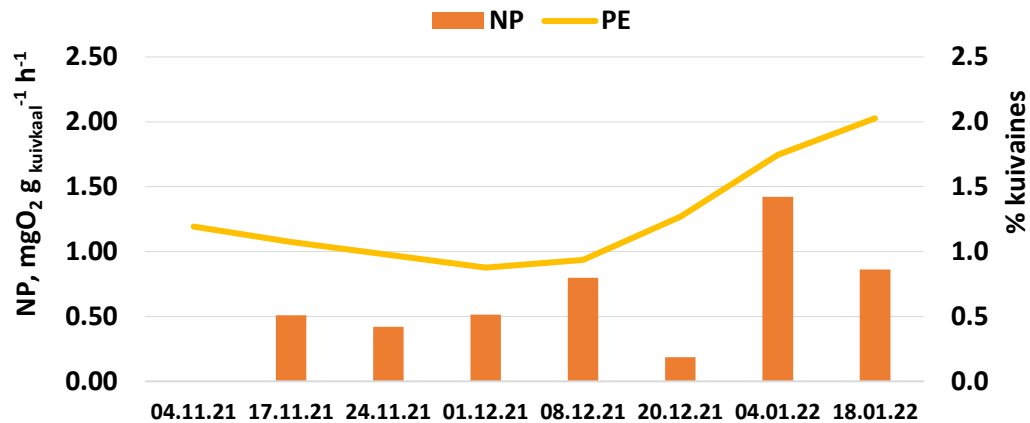
Ka *C. tenuicorne* produktsiooni (neto fotosünteesi kiirus) puhul leiti statistiliselt oluline seos valgustingimustega (ANOVA, $F=21,710$, $p<0,005$). Tukey HSD testi tulemused näitasid, et katseperioodi erinevatel etappidel mõõdetud netofotosünteesi kiiruse (NP) keskmised väärtused erinevate PAR väärtuste juures (s.o 20, 60 ja 90 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$) erinesid oluliselt üksteisest ($p<0,005$; joonis 4.1.1.5), kuid erinevalt fükoerütriini ja teiste pigmentide sisaldusest mõõdeti *C. tenuicorne* kõrgemad NP väärtused kõrgema valgusintensiivsuse juures (joonised 4.1.1.6–4.1.1.8)



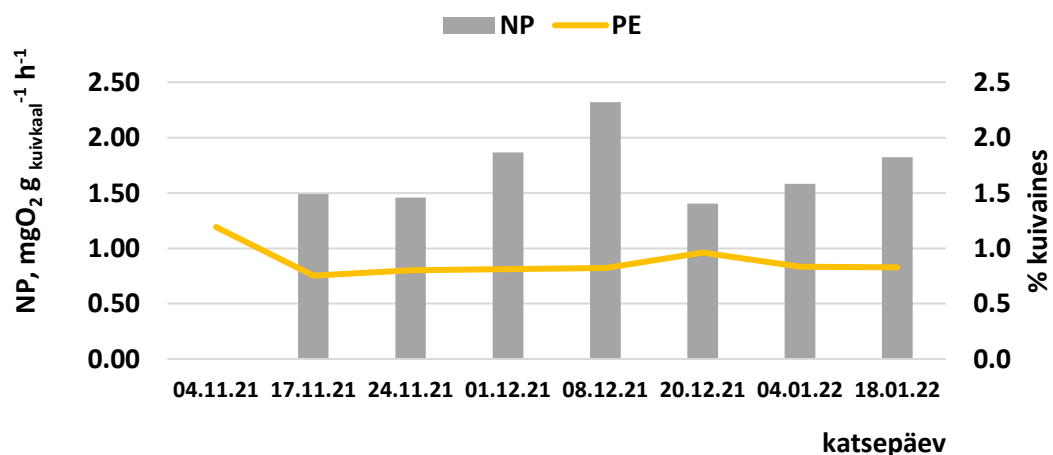
Joonis 4.1.1.5. *Ceramium tenuicorne* katseperioodi keskmine, maksimaalne ja minimaalne netofotosünteesi kiirus erinevate valgustingimuste juures



Joonis 4.1.1.6. *Ceramium tenuicorne* fotosünteesi kiiruse (NP) ja fükoerütriini (PE) sisalduse muutused PAR väärtuse 60 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (sinine valgus) juures

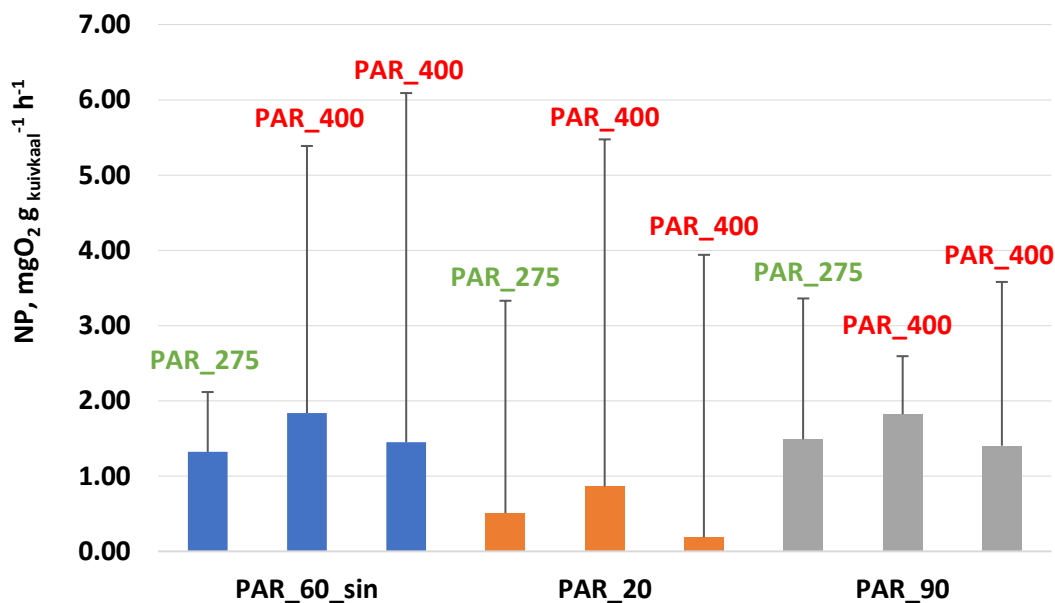


Joonis 4.1.1.7. *Ceramium tenuicorne* fotosünteesi kiiruse (NP) ja fükoerütriini (PE) sisalduse muutused PAR väärtuse 20 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (sinine valgus) juures



Joonis 4.1.1.8. *Ceramium tenuicorne* fotosünteesi kiiruse (NP) ja fükoerütriini (PE) sisalduse muutused PAR väärtuse 90 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures

Kuna meie katsete põhieesmärgiks oli leida eelkõige sobivaimad valgustingimused kõrge fükoerütriini sisalduse saamiseks punavetikas *C. tenuicorne*, siis eelpool kirjeldatud katsetes kasutatud PAR väärtused olid madalamad fotosünteesi valgusküllastus väärtustest, millest tingitult ka produktsiooniväärtused olid suhteliselt madalad (võrreldavad liigi looduslikes sügavas vees kasvavates kooslustes mõõdetud väärtustega). Madalama valguse juures kasvatatud *C. tenuicorne* lühiajaline inkubeerimine kõrgemate PAR väärtuste (275 ja 400 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$) näitas märkimisväärset netofotosünteesi intensiivistumist, s.o sõltuvalt valgustingimustest mõõdeti kuni 6 korda kõrgemad NP väärtused (joonis 4.1.1.9).

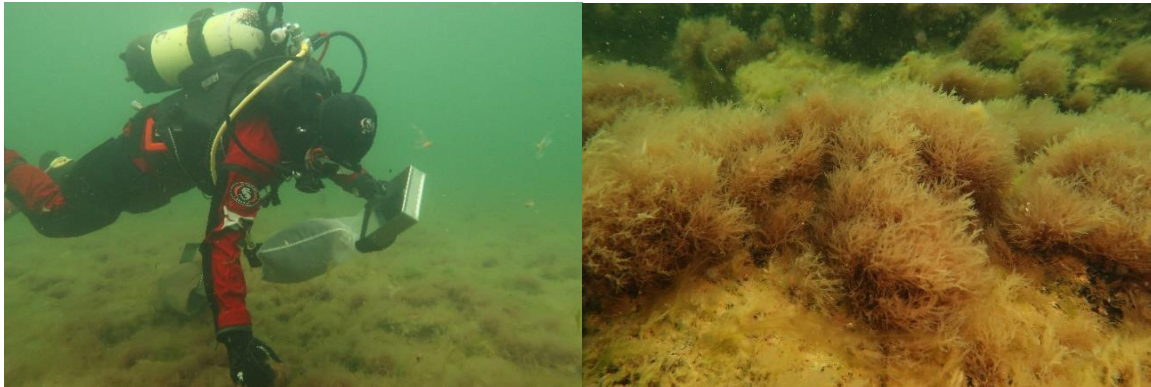


Joonis 4.1.1.9. Lühiajalisest valgusintensiivsuse tõusust (275 ja 400 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$) tingitud netofotosünteesi kiiruse tõus. Eri värvi tulpadega on tähistatud samal ajal mõõdetud NP väärtused madalama valgusintensiivsuse juures.

4.1.2. 2022 kevad-suve katseseeria

2022. a kevad-suvel (06.05.–07.07.2022) viidi läbi *C. tenuicorne* kultiveerimiskatsed kolme erineva valgusintensiivsuse juures – PAR vastavalt 400, 30 (sinine valgus) ja 90 (sinine valgus) $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

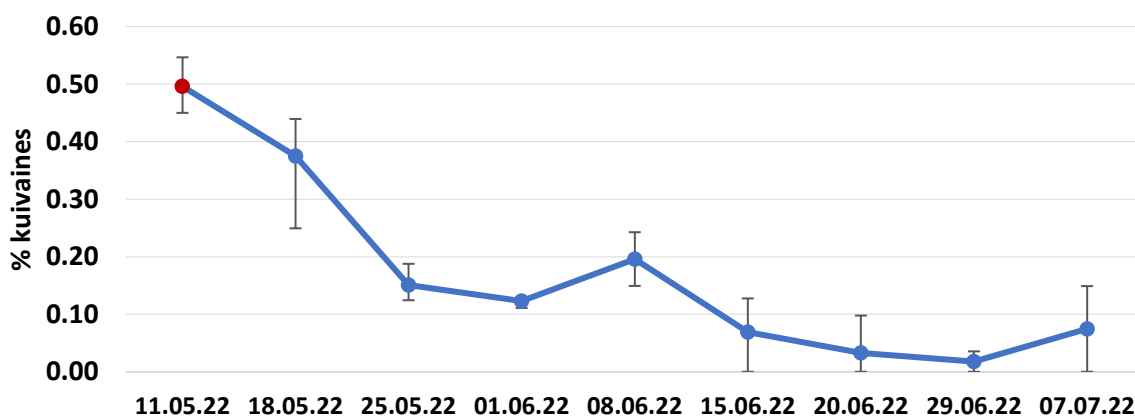
C. tenuicorne koguti Vilsandi rannikumerest 06.05.2022 läbiviidud välitööde käigus sukeldujate poolt 4 m sügavuselt (joonis 4.1.2.1)



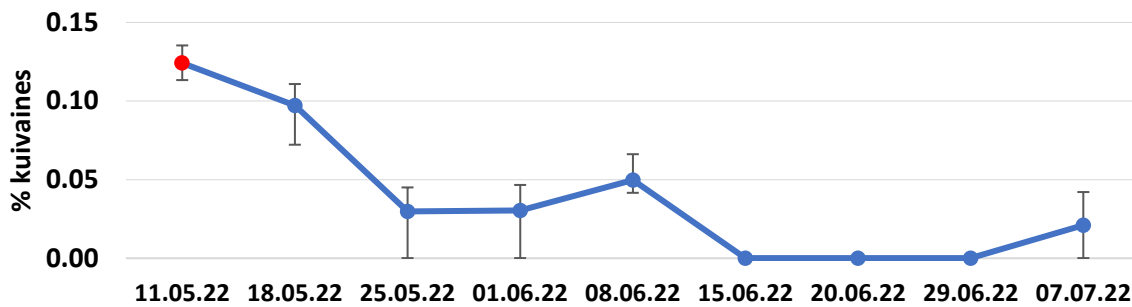
Joonis 4.1.2.1. *Ceramium tenuicorne* kogumine, Vilsandi 2022. a mai (fotod Kaire Kaljurand)

Katseperioodi vältel (11.05. – 07.07.2022) koguti reeglina üks kord nädalas vetikaproovid pigmentide analüüsiks. Fükoerütriini, allofükotsüaniini ja klorofüll *a* sisaldus määrati Tallinna ülikooli loodus- ja terviseteaduste instituudi laboratooriumis.

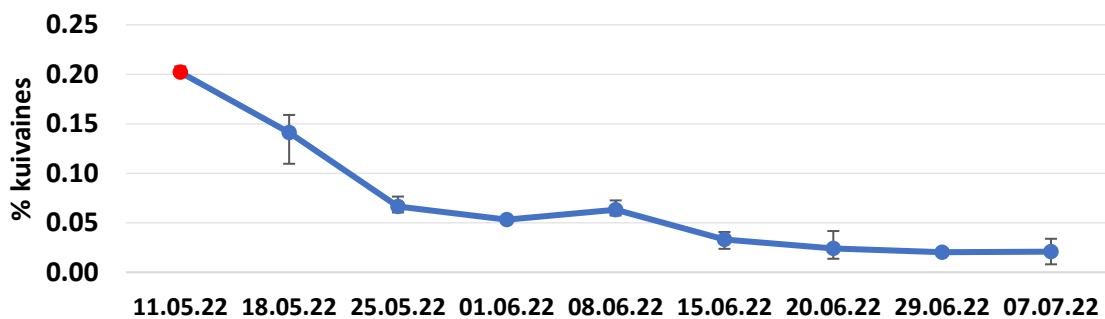
C. tenuicorne kasvatamisel kõrge valgusintensiivsuse juures ($400 \mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$; joonis 4.1.2.2) vähenes katseperioodi käigus märkimisväärselt fükoerütriini sisaldus vetikas (ANOVA, $F=19,6535$; $p<0,005$). Sarnane sisalduse langus oli iseloomulik ka allofükotsüaniinile ja klorofüll *a*-le (joonised 4.1.2.3 ja 4.1.2.4).



Joonis 4.1.2.2. Fükoerütriini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel PAR $400 \mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures

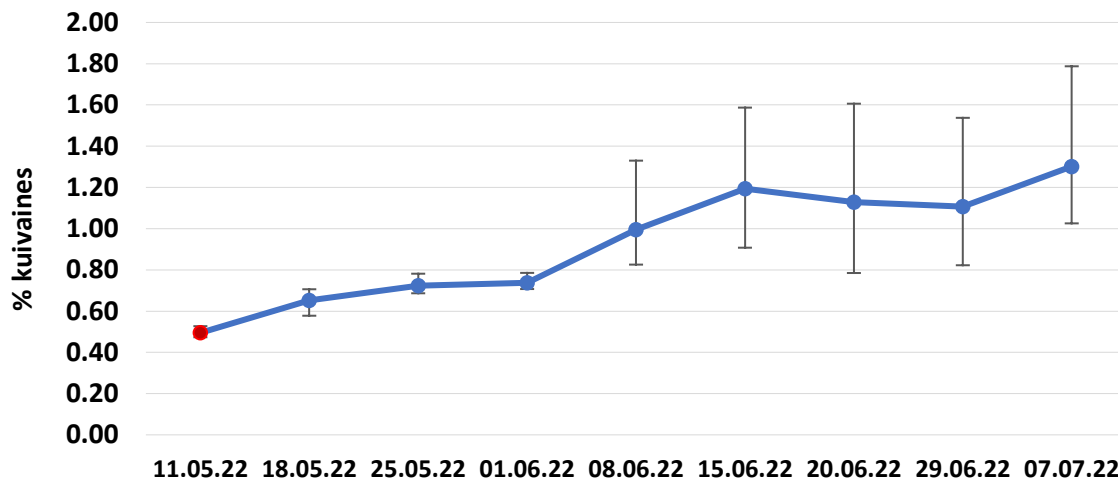


Joonis 4.1.2.3. Allofükotsüaniini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel PAR 400 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures

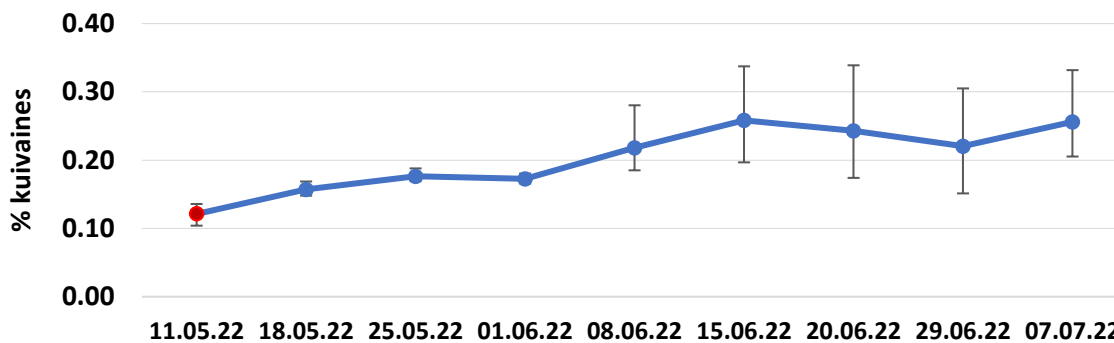


Joonis 4.1.2.4. Klorofüll *a* keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel PAR 400 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures

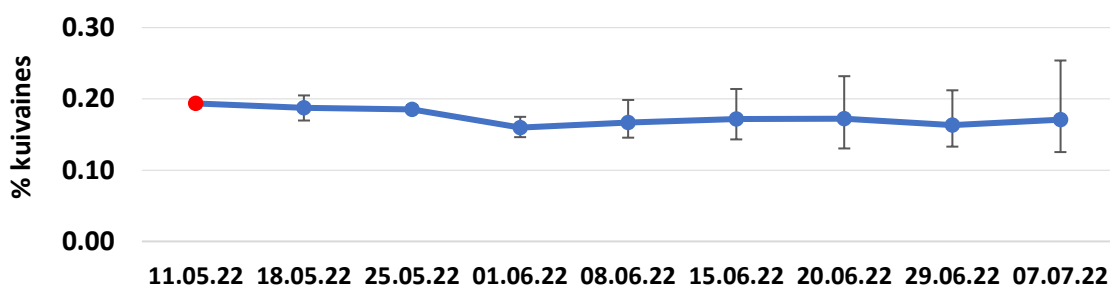
Kui kõrge valgusintensiivsusega katsetes (PAR 400 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$) langes *C. tenuicorne* fükoerütriini sisaldus katse käigus peaaegu 5 korda, siis madala valgusintensiivsuse (sinine valgus, 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$) juures läbi viidud katsetes tõusis fükoerütriini sisaldus märkimisväärselt (ANOVA, $F=2,9376$, $p<0,05$), keskmiselt ca kolm korda (joonis 4.1.2.5). Sarnane kasvutendents leiti ka allofükotsüaniidi sisalduse puhul (joonis 4.1.2.6), seevastu klorofüll *a* sisalduses ei leitud statistiliselt olulisi muutusi (joonis 4.1.2.7).



Joonis 4.1.2.5. Füksoerütriini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel PAR 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures (sinine valgus)



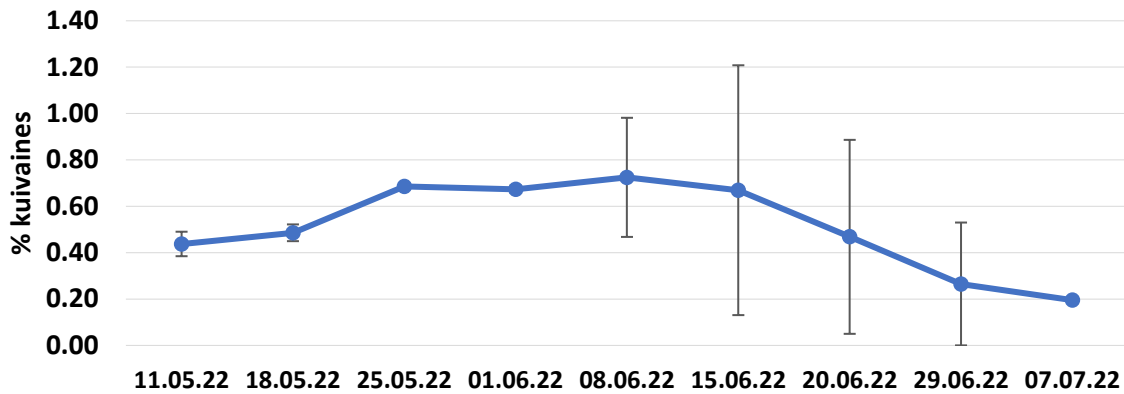
Joonis 4.1.2.6. Allofükotsüaniini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel PAR 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures (sinine valgus)



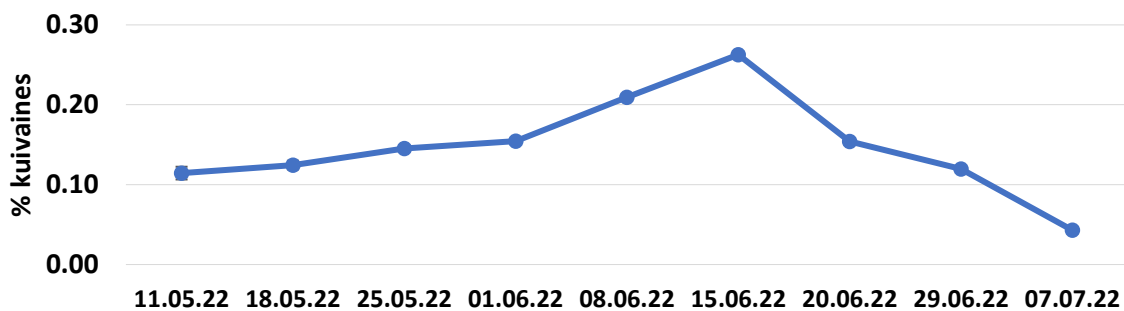
Joonis 4.1.2.7. Klorofüll *a* keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel PAR 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures (sinine valgus)

Füksoerütriini sisalduse tõusu (keskmiselt kuni 2 korda võrreldes algsisaldusega) võis täheldada ka PAR 60 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures (sinine valgus). Esines väga suur erinevus erinevate paralleelkatsete (akvaariumite) vahel, mis oli ilmselt tingitud valgustingimuste erinevusest

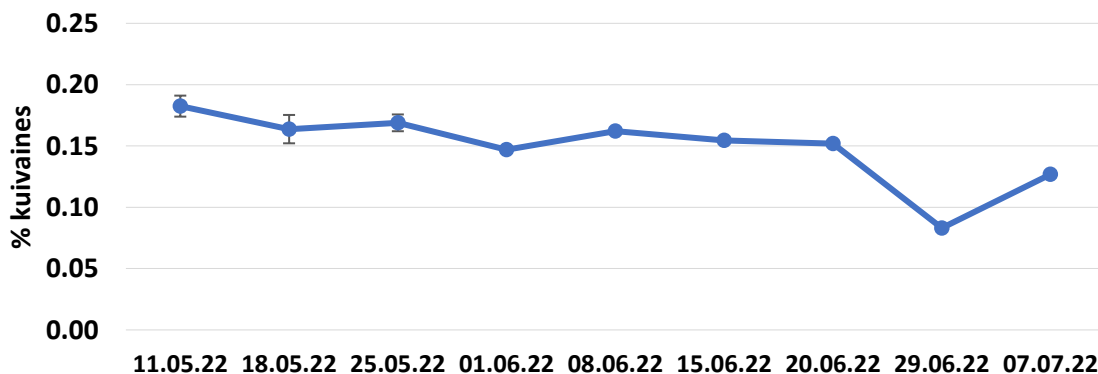
vetikamassis (visuaalselt nähtav erinevus värvuses). Muutused pigmentide sisaldustes katseperioodil on esitatud joonistel 4.1.2.8–4.1.2.10.



Joonis 4.1.2.8. Fükooerütriini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel PAR 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures (sinine valgus)

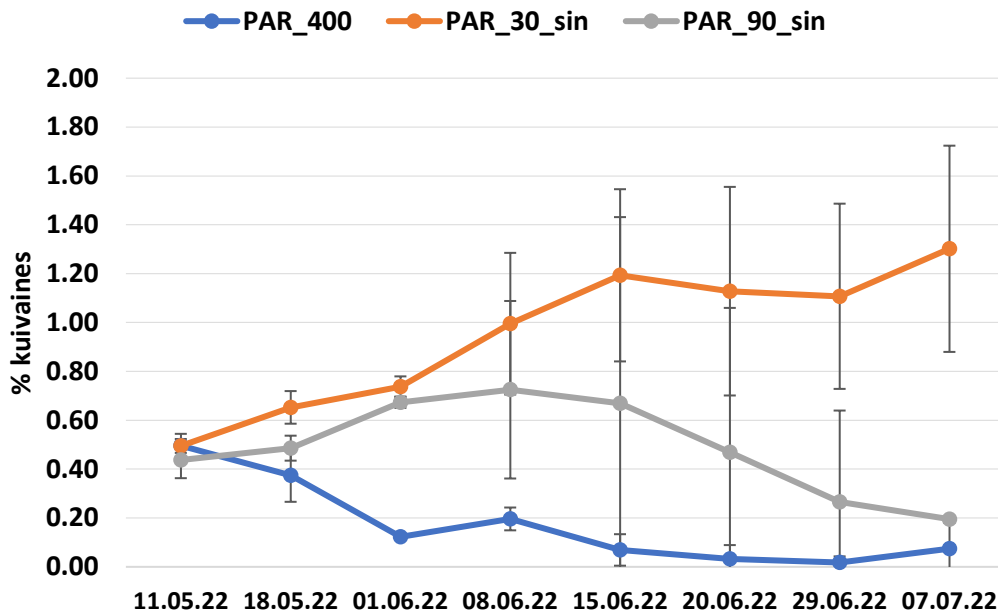


Joonis 4.1.2.9. Allofükotsüaniini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel PAR 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures (sinine valgus)



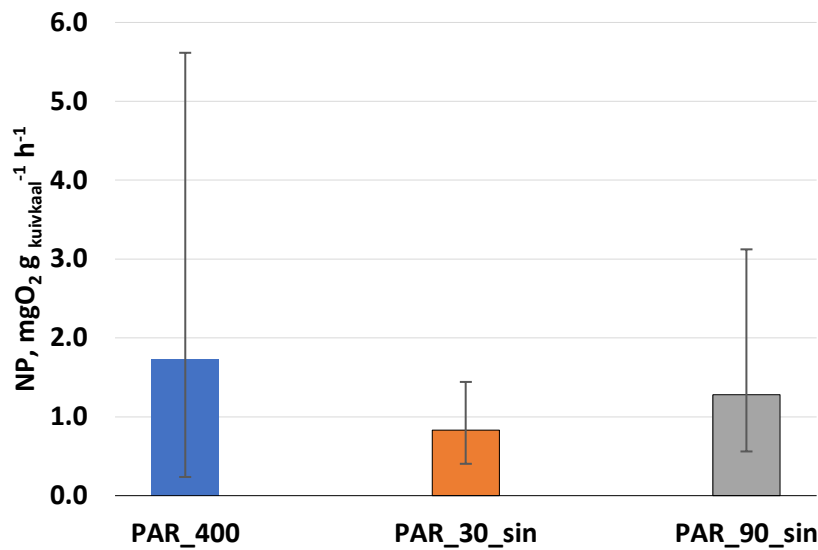
Joonis 4.1.2.10. Klorofüll *a* keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel PAR 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures (sinine valgus)

Andmete statistiline analüüs kinnitas, et erinevate valgustingimuste juures kasvanud *C. tenuicorne* fükoeerütriini sisalduses on olulised erinevused (joonis 4.1.2.11). Tukey HSD test näitas olulisi erinevusi ($p < 0,05$) kõigi erinevate katses kasutatud PAR väärtuste juures saadud fükoeerütriini sisalduste vahel.

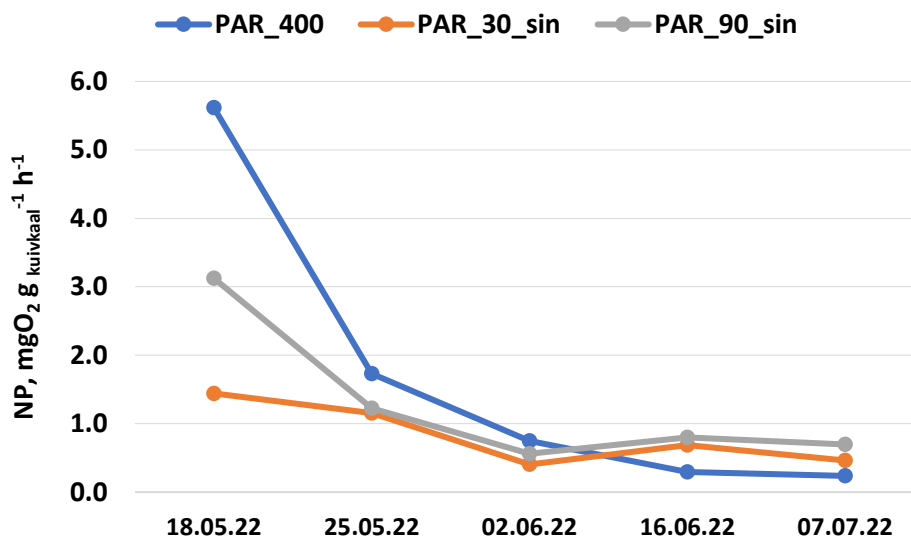


Joonis 4.1.2.11. Fükoeerütriini sisalduse (keskmine \pm standardhälve) muutused *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel erinevate valgustingimuste juures

C. tenuicorne netofotosünteesi (NP) kiiruse keskmised, maksimaalsed ja minimaalsed väärtused on esitatud joonisel 4.1.2.12. Jooniselt ilmneb, et kõrgeimad NP väärtused mõõdeti katseperioodi alguses, kui PAR 400 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures saadi NP väärtuseks 5,6 $\text{mgO}_2 \text{ g kuivkaal}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (vastab päevasele juurdekasvule ca 5,6%) ja PAR 90 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures (sinine valgus) 3,1 $\text{mgO}_2 \text{ g kuivkaal}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (vastab päevasele juurdekasvule ca 1,8% päevas), järgneval katseperioodil olulisi erinevusi erinevatel valgusintensiivsustel mõõdetud NP väärtustetes ei tuvastatud. Suhteliselt madalad NP väärtused PAR 400 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures katseperioodi teises pooles (joonis 4.1.2.13) viitavad fotoinhibitsioonile, kuna punavetikad on reeglina kohastunud suhteliselt madala valgusintensiivsusega ja pikaajaline inkubeerimine kõrge valgusintensiivsuse juures võib viia muutustele vetika füsioloogilises seisundis, samuti kiirendada lagunemisprotsesse või CO_2 defitsiidile (vt ptk 4.2).



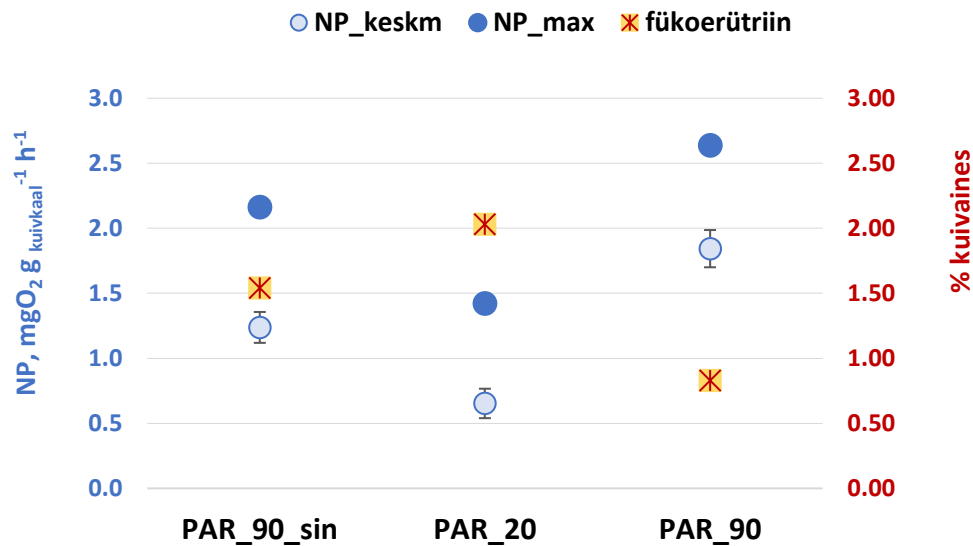
Joonis 4.1.2.12. *Ceramium tenuicorne* katseperioodi keskmine, maksimaalne ja minimaalne netofotosünteesi kiirus erinevate valgustingimuste juures



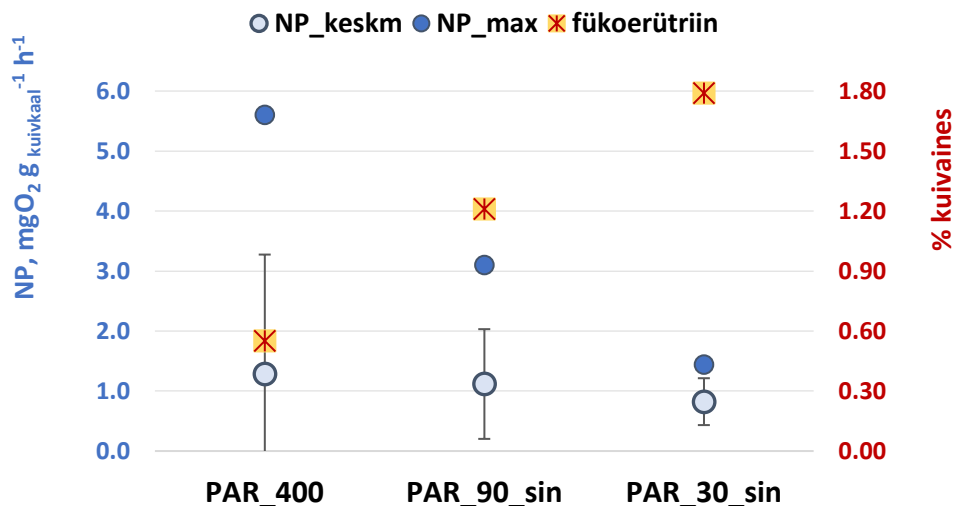
Joonis 4.1.2.13. *Ceramium tenuicorne* fotosünteesi kiiruse (NP) muutused katseperioodil erinevatel valgustingimustel

Eelpool kirjeldatud kahe katseperioodi (04.11.2021–18.01.2022 ja 11.05.2022–07.07.2022) tulemused, s.o valgustingimuste mõju *C. tenuicorne* punase pigmendi fukoerütriini sisaldusele ja produktsioonile on esitatud joonistel 4.1.2.14 ja 4.1.2.15. Kõrgemad fukoerütriini sisaldused 2,0% ja 1,8% kuivkaalust mõõdeti madala valgusintensiivsuse – vastavalt PAR 20 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ja 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (sinine valgus) juures. Kuigi lühiajaline *C. tenuicorne* inkubeerimine

kõrge valgusintensiivsuse juures (PAR 400 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kiirendas netofotosünteesi vetikas, siis kõrgemad NP katseperioodi keskmised väärtused mõõdeti PAR 90 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures.



Joonis 4.1.2.14. *Ceramium tenuicorne* netofotosünteesi (NP) katseperioodi (04.11.2021–18.01.2022) keskmised (\pm standardhälve) ja maksimaalsed väärtused ja fukoerütriini maksimaalne sisaldus erinevate valgustingimuste juures

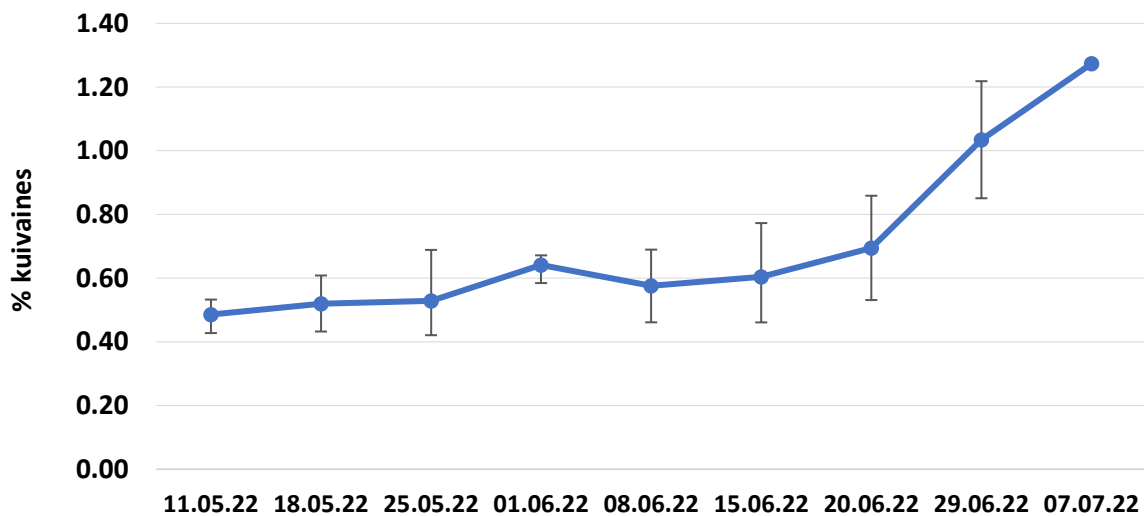


Joonis 4.1.2.15. *Ceramium tenuicorne* netofotosünteesi (NP) katseperioodi (11.05.–07.07.2022) keskmised (\pm standardhälve) ja maksimaalsed väärtused ja fukoerütriini maksimaalne sisaldus erinevate valgustingimuste juures

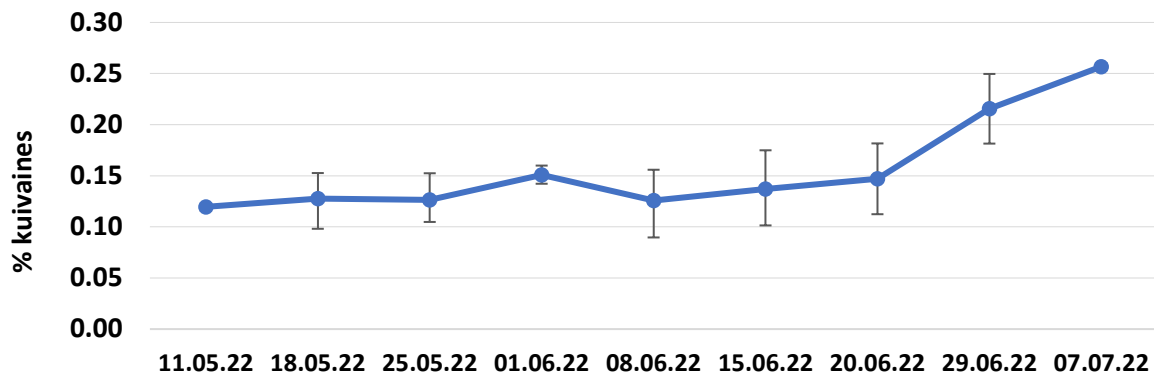
4.2. pH mõju *C. tenuicorne* pigmentide sisaldusele ja produktsioonile

Katsed pH (mõjutab CO₂ sisaldust vees) võimaliku mõju välja selgitamiseks *C. tenuicorne* pigmentide sisaldusele ja netofotosünteesile kasvatati vetikat CO₂-ga rikastatud vees kolme erineva pH väärtuse juures: pH 7,7; pH 8,0 ja pH 8,3. Katsed viidi läbi PAR 30 μmool m⁻² s⁻¹ juures. Katseperioodi vältel (11.05.–07.07.2022) koguti regulaarselt vetikaproovid pigmentide analüüsiks ja viidi läbi netofotosünteesi mõõtmised.

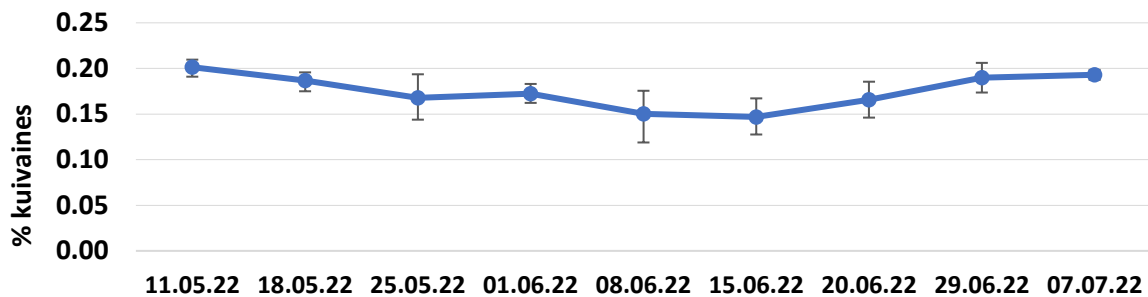
Pigmentide (fükoerütriini, allofükotsüaniini ja klorofüll *a* sisalduse muutused katseperioodil on esitatud alljärgnevatel joonistel 4.2.1–4.2.9. *C. tenuicorne* fükoerütriini sisalduse tõusust põhjustatud erinevus katseperioodi alguse ja lõpus pH 7,7 juures osutus statistiliselt oluliseks (Tukey HSD test $p < 0,05$). *C. tenuicorne* kasvatamine kõrgemate pH väärtuste 8,0 ja 8,3 (madalam CO₂ sisaldus) juures ei soodustanud fükoerütriini sisalduse tõusu või põhjustas (pH 8,3) sisalduse märkimisväärse languse (ANOVA, $F=3,9372$, $p < 0,005$).



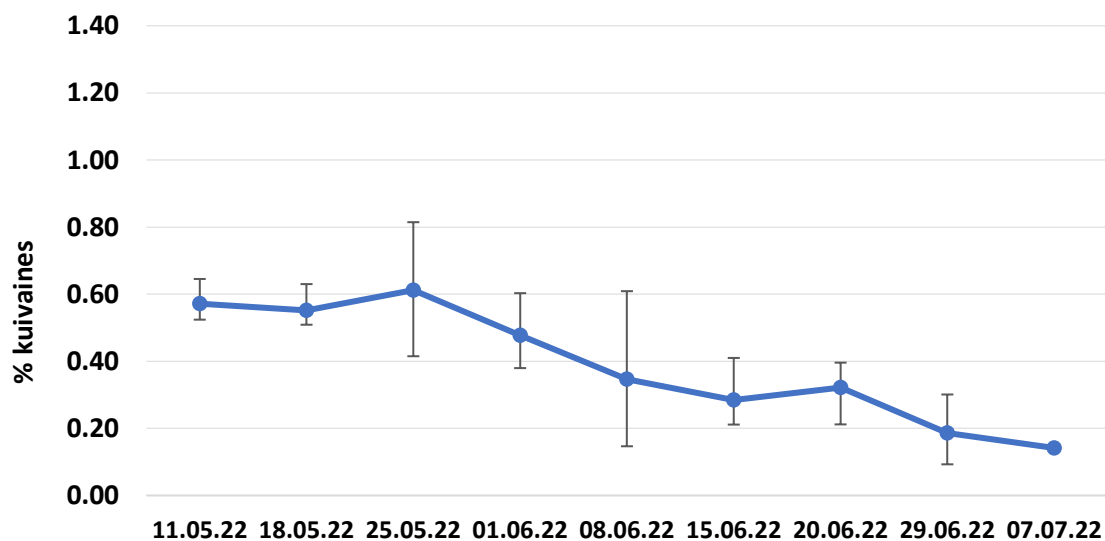
Joonis 4.2.1. Fükoerütriini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel fikseeritud pH 7,7 ja PAR 30 μmool m⁻² s⁻¹ juures



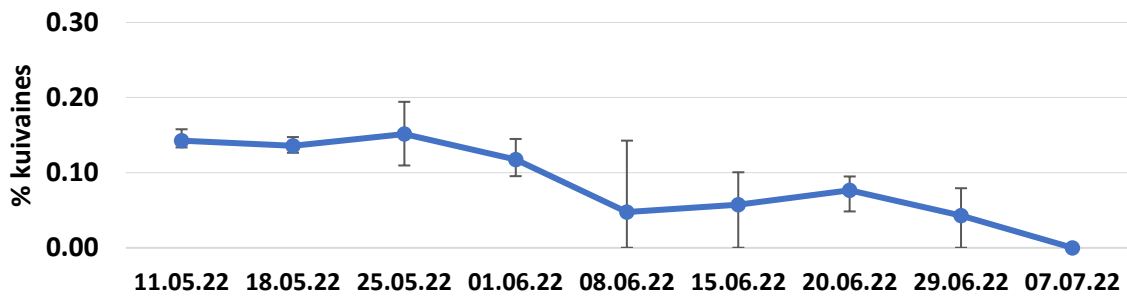
Joonis 4.2.2. Alloxantsüaniini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel fikseeritud pH 7,7 (PAR 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$) juures



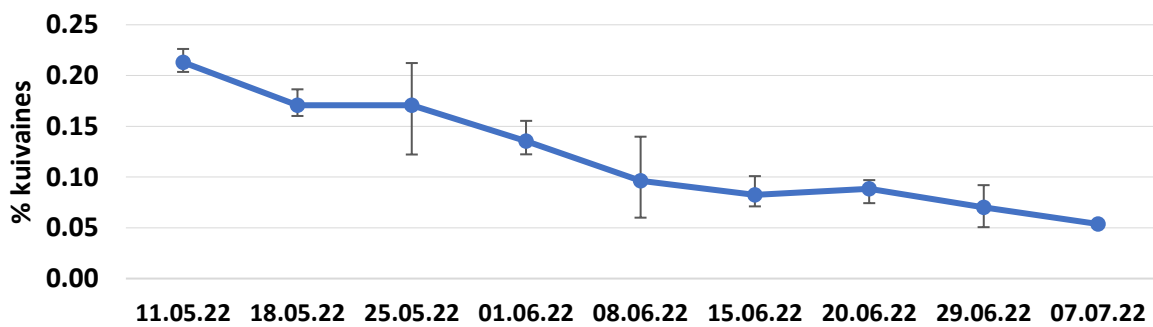
Joonis 4.2.3. Klorofüll *a* keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel fikseeritud pH 7,7 (PAR 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$) juures



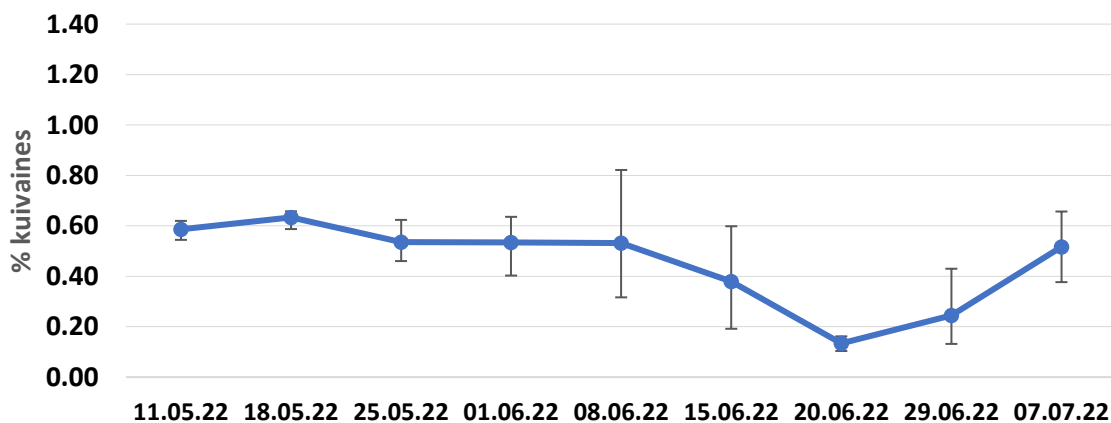
Joonis 4.2.4. Fükooerütriini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel fikseeritud pH 8,3 ja PAR 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures



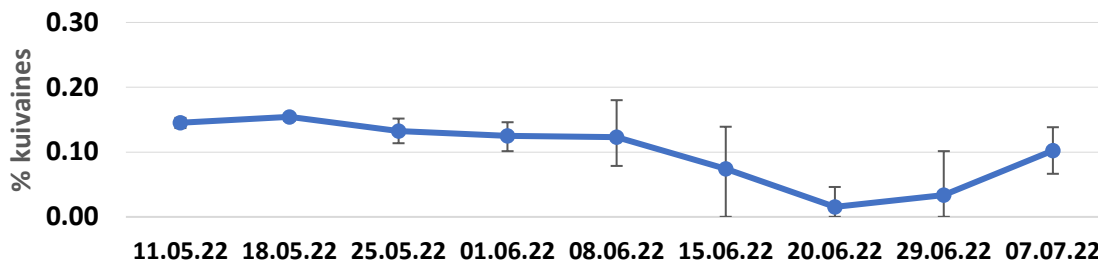
Joonis 4.2.5. Alloxantsüaniini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel fikseeritud pH 8,3 (PAR 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) juures



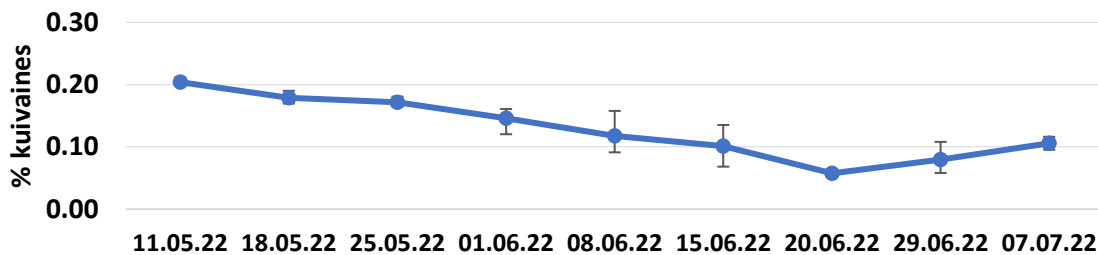
Joonis 4.2.6. Klorofüll *a* keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel fikseeritud pH 7,7 (PAR 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) juures



Joonis 4.2.7. Füksoerütriini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel fikseeritud pH 8,0 ja PAR 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures

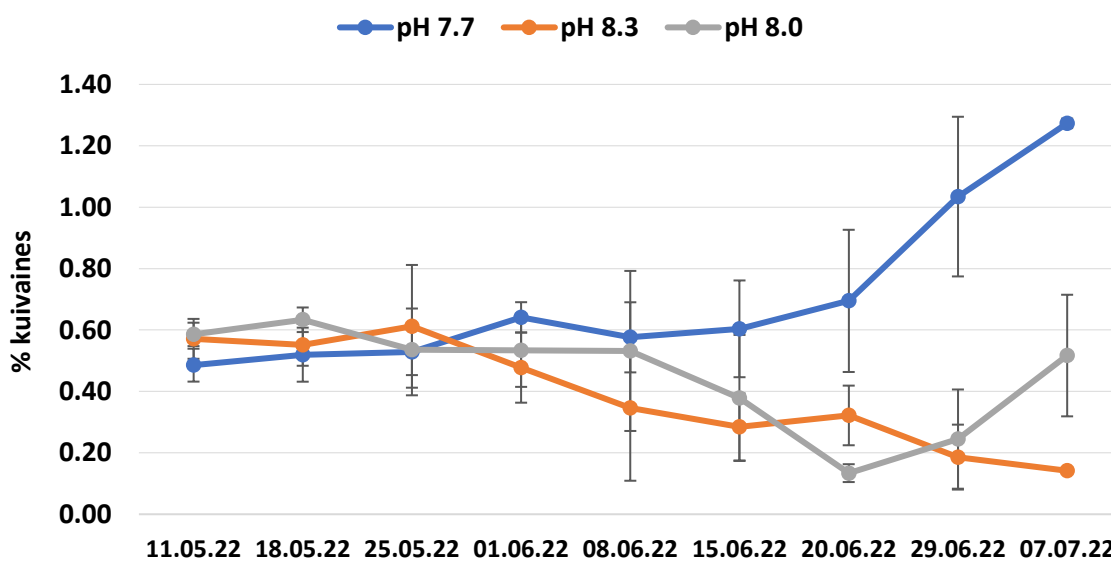


Joonis 4.2.8. Alloxanthiini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel fikseeritud pH 8,3 (PAR 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$) juures



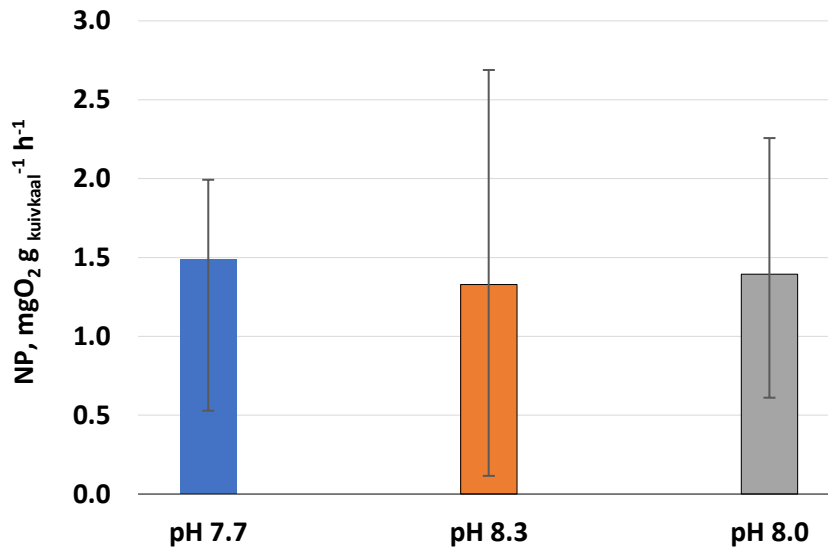
Joonis.4.2.9. Klorofüll *a* keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel fikseeritud pH 8,0 (PAR 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$) juures

Andmete statistiline analüüs näitas, et erinevate pH väärtuste (CO_2 sisalduse) juures kasvanud *C. tenuicorne* fükoerütriini sisalduses on olulised erinevused (joonis 4.2.10). Tukey HSD test näitas olulisi erinevusi ($p < 0,0005$) pH 7,7 juures saadud fükoerütriini sisalduses võrreldes kõrgemate pH väärtustega (pH 8,0 ja 8,3).

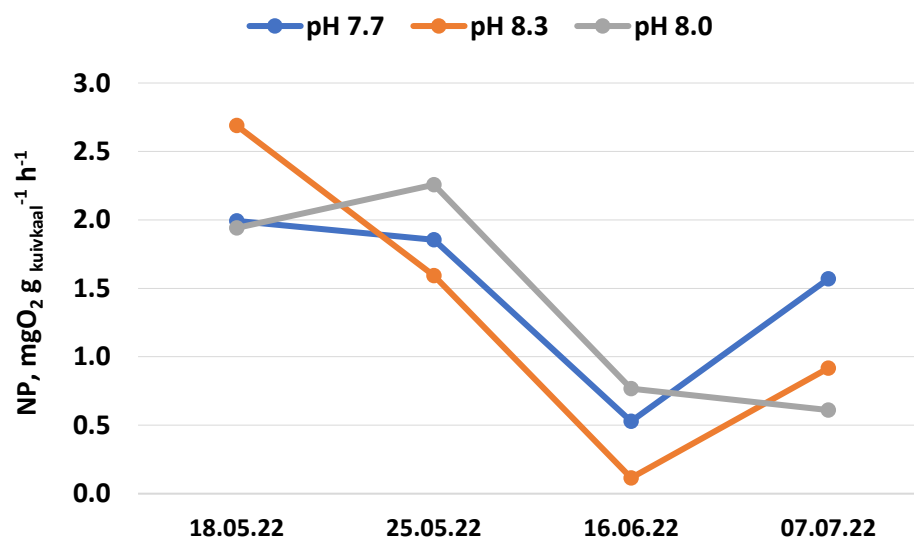


Joonis 4.2.10. Fükoerütriini sisalduse (keskmine \pm standardhälve) muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel erinevate fikseeritud pH väärtuste juures

Kuna netofotosünteesi mõõtmised viidi läbi suhteliselt madalal PAR väärtusel ($30 \mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$), st CO_2 defitsiiti fotosünteesi protsessis katsevees ei tekkinud, siis märkimisväärseid erinevusi NP katseperioodi keskmiste väärtuste vahel ei tuvastatud (joonised 4.2.11 ja 4.2.12).



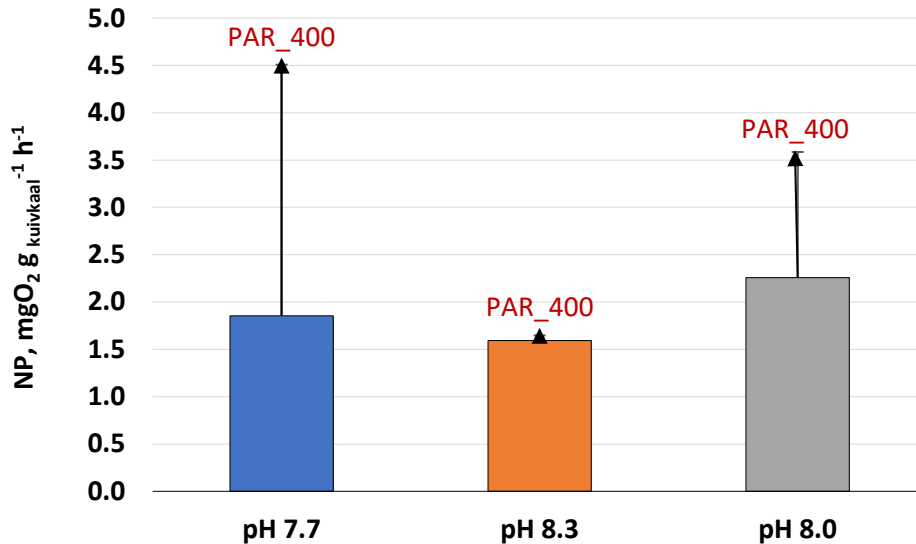
Joonis 4.2.11. *Ceramium tenuicorne* katseperioodi keskmine, maksimaalne ja minimaalne netofotosünteesi kiirus erinevate fikseeritud pH väärtuste juures



Joonis 4.2.12. *Ceramium tenuicorne* fotosünteesi kiiruse (NP) muutused katseperioodil erinevate fikseeritud pH väärtuste juures

Samas, kui tõsteti valgusintensiivsust lühiajaliselt (s.o NP mõõtmiste ajaks) PAR $30 \mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1} \rightarrow 400 \mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tõusid madalama pH juures (pH 7,7 ja 8,0) läbiviidud katsetes NP

kiirused (joonis 4.2.13), pH 8,3 juures jäi NP aga praktiliselt samaks. Siit võib järeldada, et eelmises peatükis mainitud madalate $400 \mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures mõõdetud NP väärtuste üheks põhjustajaks võiks olla ka kõrge pH-st põhjustatud CO_2 defitsiit, mis limiteerib fotosünteesi.

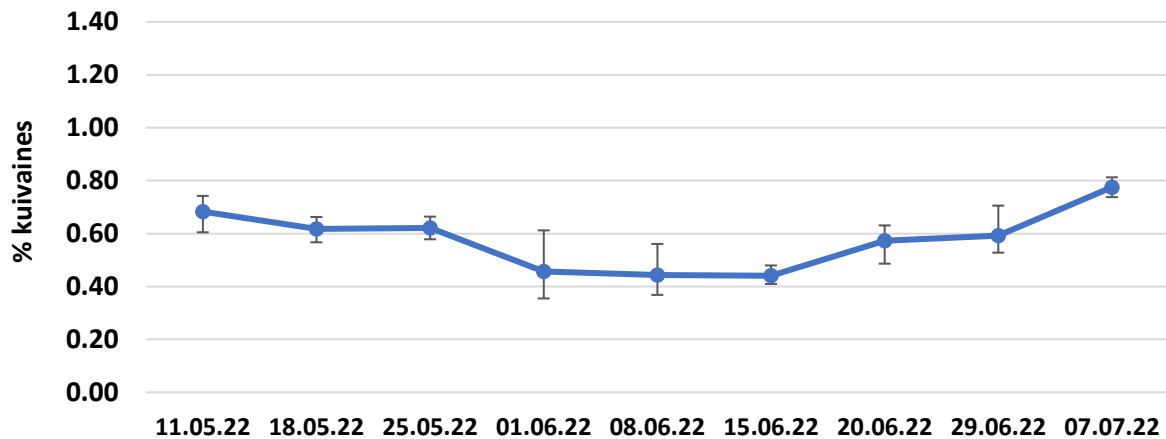


Joonis 4.2.13. Lühiajalisest valgusintensiivsuse tõusust ($30 \mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1} \rightarrow 400 \mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$) tingitud netofotosünteesi kiiruse tõus erinevate pH väärtuste juures.

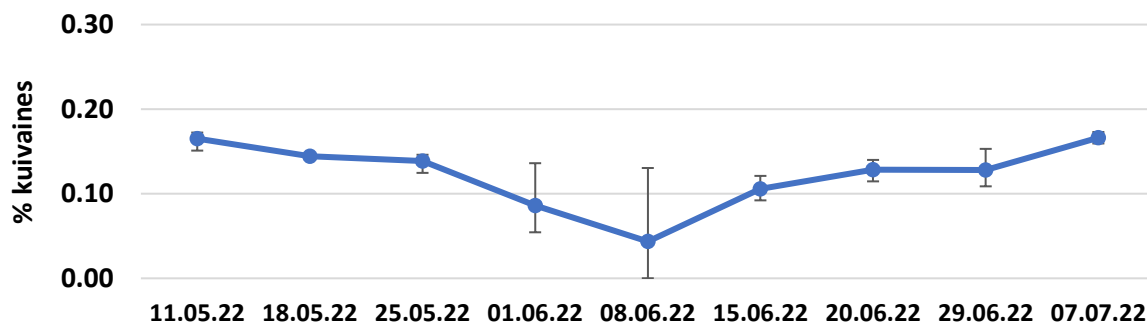
4.3. Toitainete mõju *C. tenuicorne* pigmentide sisaldusele ja produktsioonile

Katsevee toitainete sisalduse võimaliku mõju välja selgitamiseks *C. tenuicorne* pigmentide sisaldusele ja netofotosünteesile võrreldi kahe erineva toitainete sisalduse juures kasvatatud vetikat: 1× – ammonium (NH_4) $0,7 \mu\text{mool/l}$; nitraadid (NO_3) $0,7 \mu\text{mool/l}$ ja fosfaadid (PO_4) $0,15 \mu\text{mool/l}$; 2× – NH_4 $1,7 \mu\text{mool/l}$; NO_3 $1,7 \mu\text{mool/l}$ ja PO_4 $0,15 \mu\text{mool/l}$. Katsed viidi läbi PAR $30 \mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$ juures. Katseperioodi vältel (11.05.–07.07.2022) koguti regulaarselt vetikaproovid pigmentide analüüsiks ja viidi läbi netofotosünteesi mõõtmised.

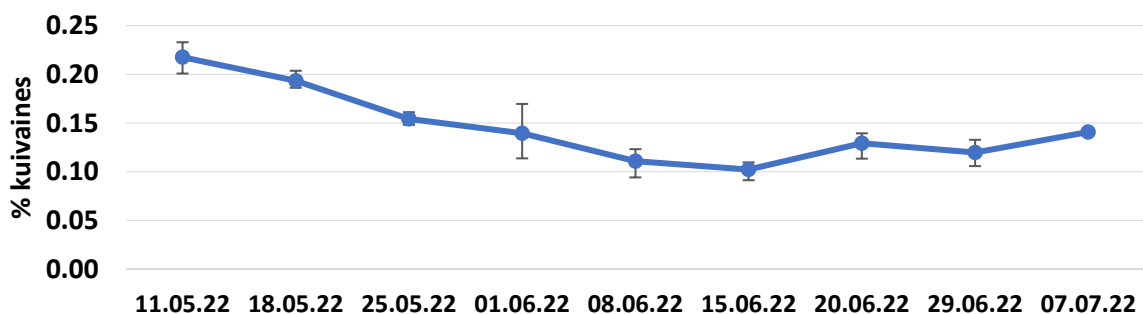
Pigmentide (fükoerütriini, allofükotsüaniini ja klorofüll a) sisalduse muutused katseperioodil on esitatud alljärgnevatel joonistel 4.3.1–4.3.6.



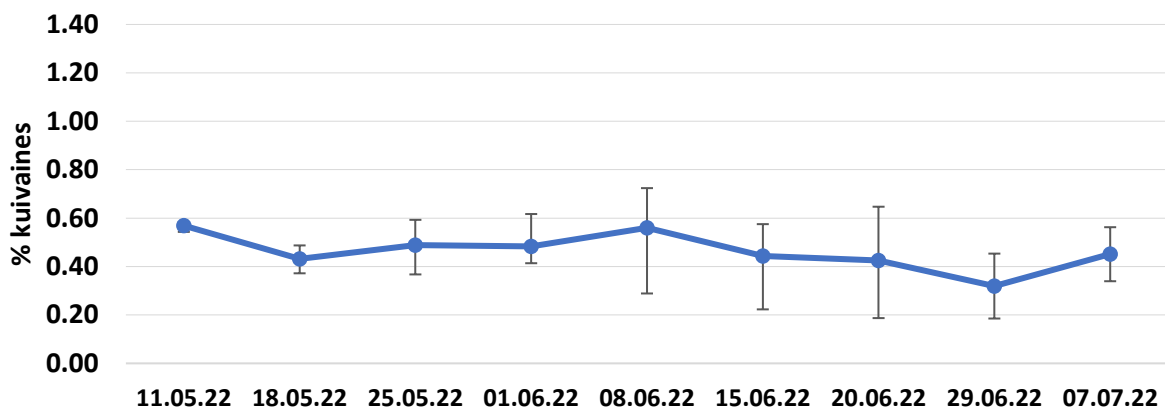
Joonis 4.3.1. Fükoerütriini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel katsevees, kus NH_4 0,7 $\mu\text{mool/l}$, NO_3 0,7 $\mu\text{mool/l}$ ja PO_4 0,15 $\mu\text{mool/l}$ ja PAR 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$



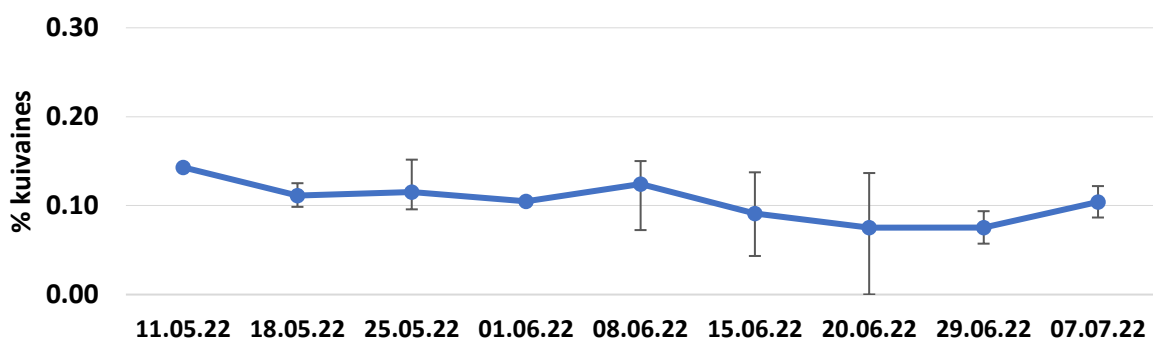
Joonis 4.3.2. Allofükotsüaniini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel katsevees, kus NH_4 0,7 $\mu\text{mool/l}$, NO_3 0,7 $\mu\text{mool/l}$ ja PO_4 0,15 $\mu\text{mool/l}$ ja PAR 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$



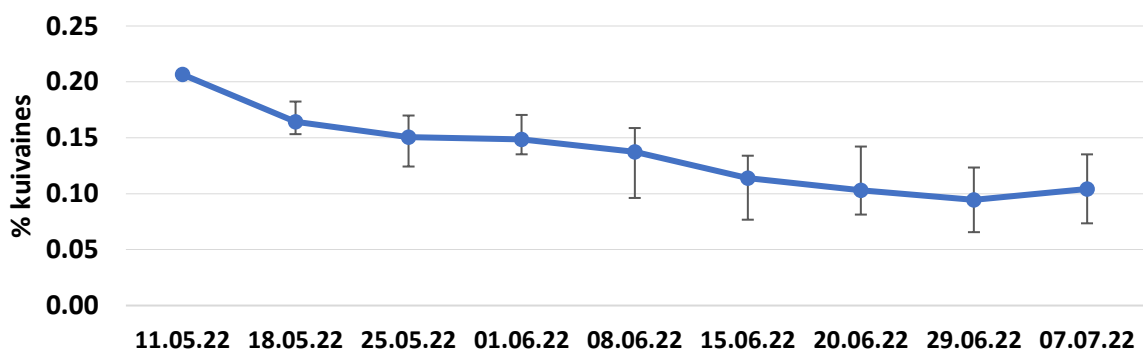
Joonis 4.3.3. Klorofüll a keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel katsevees, kus NH_4 0,7 $\mu\text{mool/l}$, NO_3 0,7 $\mu\text{mool/l}$ ja PO_4 0,15 $\mu\text{mool/l}$ ja PAR 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$



Joonis 4.3.4. Fükooerütriini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel katsevees, kus NH_4 1,4 $\mu\text{mool/l}$, NO_3 1,4 $\mu\text{mool/l}$ ja PO_4 0,15 $\mu\text{mool/l}$ ja PAR 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$

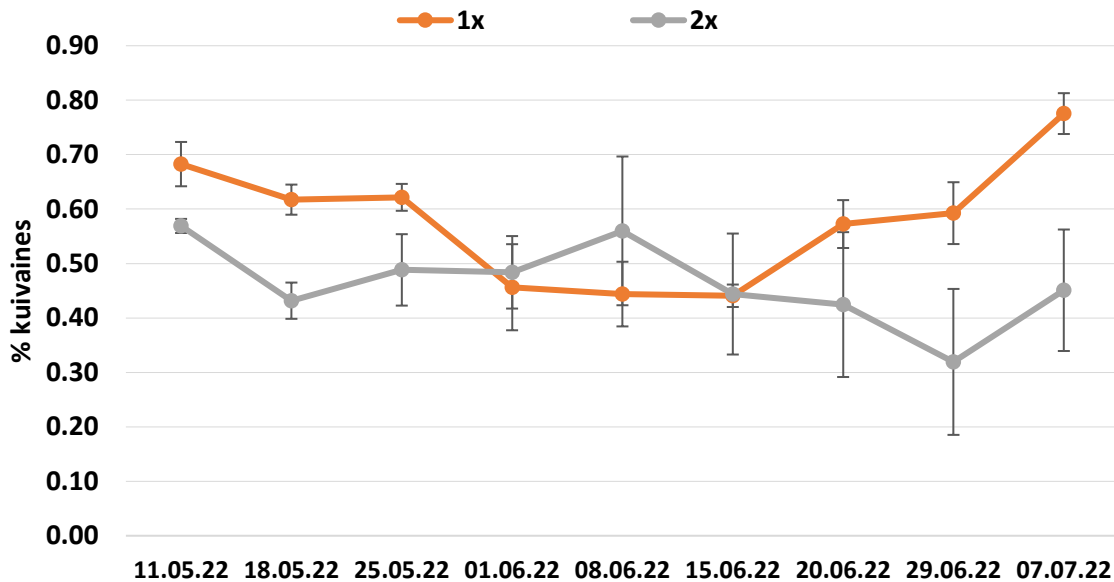


Joonis 4.3.5. Allofükotsüaniini keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel katsevees, kus NH_4 1,4 $\mu\text{mool/l}$, NO_3 1,4 $\mu\text{mool/l}$ ja PO_4 0,15 $\mu\text{mool/l}$ ja PAR 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$



Joonis 4.3.6. Klorofüll a keskmise, maksimaalse ja minimaalse sisalduse muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel katsevees, kus NH_4 1,4 $\mu\text{mool/l}$, NO_3 1,4 $\mu\text{mool/l}$ ja PO_4 0,15 $\mu\text{mool/l}$ ja PAR 30 $\mu\text{mool m}^{-2} \text{s}^{-1}$

C. tenuicorne fükoerütriini sisalduse võrdlus erineva katsevee toitainete (lämmastikuühendite) kontsentratsiooniga katsetes on esitatud joonisel 4.3.7.

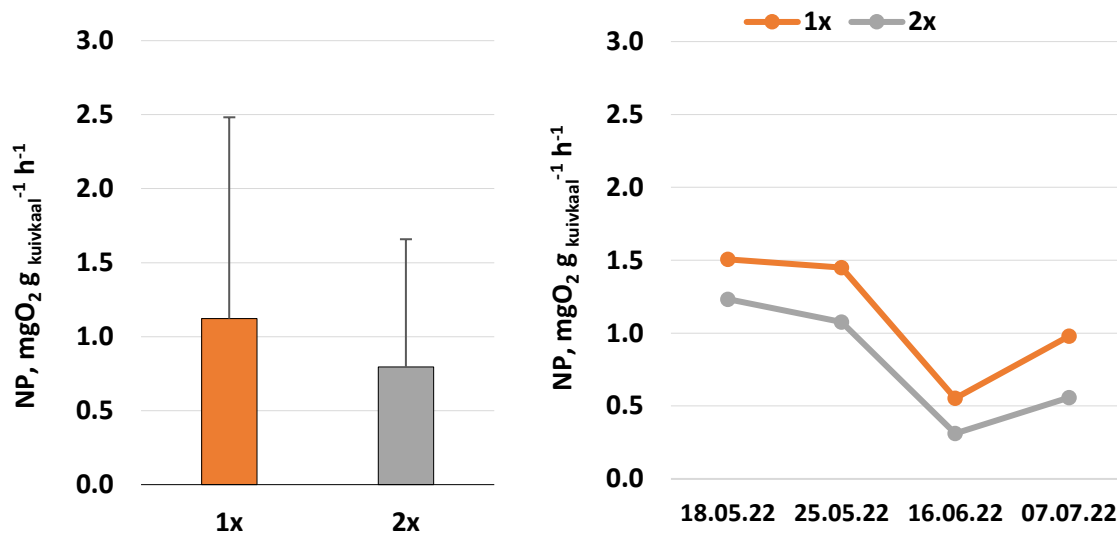


Joonis 4.3.7. Fükoerütriini sisalduse (keskmine \pm standardhälve) muutused katseperioodil *Ceramium tenuicorne* kasvatamisel erinevate toitainete kontsentratsioonide juures: 1x – NH₄ 0,7 μ mool/l, NO₃ 0,7 μ mool/l ja PO₄ 0,15 μ mool/l ja 2x – NH₄ 1,4 μ mool/l, NO₃ 1,4 μ mool/l ja PO₄ 0,15 μ mool/l

Tulemuste analüüs näitab statistiliselt olulist erinevust (ANOVA F=10,2624, p<0,005) *C. tenuicorne* fükoerütriini sisaldustes erineva toitainete kontsentratsiooniga katseseeriates. Kuna *C. tenuicorne* algne lämmastiku ja fosfori sisaldus vetikatalluses (kogutud 06.05.2022) oli suhteliselt kõrge, vastavalt 18,0 ja 2,58 mg/g kuivaines (võrdluseks 04.11.2021 oli algmaterjalisisaldused vastavalt ainult 2,24 ja 0,37 mg/g kuivaines), siis suure tõenäosusega jäi toitainete lisamisest katsevette tingitud efekt minimaalseks. Ka katseperioodi lõpus oli lämmastiku ja fosfori sisaldus *C. tenuicorne* talluses suhteliselt kõrge – kõrgema katsevee lämmastiku kontsentratsiooni puhul (2x) vastavalt 14,24 ja 1,89 mg/g kuivaines ning madalama katsevee lämmastiku kontsentratsiooni puhul (1x) vastavalt 12,26 ja 1,53 mg/g kuivaines. Märkimisväärselt madalam oli toitainete sisaldus kõrge valgusintensiivsuse juures (PAR 400 μ mool m⁻² s⁻¹) kasvatatud *C. tenuicorne* talluses, kus fosfori sisaldus langes katseperioodi lõpuks 0,93-le ja lämmastiku sisaldus 9,72 mg-le g kuivaines.

Kuna netofotosünteesi mõõtmised viidi läbi madala valgusintensiivsuse juures ja *C. tenuicorne* lämmastiku ja fosforisisaldus vetikatalluses oli nagu eelpool mainitud suhteliselt kõrge, siis

märkimisväärsed efekti netofotosünteesile (joonis 4.3.8) erineva toitainete sisaldusega katsevees kasvanud vetikatega läbiviidud katsetes ei tuvastatud (ANOVA, $F=4,3643$, $p=0,0662$).



Joonis 4.3.8. *Ceramium tenuicorne* katseperioodi keskmine ja maksimaalne netofotosünteesi (NP) kiirus (vasakpoolne joonis) ning NP kiiruse muutused katseperioodi erinevatel etappidel (parempoolne joonis) erinevate toitainete kontsentratsioonide juures: 1x – NH₄ 0,7 µmool/l, NO₃ 0,7 µmool/l ja PO₄ 0,15 µmool/l ja 2x – NH₄ 1,4 µmool/l, NO₃ 1,4 µmool/l ja PO₄ 0,15 µmool/l

4.4 Metoodilised soovitused *Ceramium tenuicorne* kasvatamiseks kunstlikes tingimustes

Tuginedes projekti raames läbi viidud kasvuesperimentide tulemuste analüüsile ja meie varasematele kogemustele vetikate kultiveerimisel esitame allpool rea metoodilisi soovitusi, mida tuleks kindlasti arvestada *Ceramium tenuicorne* kultiveerimise planeerimisel.

1) *Ceramium tenuicorne* algmaterjal

Kuna meetodika on välja töötatud kasutades looduslikest punavetika kooslustest kogutud vetikamaterjalil, siis osutus väga oluliseks vetika kogumise aeg, s.t *C. tenuicorne* kasvufaas ja sellest tingitult füsioloogiline seisund, pigmentide ja toitainete sisaldus vetikatalluses. Kõige sobivamaks osutus hilissügisel, s.o oktoobris-novembri alguses kogutud vetikas. Varakevadel kogutud vetikas on pigmentide, s.h fükoerütriini algne sisaldus reeglina suhteliselt madal 0,4–0,6% kuivainest, samas aga erinevalt sügisel kogutud vetikast, kõrge toitainete sisaldus (vt ptk 4.3). Kevadel kogutud *C. tenuicorne* pinnal võib esineda ka massiliselt ränivetikaid, mis võivad

tekitada kultiveerimissüsteemi sattudes probleeme katsevee kvaliteedile. Algmaterjali kogus valida vastavalt kasvuakvaariumide pinnale, s.o <math> < 25 \text{ g vetika (m\u00e4rgkaalus) } 100 \text{ cm}^2 \text{ pinna kohta}</math>. Looduslikest kooslustest kogutud *C. tenuicorne* transpordil on oluline transportimiseks kasuta mahuteid, mida on v\u00f6imalik aereerida ja vajadusel ka jahutada. Kuna *C. tenuicorne* tallus on v\u00e4ga \u00f5rn, siis tuleb v\u00e4ltida ka vetika talluse v\u00f6imalikke mehhaanilisi vigastusi transpordil.

2) Kultiveerimiskeskond

Soovituslik temperatuur 10 °C, k\u00f6rgem temperatuur p\u00f5hjustas katseperioodi m\u00e4rkimisv\u00e4ärset l\u00fchenemist ja *C. tenuicorne* lagunemisprotsesside varajast k\u00e4ivitumist.

Toitainete sisalduse valikul tuleb l\u00e4htuda vetikamaterjali l\u00e4mmastiku ja fosfori sisaldusest. Varakevadel kogutud materjali puhul on soovituslik ammooniumi, nitraatide ja fosfaatide kontsentratsioon katsevees vastavalt NH_4 0,7–1,4 $\mu\text{mool/l}$, NO_3 0,7–1,4 $\mu\text{mool/l}$ ja PO_4 0,15–0,2 $\mu\text{mool/l}$. Hiliss\u00fcgisel kogutud vetikamaterjalis, kus reeglina on vetikatalluses l\u00e4mmastiku ja fosfori sisaldus m\u00e4rkimisv\u00e4\u00e4rseilt madalam v\u00f6ib kasutada vastavalt k\u00f6rgemaid toitainete kontsentratsioone NO_3 2,0–3,0 $\mu\text{mool/l}$ ja PO_4 0,4–0,5 $\mu\text{mool/l}$.

CO₂ defitsiidi v\u00e4ltimiseks katsevees on soovituslik lisaks katsevee pidevale aereerimisele kontrollida pH taset katsevees, eriti k\u00f6rgemate valgusintensiivsuste ($\text{PAR} > 90 \mu\text{mool m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ja vajadusel ($\text{pH} < 8$) rikastada vett s\u00f5sihappegaasiga.

Valgustingimused kultiveerimise l\u00e4biviimiseks s\u00f5ltuvad eesm\u00e4rgist – k\u00f6rge f\u00fckoer\u00fctriini jt pigmentide saagise saavutamiseks tuleb vetikat inkubeerida madala valgusintensiivsuse juures, s.o $\text{PAR } 20\text{--}30 \mu\text{mool m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, samas biomassi juurdekasvu kiirendamiseks on vajalik m\u00e4rkimisv\u00e4\u00e4rseilt k\u00f6rgemad valgusintensiivsused $>90 \mu\text{mool m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Ka l\u00fchেম valgusts\u00fckkel, nt 8:16 (valge/pime) soodustab pigmentide s\u00fcnteesi, samas produktsioon (biomassi juurdekasv) on k\u00f6rgem valgusts\u00fckli 14:10 juures.

4.5 Hinnang v\u00e4lja t\u00f5\u00f5tatud *Ceramium tenuicorne* kasvatamistehnoloogiale ja selle edasi arendamise v\u00f6imalused

Projekti peamiseks eesm\u00e4rgiks oli v\u00e4lja t\u00f5\u00f5tada spetsiaalne kultiveerimismetoodika, mis sobiks punavetika *Ceramium tenuicorne* kasvatamiseks liigile optimaalsetes kunstlikes kasvu-

tingimustes ja mis võimaldaks kasvatatud biomassi väärimist, s.o kõrgepuhta fükoerütriini eraldamiseks vajaliku kvaliteedi saavutamist (võimalikult kõrge fükoerütriini saagis).

Meie poolt välja töötatud meetodika võimaldab manipuleerides eelkõige valgustingimustega tõsta märkimisväärselt *C. tenuicorne* fükoerütriini sisaldust suhteliselt lühikese kasvuperioodi (6–8 nädalat) jooksul (joonis 4.5.1). Projektis saavutatud fükoerütriini saagist 2% kuivainest punavetika *C. tenuicorne* talluses võib lugeda väga kõrgeks, ületades looduslikes kooslustes kasvava vetika maksimaalse pigmendisisalduse 2-kordselt. Seega võib eesmärgi lugeda saavutatuks.



Joonis 4.5.1. *Ceramium tenuicorne* proovid, kasvatatud erinevates valgustingimustes.

Samas jäi juurdekasvu kiirus meie katsetes sarnaseks looduslike *C. tenuicorne* kooslustega. Praegusel kujul sobikski välja töötatud meetodika pigem loodusliku vetikamaterjali pigmendisisalduse tõstmiseks, kasvatades seda lühiajaliselt kunstlikes kontrollitud valgusintensiivsusega tingimustes.

Meetodika vääriks seega kindlasti edasi arendamist, kusjuures põhirõhk peaks olema suunatud eelkõige *C. tenuicorne* vegetatiivsele paljundamisele, et oleks võimalik katsetes kasutada kunstlikes tingimustes ettekasvatatud vetikamaterjali (joonis 4.5.2).

Teiseks edasiarendamise suunaks võiks olla *C. tenuicorne* nn ettekasvatamine meres (biomassi juurdekasv) ja saadud biomassis fükoerütriini sisalduse tõstmine, kasutades välja töötatud meetodikat, kontrollitud sisetingsimustes.



Joonis 4.5.2. *C. tenuicorne* tallusetükikeste kasvatamine kunstlikes tingimustes (pilootkatse)

5. Summary

The project „**Development of cultivation technology for *Ceramium tenuicorne* to obtain biomass suitable for extraction of red pigment phycoerythrin of analytical grade purity**“ (01/09/2020 – 31/12/2022) was funded by European Maritime and Fisheries Fund.

Ceramium tenuicorne (Ceramiales, Rhodophyta) is widely distributed red macroalgal species in the Baltic Sea. The species has lately earned increased attention as a potential source of highly valued bioactive compounds, first for extraction of the red pigment R-phycoerythrin of analytical grade purity, which is commonly used for its fluorescence properties in biochemistry and as a marker in cell studies. As a part of the development of technology suitable for land-based cultivation of *C. tenuicorne* laboratory experiments to test the effects of light on pigment content and net photosynthetic rate were carried out. The aim of this study was the optimization of cultivation conditions to obtain biomass which quality is suitable for the extraction of the pigment (high content of R-phycoerythrin) and provide high growth rate of the species. The results showed that at low incubation irradiances (PAR 20-30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) the R-phycoerythrin contents of *C. tenuicorne* were significantly, up to three times higher compared to higher irradiances (PAR >90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The opposite effect of irradiance was revealed for the net photosynthesis of *C. tenuicorne*, i.e., over two times lower net photosynthesis rates at above mentioned low light conditions compared to higher incubation irradiance were obtained. Meanwhile, using blue light instead of white in experiments performed at higher irradiances remarkably enhanced the R-phycoerythrin contents of *C. tenuicorne* but reduced the net photosynthetic rates to a certain extent. Thus, further optimization of cultivation conditions will be needed to refine the biomass and increase the economic potential of *C. tenuicorne*.



6. KASUTATUD KIRJANDUS

- Albert G, Hepburn CD, Pajusalu L, Paalme T, Pritchard DW, Martin G (2020) Could ocean acidification influence epiphytism? A comparison of carbon-use strategies between *Fucus vesiculosus* and its epiphytes in the Baltic Sea. *Journal of Applied Phycology* 32: 2479-2487.
- Amano H, Noda H (1987) Effect of nitrogenous fertilizers on the recovery of discoloured fronds of *Porphyra yezoensis*. *Botanica Marina* 30: 467-473.
- Barbier M, Charrier B, Araujo R, Holdt SL, Jacquemin B, Rebours C (2019) PEGASUS - PHYCOMORPH European Guidelines for a Sustainable Aquaculture of Seaweeds, COST Action FA1406, Roscoff, France.
- Bergström L, Bruno E, Eklund B, Kautsky L (2003) Reproductive strategies of *Ceramium tenuicorne* near its inner limit in the brackish Baltic Sea. *Botanica Marina* 46: 125-131.
- Bergström L (2005) Macroalgae in the Baltic Sea: responses to low salinity and nutrient enrichment in *Ceramium* and *Fucus*. PhD Thesis, Umeå University.
- Bergström L, Kautsky L (2005) Local adaption of *Ceramium tenuicorne* (Ceramiales, Rhodophyta) within the Baltic Sea. *Journal of phycology* 42: 36-42.
- Bird KT, Habig C, DeBusk T (1982) Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 18: 344-348.
- Bäck S, Likolammi M, 2004. Phenology of *Ceramium tenuicorne* in the SW Gulf of Finland, northern Baltic Sea. *Annales Botanici Fennici* 41: 95-101.
- Chaloub RM, Motta NMS, de Araujo SP, de Aguiar PF, da Silva AF (2015) Combined effects of irradiance, temperature and nitrate concentration on phycoerythrin content in the microalga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae). *Algal research* 8: 89-94.
- Hiroyuki M, Yasuhiro S, Hajime Y (2002) Relationship between phycoerythrin and nitrogen content in *Gloiopeltis furcata* and *Porphyra yezoensis*. *Algae* 17: 89-93.
- Grasshoff K, Kremling K, Ehrhardt M (Eds.) (1991) *Methods of seawater analysis*. John Wiley & Sons.
- Koch M, Bowes G, Ross C, Zhang XH (2013) Climate change and ocean acidification effects on seagrasses and marine macroalgae. *Global change biology* 19: 103-132.

Lapointe BE (1981) The effects of light and nitrogen on growth, pigment content, and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* v. *angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 17: 90-95.

Neish AC, Shacklock PF, Fox CH, Simpson FJ (1977) The cultivation of *Chondrus crispus*. Factors affecting growth under greenhouse conditions. *Canadian Journal of Botany* 55: 2263-2271.

Nielsen R, Kristiansen A, Mathiesen L, Mathiesen H (1995) Distributional index of the benthic marine macroalgae of the Baltic Sea area. *Acta Botanica Fennica* 155: 1-70.

Paalme T (2005) Nuisance brown macroalga *Pilayella littoralis*: primary production, decomposition and formation of drifting algal mats. PhD Thesis, University of Tallinn.

Ramus J, Beale S, Mauzerall D, Howard KL (1976a) Changes in photosynthetic pigment concentration in seaweeds as a function of water depth. *Marine Biology* 37: 223-229.

Ramus J, Beale S, Mauzerall D (1976b) Correlation of changes in pigment content with photosynthetic capacity of seaweeds as a function of water depth. *Marine Biology* 37: 231-238.

Raven JA, Ball LA, Beardall J, Giordano M, Maberly SC (2005) Algae lacking carbon-concentrating mechanisms. *Canadian Journal of Botany* 83: 879-890.

Raven JA, Beardall J, Giordano M (2014) Energy costs of carbon dioxide concentrating mechanisms in aquatic organisms. *Photosynthesis Research* 121: 111-124.

Rico JM, Fernández C (1996) Seasonal nitrogen metabolism in an intertidal population of *Gelidium latifolium* (Gelidiaceae, Rhodophyta). *European Journal of Phycology* 31: 149-155.

Rueness, J., Gabrielsen, T. M., Düwel, L. (2002) Observations on *Ceramium tenuicorne* (Rhodophyta) and its reproduction. *Cryptogamie Algologie* 23: 251-261.

Saluri M, Kaldmäe M, Tuvikene R (2019) Extraction and quantification of phycobiliproteins from the red alga *Furcellaria lumbricalis*. *Algal Research* 37: 115-123.

Saluri M, Kaldmäe M, Tuvikene R (2020) Reliable quantification of R-phycoerythrin from red algal crude extracts. *Journal of Applied Phycology* 32: 1421-1428.

Trei T (1991) Taimed Läänemere põhjal. Tallinn: Valgus. 143 lk



TARTU ÜLIKOOL



Toetuse saaja: Tartu Ülikool

Tartu Ülikooli esindaja: Siret Rutiku, grandikeskuse juhataja

/allkirjastatud digitaalselt/

Vastutav täitja: Tiina Paalme

tiina.paalme@ut.ee