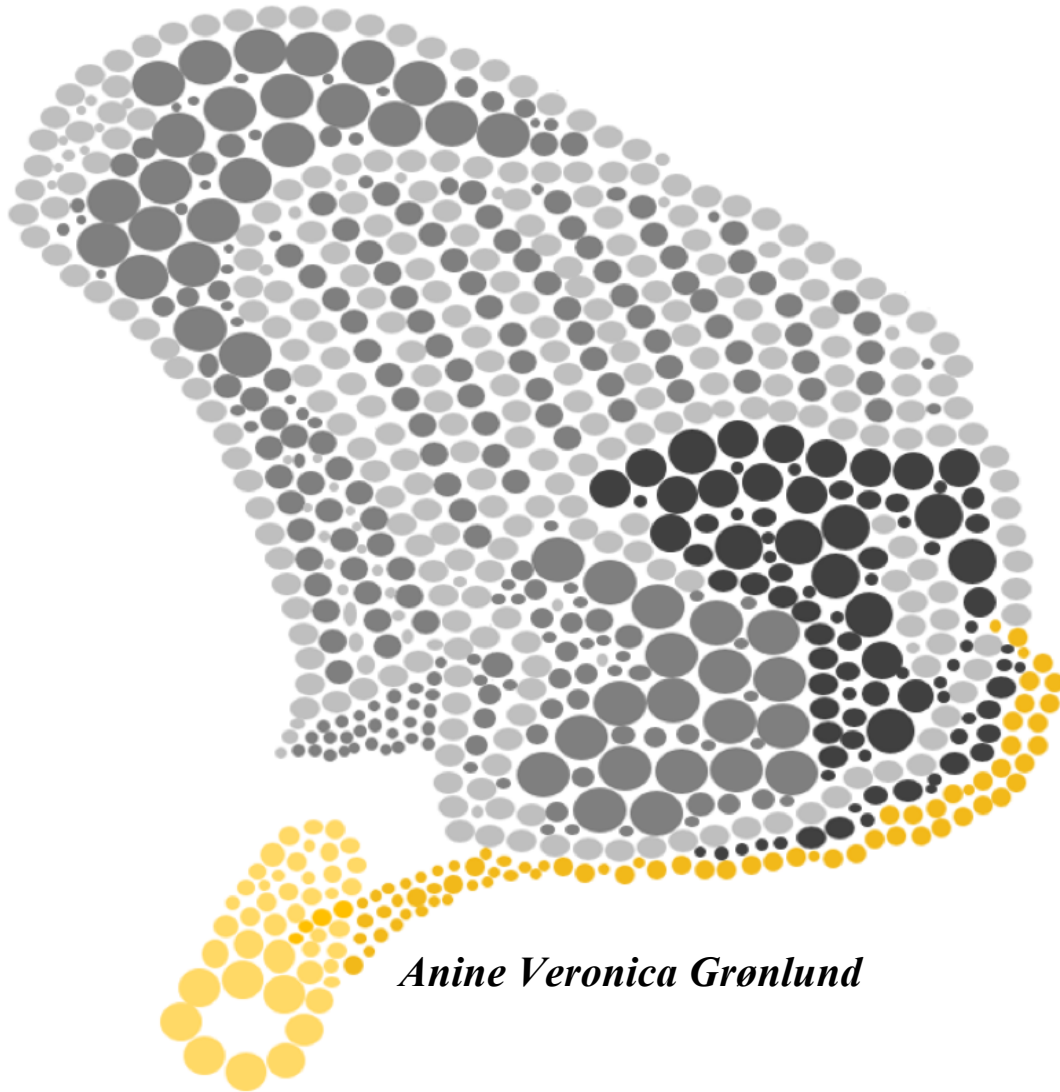


# Trofiske interaksjoner mellom appendicularia (halesekkdyr) og marine virus

*Konsekvens for virus diversitet, spredning og persistens*



*Anine Veronica Grønlund*

Master of Science  
Institutt for biologi  
Mikrobiologi  
Vår 2018



UNIVERSITETET I BERGEN

© Anine Veronica Grønlund

2018

Trofiske interaksjoner mellom appendicularia (halesekkdyr) og marine virus – konsekvens for virus diversitet, spredning og persistens.

Illustrasjon: Anine Veronica Grønlund ©

# Sammendrag

Appendikularien *Oikopleura dioica* (Chordata:Tunicata) er en marin mesozooplanktonisk organisme som bruker geléaktige "hus" til å fange mikroskopiske matpartikler fra sjøvann. Tidligere observasjoner av appendikularier har ført til spekulasjoner om hvorvidt det nokså spesielle filtreringsapparatet til *O. dioica* har blitt såpass spesialisert på å effektivt fange små partikler at det også fanger viruspartikler som varierer i størrelse fra noen nanometer til nesten en mikrometer i diameter. Dersom dette skjer kan det medføre konsekvenser for viruskonsentrasjonen, diversiteten og persisteringen i det marine miljøet. Målet for dette masterprosjektet var derfor å avdekke/kvantifisere interaksjonen mellom *O. dioica* og et viktig marint algevirus *Emiliana huxleyi virus* (EhV). Flowcytometri ble brukt for å bestemme filtreringsselektiviteten og filtrasjonsraten for EhV, samt frigjøring av EhV-partikler fanget over tid fra hus og fekalpellets. Til sist ble også nedbrytningsraten av hus og fekalpellets undersøkt ved hjelp av en lysmikroskopisk bildeserie. Filtrasjonsraten for dag 5 dyr av *O. dioica* ble funnet til å være  $0.013 \pm 0.004$  mL EhV individ<sup>-1</sup> dag<sup>-1</sup>, mens dag 3 og 4 dyr ikke visste målbar filtrering av EhV. Dette ga en filtreringseffektivitet på 1.1 % for dag 5 dyrene. Det tyder derfor på at selv om det kan observeres en filtrasjon av EhV for dag 5 dyrene, er EhV en relativ liten del av den totale beitingen til *O. dioica*. Til tross for dette, kan en observerbar filtrasjon av EhV tyde på en sammenkobling av det mikrobielle næringsnettets og den klassiske marine næringskjeden. En total nedbrytning av fekalpellets ble funnet etter ~48 dagers inkubering i mørke ved 8°C, mens det ikke ble observert en total nedbrytning av *O. dioica* hus etter 64 dagers inkubering. Sammen med en nedbrytningshastighet på >4 uker for EhV-partikler, kan hus og fekalpellets være med på å øke persistens og spredning av EhV.

**NØKKELOD:** Zooplankton, *Oikopleura dioica*, *Emiliana huxleyi virus*, virusfortæring, virusfangst, filterføring, filtrasjonsrate, filtreringseffektivitet, filterhus, fekalpellets og flowcytometri.

# Summary

The appendicularian *Oikopleura dioica* (Chordata:Tunicata) is a mesozooplanktonic marine organism that utilizes a gelatinous house to effectively trap microscopic particles from seawater. Earlier observations of the ultrastructure of appendicularian houses has led to the speculation that the distinct filtration apparatus of *O. dioica* has become so specialized at filtering small particles that it can theoretically also trap virus particles. If this occurs then it may have consequences for virus abundance, diversity and persistence in the marine environment. The goal of this master thesis is therefore to reveal/quantifying the importance of the interaction between *O. dioica* and a cosmopolitan marine virus, the *Emiliana huxleyi* virus (EhV). Flow cytometry was used to measure the filtration selectivity and clearance rate for EhV, as well as the release of ingested EhV particles over time from houses and faecal pellets. Finally, the rate of *O. dioica* house and faecal pellet degradation was observed using time series light microscopy. The clearance rate for day 5 animals of *O. dioica* was determined to be  $0.013 \pm 0.004$  mL EhV individual<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, while day 3 and 4 animals showed no filtration for EhV. This gave a filtration efficiency of 1.1 % for day 5 animals. This indicates that although a filtration of EhV can be observed for the day 5 animals, the measurements indicate that EhV is a small fraction of the total consumption by *O. dioica*. In spite of this, an observable filtration of EhV may indicate a connection of the microbial loop and the classical marine food web. A total degradation of faecal pellets was found after ~48 days of incubation in the dark at 8°C, while no complete degradation of *O. dioica* houses was observed after 64 days of incubation. Together with a degradation rate of >4 weeks for EhV particles, houses and faecal pellets could help increase the survival and proliferation of EhV.

**KEYWORDS:** Zooplankton, *Oikopleura dioica*, *Emiliana huxleyi* virus, virus consumption, virus trapping, filter-feeding, clearance rate, filtration efficiency, houses, faecal pellets and Flow cytometry.

# Forord

Først vil jeg takke mine veiledere Jessica Louise Ray, Ruth-Anne Sandaa og Eric Thompson for en spennende oppgave og ikke minst for gode forklaringer på mine 3643 spørsmål. Tusen takk for gode tilbakemeldinger på oppgaven og uvurderlig hjelp. Jeg vil også takke Janice Lawrence og Marius Saltvedt, samt veilederne for en uvurderlig innsats under de hektiske forsøksdagene. Takk skal også rettes til Elzbieta Petelenz-Kurdziel og Hilde Stabell for hjelp og opplæring på lab. Spesielt når noen av flowcytometerprøvene mine gjemte seg i nitrogentanken. Samt vil jeg også takke Gunnar Bratbak for opplæring på inversmikroskopet og Joachim Paul Töpfer for hjelp med beregninger og R. Jeg vil også takke de snille damene på Appypark: Kjerstin Nøkling og Anne Aasjord for strålende opplæringen i hvordan jeg skulle ta vare på mine 9000 små søte fosterbarn (Figur 1). Takk til alle studiekamerater for å ha gjort denne studietiden til en drøm med latter, gleder, motivasjon og et snev av tårer. Takk skal også rettes mot øvrige familie som har støttet meg under hele denne perioden. Dere er fantastiske! Til sist og aller viktigst vil jeg takke min kjære pappa. Du var en uendelig snill, morsom, sterk, støttende og utrolig sta person. Rett og slett helt unik. Det går ikke et sekund uten at jeg savner deg og du er grunnen til at jeg har kommet hit i dag. Du har lært meg alt du kunne og av det er jeg evig takknemlig. Derfor vil jeg dedikere denne oppgaven til deg.



Figur 1. Opplæring på dyrkningsfasiliteten til SARS senter for marin molekylær-biologi ved UIB ("Appypark"). © Jessica Louise Ray.

*Til minne om*

*Roar Andreas Grønlund Magnussen 16.11.1996-18.11.2016*

# Forkortelser

<b>A+/V+</b>	Forsøksbeger tilsatt både <i>Oikopleura dioica</i> og <i>Emiliana huxleyi</i> virus
<b>A+/V-</b>	Forsøksbeger tilsatt <i>Oikopleura dioica</i> , men ikke <i>Emiliana huxleyi</i> virus
<b>A-/V+</b>	Forsøksbeger tilsatt <i>Emiliana huxleyi</i> virus, men ikke <i>Oikopleura dioica</i>
<b>A-/V-</b>	Forsøksbeger tilsatt verken <i>Oikopleura dioica</i> eller <i>Emiliana huxleyi</i> virus
<b>ANCOVA</b>	Kovariansanalyse
<b>ANOVA</b>	Variansanalyse
<b>Dag 1-5 dyr av <i>O. dioica</i></b>	Referer til <i>Oikopleura dioica</i> tidsbestemte alder som er i samsvar med ulike utviklingsstadier for dyrene.
<b>DF</b>	Frihetsgrader
<b>DNA</b>	Deoksyribonukleinsyre
<b>EhV</b>	<i>Emiliana huxleyi</i> virus
<b>FCM</b>	Flowcytometri
<b>MPN</b>	Mest sannsynlig antall analyse
<b>N</b>	Utvalgsstørrelse
<b>SD</b>	Standardavvik
<b>T0-T12</b>	Prøvetakingstidspunkt fra forsøksstart (T0) med en økning på 60 minutter for hvert hele tall (T1-T12)
<b>V+</b>	Tilsatt <i>Emiliana huxleyi</i> virus etter prøvetakning

# Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon .....	1
1.1	Appendicularia .....	1
1.1.1	<i>Oikopleura dioica</i> .....	1
1.2	Marine virus .....	5
1.2.1	<i>Emiliana huxleyi</i> virus (EhV) .....	9
1.3	Interaksjonen mellom <i>Emiliana huxleyi</i> virus (EhV) og <i>Oikopleura dioica</i> .....	10
1.4	Fokuset for masteroppgaven .....	10
2	Materiale og metode .....	12
2.1	Dyrkning av <i>Oikopleura dioica</i> .....	12
2.1.1	Dyrkningssystemet .....	13
2.1.2	Dag 1 dyr .....	16
2.1.3	Dag 2 dyr .....	17
2.1.4	Dag 3, 4 og 5 dyr .....	18
2.1.5	Gyte .....	19
2.2	Dyrkning av <i>Emiliana huxleyi</i> virus (EhV) .....	20
2.2.1	Dyrkning av verten, mikroalgen <i>Emiliana huxleyi</i> .....	20
2.2.2	Dyrkning av algeviruset EhV .....	20
2.2.3	Flowcytometri (FCM) .....	21
2.3	Eksperimentelt design og prøvetakning .....	22
2.3.1	Bestemmelse av filtrasjonskurve til <i>Oikopleura dioica</i> .....	22
2.3.2	Filtrasjonsrate, infeksiositet og persistens av <i>Emiliana huxleyi</i> virus (EhV) ..	23
2.3.3	Måling av filtrasjonsrate og filtreringseffektivitet til <i>Oikopleura dioica</i> .....	26
2.4	Skjebnen til virus fanget i hus og fekalpellets .....	29
2.4.1	Kontroll av vaskeprosessen .....	29
2.4.2	MPN-analyser .....	30
2.4.3	Visualisering av nedbrytningsprosessen for hus og fekalpellets .....	32
3	Resultater .....	34
3.1	Filtrasjonskurve .....	34
3.2	Filtrasjonsraten og filtreringseffektiviteten .....	35
3.2.1	Filtrasjon .....	37
3.2.2	Filtrasjonsraten .....	40

3.2.3	Filtreringseffektiviteten.....	42
3.3	Viruspersistens og virusinfeksiositet i <i>Oikopleura dioica</i> hus og fekalpellets .....	43
3.3.1	Nedbrytning av <i>Emiliana huxleyi</i> virus (EhV) partikler.....	44
3.4	Nedbrytning av <i>Oikopleura dioica</i> hus og fekalpellets .....	46
4	Diskusjon .....	49
4.1	Filtrasjonsraten for <i>Emiliana huxleyi</i> virus av <i>Oikopleura dioica</i> .....	50
4.2	Effekten av nedbrytningshastigheten til <i>Oikopleura dioica</i> hus og fekalpellets på virusøkologi .....	54
4.3	Veien videre .....	59
5	Konklusjon.....	61
	Kilder og litteratur.....	62
	Vedlegg A: Protokoll FCM.....	68
	Vedlegg B: IMR medium.....	73



# 1 Introduksjon

## 1.1 Appendicularia

Appendikularier (Chordata:Tunicata) er fritt svømmende pelagiske tunikater som er blant de høyst forekommende av zooplanktonene (R. Fenaux, Q. Bone, & D. Deibel, 1998). De befinner seg i en rekke havområder fra overflaten og ned til over 2000 m havdyp med høyest forekomst i varme havområder i den eufotiske sonen (R. Fenaux et al., 1998). Som voksne består appendikulariene av en kropp med en muskuløs bevegelig hale som er støttet opp av en ryggstreng. På oversiden av halen sammen med ryggstrengen ligger også en nervestreng. Kroppen er vanligvis 1-8 mm i lengde, mens halen kan være betydelig lengre (R. Fenaux et al., 1998). Til sammen kan appendikularienes lengde være fra noen få millimeter til hele 8-9 cm medberegnet halen (R. Fenaux et al., 1998). Ratioen mellom kroppen og halen kan variere mellom familiene, men også mellom arter. Blant de mer uvanlige særtrekkene som finnes blant appendikulariene er deres korte livssyklus som kan være ned til 24 timer i varme havområder, samt sekresjonen av ekstracellulære hus (L. Z. Holland, 2016). Huset som sekreteres av ektodermcellene innkapsler dyrene og har som funksjon å filtrere matpartikler samt å gi oppdrift (L. Z. Holland, 2016). Husene som kan bli opp til 30 cm i diameter for noen arter (L. Z. Holland, 2016) består av en rekke nivåer av filtre. Filtrene har ulike størrelse slikt at matpartiklene som når fram til munnen av dyret er tilpasset til deres størrelseskapasitet. På grunn av deres bemerkelsesverdige filtrasjonssystem og raske generasjonstid spiller de en viktig trofisk rolle i den marine næringskjeden (R. Fenaux et al., 1998). Husets videre avanserte struktur, morfologi og størrelse er avhengig av dyrets slekt. Appendikularier blir delt inn i tre familier Oikopleuridae, Fritillariidae og Kowalevskiidae (R. Fenaux et al., 1998). Den førstnevnte familien består av blant annet arten *Oikopleura dioica* som har vekket interesse for dette prosjektet.

### 1.1.1 *Oikopleura dioica*

*Oikopleura dioica* er en mesozooplanktonisk organisme som finnes i marine miljøer over hele verden (G. Gorsky, M. J. Chrétiennot-Dinet, J. Blanchot, & I. Palazzoli, 1999), både i

tempererte og varmere havområder samt i både pelagiske og kystnære havområder. *O. dioica* er også blant de mest tallrike artene av dyreplankton sammen med hoppekreps (F. Delsuc, H. Brinkmann, D. Chourrout, & H. Philippe, 2006). I fremre part av kroppen finnes vitale organer som mage-tarmkanalen og munnåpningen, mens bakre del hovedsakelig består av organismens kjønnsorganer. Fra kroppen strekker det seg ut en lang, flattrykt svømmehale som er avstivet av en ryggstreng og er 6-7 ganger lengre enn kroppen. På ryggsiden av halen finnes kraftige muskler og en nervestreng som brukes til å skape sinusbevegelser på halen med en frekvens på ~10 Hz (R. Fenaux et al., 1998). Halebevegelsene skaper en svømming bakover samtidig som den fører en strøm i vannet gjennom selvproduserte ekstracellulære hus.

Spesielt for *O. dioica* er at det er den eneste kjente arten av appendikulariene som er ikke-hermafroditisk diøsis (definisjon: har både hundyr og handyr). De har også en eksepsjonell kort generasjonstid på omtrent 6 dager ved 15°C (C.

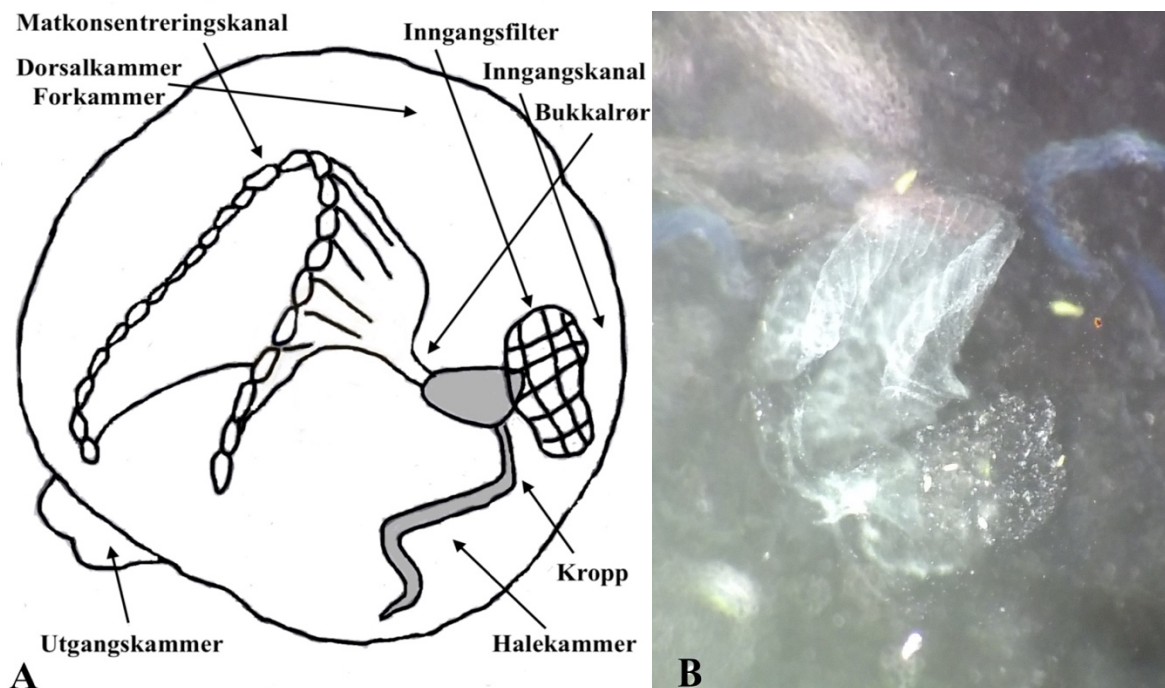
Troedsson, J. Bouquet, D. Aksnes, & E. Thompson, 2002). Først ved dag 6 blir *O. dioica* kjønnsmodne (Figur 2). Da svømmer hundyrene og handyrene opp mot vannoverflaten for en ekstern fertilisering. Under fertiliseringen slippes gametene løs ved at gonadene til de kjønnsmodne dyrene sprekker. Fertiliseringen av *O. dioica* er derfor en vital affære med døden som følge. For hvert hundyr produseres det omtrent 300 egg (C. Troedsson et al., 2002). Dette gir en høy fruktbarhet med rask populasjonsvekst når matforholdene er gode. Dette sees særlig under algeoppblomstringer (C. Troedsson et al., 2002). Fra befruktningen inntreffer kan det ta så kort tid som fire timer før en fri svømmelarve kan observeres (H. Nishida, 2008; S. Fujii, T. Nishio, & H. Nishida, 2008). Videre vokser kroppen til *O. dioica* fra ca. 200 µm til 1000 µm mellom dag 1 (utklekking) og dag 6 (reproduksjon) ved 15°C (C. Troedsson, P. Ganot, J. Bouquet, D.



Figur 2. Hun- og handyr av *Oikopleura dioica* uten hus. Hundyrene er hvite med sirkulære skinnende egg på innsiden av kroppen, mens handyrene oppnår en eggeplommegul farge. © Anine Veronica Grønlund.

Aksnes, & E. Thompson, 2008). Kroppen til *O. dioica* har en ellipsoid form som forblir fullstendig gjennomsiktig gjennom hele livssyklusen.

De geléaktige husene til *O. dioica* danner en sfærisk form med bilateral symmetri som kan endres av utfra halebevegelsen (Figur 3). Husene til et fullvoksent *O. dioica* individ er omtrent 4 mm i diameter og består av glykopolysakkarider, mukopolysakkarider og cellulose (R. Fenaux et al., 1998). Hensikten bak disse husene er å fange og konsentrere matpartikler i sjøvannet (E. M. Thompson, T. Kallesoe, & F. Spada, 2001; F. Spada et al., 2001; S. Kimura, C. Ohshima, E. Hirose, J. Nishikawa, & T. Itoh, 2001). Vannet blir filtrert inn i huset gjennom to symmetriske innganger på hver sin side av huset. Inngangene er dekket av mobile membranklaffer som beveger seg i forhold til vannstrømmen (R. Fenaux, 1986). Like innenfor inngangen ligger det første filteret som består av rektangulære masker som måler 30 x 100  $\mu\text{m}$  hos store individer av *O. dioica*. Fra inngangsfileret går vannet videre til halekammeret, som er en aksial kanal under dyrets kropp og inneholder halen. Fra enden av halekammeret går vannet videre til en matkonsentreringskanal. Denne kanalen er formet som to symmetriske vinger som går helt fram til dyrets munn via bukkalrøret. I kanalen finnes det to ark laget av et løst nettverk av rektangulære masker som består av filamenter som innrettet vekselvis parallelt og vinkelrett på korrugeringene (firkantmønster). Det har ikke blitt observert at det forgår en filtrering i det ytterste arket, men det indre arket er et filter (R. Fenaux, 1986). Fra bukkalrøret finnes det en passasje videre til dorsalkammeret, som befinner seg i den øvre delen av huset mellom de to vingene, og er det største av husets 4 kamre. Sammen med dorsalkammeret sitter det også et forkammer som har til hensikt å stabilisere det hydrostatiske trykket i huset. Det har ikke blitt observert at det er en direkte forbindelse mellom dorsalkammeret og forkammeret. Fra dorsalkammeret finnes det tre utveier til utgangskammeret. To av utgangene har mobile klaffer og befinner seg på hver sin side av bukkalrøret. Den siste utgangen ligger horisontalt mellom de to vingene og er uten lukkemekanisme. Utgangskammeret har til hensikt å dirigere det filtrerte vannet til utsiden. Dette er mulig ved hjelp av en ringmuskel som ligger ved enden av kammeret. Det er viktig å bemerke seg at til tross for navnet utfører ikke ringmuskelen en egentlig muskelhandling, men har fått sitt navn på bakgrunn av det var den beste måten å forklare anatomien og funksjonen til ringmuskelen (R. Fenaux, 1986). Utgangskammeret samler også opp fekalpellets fra endetarmsåpningen og forflytter de videre til ringmuskelen, og til slutt ut i vannet.



Figur 3. (A) Skjematisk framstilling av huset til *Oikopleura dioica*. © Anine Veronica Grønlund (B) Et fullt oppblåst hus med to fekulpellets av *Oikopleura dioica*. © Anine Veronica Grønlund.

Gjennom vannet kan disse spesialiserte filterhusene fange alt fra bakterier og små fyttoplankton til partikulært organisk materiale (P. R. Flood, D. Deibel, & C. C. Morris, 1992), med en nedre grense for effektiv fangst av partikler med en diameter på  $0.2 \mu\text{m}$  (A. W. Bedo, J. L. Acuña, D. Robins, & R. P. Harris, 1993; J. L. Acuña & Kiefer, 2000). I områder med optimale partikkelstørrelse og tetthet gir dette en effektiv filtrasjonshastighet av mange milliliter sjøvann per dag per dyr, noe som gjør *O. dioica* til en viktig bidragsyter til vertikal overføring av planktonisk biomasse til høyere trofiske nivåer. Ved at *O. dioica* kan oppnå høy populasjonstetthet i naturlig miljø (så høyt som  $53\,000 \text{ individer m}^{-3}$ ), kan denne netto filtreringsaktiviteten være svært høy (F. Delsuc et al., 2006; S. Uye & S. Ichino, 1995). Når disse husene til slutt blir for tilstoppet av partikler vil *O. dioica* svømme ut av huset og erstatte det med et forhåndsutskilt nytt hus som venter sammenpakket ved kroppen. Denne utskiftningen skjer gjennom hele organismens livstid, omtrent hver 4. time når tetthet av matpartikler er høy, og har til hensikt å opprettholde god filtrasjonshastighet (C. Troedsson, M. E. Frischer, J. C. Nejstgaard, & E. M. Thompson, 2007). Samtidig som beiteaktivitet av *O. dioica* utgjør en viktig del av biomasseoverføring til høyere trofiske nivåer, kan hyppig kassering av husene sammen med fanget materiale og produksjon av fekulpellets være med på

å skape marin snø, som noen ganger kan spille en betydelig men også dominant rolle i den oseaniske vertikale karbon fluksen, også kalt den biologiske pumpen (A. L. Alldredge, 1976; B. H. Robison, K. R. Reisenbichler, & R. E. Sherlock, 2005; F. Azam, 1998; R. Fenaux et al., 1998). Den biologiske pumpen består av en rekke prosesser som fører karbon fra overflatevannet ned til sedimentene ved hjelp av synkende organisk materiale. Dette organiske materiale består av blant annet døde og levende celler, fekalpellets fra zooplankton og avfallsprodukter (C. Suttle, 2007). Den spesielle levemåten til *O. dioica* er dermed med på å påvirke det globale karbonkretsløpet.

## 1.2 Marine virus

Marine virus er den mest tallrike og diverse biologiske enheter som finnes i verdenshavene (C. Suttle, 2005). I havet er det estimert at det finnes omtrent  $\sim 10^{30}$  viruspartikler med en konsentrasjon som varierer fra  $\sim 3 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  i dypere havområder til  $\sim 10^8 \text{ ml}^{-1}$  i produktive kystvann (A. Ortmann & C. Suttle, 2005; C. Suttle, 2007; N. Guixaboixereu, D. Vaqué, J. Gasol, J. Sanchezcamara, & C. Pedrosalio, 2002). Virusdiversiteten er enorm med flere tusen forskjellige virusgenotyper i 200 liter sjøvann og omtrent én million virusgenotyper i 1 kg med sediment (M. Breitbart & F. Rohwer, 2005). Som en pekepinn på hvor høy diversitet virusene utgjør, står de mest tallrike genotypene for mindre enn 5% av det totale virussamfunnet, mens de aller fleste genotypene utgjør  $<0.01\%$  (A. Edwards, R. Rohwer, & Forest, 2005; M. Breitbart & F. Rohwer, 2005). Med denne bakgrunnen, er det ikke overraskende at virus er en viktig del av marine miljøet.

Virus påvirker omverden rundt seg ved å infisere andre organismer. I havet, der de fleste virus infiserer marine mikroorganismer som bakterier og fyttoplankton, har det blitt beregnet at det skjer omtrent  $10^{23}$  virale infeksjoner hvert sekund der virus står for mortaliteten av omtrent 20% av den marine biomassen per dag (C. Suttle, 2007). Dette er mulig fordi de fleste virusene i havet ser ut til å være infeksjose (S. Wilhelm, M. Weinbauer, C. Suttle, R. J. Pledger, & D. L. Mitchell, 1998), samt at noen av disse virusene kan forbli infeksjose i sedimentene i lange perioder, i alt fra et tiår til hundre år eller mer (J. E. Lawrence, A. M.

Chan, & C. A. Suttle, 2002). Målskiven for alle disse infeksjonene kan være alt fra bakterier, alger, marine pattedyr og mennesker (A. Hall, P. Jepson, S. Goodman, & T. Härkönen, 2006; C. A. Suttle & A. M. Chan, 1994; G. Di Guardo, G. Marruchella, U. Agrimi, & S. Kennedy, 2005; J. O. Britt, A. Z. Nagy, & E. B. Howard, 1979; J. R. Geraci et al., 1982; K. Burek-Huntington et al., 2005; M. T. Cottrell & C. Suttle, 1995). Virus har derfor en stor innflytelse på komposisjonen av marine samfunn gjennom sin vertsspesifisitet (E. K. Wommack, J. Ravel, R. Hill, & R. Colwell, 1999; E. K. Wommack & R. Colwell, 2000; J. Fuhrman & C. Suttle, 1993; M. G. Weinbauer & F. Rassoulzadegan, 2004). Virusene kan også være med på å utvikle verts- og virale sammensetninger gjennom å øke den genetiske diversiteten ved hjelp av horisontal genoverføring (C. Suttle, 2007). I tillegg kan noen virus medføre sykdom i høyere organismer, som kan være alt fra krepsdyr og fisk til hvaler (C. Suttle, 2005). Noen virus har også flere vertsorganismer, slik at de kan bevege seg mellom ulike habitater og medføre en større påvirkning (C. Suttle, 2007).

Gjennom infeksjonen av fytoplankton kan virus være med på å forårsake avslutningen av algeoppblomstringene. Dette har blant annet blitt registrert ved oppblomstringen av enkelte fytoplankton arter f.eks. *Emiliana huxleyi*, *Phaeocystis globosa* og *Heterosigma akashiwo* (C. Brussaard, B. Kuipers, & M. Veldhuis, 2005; G. Bratbak, J. Egge, & M. Haldal, 1993; J. Martínez, D. C. Schroeder, A. Larsen, G. Bratbak, & W. Wilson, 2007; K. Nagasaki, M. Ando, S. Itakura, I. Imai, & Y. Ishida, 1994; K. Tarutani, K. Nagasaki, & M. Yamaguchi, 2000), der forekomsten av synlige infiserte celler og virus i tilknytning til lyserte celler, har blitt koblet med en økning av en morfologisk homogen viruspopulasjon. Disse algevirusene står for 25-100% av dødeligheten blant fytoplankton og kan medføre en fullstendig kollaps av algeoppblomstringene (G. Bratbak et al., 1993). Ved avslutning av algeoppblomstringer åpner man også opp for en høyere artsdiversitet ved å redusere forekomsten av den mest dominerende arten. Det er likevel viktig å huske på at selv om det forekommer en høy konsentrasjon av vertsspesifikke virus, medfører ikke dette nødvendigvis utrydning av en art da deler av vertspopulasjonen kan opparbeide resistens mot viruset, i tillegg til det at infeksjon av en vertscelle krever en fysisk kollisjon mellom vertscellen og en infeksjons viruspartikkel (C. A. Suttle & A. M. Chan, 1994; J. B. Waterbury & F. W. Valois, 1993). Ulike virus i forskjellige miljøer kan derfor ha en variabel påvirkningsgrad på verten avhengig av graden av persistens blant vertspopulasjonen samt tetthet av både

vertspopulasjonen og virussamfunnet.

Virus er også med på å påvirke de tilgjengelige næringsstoffene i miljøet gjennom den biologiske pumpen (C. Suttle, 2007). Viruslysis medfører at levende organisk materiale blir til partikulært og oppløst organisk materiale. Når lysis av en vertscelle inntreffer betyr dette at større partikler blir omdannet til mindre partikler som medfører at karbonet synker saktere ned mot sedimentene og at en større grad av karbonet forblir i overflatevannet. Viruslysering medfører derfor at karbonet blir omdannet til et lavere nivå av cellulært karbon. Dette er av betydning da denne prosessen omhandler omtrent 3 gigatonn karbon per år og påvirker CO<sub>2</sub>-syklusen (C. Suttle, 2005). På grunn av viruslyseringen er trolig oppbygningen av CO<sub>2</sub> i atmosfæren kun halvparten av hva den omtrent ellers ville vært (C. Suttle, 2005).

Viruslysering spiller dermed en svært viktig rolle i reguleringen av CO<sub>2</sub> opptak fra atmosfæren og dermed klima. Det finnes allikevel et unntak som omhandler noen fyttoplankton, der virusinfiserte celler har en økt synkningshastighet og potensielt kan øke transporten av celler til havbunnen (J. E. Lawrence et al., 2002). Det finnes derfor celler som kan øke synkningshastigheten av karbon og andre organiske molekyler fra den fotiske sonen (Definisjon: havets øvre lag hvor sollyset er gjennomtrengelig) til dypere vannlag (J. E. Lawrence & C. Suttle, 2004). I tillegg til karbon frigjøres også andre viktige næringsstoffer under viruslysering, som f.eks. nitrogen og fosfor (C. Gobler et al., 1997; L. Poorvin, J. Rintakanto, D. Hutchins, & S. Wilhelm, 2004). Ved å transformere næringsstoffer fra levende organismer til frie næringsstoffer, muliggjør dette en høyere tilgjengelighet av disse næringsstoffene til mikrobielle samfunn. Dette forhindrer overføring av karbon og andre næringsstoffer til høyere trofiske nivåer (C. Suttle, 2005). Graden av viruslysering og sammensetningen av de næringsstoffene som frigjøres påvirker også dødeligheten til det mikrobielle samfunnet og med dette også globale geokjemiske sykluser (C. Suttle, 2007).

Påvirkningskraft av marine virus bestemmes av tettheten til virus- og vertsbestandene samt virusenes infeksiositet, utbrytelsesstørrelse ("burst size"), sesongvariasjon og persistens. For at virus skal kunne persistere i et miljø er det nødvendig enten med at ny virusproduksjon overstiger tap av virus på grunn av virusnedbrytning ("decay") eller at viruspartikler beskyttes mot nedbrytning. Ulike mekanismer som kan forårsake virusnedbrytning er ekstracellulære

enzymmer og partikler større enn 0.2  $\mu\text{m}$ , men det spekuleres at solstråling står for hovedansvaret av virusnedbrytningen (C. Suttle & F. Chen, 1992; R. Noble & J. Fuhrman, 1997). Den nedre grensen for vertstetthet som tillater viruspersistens er undersøkt for et fåtall av algevirus, deriblant *Micromonas pusilla* virus (MpV) og *Emiliania huxleyi* virus (EhV) (M. T. Cottrell & C. Suttle, 1995; S. Jacquet et al., 2002). Det finnes allikevel en balanse hvor enn lavere infeksjonsrate sees i sammenheng med en lavere vertskonsentrasjon og vice versa. Dette tyder på at virus er en viktig regulator av vertsbestanden samtidig som det lar seg påvirke av den. Ulike virus har nemlig ulike tidsforløp for når deres konsentrasjon er høyest. Noen marine algevirus viser en sesongvariasjon, som for eksempel en økt konsentrasjon om sommeren med årsvariasjon i vertspopulasjoner (K. Nagasaki, Y. Tomaru, K. Nakanishi, et al., 2004). Dette kan sees i sammenheng med oppblomstringer av verten (Y. Tomaru et al., 2007). Andre virus viser større grad av sameksistens med sin vert der viruset detekteres oftere og over lengre tid (C. M. Short, O. Rusanova, & S. Short, 2010; S. Short & C. M. Short, 2009; Y. Tomaru, N. Fujii, S. Oda, K. Toyoda, & K. Nagasaki, 2011). Det er i en større grad blitt funnet at større algevirus har en større tendens til å ha lengre deteksjonsperioder enn mindre algevirus (T. Yamada, T. Higashiyama, & T. Fukuda, 1991). Dette kan allikevel ikke trekkes som en generell konklusjon for større marine virus, da motsatt tilfelle også har blitt funnet med store marine virus med kortere deteksjonsperioder (Y. Tomaru, K. Tarutani, M. Yamaguchi, & K. Nagasaki, 2004).

Sammen med vertstettheten, celledørrelsen og svømmehastigheten påvirker også antall frigjorte viruspartikler ved lysering av vertscellen ("burst size") virusbestanden gjennom å påvirke sannsynligheten for at et virus skal møte sin vertsorganisme og infisere den. Antall viruspartikler som frigjøres ved lysis av en algecelle kan variere fra noen hundre til flere tusen viruspartikler per vertscelle, avhengig av blant annet veksttilstanden til verten og temperatur (K. Nagasaki et al., 2003; K. Nagasaki, Y. Tomaru, N. Katanozaka, et al., 2004; S. Short, 2012). Det viser seg også at virus besitter mekanismer som sikrer deres vedvarighet i miljøet, også når forholdene er ugunstige for virusproduksjon. Planktoniske viruspartikler kan bli skjermet fra fysiske prosesser f.eks. når de sedimenterer sammen med infiserte og døende vertsceller. Bevis for dette finnes i havsedimentene der det har blitt funnet to-tre ganger så mange virus per enhetsvolum i forhold til overvannet (J. E. Lawrence et al., 2002; J. H. Paul, J. Rose, S. Jiang, C. A. Kellogg, & L. Dickson, 1993). Virusinfeksjon av f.eks. algen



*Heterosigma akashiwo* fører til en økt synkehastighet for denne algen ned til sedimentene der virusproduksjon ferdigstilles slik at nye viruspartikler blir frigjort til sedimentene (J. E. Lawrence & C. Suttle, 2004).

### **1.2.1 *Emiliana huxleyi* virus (EhV)**

*Emiliana huxleyi* virus (EhV) er et dobbeltrådig DNA-virus med en diameter på 160-180 nm (T. Castberg et al., 2002). Til liket med andre virus som infiserer alger har EhV en ikosaedrisk morfologi uten hale og med en ytre membran (T. Castberg et al., 2002). Vertsorganismen til EhV er en encellet kalkflagellat ved navn *Emiliana huxleyi*. På verdensbasis finnes oppblomstringer av denne kalkflagellaten sted offshore, ved kyst og havvann i midtre breddegrader (S. Ackleson, W. Balch, & M. P. Holligan, 1988). Oppblomstringene som finner sted mellom vår og sommer, kan oppnå en celletetthet opp mot  $5 \times 10^6$  celler  $L^{-1}$  i verdenshavene (P. M. Holligan, M. Viollier, D. S. Harbour, P. Camus, & M. Champagne-Philippe, 1983; S. Ackleson et al., 1988). I tempererte havområder kan oppblomstringene være i et så stort omfang at det synes fra verdensrommet. I Norge er det vanlig å se oppblomstringer av *E. huxleyi* årlig mellom mai og juni i kystvann og fjorder (G. Berge, 1962; G. Bratbak et al., 1993). Under oppblomstringene kan celletettheten bli så høy som  $1.2 \times 10^8$  celler  $L^{-1}$  i norske farvann (G. Berge, 1962). Det finnes en mengde med forskning som viser at oppblomstringer av *E. huxleyi* kan dø eller avta ("bloom crash" på engelsk) på grunn av omfattende EhV infeksjon, noe som fører til at mye oppløst karbon blir frigjort og at de kalkholdige skjellene som dekker *E. huxleyi* celler synker til havbunnen (C. P. D. Brussaard, R. S. Kempers, A. J. Kop, R. Riegman, & M. Heldal, 1996; G. Bratbak, 1995). Infeksjon av *E. huxleyi* med EhV spiller dermed en viktig rolle i omsetning av både organiske og uorganiske karbon i havet. Den latente perioden for EhV varer mellom 12-14 timer og avsluttes gjennom en utbuling av viruset gjennom cellemembranen (L. C. M. Mackinder et al., 2009; T. Castberg et al., 2002). Fra hver *E. huxleyi* celle produseres det mellom 400-1000 viruspartikler (C. P. D. Brussaard et al., 1996; G. Bratbak et al., 1993; T. Castberg et al., 2002).

### **1.3 Interaksjonen mellom *Emiliana huxleyi* virus (EhV) og *Oikopleura dioica***

Tidligere observasjoner av appendikularier har ført til spekulasjoner om hvorvidt det nokså spesielle filtreringsapparatet til *O. dioica* har blitt såpass spesialisert på å effektivt fange små partikler at det også fanger virus (D. Deibel personlig kommunikasjon, 2017). Denne spekulasjonen har blitt gjort på grunnlag av mikroskopiske undersøkelser av husets struktur samt resultater fra filtrasjonen av plastkuler (A. W. Bedo et al., 1993; D. Deibel, 1986; D. Fernández, A. Lopez-Urrutia, & A. Fernández, 2004). Hvis *O. dioica* kan fange partikler med en størrelse på ned til 0.1-0.2  $\mu\text{m}$ , deriblant virus, kan dette bety at interaksjonen mellom *O. dioica* og viruspartikler gir en direkte kobling mellom det mikrobielle næringsnett og den klassiske næringskjeden (F. Azam et al., 1983; L. R. Pomeroy, 1974). I tillegg vil en slik interaksjon ha potensialet til å påvirke den biologiske pumpen ved å regulere virustilstedeværelse, diversitet og persistens i havet. På bakgrunn av kunnskapen om hvor viktige virus er som regulerende element for mange prosesser i havet (1.2), er det interessant å se nærmere på hva den mulige interaksjonen mellom appendikularier og virus har å si for virusøkologi. I denne mulige interaksjonen finnes det en usikkerhet i hvorvidt fangsten av viruspartikler i filtreringshus og fekalpellets vil påvirke virusenes evne til å infisere vertsceller og/eller til å vedvare i det marine miljøet gjennom periodevis opphold i sedimentene. Ikke minst, er det mulig å identifisere/kvantifisere denne effekten?

### **1.4 Fokuset for masteroppgaven**

Målet for dette masterprosjektet er å avdekke/kvantifisere viktigheten av interaksjonen mellom *O. dioica* og marine virus. Oppgaven ble begrenset til å kun kartlegge interaksjonen mellom *O. dioica* og det viktige algeviruset EhV, da dette viruset er et større marint virus (160-180 nm) som har tidligere blitt brukt med suksess for å kartlegge denne interaksjonen (J. Lawrence et al., 2017; T. Castberg et al., 2002). Denne oppgaven vil bygge videre på dette studiet ved å utforske filtreringseffektiviteten av *O. dioica* for EhV samt undersøke skjebnen til fangede EhV partikler i *O. dioica* hus og fekalpellets. Flowcytometri ble brukt som hovedverktøy for å bestemme filtrasjonsraten og filtreringseffektiviteten for EhV, også for å

undersøke frigjøring av fangede EhV partikler over tid fra *O. dioica* hus og fekalpellets. For å undersøke skjebnen til fangede viruspartikler (det vil si effekten på infeksiositet) ble det brukt mest sannsynlig antall (MPN) analyse på viruspartikler avgitt fra *O. dioica* hus og fekalpellets. For å bedre forstå tidselementet i nedbrytning av *O. dioica* hus og fekalpellets som et regulerende element i sedimentering og persistens av EhV partikler, ble det brukt en lysmikroskopisk bildeserie. Ut fra dette ble det definert tre forskningsspørsmål (FS).

FS1. Hva er filtrasjonsraten av *Oikopleura dioica* for EhV?

FS2. Hvordan endrer filtrasjonsraten av *Oikopleura dioica* seg for EhV over tid og ved forskjellige utviklingsstadier av *O. dioica*?

FS3. Hvilken betydning har interaksjonen mellom EhV og *Oikopleura dioica* hus samt fekalpellets for virusøkologi?

## 2 Materiale og metode

### 2.1 Dyrkning av *Oikopleura dioica*

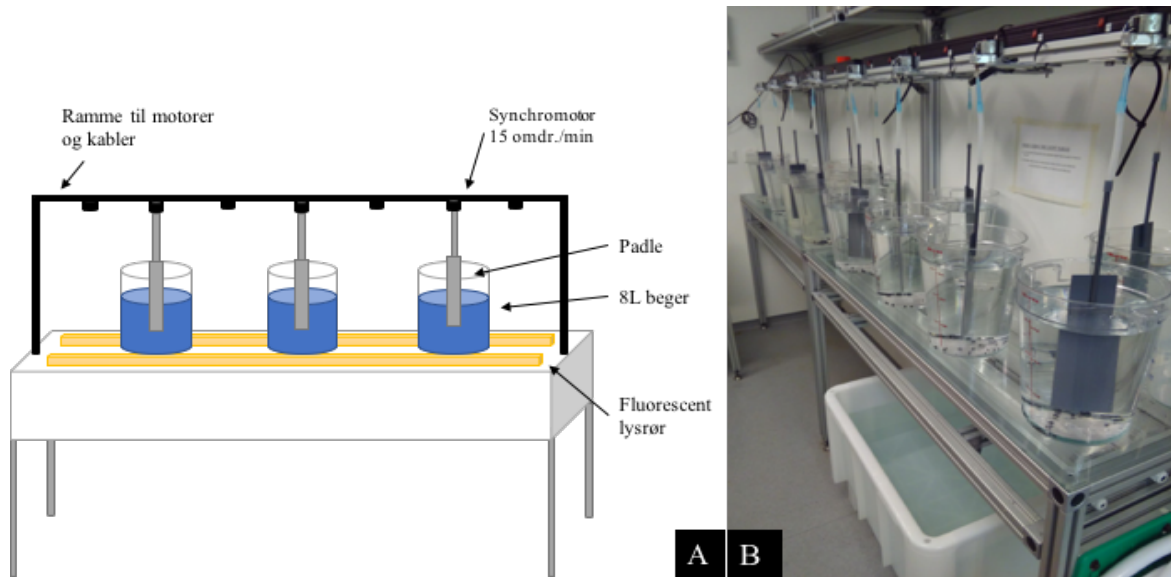
Eksperimentet ble utført ved Espegrend Marine Biologiske stasjon (60°16'10.1"N 5°13'24.9"E) i tidsperioden fra 16. september til 4. Oktober (Figur 4). På den første dagen av forsøksperioden ble en gyte bestående av 55 hundyr og 25 handyr transportert fra dyrkningsfasiliteten til SARS senter for marin molekylær-biologi ved UIB (60°22'53.1"N 5°19'53.9"E) (SARS) over til den Marine Biologiske stasjonen. Dyrkningsfasilitetene ved Espegrend består av et klimarom utstyrt med vannbeholder, filtreringsapparat, dyrkningsbenker og klimaanlegg (2.1.1). Oppstartsperioden før forsøkene ble brukt for å dyrke *O. dioica* opp til et tilstrekkelig antall for forsøkene samtidig som det gjensto tilstrekkelig med dyr for å dyrke kulturene videre. På grunn av lav befruktning ble det transportert to ytterligere beger med dag 1 dyr fra SARS til Espegrend den 23 og 29 september. Det ble dyrket dyr i alderen 1-5 dager ved 14°C, mens eksperimentet ble utført med dyr i alderen 3-5 dager. Siden dyrene utvikles i dagslangetrinn, avhengig av temperatur, refereres videre dagene til de ulike utviklingstrinnene for *O. dioica*.



Figur 4. Habitatet utenfor Espegrend Marine Biologiske stasjon (60°16'10.1"N 5°13'24.9"E) den 25.09.2017.  
©Anine Veronica Grønlund.

### 2.1.1 Dyrkningssystemet

Dyrkningsprotokollen for *O. dioica* er utviklet av Bouquet et al. (J. Bouquet et al., 2009) basert på et dyrkningsoppsett utviklet av Fenaux og Gorsky (R. Fenaux & G. Gorsky, 1985). Basert på dette systemet ble dyrene dyrket i 8L polykarbonat begre (Cambro Camwear) som inneholdt 6L filtrert sjøvann (Figur 5). Sjøvannet som ble brukt til dyrkning er hentet opp fra 4 til 8m vanddybde utenfor Espegrend Marine Biologiske stasjon og ført inn gjennom et pumpesystem inn til dyrkningsfasiliteten. Der ble vannet oppbevart over natten i en polypropylen tank (600 L) for temperaturlpasning. Videre fra vanntanken ble vannet ført gjennom tre Hytrex-II-patronfiltre (størrelse: 20, 10, 1  $\mu\text{m}$ ) og et aktivt kullfilter (Sigma/Fulka Norit) med en gradient på 1-2 mm. Til sist ble sjøvannet eksponert for et Aqua-Care UV-lys (254 nm, 10 W) før det ble brukt til dyrkning av dyrene. Patronfiltrene (20, 10, 1  $\mu\text{m}$ ) og halvparten av kullet i det aktive kullfilteret ble skiftet en gang ved oppstart av forsøket. Til hver av dyrkningsbegrene, med unntak av gyte-begeret, ble det tilsatt ca. 10 g kullpellets (VWR Charcoal) for å bevare vannkvaliteten ved å absorbere forurensinger i vannet og tiltrekke seg tomme *O. dioica* hus. Filtrerte sjøvann-vaskede kullpellets ble brukt ved hver overføring, det vil si hver dag under dyrkning og forsøksperiodene. Grunnen til at kullpelletene ikke ble tilsatt i gyte-begeret er at dette fører til oppsamling av embryoer og hindrer reproduksjon. Kullpelletsene ble vasket i rennende filtrert sjøvann etter bruk, totalt tre ganger under forsøket.



Figur 5. (A) Systematisk illustrasjon av dyrkningssystemet. Det bestod av Polykarbonat beger (Cambro Camwear) med filtrert sjøvann som ble rotert av padleårer laget av polyvinylkarbonat som var koblet til individuelle elektriske motorer (Synchromotor Crouzet, 15 omdr./min). Padleårenes dimensjoner var bestemt ut fra *O. dioica* utviklingsstadier, og kunne enten være H x L x B (cm)= 25 x 30 x 8 (Gyten, Dag 1-2) eller H x L x B (cm)= 25 x 30 x 7 (dag 3-5). Under begrene ble det tatt i bruk lys (OSRAM lysrør kjølig hvit 36W) montert i bordene. Temperaturen ble holdt til å være  $14 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  under dyrkingen og forsøkene. © Anine Veronica Grønlund. (B) Oversikt over dyrkningssystemet på Espegrend Marine Biologiske stasjon ( $60^{\circ}16'10.1''\text{N}$   $5^{\circ}13'24.9''\text{E}$ ) under dyrkingen av *O. dioica*. © Anine Veronica Grønlund.

For å oppnå en naturlig bevegelse i vannet, ble det i hvert beger montert en padleåre laget av polyvinylkarbonat. Padleårene var koblet til individuelle elektriske motorer (Synchromotor Crouzet, 15 omdr./min). Padleårene har en 3 mm tykk plate og er laget av polyvinylklorid (PVC). Denne er videre festet til en PVC-stang med materialespesifikt lim. Padleårenes videre dimensjoner er bestemt av dyrenes utviklingsstadier. For gyten, dag 1 og dag 2 dyr er padleårenes dimensjon (cm) H x L x B= 25 x 30 x 8, mens dag 3-5 har dimensjonen (cm) H x L x B= 25 x 30 x 7.

Temperaturen i dyrkningsrommet ble holdt til  $14 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  under dyrkingen og forsøkene. Unntaket var under den første livssyklusen før forsøket, fra dag 1 til gyte, der temperaturen ble holdt til å være  $15 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . Grunnen bak nedjusteringen av temperaturen med en grad var på bakgrunn av observasjoner av at enkelte dyr visste en for tidlig utvikling, det vil si at generasjonstiden var noe kortere enn den beregnede generasjonstiden på seks dager. Under rutinemessig overføring og fôring av dyrene og ved forsøkene ble det tatt i bruk lys (OSRAM

lysrør kjølig hvit 36W) montert i bordene (Figur 5). Disse lysrørene samsvarte med romtemperaturen. Den resterende tiden var lysene skrudd av.

I henhold til optimaliseringen av fôringsregimet utviklet av Bouquet og medarbeidere (J. Bouquet et al., 2009), ble det valgt å benytte algene *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis sp.* og *Rhinomonas reticulata*, samt cyanobakterien *Synechococcus sp.* til næring under dyrkingen av *O. dioica*. Disse ble valgt da de kan dyrkes relativt stabilt i kultur (J. Bouquet et al., 2009), og fordi en diet hovedsakelig bestående av *Isochrysis sp.* og *Chaetoceros calcitrans* gir et balansert kosthold for *O. dioica* med en komplementær sammensetning av fettsyrer (C. Troedsson, O. Grahl-Nielsen, & E. M. Thompson, 2005). All mat ble dyrket av SARS (J. Bouquet et al., 2009), og bragt ut fersk hver dag til Espegrend Marine Biologiske stasjon. Hovedtrekkene bak dette fôringsregime er at det blir gjennomført en morgen og kveldsmating, henholdsvis kl. 10.00 og 17.00 fra dag 1 til 5. Mengden mat som gis avhenger av målt konsentrasjon av algekulturene basert på spektrofotometrisk måling (Spectrophotometer Beckman Du-640<sup>W</sup>, 600nm, 1cm kyvette), som måler prøvens konsentrasjon basert på dens absorbans av innsendt lys oppimot en vannreferansekontroll. Fôringen om morgenen hadde dobbel dose av kveldsfôringen. Matingen blir også doblet fra og med dag 3. *Isochrysis sp.* og *C. calcitrans* ble gitt under hele livssyklusen, mens *Synechococcus sp.* kun gis i første halvdel (dag 1, 2 og morgenfôringen på dag 3) og *R. reticulata* kun gis i andre halvdel av syklusen (kveldsfôringen på dag 3 samt dag 4-5). Dette skyldes de ulike størrelsene til *Synechococcus sp.* (1µm i diameter) og *R. reticulata* (14x7 µm (LxB)), der førstnevnte er mindre enn sistnevnte (J. Bouquet et al., 2009). *R. reticulata* er dermed for stor til å bli spist av *O. dioica* før dag 3 (J. Bouquet et al., 2009).

I tillegg til de overstående levende partiklene, kan også *O. dioica* livnære seg på døde partikler ned til en størrelse på 0.2 mm i diameter (D. Fernández et al., 2004; P. R. Flood & D. Deibel, 1998). Det ble derfor valgt å supplementere dyrenes diet med en løselig ekstrakt av *R. reticulata* (knuste alger). Fordelen med dette er at de tidlige utviklingsfasene av *O. dioica* (dag 1-3) da kan absorbere næringen fra *R. reticulata* (J. Bouquet et al., 2009).

Ekstrakten av *R. reticulata* ble tillaget av SARS (J. Bouquet et al., 2009) der hver ekstrakt ble tillaget i et mengdeforhold på 10-50 doser etter behov i Eppendorf-rør oppbevart ved -80°C frem til bruk. En dose tilsvarer ca. 6 millioner celler *R. reticulata*. Når røret skal benyttes blir det tint og deretter resuspendert i filtrert sjøvann i henhold til mengdeforholdet i tabellen under (Tabell 1).

Ulik behandling av dyrene ble gjennomført i henhold til utviklingsstadier, beskrevet under. Dyrkningscyklusen ble gjentatt under hele forsøksperioden.

Tabell 1. Ekstrakt av *R. reticulata* ble gitt som supplement under føring av *O. dioica*. Antall doser *R. reticulata* ekstrakt (1 dose = 6 millioner celler) ble fortynnet i filtrert sjøvann (mL) i henhold til mengdeforholdet i tabellen.

Antall doser	Filtrert sjøvann (mL)
10	50
20	100
30	150
45	200
50	250

### 2.1.2 Dag 1 dyr

Tetthet av dyrene ble undersøkt omtrent et døgn etter at gyten ble satt opp (mellom 18-24 timer etter gyte). Dette ble gjort ved å senke lengden av en 25 mL pipette ned til merke som tilsvarer 10 mL væske, trekke opp 10 mL og deretter pipettere innholdet i to saliers (Hecht Assistant, 2020/1) med 5 mL i hver. Ved overføringen til salierne ble pipetten holdt på skrå for å forhindre vitalt trykk for dyrene. Det samme ble gjentatt for vanndybden ned til merke som tilsvarer 15 mL væske i pipetten. Dyrene ble så telt i lystfeltmikroskop (Olympus), og gjennomsnittet av dyr ved forskjellige vanndybder ble utregnet (Tabell 2). Basert på gjennomsnittet av dyr, ble det valgt å bruke en fortyning som inneholdt omtrent 1500 dyr per beger.



Tabell 2. Fortynning av gytekulturen til nye beger ved dag 1, ble gjort i henhold til antall telte *O. dioica* per 5 mL vannprøve i lysfeltmikroskop (Olympus). Antall telte dyr bestemte hvor mange beger gyten skulle fortynnes til og mengdeforholdet mellom kultur og filtrert sjøvann.

Antall dyr	Fortynning til	Filtrert sjøvann (mL)
15	4 beger (~1250 mL kultur)	4750
15-25	5 beger (~1000 mL kultur)	5000
25-30	6 beger (~850-750 mL kultur)	5150-5050

Ved tetthet på under 15 dyr, ble det valgt å øke fortynningen til 1500 mL fra kulturen. Fortynningen ble utført ved å forsiktig overføre ønsket mengde gytekultur ned i forhåndsfylte beger med filtrert sjøvann og litt aktivt kull, med et glasslitemål. En padleåre (dimensjon(cm): H x L x B = 25 x 30 x 8) ble deretter plassert i begeret, som ble overført til dyrkingssystemet. Etter fortynningen, som ble gjennomført rundt kl. 10.00, ble dyrene føret i henhold til tabell 3. En ytterligere fôring ble utført kl. 17.00.

Tabell 3. Oversikt for sammensetningen av dietten til *O. dioica* ved dag 1. Dyrene ble føret to ganger per dag, en morgendose kl. 10.00 og en kveldsdose kl. 17.00.

Kl. 10.00	Kl.17.00
2000 celler/mL <i>Isochrysis sp.</i>	1000 celler/mL <i>Isochrysis sp.</i>
2000 celler/mL <i>Chaetoceros calcitrans</i>	1000 celler/mL <i>Chaetoceros calcitrans</i>
1 dose knuste alger (5 mL fortynnet løsning)	1 dose knuste alger (5 mL fortynnet løsning)
80 000 celler <i>Synechococcus sp.</i>	40 000 celler <i>Synechococcus sp.</i>

### 2.1.3 Dag 2 dyr

For dag 2 dyrene ble hvert beger fortynnet 50/50 %, ved å tilsette 3L av dag 2 dyrene til et beger som allerede inneholdt 3L filtrert sjøvann. Det gjenværende begeret med 3L dag 2 dyr ble deretter fylt med 3L filtrert sjøvann. Dette ble gjentatt til alle begrene var fortynnet. Til hvert av begrene ble det tilsatt litt kull og en padleåre (dimensjon (cm): H x L x B = 25 x 30 x

8) før fortynningen. Etter fortynningen, som ble gjennomført rundt kl.10.00, ble dyrene fôret i henhold til tabell 4. En ytterligere fôring ble utført kl. 17.00.

Tabell 4. Oversikt for sammensetningen av dietten til *O. dioica* ved dag 2. Dyrene ble fôret to ganger per dag, en morgendose kl. 10.00 og en kveldsdose kl. 17.00.

<b>Kl. 10.00</b>	<b>Kl.17.00</b>
2000 celler/mL <i>Isochrysis sp.</i>	1000 celler/mL <i>Isochrysis sp.</i>
2000 celler/mL <i>Chaetoceros calcitrans</i>	1000 celler/mL <i>Chaetoceros calcitrans</i>
1 dose knuste alger (5 mL fortynnet løsning)	1 dose knuste alger (5 mL fortynnet løsning)
80 000 celler <i>Synechococcus sp.</i>	40 000 celler <i>Synechococcus sp.</i>

#### **2.1.4 Dag 3, 4 og 5 dyr**

Ved dag 3, 4 og 5 ble ønsket antall beger fylt med 6L filtrert sjøvann og litt kull. En padleåre (dimensjon (cm): H x L x B = 25 x 30 x 7) ble plassert i begeret, før det ble tilsatt næring i henhold til tabell 5 rundt kl. 10.00. Etter dette ble 150 dyr overført ved dag 3, 130 dyr ved dag 4 og 110 dyr ved dag 5 til hvert av begrene med en Sterilin pipette med avkuttet spiss (diameter: 6-10 mm). Det ble valgt dyr som hadde så homogen størrelse som mulig for å forsikre seg om en synkron modning og suksessiv gyte. Rundt kl. 17.00 ble dyrene fôret i henhold til tabell 5.

Tabell 5. Oversikt for sammensetningen av dietten til *O. dioica* ved dag 3, 4 og 5. Dyrene ble føret to ganger per dag, en morgendose kl. 10.00 og en kveldsdose kl. 17.00.

Utviklingsstadium	Kl. 10.00	Kl.17.00
<b>Dag 3</b>	2000 celler/mL <i>Isochrysis sp.</i>	1000 celler/mL <i>Isochrysis sp.</i>
	2000 celler/mL <i>Chaetoceros calcitrans</i>	1000 celler/mL <i>Chaetoceros calcitrans</i>
	1 dose knuste alger (5 mL fortynnet løsning)	1000 celler/mL <i>Rhinomonas reticulata</i>
	80 000 celler <i>Synechococcus sp.</i>	1 dose knuste alger (5 mL fortynnet løsning)
		40 000 celler <i>Synechococcus sp.</i>
<b>Dag 4</b>	4000 celler/mL <i>Isochrysis sp.</i>	2000 celler/mL <i>Isochrysis sp.</i>
	4000 celler/mL <i>Chaetoceros calcitrans</i>	2000 celler/mL <i>Chaetoceros calcitrans</i>
	1000 celler/mL <i>Rhinomonas reticulata</i>	1000 celler/mL <i>Rhinomonas reticulata</i>
	1 dose knuste alger (5 mL fortynnet løsning)	1 dose knuste alger (5 mL fortynnet løsning)
<b>Dag 5</b>	4000 celler/mL <i>Isochrysis sp.</i>	2000 celler/mL <i>Isochrysis sp.</i>
	4000 celler/mL <i>Chaetoceros calcitrans</i>	2000 celler/mL <i>Chaetoceros calcitrans</i>
	1000 celler/mL <i>Rhinomonas reticulata</i>	1000 celler/mL <i>Rhinomonas reticulata</i>
	1 dose knuste alger (5 mL fortynnet løsning)	1 dose knuste alger (5 mL fortynnet løsning)

### 2.1.5 Gyte

Gyte-begeret ble forberedt en dag før oppsettet av gyten med gyte-tilsetning ferdig tillaget av SARS, som hadde til hensikt å øke suksessen til gyten (J. Bouquet et al., 2009). Gyte-begeret rommet 8 L og inneholdt 6L filtrert sjøvann supplert med 1 mg L<sup>-1</sup> ethylenediaminetetraacetic

syre (EDTA, Merck 108417) og 20 mg L<sup>-1</sup> av natriummetasilikat (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>·9 H<sub>2</sub>O, Sigma 5904) som tidligere forsøk av J. Bouquet et al. (J. Bouquet et al., 2009). Ved oppsett av gyten ble først 2000 celler/mL *Isochrysis sp.* og 2000 celler/mL *Chaetoceros calcitrans* tilsatt begeret, før 55 hundyr og 25 handyr ble overført. Det ble valgt dyr med så homogen størrelse som mulig for å forsikre seg om en vellykket befruktning. Gyten ble satt opp rundt klokken 10 under hele perioden.

## 2.2 Dyrkning av *Emiliana huxleyi* virus (EhV)

### 2.2.1 Dyrkning av verten, mikroalgen *Emiliana huxleyi*

En datterkultur av haptofyten *E. huxleyi* (Prymnesiophyceae : Isochrysidales), isolat BOF92, ble hentet fra algekultursamlingen ved Institutt for biovitenskap ved Universitetet i Bergen. Kulturen ble dyrket i ½ IMR-medium (Vedlegg B) ved 16°C i lys-mørkesykluser med fordeling 14:10 under 180 µm fotoner m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Kulturen ble overført ukentlig i 70 dager for å holde cellene i vekstfase. Kulturen ble så brukt til produksjon av EhV samt i MPN-analyser (2.4.3). Cellevekst ble jevnlig kontrollert ved celletellinger på flowcytometeret (2.2.3).

### 2.2.2 Dyrkning av algeviruset EhV

*E. huxleyi* viruset 99B1 (EhV-99B1) ble hentet fra virussamlingen ved Institutt for biovitenskap ved Universitetet i Bergen. EhV-99B1 ble dyrket på *E. huxleyi* BOF92 ved å infisere en sen-eksponensiell fase kultur av BOF92 (ca. 10<sup>5</sup> celler mL<sup>-1</sup>) med 20 mL EhV-99B1 lysat (ca. 10 EhV-99B1 per 1 vertscelle) (R.-A. Sandaa personlig kommunikasjon, Vår 2018). Blandingen ble inkubert ved 16 °C under vanlige vekstforhold for BOF92 frem til synlige tegn på lysis sammenlignet med en kontrollkultur som ikke var tilsatt virus. Lysis ble konstatert som fullstendig ved synlig tap av pigmentfarge fra *E. huxleyi* og ved flowcytometrisk bekreftelse på kraftig nedgang i antall *E. huxleyi* celler samtidig med en kraftig økning i antall EhV-liknende partikler (2.2.3). Lysatet ble sentrifugert (Beckman JA-10) på 5500 omdr./min i 15 minutter for å fjerne cellerester. Lysatet ble deretter lagret ved 4

°C i mørket frem til bruk. Tetthet av EhV partikler i viruslysatet ble bestemt ved hjelp av flowcytometri (2.2.3). Den endelige konsentrasjonen av viruset EhV i lysatet som ble brukt på alle forsøksdagene var  $3.38 \times 10^8$  EhV mL<sup>-1</sup>. Lysatet ble tilsatt forsøksbegrene til en endelig tetthet på  $\sim 1 \times 10^6$  EhV mL<sup>-1</sup>. Dette skal representere den naturlige forekomsten av viruset i en etterfase av *E. huxleyi* oppblomstring i norske kystøkosystemer (G. Bratbak, 1995).

### 2.2.3 Flowcytometri (FCM)

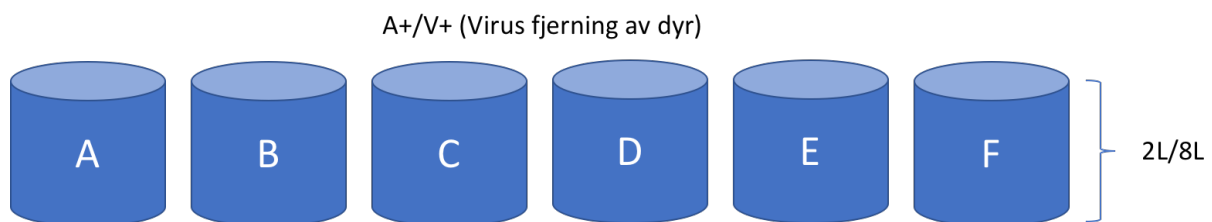
Glutaraldehyd-fikserte vannprøver ble analysert etter en standardprotokoll (D. Marie, C. P. D. Brussaard, R. Thyrraug, G. Bratbak, & D. Vaultot, 1999) modifisert av Elzbieta Petelencz-Kurdziel ved Universitet i Bergen 2016 (Vedlegg A) på instrumentet FACS Calibur flowcytometer (E1831). Vannprøvene ble fiksert med 20 µL av en 25% (v/v) glutaraldehydløsning (endelig konsentrasjon: 0.5 % (v/v)) (Sigma-Aldrich), vendt flere ganger for å blande glutaraldehyden grundig med vannprøven og oppbevart 30 minutter i mørke ved 4°C og deretter hurtig-fryst i flytende nitrogen. Prøvene ble så oppbevart på -80°C fram til tining og analyse. Ved FCM tellinger ble EhV/bakterier målt ved å fortynne hver vannprøve 10x, 100x, 1000x og 10 000x med 0.2 µm filtersterilisert TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0). Deretter ble fortynningene tilsatt 10 µL 1X SYBR Green I DNA fargestoff så inkubert 10 minutter i et 80°C vannbad, før de ble avkjølt i minst 10 minutter i mørke ved romtemperatur. Separate vannprøver for telling av matalgene *Isochrysis sp.* og *R. reticulata* ble brukt direkte uten fortynning eller tilsetning av DNA fargestoff. Både virus og alger ble telt på høy strømningshastighet (ca. 100 µL s<sup>-1</sup>) i 60 sekunder. Instrumentinnstillinger er grundig beskrevet i Vedlegg A. Fra alle FCM resultatene ble antall telte partikler omregnet til konsentrasjonen av partikler per mL i henhold til formel 1 (2.3.3).

## 2.3 Eksperimentelt design og prøvetakning

### 2.3.1 Bestemmelse av filtrasjonskurve til *Oikopleura dioica*

Nøyaktig beregning av filtrasjonsrate for en organisme krever at den målte endringen i partikkeltetthet mellom start- og endepunktet er lineært (M. R. Landry & R. Hassett, 1982). Dette kommer av at man ønsker å finne den effektive filtreringsraten til *O. dioica* uten ytre påvirkninger. Dersom en setter starttidspunktet for tidlig, kan det være at EhV partiklene ikke har blitt tilstrekkelig jevnt fordelt i vannet i forsøksbegrene. Dersom en setter sluttidspunktet for sent, kan mesteparten av EhV partiklene allerede ha blitt fjernet. Det lineære området for filtrering av EhV ble først bestemt med et forenklet beiteforsøk med *O. dioica* og EhV. Med de rette start- og endepunktene for måling av filtrasjonsraten ble da hovedforsøket (2.3.2) satt opp der filtrasjonsraten og filtreringseffektiviteten til *O. dioica*, samt persistens og infektivitet til EhV etter filtrering, ble undersøkt.

Seks polykarbonat beger på 8 L ble fylt med 2 L filtrert sjøvann og mat i henhold til fôringsprotokollen (2.1.4) (Figur 6). Fôringen ble prosentvis justert etter dyrkningsprotokoll (2.1.4) med hensyn på antall dyr. Det ble ikke tilsatt aktivt kull til begrene. Deretter ble 40 tilfeldig utvalgte dag 5 dyr av samme størrelse tilsatt til hver av de 6 forsøksbegrene. Etter 20 minutters tilvenningstid for dyrene ble EhV tilsatt (endelig konsentrasjon;  $\sim 10^6$  EhV mL<sup>-1</sup>). En homogen distribusjon av EhV ble forsikret med en polyvinylkarbonat-padleåre som roterte i begrene med en konstant hastighet under hele forsøket (J. Bouquet et al., 2009).



Figur 6. Oppsettet for de seks polykarbonat begrene ved forsøket for å finne det lineære området for fjerning av EhV av *O. dioica*. Hvert beger inneholdt 2L filtrert sjøvann og morgendose av fôr for *O. dioica* (2.1.4 Dag 3, 4 og 5 dyr). Hver av begrene fikk tilsatt 40 dag 5 dyr med omtrent samme størrelse og EhV (endelig konsentrasjon;  $\sim 10^6$  EhV mL<sup>-1</sup>). Hver behandling ble representert i 3 biologiske replikanter. © Anine Veronica Grønlund.

Etter 5 minutters ventetid (for å sikre homogen distribusjon av EhV i vannet) ble prøvetakningen startet. Prøvene ble tatt ved start av forsøket (T0) og deretter hver time i 12 timer (T1 - T12). For hvert tidspunkt ble det tatt 2 x 0.5 mL vann fra hvert av begrene til flowcytometri (2.2.3). Prøvene ble så fiksert, fryst, oppbevart og analysert med FCM som beskrevet over (2.2.3). Filtreringsresultatene ble analysert i R versjon 3.2.2 (R Developmental core Team, 2015), der det ble utført en anova-test for målepunktene under det trolige lineære området i grafen konstruert fra alle målepunktene. Det lineære området for fjerning av EhV av *O. dioica* ble deretter brukt videre til å beregne filtreringsraten under det andre forsøket.

### **2.3.2 Filtreringsrate, infeksiositet og persistens av *Emiliana huxleyi* virus (EhV)**

#### **Forsøksoppsett og prøvetaking**

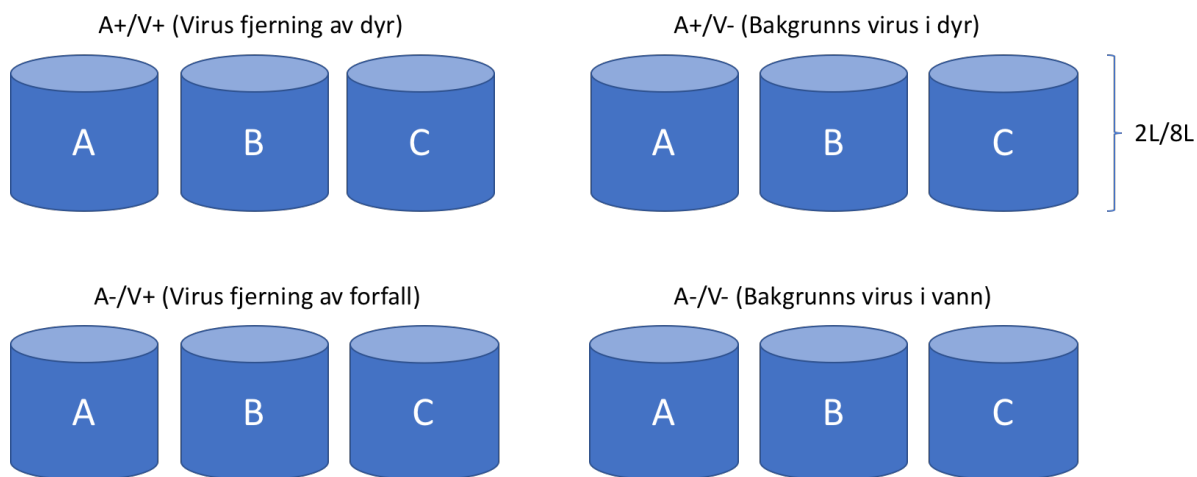
Basert på resultatene fra filtreringskurven (2.3.1) ble det besluttet at det lineære området for fjerning av EhV av *O. dioica* lå mellom T3 ( $7.09 \times 10^5 \pm 5.9 \times 10^4$  EhV mL<sup>-1</sup>) og T6 ( $4.22 \times 10^5 \pm 3.4 \times 10^4$  EhV mL<sup>-1</sup>), derfor ble filtreringsrate beregnet fra disse to tidspunktene. Den 1, 2 og 3 oktober ble det derfor gjennomført daglige forsøk for å finne filtreringsraten og filtreringseffektiviteten for EhV av tre utviklingsstadier (dag 3-5) av *O. dioica*. Fra samme forsøksserie ble det tatt prøver til måling av persistens og infeksiositet av EhV fanget i *O. dioica* hus og fekalpellets. I disse forsøkene ble 12 polykarbonat begre (8 L) fylt med 2 L filtrert sjøvann og mat i henhold til fôringsprotokollen (2.1.4). Fôringen ble prosentvis justert etter dyrkningsprotokoll (2.1.4) med hensyn på antall dyr. Det ble ikke tilsatt aktivt kull til begrene. Det eksperimentelle oppsettet bestod av to faktoriale variabler; appendikularien *O. dioica* (A+ eller A-) og viruset EhV (V+ eller V-), med tre biologiske replikater av hver behandlingkombinasjon. Dette gir de fire ulike behandlingene; begre tilsatt både *O. dioica* og EhV (A+/V+), begre kun tilsatt *O. dioica* (A+/V-), begre kun tilsatt EhV (A-/V+) og begre verken tilsatt *O. dioica* eller virus (A-/V-). De ulike behandlingene skal undersøke for følgende (Tabell 6):

Tabell 6. Oversikt for de ulike behandlingene som ble brukt under forsøkene og hva disse skulle undersøke. De fire ulike behandlingene var: begre tilsatt både appendikularier og EhV (A+/V+), begre kun tilsatt appendikularier (A+/V-), begre kun tilsatt EhV (A-/V+) og begre verken tilsatt appendikularier eller EhV (A-/V-).

<b>Eksperimentell behandling</b>	<b>Undersøkelse</b>
A+/V+	EhV fjernet av <i>O. dioica</i>
A+/V-	EhV som finnes naturlig i <i>O. dioica</i>
A-/V+	EhV sitt naturlige forfall
A-/V-	Bakgrunns EhV som finnes i vannet

For dag 3 dyrene ble 120 tilfeldig utvalgte *O. dioica* med omtrent samme størrelse overført til hvert av begrene markert med “A+” (Figur 7). For dag 4 og 5, var antallet henholdsvis 80 (mellom kl. 09.15-09.45) og 40 dyr (mellom kl. 09.30-09.41). På starten av forsøksdagene ble kroppslengden til 10 tilfeldige individer målt uten hale. Målingene ble gjort hver dag fordi den effektive maskestørrelsen på “filterhuset” kan forandre seg ved ulike utviklingsstadier, noe som kan påvirke filtrasjonraten (F. Broms & P. Tiselius, 2003). En generell konklusjon av alle utviklingsstadier basert på målinger fra en forsøksdag kan derfor gi feilaktige resultater. Til hvert av begrene merket med “V+” (Figur 7) ble EhV tilsatt (endelig konsentrasjon;  $\sim 10^6$  EhV mL<sup>-1</sup>) etter noen minutters ventetid etter overføringen av dyrene (dag 3 kl. kl. 11.30, dag 4 kl. 10.17, dag 5 kl. 10.15). En homogen distribusjon av EhV ble forsikret med en polyvinylkarbonat-padleåre som roterte i begrene med en konstant hastighet under hele forsøket (J. Bouquet et al., 2009). Etter 5 minutters ventetid ble prøvetakningen startet. Det ble totalt utført 7 prøvetakningstidspunkt med tidsintervaller på en time (T0-T6). For hvert tidspunkt ble det tatt 2 x 1 mL prøve fra hvert av begrene til flowcytometeret (FCM).





Figur 7. Oppsettet for de 12 polykarbonat begrene under filtrerings-, infeksjonstets- og persistensforsøket. Hvert beger inneholdt 2L filtrert sjøvann og morgendose av fôr for *O. dioica* (2.1.4 Dag 3, 4 og 5 dyr). *O. dioica* ble tilsatt i alle begrene markert med behandling "A+" med antall tilfeldig utvalgte dyr med omtrent samme størrelse i henhold til utviklingsstadiet (dag 3: 120 dyr, dag 4: 80 dyr, dag 5: 40 dyr). Ehv (endelig konsentrasjon;  $\sim 10^6$  EhV mL<sup>-1</sup>) ble tilsatt til alle begrene markert med behandling "V+". Hver behandling ble representert i 3 biologiske replikater. © Anine Veronica Grønlund.

For undersøkelsen av persistens og opprettholdelse av infeksjonstet hos EhV partikler som ble fanget opp av *O. dioica* hus eller som passerte gjennom dyret og havnet i fekalpellets, ble det tatt prøver for bestemmelse av mest sannsynlig antall (MPN) frie infeksjonse viruspartikler. I behandlingene A+/V+ (virus fjerning av dyr) og A+/V- (bakgrunn av viruspartikler i dyr), ble det samlet 15 intakte og evakuerte hus kombinert fra dag 4 og dag 5 dyrene i hver av fire brønner i en mikrotiterplate med 24 brønner. Dette ble gjort for hver av forsøksreplikatene. I en annen mikrotiterplate for hver forsøksreplikat ble det samlet 50 fekalpellets kombinert fra dag 4 og dag 5 dyrene i hver av fire brønner. Både hus og fekalpellets ble samlet mellom T4 og forsøkslutt. Deretter ble husene og fekalpelletsene forsiktig vasket seks ganger med filtrert sjøvann (ytterligere beskrevet i kapittel 2.5) for å fjerne eventuelle frie viruspartikler som ble overført med forsøksvannet. På den siste dagen av eksperimentet (dag 5), ble det tilsatt 2 mL vann fra A-/V+ og i hver av brønnene med *O. dioica* hus fra A+/V- behandlingen. Dette var for å undersøke om tilstedeværelsen av hus eller fekalpellets og nedbrytningsaktivitet assosiert med disse vil gi en økt nedbrytning av frie viruspartikler over tid. For å undersøke bakgrunnen av virus i *O. dioica* husene ble det også samlet in 15 hus og 50 fekalpellets fra dag 4 og 5 i duplikat fra hver av forsøksreplikatene. Dette ble kun utført ved T0. For behandlingene A-/V+ (naturlig nedbrytning av planktoniske virus) og A-/V- (bakgrunn av EhV i forsøksvannet) ble det samlet inn 0.5 mL vann kombinert fra dag 4 og 5 i

totalt 4 brønner for hver av replikatene og for hver av behandlingene. Dette ble samlet inn under prøvetakningstidspunktene T0-T3. Innsamlet hus og fekalpellets ble oppbevart i mørke ved 8°C for å simulere samme lys og temperaturforhold som finnes på fjordbunnen i området utenfor Bergen (R.-A. Sandaa personlig kommunikasjon, Høsten 2017).

### 2.3.3 Måling av filtrasjonsrate og filtreringseffektivitet til *Oikopleura dioica*

For hver av flowcytometri-prøvene ble det telt antall EhV, *Isochrysis sp.* og *Rhinomonas reticulata*. For å kontrollere for bakgrunnstøy i FCM-tellinger ble det anvendt tre kontrollprøver som bestod av samme TE-buffer og SYBR-Green-løsning som ble brukt til tillaging av prøvefortynninger. Tre slike kontrollprøver ble telt for hver 15 forsøksprøver som ble telt. For et utvalg av prøvene ble det også tilsatt 1 µL av en løsning med 1.0 µm diameter plastkuler for å dokumentere størrelsesforholdet på partiklene i prøvene (E. Petelenz-Kurziel personlig kommunikasjon, 25. Oktober 2017). Det ble valgt å tilsette kuler til alle behandlingene i replikat “A” ved et prøvetidspunkt, samt algeprøvene for samme tidspunkt og en kontroll. Dataene ble behandlet med programmet Cell Quest Pro.

#### Statistisk analyse og kalkuleringer

Resultatene fra analyseringen på flowcytometeret ble manuelt sortert i et regneark på Excel (2016). Deretter ble antall telte partikler på instrumentet omregnet til konsentrasjonen av partikler per milliliter i henhold til formelen under:

$$\frac{\text{Antall telte partikler} \times \text{Fortynning} \times 1000}{\text{Strømningshastighet} \times \text{Tid}^{\text{min}}} \quad (1)$$

Partikkelkonsentrasjonene ble analysert for statistiske forskjeller som tidligere beskrevet (J. Lawrence et al., 2017). For hver av behandlingene (A+/V+, A+/V-, A-/V+, A-/V-) fra de to prøvetidspunktene T3 og T6 ble det utført “Bootstrapping” simulert i R versjon 3.2.2 (R Developmental core Team, 2015) med 10 000 gjentakninger. For hver av behandlingene ved de to prøvetidspunktene er beregningene basert på tre biologiske replikater fra prøvebegrene og 3 tekniske replikater fra instrumentet. Under beregningene ble det tatt hensyn til at tre og

tre tekniske replikater var underordnet hvert sitt biologiske replikat. Dette gjelder ikke for analyseringen av *Isochrysis sp.* og *R. reticulata*, som bare har tre biologiske replikater. Hensikten bak “Bootstrapping” er å simulere nye hypotetiske datasett fra det opprinnelige datasettet ved å gjøre gjentatte tilfeldige uttrekk og tilbakelegging av de målte dataene. Dette fører til en økning av antall resultater, som igjen kan brukes i en større grad til å trekke en konklusjon fra prøveresultatet basert på en hel art fremfor en begrenset populasjon under forsøket (J. Tøpper personlig kommunikasjon, 12. Januar 2018). For dette eksperimentet ble det valgt å utføre “Bootstrappingen” 10 000 ganger da en ytterligere økning ikke visste en betydelig forskjell i fordelingen av datasettet. Fra hver av “Bootstrappingene” ble det konstruert et histogram for visualisering av fordelingen av prøveresultatene. Det ble konstruert et histogram for hver analyse ved hvert utviklingstrinn av *O. dioica* da det ble brukt et ulikt antall av dyr i hvert av forsøksbegreene ved de ulike utviklingstrinnene.

De ulike fordelingene fra histogrammene ble brukt til å beregne filtrering (partikler mL<sup>-1</sup>) og filtrasjonsraten (i mL individuell<sup>-1</sup> dag<sup>-1</sup>). Dette ble gjort ved å trekke sluttidspunktet (T6) ved forsøket fra starttidspunktet (T3) for hver av behandlingene. Dette gir gjennomsnittsforandringen av den målte faktoren under forsøket. Visst det oppnås en positiv verdi vil dette si at det har oppstått en filtrering eller nedbrytning av den målte analytten, i dette tilfelle EhV. Deretter blir differansen fra behandlingene med bare EhV (A-/V+) og bare *O. dioica* (A+/V-) trukket fra differansen til behandlingen både *O. dioica* og EhV (A+/V+). Dette er for å beregne effektiv filtrasjonsrate for EhV som er tilsatt til forsøksbegreene. Ved å trekke fra behandlingene med bare EhV (naturlig nedbrytning av virus) og bare *O. dioica* (bakgrunn av viruspartikler i dyr), vil man fjerne bakgrunnseffekter som finner sted i begreene (J. Lawrence et al., 2017). For EhV kan dette oppstå fra (1) nedbrytningen av eksperimentelt tilsatt EhV, (2) nedbrytningen av EhV som finnes naturlig i sjøvannet og/eller (3) *O. dioica* filtrasjon av EhV som finnes naturlig i sjøvannet. Siden begge de fratrukkede behandlingene inneholder nedbrytningen av naturlig forekommende EhV i sjøvannet, ble behandlingen uten *O. dioica* og EhV (A-/V-) lagt tilbake til prøveestimatet. Dette forhindret at nedbrytningen av naturlig forekommende EhV ikke ble trukket fra prøveresultatet to ganger, da denne kontrollen kun inneholder denne effekten. Tilsammen utgjør dette resultatet mengde med viruspartikler filtrert av *O. dioica* (EhV partikler mL<sup>-1</sup>).

Fra dette filtreringsestimatet (EhV partikler mL<sup>-1</sup>) ble det beregnet filtrasjonsraten (i mL individuell<sup>-1</sup> dag<sup>-1</sup>). Dette ble gjort ved å dele det oppnådde estimatet på de 3 timene som estimatet er beregnet fra forsøket (T3-T6). Dette blir multiplisert med døgnetts 24 timer, før svaret deles på antall dyr som befinner seg i forsøksbegrene for hvert av utviklingstrinnene. For dag 3 er dette 120 dyr, mens for dag 4 og 5 er dette henholdsvis 80 og 40 dyr. For å ta hensyn til hvor mange partikler det finnes av den målte analytten i hver av forsøksbegrene, ble estimatet deretter delt på konsentrasjonen av målt analytt i mL. Dette kommer av at en høyere konsentrasjon av EhV tar lengre for *O. dioica* å filtrere enn en lavere konsentrasjon (J. Tøpper personlig kommunikasjon, 12. Januar 2018). Konsentrasjonen av EhV var 10<sup>6</sup> EhV ml<sup>-1</sup> under forsøkene, mens 2000 celler/mL *Isochrysis sp.* var tilsatt til dag 3 dyr begrene. For dag 4 og 5 ble 4000 celler/mL *Isochrysis sp.* tilsatt. For *R. reticulata* ble 1000 celler/mL tilsatt til dag 4 og 5 dyrene. Filtrasjonsraten ble ikke beregnet for bakterier og for *R. reticulata* for dag 3 dyrene. Dette var fordi det var en ukjent konsentrasjon av bakterier i sjøvannet og fordi dag 3 dyrene ikke ble fôret med *R. reticulata* før forsøkene. Hele beregningen for filtreringsraten av EhV for dag 5 dyr er demonstrert i formelen under:

$$\frac{\left(\frac{\text{Filtreringsestimatet}}{3 \text{ timer}}\right) \times 24 \text{ timer}}{\frac{40 \text{ dyr}}{10^6 \text{ EhV ml}^{-1}}} \quad (2)$$

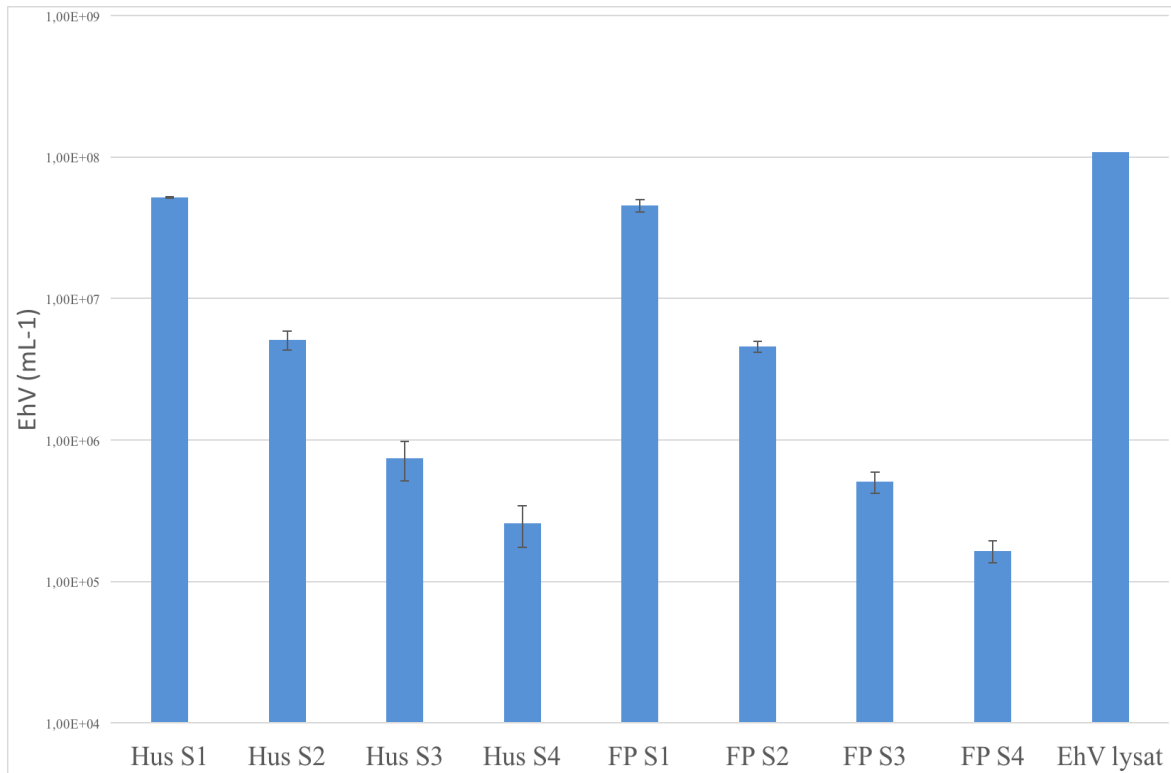
For både det beregnede filtreringsestimatet og filtrasjonsraten ble det beregnet gjennomsnitt og 95% konfidensintervaller ved hjelp av R versjon 3.2.2 (R Developmental core Team, 2015). Ut fra de estimerte histogrammene ble det også beregnet hvor sannsynlig det var at resultatet var forskjellig fra null, der 0 betyr at det ikke har skjedd en filtrering av EhV av *O. dioica*. Et resultat ble definert forskjellig fra null dersom sannsynligheten for et negativt gjennomsnittsfordelingsestimat for filtrasjonsraten/filtreringseffektiviteten under 0 var >95% og dersom sannsynligheten for et positivt gjennomsnittsfordelingsestimat under 0 var <5%.

For beregning av filtreringseffektiviteten ble filtrasjonsraten (i mL individuell<sup>-1</sup> dag<sup>-1</sup>) kalkulert fra fjerning av EhV av *O. dioica* sammenlignet med filtrasjonsraten kalkulert fra fjerning av matalgene, *Isochrysis sp.* og *R. reticulata*. Den av de to matalgene som viste høyest filtrasjonsrate ble satt til å være 100%, der filtreringseffektiviteten av de andre matpartiklene og EhV ble beregnet som en prosentandel av dette (K. O. Rothhaupt, 1990).

## 2.4 Skjebnen til virus fanget i hus og fekalpellets

### 2.4.1 Kontroll av vaskeprosessen

Før forsøket ble startet ble det gjort en kontrolltest for å undersøke for en tilstrekkelig vaskeprosess av hus og fekalpellets. Hensikten bak testen var å forsikre seg om at EhV som ble målt over tid skulle være viruspartikler avgitt fra hus og fekalpellets og ikke viruspartikler overført fra forsøksvannet. Tomme *O. dioica* hus og fekalpellets ble innsamlet fra tilfeldige dyrkningsbeger med dag 5 dyr som ikke hadde blitt eksponert for EhV viruset før. Vann med hus og fekalpellets ble overført til 50 mL Falkonrør og tatt til mikroskoperingsfasilitetene ved Institutt for biovitenskap ved Universitetet i Bergen. Tre replikater hver bestående av 45 *O. dioica* hus eller 150 fekalpellets ble overført til hver sine brønner i en mikrotiterplate (Costar 3524, 24 brønner). Deretter ble overflødig vann fjernet med skånsom pipettering og 2 mL EhV lysat tilsatt til hver av brønnene som inokulum. Fra hver av brønnene ble det deretter tatt ut 1 mL til analysering på FCM. Vasketrinnet ble gjentatt totalt 8 ganger for hver av brønnene. Et tilstrekkelig antall med vasketrinn skulle sikre at antall viruspartikler igjen i inkuberingsvannet er trivielt i forhold til viruspartikler fanget i hus og fekalpellets. På grunn av den tydelige nedgangen av antall frie EhV partikler ble det valgt å bare analysere 4 av trinnene i vaskeprosessen på FCM (2.2.3). Fra disse prøvene ble det observert at man kan fjerne omtrent 90% av EhV partiklene ved hvert vasketrinn som ble gjennomført (Figur 13). Dette tilsvarte en prosentvis nedgang på henholdsvis -90.3%, -85.3% og -65.2%, for hvert vasketrinn av husprøvene. For fekalpelletsprøvene var den prosentvise nedgangen henholdsvis -89.9%, -88.9% og -67.4%. Det ble derfor besluttet at det var tilstrekkelig å gjennomføre 6 vasketrinn for hver brønn under forsøket. Dette ble valgt da en ytterligere økning av antall vasketrinn trolig ville komme under instrumentets deteksjonsnivå.



Figur 8. Kontrolltest av vaskeprosessen av hus og fekalpellets(FP). Markeringen “S” står for skylling og er referert til hvilket nummer av vasketrinn som er gjennomført. For eksempel står “S1” for vasketrinn nummer 1. Hvert vasketrinn er basert på et gjennomsnitt av tre replikater.

Videre defineres derfor at resterende viruspartikler er “fanget” i hus og fekalpellets, uavhengig av om de befinner seg i hus og fekalpellets eller i inkuberingsvannet. Denne definisjonen blir brukt videre da det er umulig å fjerne absolutt alt av inkuberingsvannet uten å ødelegge prøvemateriale. For hvert vasketrinn ble det beregnet standardavvik og resultatene ble deretter plottet inn i et søylediagram ved hjelp av Excel (2016).

## 2.4.2 MPN-analyser

For å undersøke for infeksiositet og persistens av EhV partikler i hus og fekalpellets ble det utført MPN-analyse 6 dager etter avsluttet forsøk med dag 5 dyr (9. Oktober 2017). Ved å måle antall infeksiøse EhV partikler frigjort fra hus og fekalpellets kan man undersøke hvorvidt EhV partikler forblir infeksiøse etter filtrasjonen samt tarmomløpet til *O. dioica*. Dette kan være med på å besvare om fangede EhV partikler vil representere en overlevelsesmekanisme for disse virusene fra ytre påvirkninger som temperatur og beiting.

Dette ble utført for hus fra behandlingene med *O. dioica* og EhV (A+/V+) (nedbrytning av EhV i hus), kun EhV (A-/V+) (nedbrytning av EhV i sjøvann), kun *O. dioica* (A+/V-) tilsatt EhV (+V) ved dag 5 (nedbrytning av EhV i sjøvann med tilstedeværelsen av hus) og verken *O. dioica* eller EhV (A-/V-) (bakgrunn av virus i inkuberingsvannet) (Tabell 7). For fekalpellets ble det kun gjennomført analysering av behandlingene med *O. dioica* og EhV (A+/V+) (nedbrytning av EhV i fekalpellets) og kun *O. dioica* (A+/V-) tilsatt EhV (+V) ved dag 5 (nedbrytning av EhV i sjøvann med tilstedeværelsen av fekalpellets). Innsamlet prøvemateriale ble vasket som beskrevet i kapittel 2.4.2 før langtidsinkubering for å redusere bakgrunnssignalet fra inkubasjonsvannet overført sammen med hus og fekalpellets. For hver prøvetakning ble det utført tre biologiske replikater for alle prøvene. Fra hver av prøvene ble det pipetert 1000 µL overvann til MPN under disseksjons mikroskop, for å forsikre seg om at hus og fekalpellets ikke kom med under prøvetakningen. For MPN-analysene ble hvert av replikatene fortynnet 10 ganger med mengdeforholdet 100 µL prøve:200 µL filtrert sjøvann og overført til mikrotiterplater (Greiner Sapphire microplate, 96 brønner). I mikrotiterplatene ble det først pipetert 150 µL filtrert sjøvann i hver brønn i første rekken av platen (totalt 8 brønner). Kontrollen ble deretter tildekket med parafilm (Parafilm M 50mm), før resterende brønner ble tilsatt 140 µL med EhV kultur og 10 µL med prøve i 8 brønner. Rekkefølgen for oppsettet var henholdsvis kontroll, ufortynnet prøve og fortynning 1-10. Mikrotiterplatene ble deretter inkubert ved 16 °C og evaluert ("scored") etter tolv dager. MPN ble også utført på EhV lysatet på grunn av mistanke om få infeksjøs viruspartikler i lysatet som ble brukt til hovedforsøket (tillaget 26-28.09.2017). Alle dataene fra MPN analysen ble beregnet med MPN Calculation Program, Versjon 5, 09.01.2017 (B. Jarvis, C. Wilrich, & P. T. Wilrich, 2010) og visuelt framstilt i et søylediagram med Excel (2016).

Tabell 7. Oversikt for de ulike behandlingene som ble brukt under forsøket og hva disse skulle undersøke. De fire ulike behandlingene var: begre tilsatt både *O. dioica* og EhV (A+/V+), begre kun tilsatt *O. dioica* (A+/V-) tilsatt EhV (+V) ved dag 5, begre kun tilsatt EhV (A-/V+) og begre verken tilsatt *O. dioica* eller EhV (A-/V-).

<b>Eksperimentell behandling</b>	<b>Undersøkelse</b>
A+/V+	Nedbrytning av EhV i hus/fekalpellets
A-/V+	Nedbrytning av EhV i sjøvann
A+/V- (+V)	Nedbrytning av EhV i sjøvann med tilstedeværelsen av hus/fekalpellets
A-/V-	Bakgrunn av virus i inkuberingsvannet

For å undersøke nedbrytning av planktoniske EhV partikler over tid og for å sammenligne denne nedbrytningen med frigjøring av EhV partikler fra *O. dioica* hus og fekalpellets, ble konsentrasjonen av EhV og bakterier analysert i overvannet fra behandlingene A+/V+ hus, A-/V+ hus og A+/V+ fekalpellets ved flowcytometri (FACS Calibur flowcytometer E1831). Dette ble gjort ved at 500 µL overvann fra hver av behandlingene ble fiksert med 10 µL av en 25% (v/v) glutaraldehydløsning (endelig konsentrasjon: 0.5 % (v/v) (Sigma-Aldrich) (2.2.3) og analysert i henhold til protokoll (Vedlegg A), med unntak av at analysene ble utført med de tre fortyningene 10x, 100x og 1000x. Dette ble utført ved fire tidspunkt med 7 dagers mellomrom (oppstart 20.11.2017). Det ble ikke målt *Isochrysis sp.* eller *R. reticulata* i prøvene på grunn av lavt deteksjonsnivå. Dette kan forklares med at prøvene har stått 48 dager i mørke. For hver av de tre behandlingene ved de fire tidspunktene ble det beregnet et gjennomsnitt og standardavvik fra tre biologiske replikater og tre tekniske replikater. Resultatene ble deretter plottet inn i et søylediagram ved hjelp av Excel (2016).

### **2.4.3 Visualisering av nedbrytningsprosessen for hus og fekalpellets**

For å visualisere nedbrytningen av hus og fekalpellets, samt kontrollere for å anslå passende tidspunkt for prøvetakning til MPN, ble det tatt fotografier med inversmikroskop (ZEISS 1021865541 SN:3834001080), hver tredje dag de tre første ukene etter forsøkene. På grunn av langsom nedbrytning, ble dette utvekslet til hver syvende dag frem til total nedbrytning for fekalpellets (20. November 2017) og ut høsten 2017 for hus (avsluttet 11. Desember 2017).

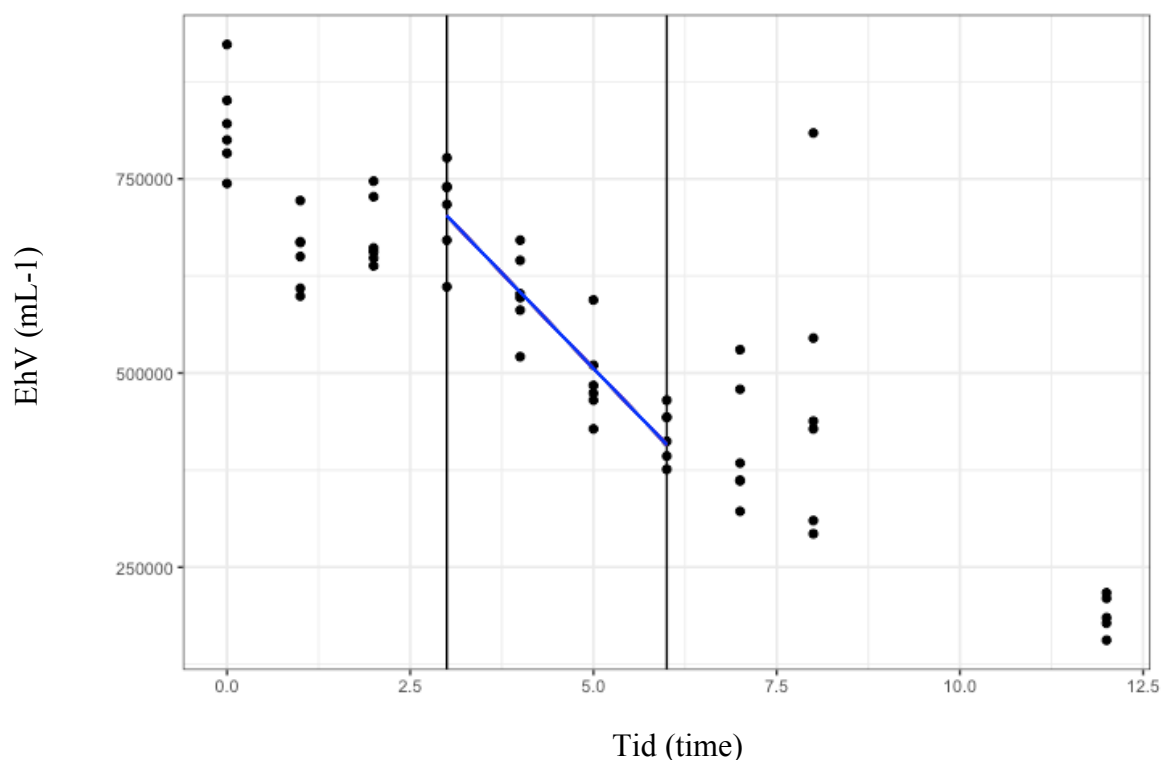


Mellom fotograferingene ble prøvematerialet oppbevart i mørke ved 8°C for å simulere samme lys og temperaturforhold som finnes på fjordbunnen i området utenfor Bergen (R.-A. Sandaa personlig kommunikasjon, Høsten 2017). Under fotograferingen ble hus og fekalpellets oppbevart i mørke ved romtemperatur frem til billedtakningen. Prøvematerialet ble maksimum værende i mikroskopet i 5 minutter på grunn av varmedannelse. Alle bildene av hus og fekalpellets ble tatt fra behandlingene med *O. dioica* og EhV (A+/V+) og kun *O. dioica* (A+/V-). Bildene ble behandlet med programmet AxioVision Rel. 4.8. Antall fekalpellets ble også telt i disseksjons mikroskop (Wild M38 Heerbrugg Switzerland). Dette ble gjort for kontrollere for antall fekalpellets i hver brønn, samt for å kontrollere for nedbrytning av enkelte fekalpellets under inkuberingsprosessen.

## 3 Resultater

### 3.1 Filtrasjonskurve

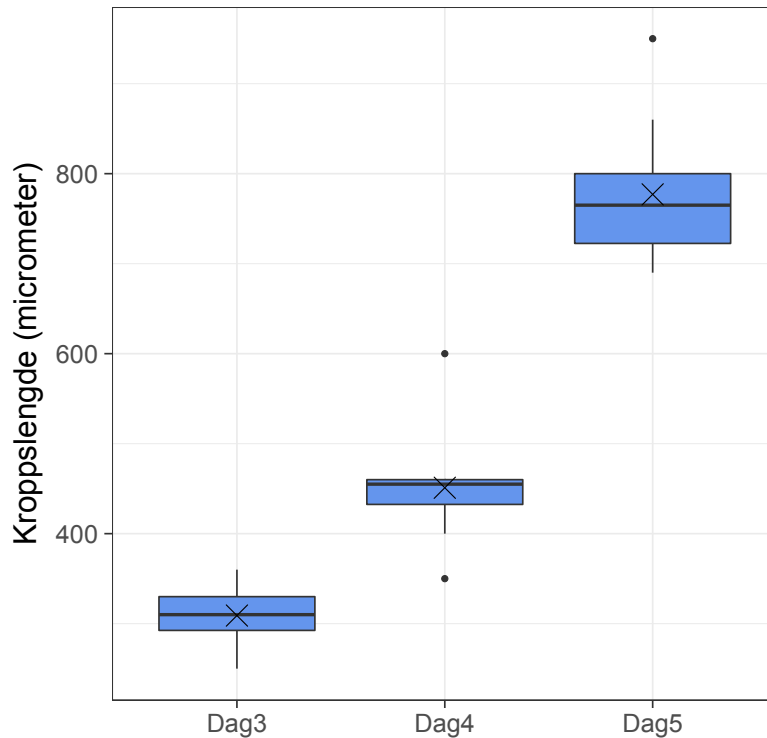
Tilstedeværelse av EhV over tid i et 12 timers forsøk med *O. dioica* viste varierende dynamikk som kunne deles inn i tre perioder: (1) T0-T3 der antall EhV synker for så å stabilisere seg, (2) T3-T6 der antall EhV synker kraftig og (3) T6-T12 der antall EhV ser ut til å stabilisere seg og spredning mellom replikatene øker. Lineær regresjon av disse tre tidsperiodene viser at kun målepunktene mellom T3 og T6 har en lineær relasjon ( $Y = -95722x + 996333$ ,  $R^2 = 0.91364$ ), mens målepunktene mellom T0-T3 ( $Y = -30683x + 761483$ ,  $R^2 = 0.18251$ ) og T6-T12 ( $Y = -40773x + 709684$ ,  $R^2 = 0.39128$ ) ikke hadde en lineær relasjon (Figur 8). Sammen med en ANOVA-test visste også den lineære regresjonen en målbar reduksjon i antall viruspartikler mellom T3 og T6 (ANOVA:  $F = 1876.60$ ,  $df = 17$ ,  $p\text{-verdi} < 0.001$ ). Det ble derfor valgt å bruke målområdet mellom T3 og T6 til beregning av filtrasjonsraten for fjerning av EhV av *O. dioica* (3.2).



Figur 9. Filtrasjonskurve for EhV av *O. dioica*. Kurven ble brukt til å finne start- og sluttidspunkt i det lineære området for fjerning av EhV av *O. dioica* til beregning av filtrasjonsraten. For hver av de 13 prøvetakingstidspunktene ble det analysert 1 mL overvannsprøve til flowcytometer (FCM) fra hver av de 6 forsøksbegreene, bestående av 40 dag 5 dyr av samme størrelse og EhV (startkonsentrasjon;  $\sim 10^6$  EhV mL<sup>-1</sup>). Hvert prøvetakingstidspunkt skjedde med 60 minutters mellomrom. Ut fra en lineær regresjonsanalyse ble det besluttet at det lineære området lå mellom T3 og T6 ( $7,09 \times 10^5 - 4,22 \times 10^5$  EhV mL<sup>-1</sup>). Tidspunkt T3 og T6 er markert med sorte linjer.

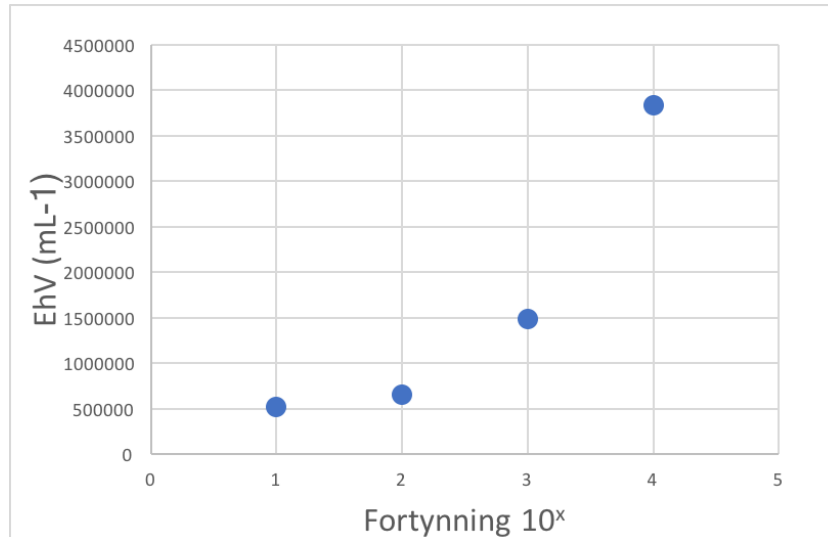
## 3.2 Filtrasjonsraten og filtreringseffektiviteten

For dag 3 dyr ble gjennomsnitt kroppslengde målt til å være  $309 \pm 33$   $\mu\text{m}$ , for dag 4:  $451 \pm 63$   $\mu\text{m}$  og dag 5:  $777 \pm 82$   $\mu\text{m}$  (gjennomsnitt  $\pm$  standard avvik,  $n=10$ ) (Figur 9). En ANOVA-test av dyrenes lengde basert dag visste en p-verdi under 0.05 som betyr at dyrene på hver av forsøksdagene hadde ulike utviklingsstadier (ANOVA:  $F=146.95$ ,  $df=27$ ,  $p\text{-verdi}=3.072 \times 10^{-15}$ ) slik at man effektivt kunne teste effekten av utviklingsstadiet på evnen til å fjerne EhV fra sjøvann.



Figur 10. Kroppslengden ( $\mu\text{m}$ ) til *O. dioica* under forsøkene. På hver forsøksdag ble 10 tilfeldige utvalgte individer målt. Kroppslengden er målt uten hale. Gjennomsnittet for hver dag er markert med et sort kryss.

Til beregningene av filtrasjonsraten og filtreringseffektiviteten ble det valgt å se bort fra resultatene fra fortytning 10 000x. Dette ble gjort på grunnlag av at fortytning 10 000x skilte seg signifikant fra gjennomsnittet av de andre fortytningene med et signifikansnivå på 0.01 for både EhV (T-test: gjennomsnitt=889510, p-verdi=0.0051) og bakterier (T-test: gjennomsnitt= 1972963, p-verdi= 0.0007). Under analysering på flowcytometeret ble det også observert at antall tellinger av partikler i den høyeste fortytningen (1:10000) visste svært likt resultat som instrumentets kontroller (Vedlegg A). Dette betyr at disse fortytningene var for å høye til å beregne et pålitelig resultat. Eksempler på differanser mellom fortytningene er visst under for måling av EhV og bakterier fra behandlingen A+/V+ ved dag 3 (Figur 10).

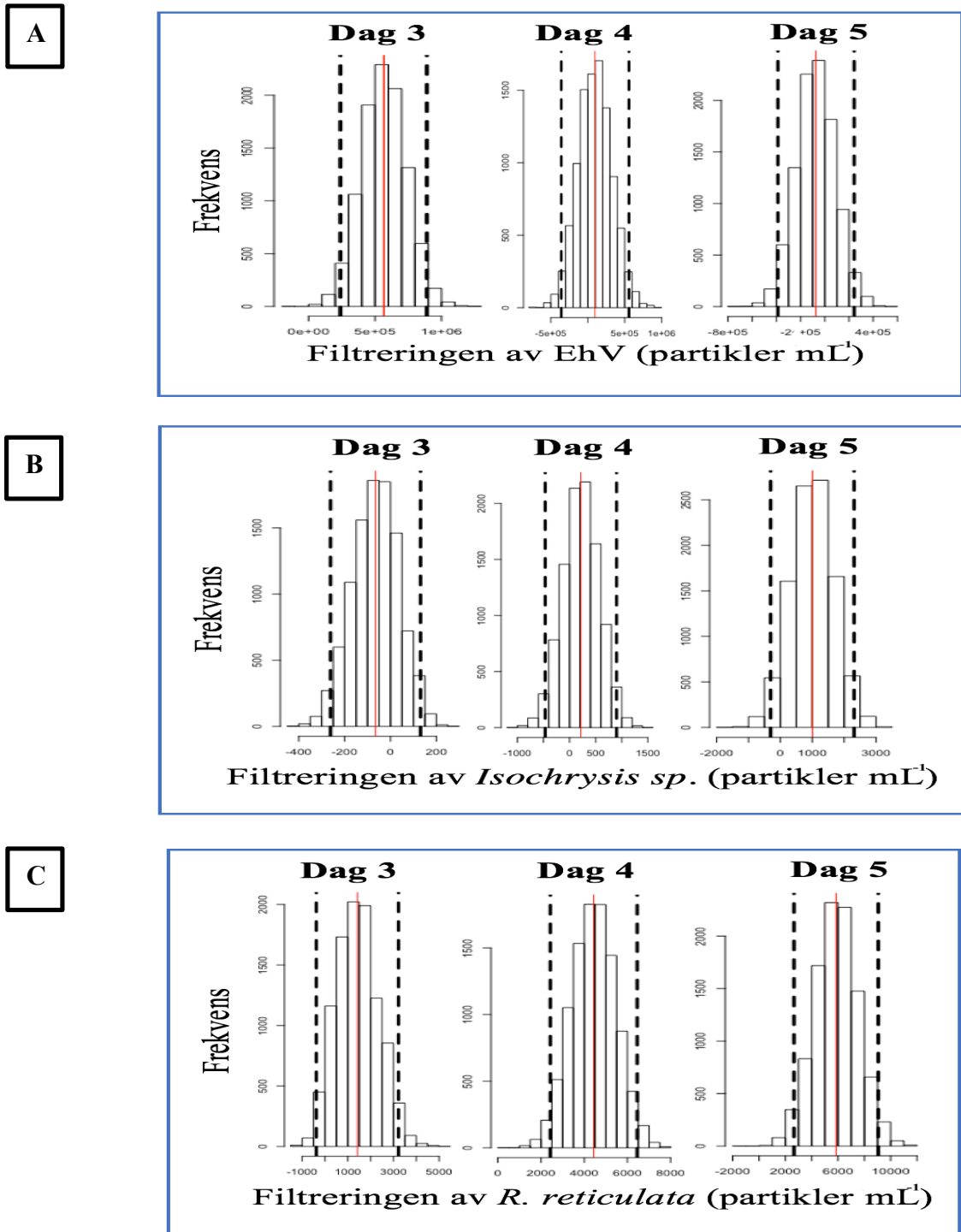


Figur 11. Et eksempel på et plot som ble brukt i beslutningen om å forkaste resultatene fra 10 000x fortynningen gjort ved målingen av EhV på flowcytometer. På plotet kan man tydelig se at 10 000x fortynningen ligger betydelig høyere enn fortynningene 10x, 100x og 1000x (x-akse fortynning  $10^x$  betyr for eksempel  $10^2$  = fortynning 100x). Målingen er gjort fra behandling A+/V+ for dag 3 dyrene, replikatt A ved 3 prøvetakingstidspunkt.

### 3.2.1 Filtrasjon

I denne oppgaven er filtrasjon definert som antall partikler fjernet per mL sjøvann av alle forsøksdyrene under det 3 timers lange forsøket i det lineære området for fjerning av partikler av *O. dioica*. Filtrasjon uttrykkes derfor som partikler fjernet per mL (partikler  $\text{mL}^{-1}$ ). De beregnede gjennomsnittene av filtreringen for dag 5 dyrene var  $6.30 \pm 2.1 \times 10^4$  EhV  $\text{mL}^{-1}$  og  $5.85 \pm 1.6 \times 10^3$  *R. reticulata* celler  $\text{mL}^{-1}$ , med 99.9% sannsynlighet for at svarene var forskjellig fra null (Figur 11). For *Isochrysis sp.* var dette gjennomsnittet  $1.00 \pm 0.7 \times 10^3$  *Isochrysis sp.* celler  $\text{mL}^{-1}$  med 93.3% sannsynlighet for at svaret var forskjellig fra null. Ut fra kriteriene som er satt for forsøket, med minimum 95% sannsynlighet at for at svaret er forskjellig fra null, når ikke svaret kriteriene. Det betyr derfor at målingene ikke viser en signifikant filtrasjon av *Isochrysis sp.* for dag 5 dyrene. De beregnede gjennomsnittene for dag 4 dyrene var  $-7.28 \pm 16 \times 10^4$  EhV  $\text{mL}^{-1}$ ,  $2.17 \pm 3.5 \times 10^2$  *Isochrysis sp.* celler  $\text{mL}^{-1}$  og  $4.44 \pm 1.0$  *R. reticulata* celler  $\text{mL}^{-1}$  med henholdsvis 32.9%, 73.5% og 99.9% sannsynlighet for at svaret var forskjellig fra null. Resultatene viser derfor en signifikant filtrasjon kun av *R. reticulata* for dag 4 dyrene. De beregnede gjennomsnittene av filtreringen for dag 3 dyrene

var  $9.83 \pm 23 \times 10^4$  EhV mL<sup>-1</sup>,  $-6.5 \pm 10 \times 10^1$  *Isochrysis sp.* celler mL<sup>-1</sup> og  $1.4 \pm 0.9 \times 10^3$  *R. reticulata* celler mL<sup>-1</sup> med henholdsvis 66.3%, 73.2% og 94.7% sannsynlighet for at svaret var forskjellig fra null. Selv om sistnevnte er svært nært kriteriene om 95 % signifikans nivå for at svaret er forskjellig fra null, møtes det ikke fullstendig. Resultatene viser dermed ingen signifikant filtrasjon for dag 3 dyrene.

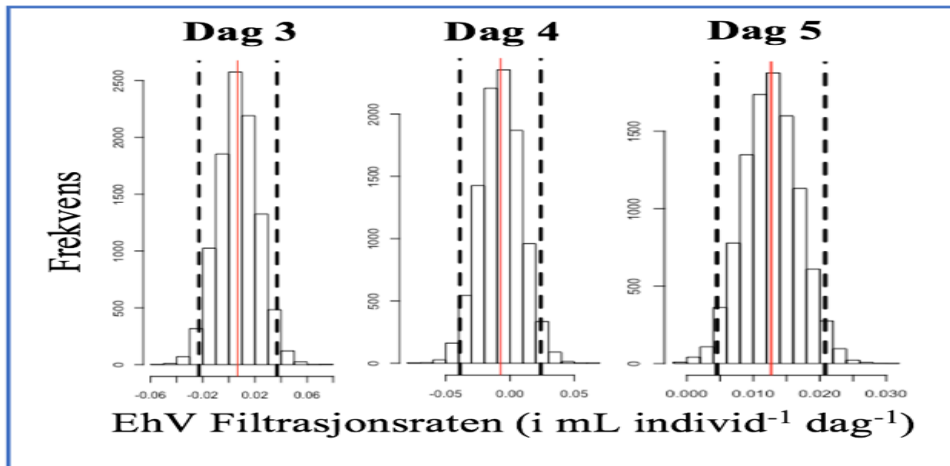
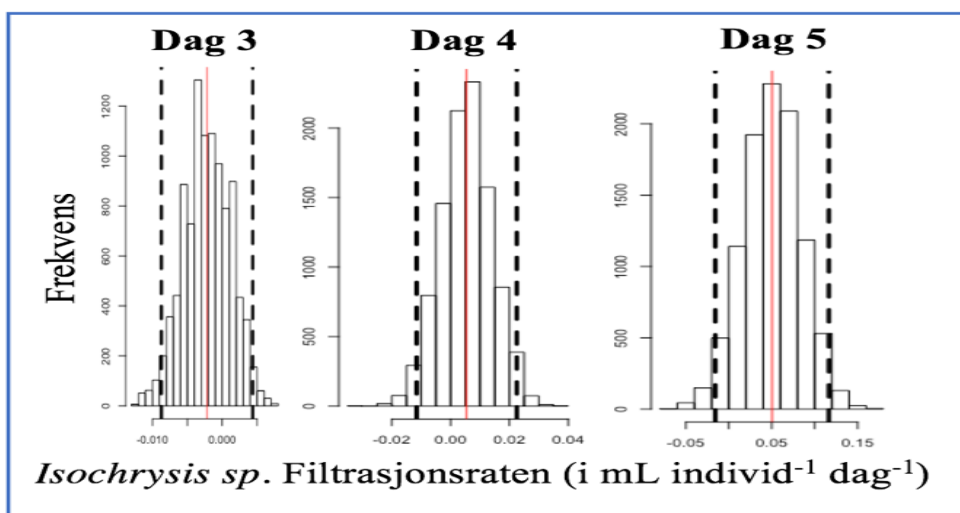
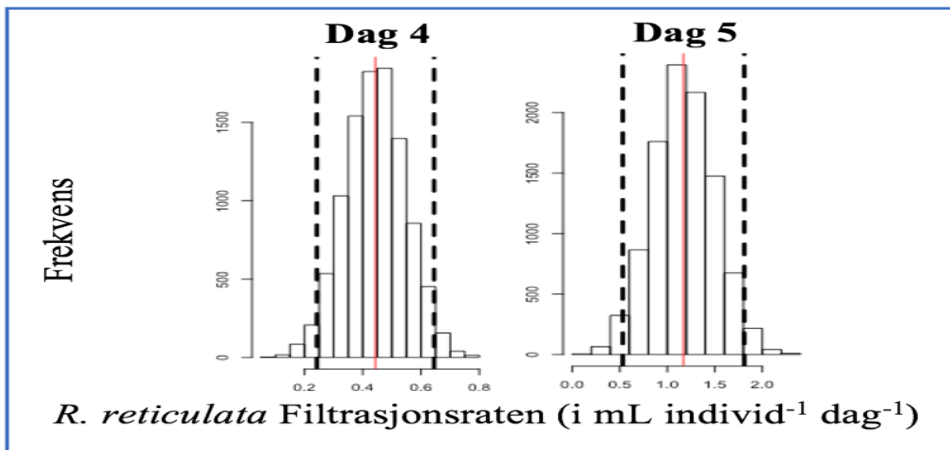


Figur 12. Fordelingen av prøveresultatene for filtreringen av (A) EhV, (B) *Isochrysis sp.* og (C) *R. reticulata*. av *O. dioica* med alder dag 3-5 målt på flowcytometer. For hver dag ble det utført 10 000 “bootstrapping” for å øke antall forsøksresultater. Med filtrering menes det antall partikler fjernet per mL av alle forsøksdyrene under forsøket i det 3 timer lange lineære området for fjerning av partikler av *O. dioica* (T3-T6). For dag 3 var dette 120 dyr, mens for dag 4 og 5 var dette henholdsvis 80 og 40 dyr. Den røde linjen viser gjennomsnittet av alle målingene, mens 95% konfidensintervallet er markert med to svartstripede linjer (0.025 og 0.975 kvantilene).

### 3.2.2 Filtrasjonsraten

Filtrasjonsraten er antall partikler fjernet per mL sjøvann av hvert forsøksdyr i løpet av 24 timer med hensyn på startkonsentrasjonen og uttrykkes derfor som mL fjernet per individ per dag ( $\text{mL individ}^{-1}\text{dag}^{-1}$ ). For EhV er det beregnede gjennomsnittet av posteriorfordelinger for filtrasjonsraten henholdsvis  $0.007 \pm 0.015$  i  $\text{mL individ}^{-1}\text{dag}^{-1}$  for dag 3 dyr,  $-0.007 \pm 0.016$  i  $\text{mL individ}^{-1}\text{dag}^{-1}$  for dag 4 dyr, og  $0.013 \pm 0.004$   $\text{mL individ}^{-1}\text{dag}^{-1}$  for dag 5 dyr med henholdsvis 34.5%, 68.0% og 99.9% sannsynlighet for at svaret var forskjellig fra null (Figur 12A). Det er derfor bare sannsynlig at det har skjedd en signifikant filtrasjon av EhV av dag 5 dyrene. For å kunne sammenligne filtrasjonsraten for EhV med filtrasjonsraten for større matpartikler ble det også beregnet gjennomsnittet av posteriorfordelinger for filtrasjonsraten av *Isochrysis sp.* og *R. reticulata*. For *Isochrysis sp.* var det beregnede gjennomsnittet av posteriorfordelinger for filtrasjonsraten  $-0.002 \pm 0.003$  i  $\text{mL individ}^{-1}\text{dag}^{-1}$  for dag 3 dyr,  $0.005 \pm 0.265$  i  $\text{mL individ}^{-1}\text{dag}^{-1}$  for dag 4 dyr og  $0.050 \pm 0.034$  i  $\text{mL individ}^{-1}\text{dag}^{-1}$  for dag 5 dyr med henholdsvis 73.2%, 73.5% og 93.3% sannsynlighet for at svaret er forskjellig fra null (Figur 12B). For *R. reticulata* var filtrasjonsraten  $0.444 \pm 0.103$  i  $\text{mL individ}^{-1}\text{dag}^{-1}$  for dag 4 dyr og  $1.171 \pm 0.327$  i  $\text{mL individ}^{-1}\text{dag}^{-1}$  for dag 5 dyr med henholdsvis 73.5% og 99.9% sannsynlighet for at svaret er forskjellig fra null (Figur 12C). Det er derfor bare sannsynlig at det har skjedd en signifikant filtrasjon av *R. reticulata* av dag 5 dyrene.



**A****B****C**

Figur 13. Fordelingen av prøveresultatene for filtrasjonsraten til (A) EhV, (B) *Isochrysis sp.* og (C) *R. reticulata* og for tre utviklingsstadier til *O. dioica* (dag 3-5) basert på flowcytometrimålinger. For hver dag ble det utført 10 000 “bootstrappinger” for å øke antall forsøksresultater. Med filtrasjonsraten menes det antall partikler fjernet per mL sjøvann av hvert forsøksdyr i løpet av 24 timer med hensyn på startkonsentrasjonen. For EhV var startkonsentrasjon  $10^6$  EhV ml<sup>-1</sup> for eksperimentelt tilsatt EhV, mens for *R. reticulata* var startkonsentrasjon 1000 celler/mL for dag 4 og 5 dyrene. For *Isochrysis sp.* var startkonsentrasjon 2000 celler/mL for dag 3 dyrene og 4000 celler/mL for dag 4 og 5 dyrene. Den røde linjen viser gjennomsnittet av alle målingene, mens 95% konfidensintervallet er markert med to svartstripede linjer (0.025 og 0.975 kvantilene).

### 3.2.3 Filtreringseffektiviteten

I denne oppgaven defineres filtreringseffektiviteten som en relativ sammenligning av filtrasjonsraten kalkulert fra fjerningen av EhV i forhold til filtrasjonsraten kalkulert fra fjerning av matalgene *R. reticulata* eller *Isochrysis sp.* Den matpartikkelen som visste høyest filtrasjonsrate ble satt til 100%, der filtreringseffektiviteten av EhV ble beregnet som en prosentandel av dette. Filtreringseffektiviteten uttrykkes derfor i prosent (%). Ved kalkulering av filtrasjonsratene ble det funnet at *O. dioica* hadde høyest filtrasjonsevne for matalgen *R. reticulata* (Tabell 7). Det ble derfor bestemt at *R. reticulata* skulle representere 100% filtreringseffektivitet for *O. dioica*. Basert på denne antagelsen ble det beregnet at dag 5 dyrene hadde en filtreringseffektivitet på 1.1% for EhV. Den eneste sammenlignbare matalgen *Isochrysis sp.* for dag 3 dyrene visste en negativ verdi og det var derfor ikke hensiktsmessig å beregne filtreringseffektiviteten for dag 3 dyrene. Dette kunne heller ikke beregnes for dag 4 dyrene da det ble funnet en negativ verdi for filtrasjonsraten av EhV.

Tabell 8. Den beregnede filtrasjonsraten og filtreringseffektiviteten for EhV og de to matalgene *Isochrysis sp.* og *R. reticulata* av *O. dioica*. Filtrasjonsraten ble beregnet for utviklingstrinnene dag 3, dag 4 og dag 5 dyr.

Analytt	Utviklingstrinn <i>Oikopleura dioica</i>	Filtrasjonsraten (i mL individ <sup>-1</sup> dag <sup>-1</sup> )	Filtreringseffektiviteten (%)
<i>Emiliana huxleyi</i> virus	Dag 3	0.007±0.015	
	Dag 4	-0.007±0.016	
	Dag 5	0.013±0.004	1.1
<i>Isochrysis sp.</i>	Dag 3	-0.002±0.003	
	Dag 4	0.005±0.265	
	Dag 5	0.050±0.034	
<i>Rhinomonas reticulata</i>	Dag 4	0.444±0.103	100
	Dag 5	1.171±0.327	100

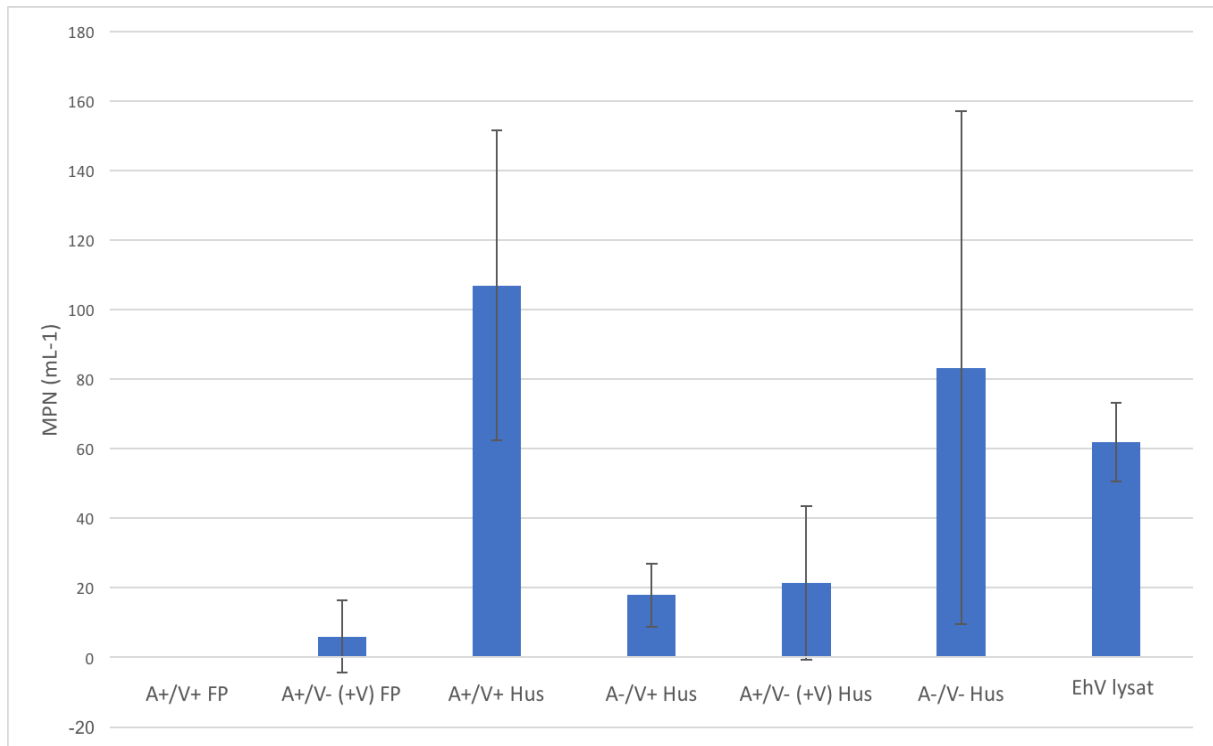
### 3.3 Viruspersistens og virusinfeksiositet i *Oikopleura dioica* hus og fekalpellets

For å måle frigjøring og infeksiositeten av EhV partikler i overvannet over tid under forhold som simulerer havbunnen ble det utført MPN-analyse. Dette ble utført for hus ved analysing av overvannet fra hus innsamlet fra behandlingene med *O. dioica* og EhV (A+/V+), kun EhV (A-/V+), kun *O. dioica* (A+/V-) tilsatt EhV (+V) ved dag 5 og verken *O. dioica* eller EhV (A-/V-). For fekalpellets ble det kun gjennomført analysing av overvannet fra fekalpellets innsamlet fra behandlingene med *O. dioica* og EhV (A+/V+) og kun *O. dioica* (A+/V-) tilsatt EhV (+V) ved dag 5. Det ble også utført en kontrolltelling for å fastslå hvor mange fekalpellets ble overført til hver av prøvebrønnene. I gjennomsnitt var det  $17 \pm 2.68$  fekalpellets i hver brønn (Tabell 9).

Tabell 9. Antall fekalpellets i hver prøvebrønn fra de to behandlingene med *O. dioica* og EhV (A+/V+) og kun *O. dioica* (A+/V-) tilsatt EhV (+V) ved dag 5.

Replikant	Eksperimentell behandling	Antall fekalpellets		
A	A+/V+	14	19	20
	A+/V- (+ V)	18	17	20
B	A+/V+	18	20	18
	A+/V- (+ V)	12	13	19
C	A+/V+	16	14	20
	A+/V- (+ V)	20	20	19

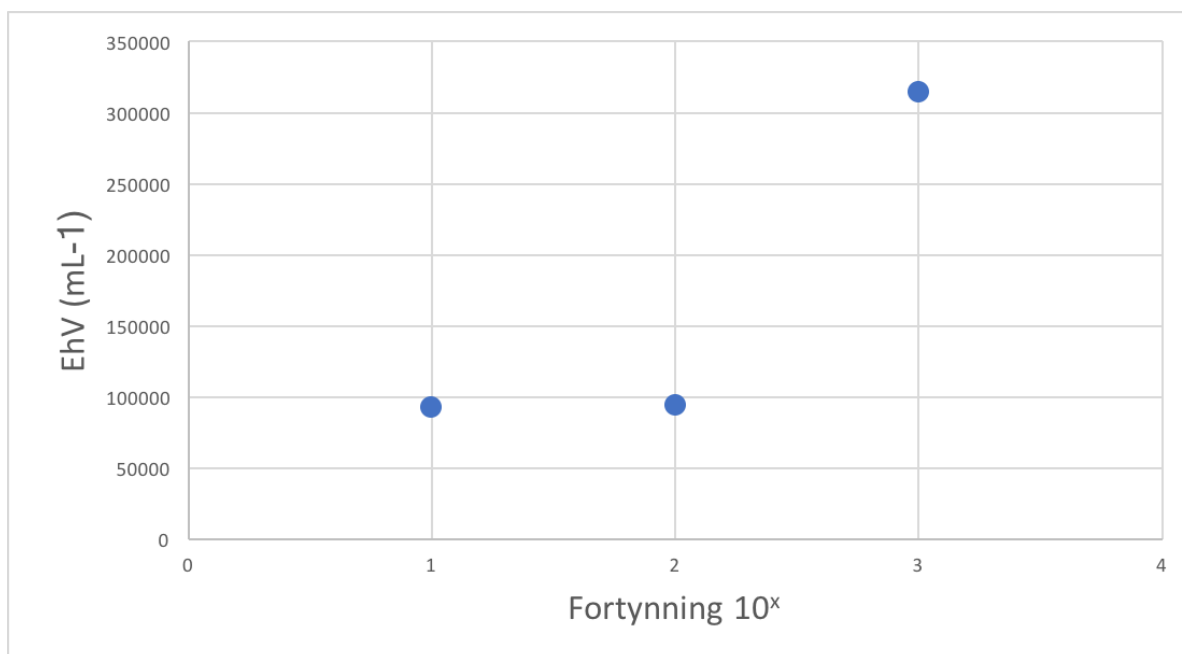
Ved målingen av antall infeksiose EhV viruspartikler ved hjelp av MPN-analyse ble det funnet i gjennomsnitt kun  $62 \pm 11$  infeksiose EhV  $\text{mL}^{-1}$  i EhV lysatet. For behandlingen A+/V- (+V) med fekalpellets ble det i gjennomsnitt målt kun  $6 \pm 10$  infeksiose EhV  $\text{mL}^{-1}$  i overvannet, mens behandlingen A+/V+ med fekalpellets ble det ikke målt noen infeksiose EhV i overvannet (Figur 14). For behandling A+/V+ med hus var det i gjennomsnitt  $107 \pm 45$  infeksiose EhV  $\text{mL}^{-1}$ . For de resterende behandlingene A-/V+ med hus, A+/V- (+V) med hus og A-/V- med hus, var det i gjennomsnitt henholdsvis  $18 \pm 9$ ,  $21 \pm 22$  og  $38 \pm 77$  infeksiose EhV  $\text{mL}^{-1}$  i overvannet (Figur 14).



Figur 14. Antall målte infeksjose EhV partikler (EhV mL<sup>-1</sup>) i overvannet fra 5 dager gamle hus og fekalpellets (FP). Hver behandling bestod av 3 biologiske replikater. Feilfeltene viser standardavviket for hver kolonne.

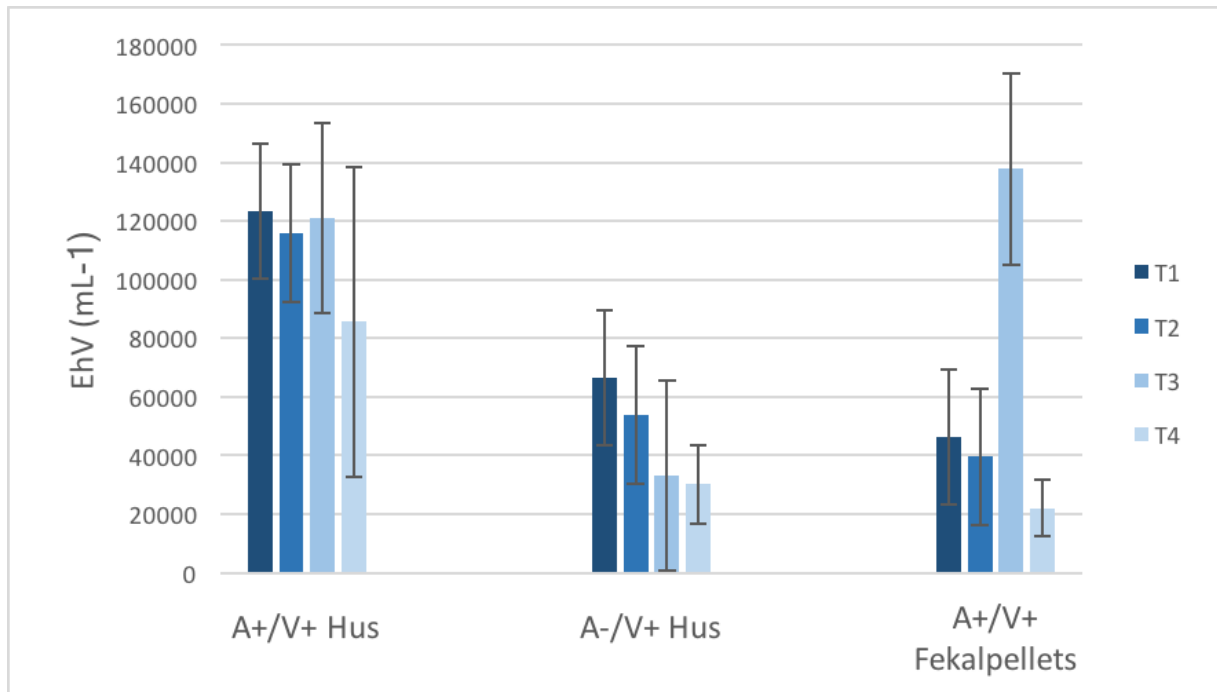
### 3.3.1 Nedbrytning av *Emiliana huxleyi* virus (EhV) partikler

Ved beregningen av gjennomsnittet av EhV partikler i hver prøve ble det valgt å se bort fra fortynning 1000x (T-test: gjennomsnitt=93574, p-verdi=0.0014) (3.2). Fra disse prøvene ble det derfor beregnet et gjennomsnitt og standardavvik fra tre biologiske replikater og to tekniske replikater. Et eksempel på en differanse mellom fortynningene er visst under for måling av EhV fra behandlingen A+/V+ med hus (Figur 15).



Figur 15. Et eksempel på et plot som ble brukt i beslutningen om å forkaste resultatene fra 1000x fortynningen gjort ved målingen av EhV på flowcytometer av hus og fekalpellets prøver. På plotet kan man tydelig se at 1000x fortynningen ligger betydelig høyere enn fortynningene 10x og 100x (x-akse fortynning  $10^x$  betyr for eksempel  $10^2 =$  fortynning 100x). Målingen er gjort fra behandling A+/V+ med hus, replikant A den 20.11.2017.

Konsentrasjonen av EhV partikler i overvannet fra hus fra behandlingen A+/V+ så ut til å holde seg konstant gjennom hele prøvetakingsperioden ( $1.23 \times 10^5$  EhV mL<sup>-1</sup>,  $1.16 \times 10^5$  EhV mL<sup>-1</sup>,  $1.21 \times 10^5$  EhV mL<sup>-1</sup> og  $8.56 \times 10^4$  EhV mL<sup>-1</sup>, for henholdsvis tidspunkt 1-4) (Figur 16). For behandling A-/V+ med hus var startkonsentrasjonen av EhV i overvannet på  $6.66 \times 10^4$  EhV mL<sup>-1</sup>, mens startkonsentrasjonen for behandling A+/V+ med fekalpellets var  $4.63 \times 10^4$  EhV mL<sup>-1</sup>. Kovariansanalyse (ANCOVA) med EhV mL<sup>-1</sup> som avhengig variabel, og behandling og tid som uavhengige variabler viste ingen signifikante forskjeller i antall frie EhV partikler over tid i noen av behandlingene (ANCOVA: P=0.39 (A+/V+ hus), P=0.93 (A-/V+ hus)), P=0.59 (A+/V+ fekalpellets)). Basert på resultatene over kunne det derfor ikke sees en signifikant forskjell i degradering av EhV mellom de ulike behandlingene over tid.

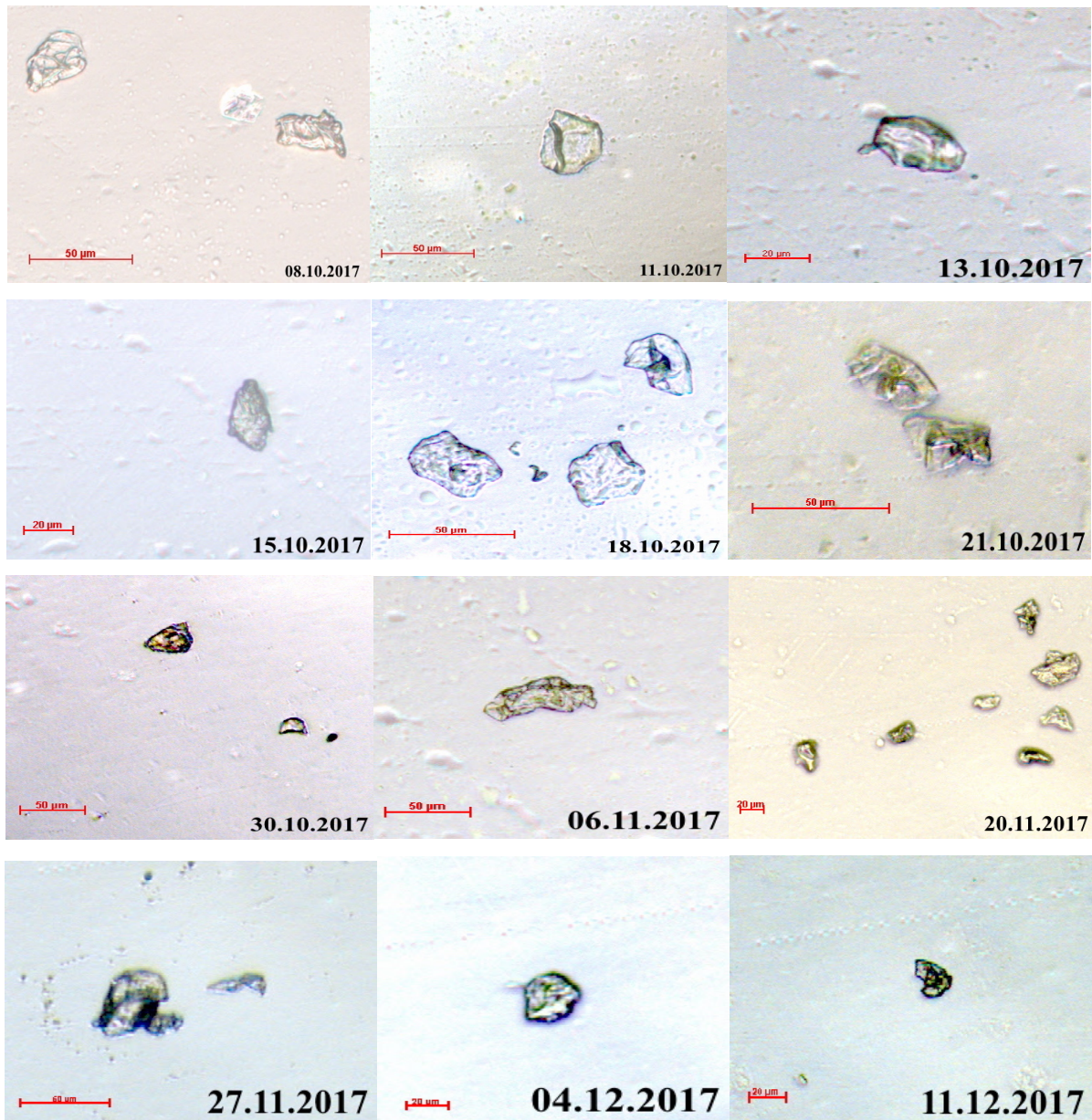


Figur 16. Nivå av EhV konsentrasjon i hus og fekalpellets prøver fra behandlingene A+/V+ og A-/V+ analysert på flowcytometer. Hver av grafene for hver behandling representerer de 4 ulike prøvetakingstidspunktene T1-T4 (20.11.2017, 27.11.2017, 04.12.2017, 11.12.2017). Feilfeltene viser standardavviket for hver kolonne.

### 3.4 Nedbrytning av *Oikopleura dioica* hus og fekalpellets

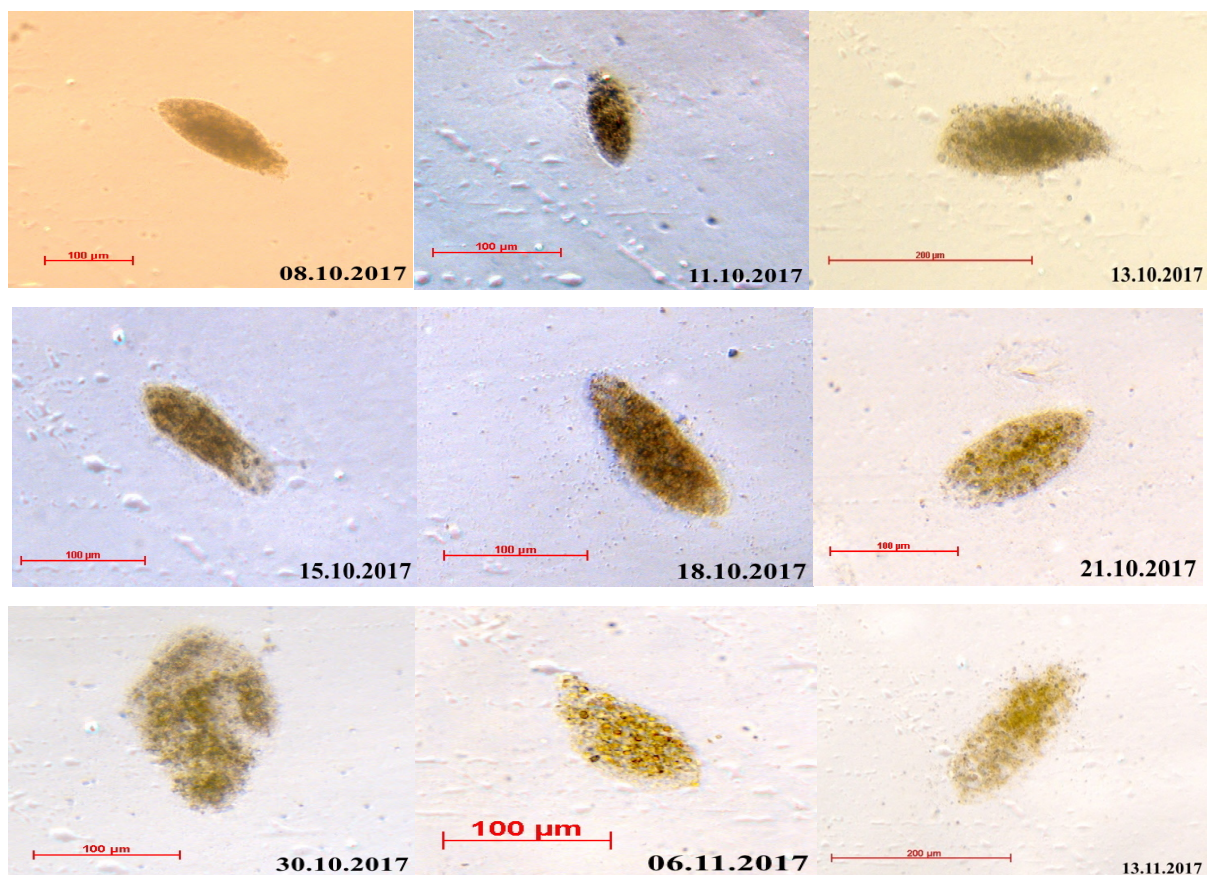
Ved nedbrytningen av hus og fekalpellets kunne det ikke observeres store visuelle forskjeller i nedbrytningsprosesser mellom behandlingene med *O. dioica* og EhV (A+/V+) og kun *O. dioica* (A+/V-). Likevel ble det observert store forskjeller mellom nedbrytningshastighetene til hus og fekalpellets. For fotograferingen av *O. dioica* hus i perioden 08.10.2017-11.12.2017 ble det observert stor forskjell i størrelse og form på husene (Figur 17). De befant seg i størrelsesområdet fra omtrent 20-60  $\mu\text{m}$  i diameter. Det så ut til at hvordan husene foldet seg hadde størst påvirkning på disse to variablene (størrelse og form). Foldingen av husene skjedde få sekunder etter at *O. dioica* hadde kassert husene under forsøkene og kommer av at vannstrømmen som er skapt av halebevegelsene opphører og dermed ikke skaper en strøm gjennom huset som "blåser det opp" (R. Fenaux, 1986). Husene var gjennomsiktige/blanker med grønne matpartikler under hele perioden og hadde en tendens til å danne grupperinger i prøvematerialet, der det var en høyere andel av hus enn andre områder. Videre utover dette

ble det ikke observert en merkbar nedbrytning av husene og det ble derfor valgt å avslutte fotograferingen den 11 november 2017 etter 64 dager.



Figur 17. Nedbrytningen av tilfeldige *O. dioica* hus fra den 08.10.2017-11.12.2017 fotografert med inversmikroskop (ZEISS 1021865541 SN:3834001080). Prøvematerialet ble oppbevart i mørke ved 8 °C mellom billedtakningene. Alle bildene ble tatt av hus fra behandlingene med *O. dioica* og EhV (A+/V+) og kun *O. dioica* (A+/V-). Representative hus ble avbildet ved de ulike tidspunktene. © Anine Veronica Grønlund.

Ved nedbrytningen av fekalpellets ble det observert en gradvis nedbrytning fra de smalere sidene og inn mot midten (Figur 18). Fekalpelletsene gikk fra å være en fast masse til å oppløse seg til små “korn” med et slimaktig lag. De holdt en størrelse på omtrent 100  $\mu\text{m}$  i diameter under hele nedbrytningsprosessen med unntak av den siste uken, da “kornene” spredde seg utover. Samtidig med nedbrytningen ble det også observert en gradvis fargeforandring fra mørk brun til lys brun, før fekalpelletsene til slutt fikk en gul-beige farge. Ved den 20 november 2017 var alle fekalpelletsene totalt nedbrutt, etter 48 dager inkubasjon.



Figur 18. Nedbrytningen av tilfeldige *O. dioica* fekalpellets fra den 08.10.2017-13.11.2017 fotografert med inversmikroskop (ZEISS 1021865541 SN:3834001080). Prøvematerialet ble oppbevart i mørke ved 8 °C mellom billedtakningene. Alle bildene ble tatt av fekalpellets fra behandlingene med *O. dioica* og EhV (A+/V+) og kun *O. dioica* (A+/V-). Representative fekalpellets ble avbildet ved de ulike tidspunktene. © Anine Veronica Grønlund.



## 4 Diskusjon

Målet for dette masterprosjektet var å avdekke/kvantifisere viktigheten av interaksjonen mellom *O. dioica* og et viktig marint virus, EhV. I dette arbeidet ble det forsøkt å besvare tre forskningsspørsmål. (1) Hva er filtrasjonsraten for EhV av *O. dioica*? (2) Finnes det en endring i filtrasjonsraten av *O. dioica* for EhV over tid og ved forskjellige utviklingsstadier av *O. dioica*? (3) Hva er nedbrytningshastigheten for *O. dioica* hus samt fekalpellets og hva har dette å si for frigjøring og dermed spredning av fangede viruspartikler? For å kunne besvare disse forskningsspørsmålene måtte man operere med visse antagelser:

1) Det antas at dyrene spiste som normalt under forsøkene. Dette ble best mulig sikret gjennom å følge de standardiserte dyrkningsbetingelsene til appendikularie fasiliteten på Sars senteret ved Universitetet i Bergen (J. Bouquet et al., 2009), slik at alle dyrene ble behandlet mest mulig likt. Dyrkningsbetingelsene var også med på å sikre gode vekstvilkår for *O. dioica*. En sekundær undersøkelse om at dyrene spiste som normalt ble gjort ved å se på mageinnholdet til dyrene under mikroskop.

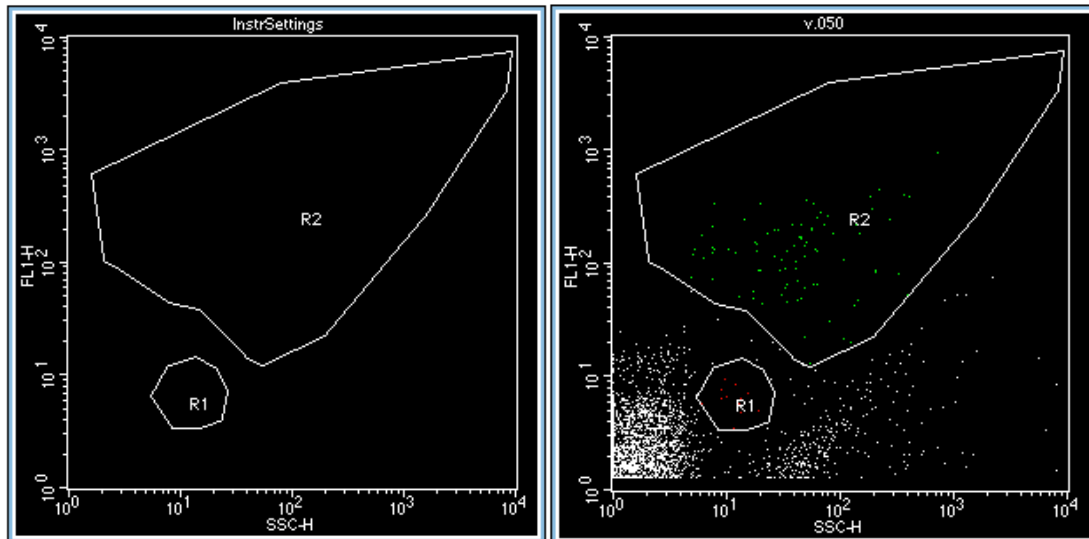
2) Det antas at alle dyrene filtrerer (beiter) og at alle dyrene filtrerer en lik mengde vann. Dette ble gjort på bakgrunn av gjennomsnittet av filtrasjonsraten til hvert av dyrene i en bestemt vekstfase (dag 3-5) fordelt på antall dyr ved denne fasen. Antall dyr som ble benyttet for hver av fasene var ulikt, da dyrene øker i størrelse etter hvert som de eldes og representerer ulik filtrasjonsevne (J. Lawrence et al., 2017). Konsekvensen av at den totale filtreringen av en populasjon med dyr blir målt er at variasjoner i filtrasjonsraten mellom individer vil ikke kunne synes. Fra et økologisk ståsted er dette uproblematisk siden den nettoeffekten av dyrenes filtrering er det som eventuelt gir utslag i det marine miljøet. For å unngå ujevne filtreringsrater ble kun friske, beitende dyr valgt til filtreringsforsøk, og aktiv beiting ble kontrollert visuelt underveis i forsøkene.

## 4.1 Filtrasjonsraten for *Emiliana huxleyi* virus av *Oikopleura dioica*

Det kunne bare observeres en signifikant filtrasjon av EhV av dag 5 dyrene ( $0.013 \pm 0.004$  mL individ<sup>-1</sup>dag<sup>-1</sup>). Dette tilsvarer en filtreringseffektivitet på 1,1 % for EhV av *O. dioica*. Det tyder derfor på at EhV utgjør en relativ liten del av den totale beitingen til *O. dioica*. Målinger av filtrasjonsraten gjennomført her skiller seg fra tidligere studier hvor det ble observert en signifikant filtrasjon av EhV av både dag 4 og 5 dyrene etter 2.5 timers inkubering med en filtrasjonsrate på ~2-50 mL EhV individ<sup>-1</sup>dag<sup>-1</sup> (J. Lawrence et al., 2017). Det kan være flere forklaringer på avviket mellom resultatene fra dette studiet og tidligere studier, f. eks. i dette studiet visste dag 4 dyrene høyest filtrasjon med  $\sim 7 \times 10^5$  partikler/mL av 0.04 dyr mL<sup>-1</sup> (J. Lawrence et al., 2017). En mulig forklaring på forskjellen mellom dette studiet og Lawrence et al. 2017 er at forsøkene hadde ulik varighet samt en ulik prøvetakningsfrekvens (J. Lawrence et al., 2017). I dette studiet varte filtrasjonsforsøket i 3 timer med en prøvetakningsfrekvens på 1 time, mens ved Lawrence et al. 2017 filtrasjonsforsøk ble det valgt å ta i bruk 2 forsøk med varighet på 2.5 timer og overnatt med prøvetakingstidspunkt på starten og slutten av forsøket (J. Lawrence et al., 2017). Det ble tatt i bruk samme antall dyr som i dette forsøket (dag 3: 120 dyr, dag 4: 80 dyr, dag 5: 40 dyr) ved både 2.5 timer og overnatt-eksperimentet, men ved 2.5 timers forsøket var det kun brukt 1L filtrert sjøvann i forsøksbegrene. Dette kan ha gitt et sterkere signal enn ved dette forsøket som brukte 2L filtrert sjøvann. En økt mengde inkubasjonsvann ble valgt for dette forsøket for å forsikre seg mot at en høy populasjonstetthet skulle stresse *O. dioica* og påvirke prøveresultatet. I tillegg ble det valgt å ta i bruk en gjennomsnittstemperatur på 14 °C under dette forsøket, mens Lawrence et al. 2017 hadde en gjennomsnittstemperatur på 15°C (J. Lawrence et al., 2017). En høyere temperatur kan gi innvirkning på *O. dioica* kroppslengde og med dette også deres filtrasjonsevne (J. Lawrence et al., 2017).

For dag 3 og 4 dyrene ble det observert en økning av henholdsvis *Isochrysis sp.* og EhV i forsøksbegrene. En økning av *Isochrysis sp.* eller EhV under forsøkene er lite trolig da det verken var tilsatt vertsceller for EhV i forsøksbegrene, eller flere matalger etter forsøksstart. Forsøket har derfor ikke klart å detektere en forskjell i filtrasjonsraten og filtreringseffektivitet mellom målebegrene og kontrollbegrene i deler av forsøket. Forsøket har derfor ikke klart å

påvise en endring i filtreringshastigheten til *O. dioica* for EhV over tid og ved forskjellige utviklingsstadier av *O. dioica*. En mulig begrunnelse for hvorfor noen av resultatene har fått en negativ verdi kan ha vært en høy andel av støy under analysering av prøvematerialet på flowcytometeret (2.2.3) som kan skyldes ufullstendig fiksering av prøvematerialet. Dette kan medføre at de ønskelige målte analyttene har blitt skjult i støyet og ikke blitt telt med i de avgrensede portene for analyttene. Støyet kan sees som hvite prikker utenfor portene i plotene fra analyseringene (Figur 19), og kan ha vært et resultat av bakgrunnspartikler i vannet eller analytiske feil, som for eksempel luftbobler i prøvematerialet. For dette forsøket var flowcytometerets deteksjonsnivå 52 partikkelmålinger per minutt. Dette vil si at visst det skal kunne skilles mellom analyttsignal og bakgrunnsstøy må det måles over 52 partikler per minutt. Under analyseringen ble det observert en del bakgrunnsstøy (Figur 19). I fremtidige forsøk kan det derfor være en fordel å se nærmere på deteksjonsnivået for instrumentet. Visst det blir observert tilsvarende støynivå, kan deteksjonsnivået økes slik at det enklere kan skilles mellom målt analytt og bakgrunnsstøy. Den målte konsentrasjonen av EhV kan også bli påvirket av prøvetakningen. Visst ikke vannprøvene umiddelbart blir fiksert eller fryst i flytende nitrogen kan dette føre til at den målte konsentrasjonen av viruspartikler blir en størrelsesorden for lav (C. Suttle, 2005). Dette har trolig ikke påvirket den målte EhV-konsentrasjonen under forsøket, da prøvene ble umiddelbart fiksert og fryst i flytende nitrogen etter prøvetakningen. Det ble også forsøkt å kontrollere for bakgrunnsstøy fra naturlige forhold under forsøket ved hjelp av avskilte bølgeprøver. Disse kontrollene skulle sikre for at målt senkning av EhV-partikler skulle komme fra beiting av *O. dioica* og ikke fra forsvinning på grunn av naturlig nedbrytning av viruspartikler. Disse naturlige forholdene bestod av EhV som finnes naturlig i *O. dioica*, EhV sitt naturlige forfall og EhV som finnes naturlig i vannet.



Figur 19. Et representativt plot fra analyseringen av EhV på flowcytometeret (2.2.3) (til høyre). Til venstre vises et tomt plot for analysering. Port “R2” i plotene skulle telle antall bakteriepartikler, mens port “R1” skulle telle antall EhV partikler. Eksempelprøven ble tatt fra behandlingen med *O. dioica* og EhV (A+/V+) med fortyning 1000x av dag 5 dyr. Et plot fra tidspunkt 3 er valgt fordi konsentrasjonen av EhV fremdeles var på sitt høyeste.

En viktig påvirkningsfaktor til filtrasjonsraten er utviklingsstadiet til *O. dioica* (FS2). Det er tidligere blitt funnet at *O. dioica* med en størrelse på mindre enn 200  $\mu\text{m}$  ofte kan ha negative filtrasjonsrater (P. Tiselius et al., 2003). Dette kommer av at mindre dyr har lavere filtrasjonsrate slik at det også blir vanskeligere å detektere forskjell i partikkelkonsentrasjon. Dette er likevel ikke aktuelt for dette forsøket, da alle dyr hadde en gjennomsnittskroppslengde på over 200  $\mu\text{m}$  (dag 3 dyr:  $309 \pm 33 \mu\text{m}$ , dag 4:  $451 \pm 63 \mu\text{m}$ , dag 5:  $777 \pm 82 \mu\text{m}$ ) med en signifikant forskjell mellom dagene (ANOVA:  $F=146.95$ ,  $df=27$ ,  $p\text{-verdi}=3.072 \times 10^{-15}$ ). Det er likevel verdt å merke seg at dyrene i dette forsøket hadde noe lavere størrelse enn tidligere filtrasjonsrateforsøk, der dag 3, 4 og 5 dyr henholdsvis hadde en størrelse på  $340 \pm 35 \mu\text{m}$ ,  $540 \pm 90 \mu\text{m}$  og  $990 \pm 160 \mu\text{m}$  ved  $15^\circ\text{C}$  (J. Lawrence et al., 2017). Det ble likevel ikke funnet noen signifikant forskjell i kroppslengden mellom disse to filtrasjonsforsøkene (T-test:  $p\text{-verdi}=0.3319$ ) eller andre forsøk med *O. dioica* ved  $15^\circ\text{C}$  (T-test:  $p\text{-verdi}=0.3431$ ) (D. Fernández et al., 2004; J. Lawrence et al., 2017). Dyrenes utvikling er avhengig av ytre påvirkninger som for eksempel dyrkingstemperatur, pH, saltinnhold, populasjonstetthet, partikkelkontaminering og tilgang på mat, samt raske forandringer av disse faktorene (J. Bouquet et al., 2009). En tidligere studie har visst at *O. dioica* kan ha en varierende størrelse avhengig av hvilket fôringsregime som ble valgt (J. Bouquet et al., 2009). Under dette studiet kunne dag 3, 4 og 5 dyr av *O. dioica* variere men en lengde på

henholdsvis 275-357  $\mu\text{m}$ , 358-601  $\mu\text{m}$  og 366-948  $\mu\text{m}$  ved 15 °C (J. Bouquet et al., 2009). Dyrene som hadde den samme fôringsregime som dette studiet visste en lengde på 345±49  $\mu\text{m}$ , 533±85  $\mu\text{m}$  og 948±116  $\mu\text{m}$  for henholdsvis dag 3, 4 og 5 dyr ved 15 °C (J. Bouquet et al., 2009). Det kan derfor tyde på at *O. dioica* i dette studiet var noe mindre enn gjennomsnittet selv om denne forskjellen ikke var signifikant (T-test: p-verdi= 0.3457). Dyrenes kroppslengde kan derfor ha påvirket deres filtrasjonsevne, men det er usikkert hvordan dette kan ha påvirket resultatene. Dyrenes velvære i forhold til faktorene temperatur, saltinnhold og pH, ble bevart gjennom et velutviklet kultiveringssystem gjennomført av appendikularie fasiliteten på SARS senteret ved Universitetet i Bergen (J. Bouquet et al., 2009). En av de mulige påvirkningsfaktorene til kroppslengden til *O. dioica* er partikkelkontaminasjon. Dette kommer av at det i en liten grad ble funnet bøss og hårstrå i dyrkningsbegrene under kultivering og forsøkene. Uønskede partikler i vannet kan tilstoppe husene til *O. dioica*, slik at de kasserer hus hurtigere enn normalt. Dette kan føre til en lavere filtrasjonseffektivitet (C. Troedsson et al., 2007). Kontaminering kan trolig unngås ved fremtidige forsøk ved å plassere et ugjennomsiktig deksel over kultiveringsvanntankene, som forhindrer direkte sollys og minsker partikkelkontaminasjon (J. Bouquet et al., 2009).

En annen faktor som kan påvirke filtrasjonsraten til *O. dioica* er populasjonstettheten. En høy populasjonstetthet kan føre til stress hos dyrene og en tidlig eggproduksjon hos hundyrene (H. Nishida, 2008). Dette fører igjen til både dyr med mindre størrelse og et lavere antall dyr. Bli populasjonstettheten for lav, påvirker dette muligheten til å detektere forskjell i partikkelkonsentrasjonene, da det er færre dyr som kan filtrere. I dette forsøket ble populasjonstetthet kontrollert ved å overføre et forutbestemt antall dyr i egne forsøksbeger for hver dag. Dette ga en populasjonstetthet på henholdsvis 60, 40 og 20 dyr per liter for henholdsvis dag 3, 4 og 5 dyr av *O. dioica*. Under kultivering er denne populasjonstettheten 25, 21.7 og 18.3 dyr per liter for henholdsvis dag 3, 4 og 5 dyr. Populasjonstettheten under forsøkene ble valgt da dette tidligere ble brukt for å få et sterkt nok deteksjonssignal (Janice Lawrence Personlig kommunikasjon, Sommer 2017). Det hadde likevel vært interessant å gjennomføre et populasjonstetthetsforsøk for å se på i hvor stor grad forsøkets populasjonstetthet påvirket *O. dioica* sin utvikling. Dette faller utenfor hovedmålene for denne oppgaven og ble dermed ikke undersøkt.

Under forsøkene ble det kun observert at dag 5 dyrene filtrerte *R. reticulata*. Dette er bemerkelsesverdig fordi dette tilsvarer at dag 3 og 4 dyrene ikke har filtrert matpartikler i signifikant grad mellom T3 og T6 under filtreringsforsøket. Det samme gjelder for filtrasjonen av *Isochrysis sp.* av dag 5 dyrene. Dette gjør også at påliteligheten til resultatet fra filtrasjonsraten av EhV synker. Observasjoner som ble gjort under forsøket tydet også på at dyrene spiste som normalt. Dette kunne observeres gjennom at dyrene vippet med halen, kasserte hus og produserte fekalpellets gjennom forsøksperioden. Det ble også observert i mikroskop at *O. dioica* hadde innhold i tarmene sine. En annen veldig tydelig indikator på at dyrene spiste var at det ikke var noen unormal høy dødelighet av *O. dioica* under forsøket. Overføring kan ha påvirkning på *O. dioica* evne til å filtrere matpartikler. Dette kommer av at ved høy konsentrasjon av partikler i vannet, vil *O. dioica* hus bli fortere tilstoppet som igjen medfører at dyrene forlater husene sine for tidlig (P. Tiselius et al., 2003). Det har også blitt funnet i tidligere studier at en høy konsentrasjon av *C. calcitrans* kan forhindre effektiv filtrering av andre alger (C. Troedsson et al., 2007). Denne matalgen har blitt tilsatt til alle forsøksbegrene før oppstart av forsøket. Det er likevel lite trolig at den tilsatte konsentrasjonen av *C. calcitrans* har hatt noe å si for filtrasjonen av de andre algene da konsentrasjonsforholdet mellom algene også blir brukt under kultivering av *O. dioica* (J. Bouquet et al., 2009). Basert på tidligere forsøk er man nødt for å anta at *O. dioica* spiser disse matpartiklene, men at måle metodene for dette forsøket ikke har vært optimale for å detektere dette (C. Troedsson et al., 2007; J. Bouquet et al., 2009).

## **4.2 Effekten av nedbrytningshastigheten til *Oikopleura dioica* hus og fekalpellets på virusøkologi**

En total nedbrytning av fekalpellets ble observert etter ~48 dagers inkubering i mørke ved 8°C. Dette står i sterk kontrast til en tidligere studie av degraderingen av fekalpellets fra hoppekreps der ble det funnet at fekalpelletsene ble degradert mellom 9-19% per dag ved ulike algedietter (P. Thor, H. Dam, & D. Rogers, 2003). Dette vil tilsvare en total degradering på 5-11 dager. Under sistnevnte forsøk ble det brukt en temperatur på 20 °C med svakt dagslys (P. Thor et al., 2003). Til likhet med dette studiet ble det også brukt filtrert sjøvann med mikrobiell aktivitet, deriblant bakterier, til å inkubere fekalpelletesene (P. Thor et al.,

2003). Det kan derfor tydes at temperaturen og solforholdene under forsøket kan ha påvirket fekalpelletsene til en langsommere nedbrytning. Det er også viktig å huske på at fekalpelletsene til hoppekreps kan være betydelig større enn fekalpelletsene til *O. dioica*, selv om noen også er mindre. I dette forsøket ble det funnet at fekalpellets av *O. dioica* hadde en størrelse på omtrent 100 µm i lengde under hele nedbrytningsprosessen. Til sammenligning kan hoppekreps ha fekalpellets med en størrelse på mellom 20-600 µm (L. Poulsen, M. Moldrup, T. Berge, & P. Hansen, 2011). Det kan derfor også være av betydning hvor stor fekalpelletsene er, selv om det er usikkert hvilken størrelsesorden som har høyest nedbrytningshastighet. Det er likevel trolig at mindre fekalpellets brytes raskere ned enn større, da disse har mindre masse å bryte ned, samtidig som større fekalpellets (>400 µm) kan være vanskelig å bryte ned da det ikke nødvendigvis finnes nok nedbrytere tilstede, deriblant dinoflagellater (L. Poulsen et al., 2011). Tidligere har det blitt funnet at protozooplankton i størrelsesområdet 20-100 µm var de største bidragsyterne til fekalpellets degradering sammen med bakterier for fekalpellets fra hoppekreps (L. Poulsen & M. Iversen, 2008). En større fekalpellets vil trolig kunne holde på flere viruspartikler over lengre tid enn mindre fekalpellets, og dermed kunne forsinke virusfrigjøringen i en større grad. Svært små eller fekalpellets som har vært utsatt for ytre skader, vil trolig gå i oppløsning etter kort tid og raskere frigjøre viruspartikler. FCM målingene i denne oppgaven av antall frie EhV partikler i overvannet til hus og FP ble det funnet at nedbrytningen av EhV partikler ikke så ut til å la seg påvirke av hvorvidt viruspartiklene befant seg i hus/fekalpellets eller som frie viruspartikler i sjøvannet. Det tyder derfor på at verken hus eller fekalpellets har en målbar innvirkning på hvor fort EhV partiklene nedbrytes. På slutten av prøvetakningsperioden ble det fremdeles målt  $2.21 - 8.56 \times 10^4$  EhV mL<sup>-1</sup> i overvannet fra hus og fekalpellets. Dette tyder på at viruspartiklene forblir i hus/fekalpellets i lengre perioder (> 4 uker). Visst dette er reelt, vil det dermed si at større fekalpellets kan potensielt ha en større innvirkning på virusøkologien enn mindre fekalpellets, da disse trolig holder lenger på viruspartiklene. Det er ukjent om virus som er avgitt fra *O. dioica* hus og fekalpellets persisterer og/eller er infeksjøs, da det ikke er kjent om det har blitt utført forskning på dette feltet tidligere. Det er viktig å ta i betraktning viruspartikler som finnes i hus og fekalpellets da bare en liten del av de partiklene som blir filtrert av *O. dioica* blir spist mens majoriteten av partiklene forblir i filtrasjonshuset (C. Troedsson et al., 2007).

Lignende infeksjonsforsøk har blitt utført for hoppekreps beiting på EhV-infiserte *E. huxleyi* celler (M. J. Frada et al., 2014), der det ble funnet at virusene overlevde tarm forløpet og forble infeksjøs. Det kan derfor tyde på at lignende resultat kan forventes for *O. dioica*, da den har et kortere tarm forløp (<10min) enn *Calanus* hoppekreps (~30 min) (A. Lopez-Urrutia & J. L. Acuña, 1999; A. W. Bedo et al., 1993; J. C. Nejstgaard et al., 2003). Det var derimot ikke tilfellet for dette forsøket MPN-analyse, der det ble funnet mellom 0-107 infeksjøs viruspartikler per mL i overvannet fra hus- og fekalpelletsprøver etter 7 dagers inkubering. På grunn av det lave antallet målte frie infeksjøs viruspartikler, kunne det ikke skilles mellom nedbrytningen av virus i hus/fekalpellets, i vannet, med tilstedeværelse av hus/fekalpellets eller nedbrytningen av naturlig forekommende viruspartikler. Den trolige grunnen til at det ble målt så få infeksjøs viruspartikler at EhV-lysatet som ble brukt under analyseringen kun inneholdt  $62 \pm 11$  infeksjøs viruspartikler per mL. Den lave konsentrasjonen av infeksjøs virus kan komme av at kalkplatene som dekker *E. huxleyi* celler, gjør det vanskeligere for virusene å infisere (T. Castberg et al., 2002). Kalkplatene kan medføre at det bare er mulig å infisere vertsceller i en bestemt vekstfase, som gjør det problematisk å oppnå et høyt nivå av infeksjøs virus (T. Castberg et al., 2002). Den lave infeksjonsraten til EhV-lysatet kan også skyldes akkumulering av virusnedbrytning da lysatet oppfriskes sjeldent.

Til sammenligningen forekommer det naturlig  $\sim 1 \times 10^6$  EhV per mL i slutfasen av *E. huxleyi* oppblomstringer i norske kystøkosystemer (G. Bratbak, 1995). Globalt finnes det omtrent  $10^8$  virus per mL sjøvann (Ø. Bergh, Y. Børsheim, G. Bratbak, & M. Heldal, 1989). Det kan derfor tyde på at antall målte infeksjøs viruspartikler under forsøket var eksepsjonelt lavt i forhold til naturlige forhold. Det er likevel viktig å huske at ikke hele populasjoner av virus er nødvendigvis infeksjøs, selv om det har blitt observert 100% infeksjonsrate hos noen viruspopulasjoner (G. Bratbak, A. Jacobsen, M. Heldal, K. Nagasaki, & T. F. Thingstad, 1998; J. L. Van Etten, D. E. Burbank, Y. Xia, & R. H. Meints, 1983; M. T. Cottrell & C. Suttle, 1995). Forskjellene mellom behandlingene vil derfor være av en ubetydelig karakter da alle behandlingene hadde et eksepsjonelt lavt antall infeksjøs viruspartikler. På grunn av disse usikkerhetsmomentene ble det bestemt å avslutte denne delen av forsøket etter første prøvetakingstidspunkt. Denne oppgaven har dermed ikke lyktes med å kartlegge påvirkningen av *O. dioica*-EhV interaksjonen på EhV infeksjonsrate og persistens sjønt den har gitt



indikasjon på at nedbrytningshastigheten til *O. dioica* hus og fekalpellets kan ta lengre tid enn det har tidligere blitt observert.

For *O. dioica* hus ble det ikke observert en total nedbrytning og forsøket ble derfor avsluttet etter 64 dagers inkubering i mørke ved 8°C. Det er ukjent om noen tidligere har undersøkt nedbrytningshastigheten til *O. dioica* hus. Det er likevel trolig at husene har ulik nedbrytningshastighet da det ble observert stor forskjell i størrelse og form på husene. De ulike formene kom trolig av foldingen av husene som skjedde få sekunder etter at *O. dioica* hadde kassert husene under forsøkene. Dette fremkommer av at vannstrømmen som er skapt av halebevegelsene opphører og dermed ikke skaper en strøm gjennom huset som ”blåser det opp” (R. Fenaux, 1986). Foldingen så også ut til å påvirke størrelsen på husene etter at de hadde kollapset, og befant seg i størrelsesområdet fra omtrent 20-60 µm i diameter. Foldingen av husene kan også ha medført at en andel av de fangede viruspartiklene ble frigjort under kollapsen av husene. Ved at EhV blir fanget i hus og fekalpellets kan det bety en økt kontakt mellom virus og deres vertsceller. Visst dette skal være gjeldende må også vertscellen, i dette tilfellet *E. huxleyi*, bli filtrert opp av *O. dioica* og enten forbli i filtrasjonshuset eller bli ført gjennom tarmforløpet og ende i fekalpelletsene. Det er stor sannsynlighet for at *O. dioica*, *E. huxleyi* og EhV forekommer samtidig i naturlige planktonsamfunn (T. Castberg et al., 2002; U. Båmstedt, H. J. Fyhn, M. Martinussen, O. Mjaavatten, & O. Grahl-Nielsen, 2004). Dersom infeksiose EhV og *E. huxleyi* blir fanget i samme *O. dioica* hus/fekalpellets kan dette øke sannsynligheten for infeksjon ved å øke kollisjonsfrekvensen. Det frister derfor å spekulere at *O. dioica* hus og fekalpellets har potensialet til å øke infeksjonsraten til *E. huxleyi* av EhV. I tillegg kan interaksjonen mellom *O. dioica* og EhV være gjeldende for både frie EhV partikler og for EhV-infiserte *E. huxleyi* (M. J. Frada et al., 2014). Det har tidligere blitt påvist at EhV partikler som har gått gjennom tarmforløpet til hoppekreps forlenger EhV sin halveringstid for infeksiositet med 35% (M. J. Frada et al., 2014). Dette betyr at zooplankton kan være med på å akkumulere og øke infeksjonsraten til EhV og potensielt andre marine virus. Fangst av EhV partikler, *E. huxleyi* celler og/eller infiserte *E. huxleyi* celler i *O. dioica* hus og fekalpellets representerer også en mulig mekanisme for nedover transport av EhV partikler i bunnsedimentene i havet. Kombinert med de lange nedbrytningstidene for *O. dioica* hus og fekalpellets som ble påvist i denne oppgaven har man grunnlag for å spekulere om hvorvidt denne interaksjonen bidrar til persistens av EhV i det marine miljøet.

Siden *O. dioica* skiller ut hus hver fjerde time og fekalpellets hvert 2-3 minutt, samt deres langsomme nedbrytningshastighet, kan dette føre til at en betydelig mengde viruspartikler blir fanget og ført ned mot havbunnen (A. Lopez-Urrutia & J. L. Acuña, 1999; J. L. Acuña & Kiefer, 2000; R. Fenaux, 1985). De utkilte husene synker med en hastighet på 26-157 m d<sup>-1</sup> mens fekalpelletsene synker med en hastighet på 25-166 m d<sup>-1</sup> avhengig av temperatur og størrelse på hus/fekalpellets (B. H. Robison et al., 2005; G. Gorsky, N. S. Fisher, & S. W. Fowler, 1984; J. L. S. Hansen, T. Kjørboe, & A. L. Alldredge, 1996). Dette gir hus/fekalpellets tilstrekkelig med tid til å både synke og oppholde seg i sedimentene i havbunnen, før de eventuelt skulle brytes ned. Det finnes en usikkerhet i hvor stor andel av husene som når havbunnen. På grunn av husene sine skjøre natur, er det ikke utenkelig at noen av husene blir ødelagt på veien eller spist av zooplankton (D. J. Mayor, R. Sanders, S. L. C. Giering, & T. R. Anderson, 2014; R. Fenaux, 1986). Visst viruspartiklene forblir i intakte hus og fekalpellets eller løselig assosiert med hus og fekalpellets, kan dette være en mulig mekanisme for beskyttelse av viruspartikler mot fysiske og kjemiske nedbrytningsprosesser i havet. I tillegg kan resuspensjon av sedimentene under vinter og vår miksing føre til en økt persistens og spredning av sedimenterte viruspartikler (J. E. Lawrence et al., 2002; T. Garstecki, S. A. Wickham, & H. Arndt, 2002). Et annet alternativ er at virusene som når bunnsedimentene mister sin infeksiositet og på den måten blir til en del av den nedadgående karbontransporten (J. Lawrence et al., 2017). Faktisk blir så mye som 30 % av materialet som blir fanget i appendikularie hus, ført ned sammen med husene (R. Fenaux et al., 1998). Dette er trolig da det ble observert grønne matpartikler i *O. dioica* hus under hele prøvetakningsperioden (08.10.2017-11.12.2017). Visst virusene blir fjernet fra overflatevannet kan dette påvirke både verdssamfunnet og virusøkologien. Den aktuelle vertsorganismen *E. huxleyi* danner vanligvis oppblomstringer i overflatevannet like over pyknoklingrenselaget (H. J. Nanninga & T. Tyrrell, 1996; T. Tyrrell & A. Merico, 2004). Dette vil si at visst EhV blir fjernet fra overflatevannet, vil dette redusere virusets påvirkningskraft på algeoppblomstringer som har vært sett tidligere (J. Etten, M. Graves, D. G. Müller, W. Boland, & N. Delaroque, 2002). Det kan derfor bety at zooplankton kan være med på å øke algeoppblomstringene ved å beite på marine virus ved å redusere antall frie EhV partikler. Samtidig kan dette medføre at marine virus får redusert sin kontakt med vertsorganismen. Dette er likevel lite trolig da tilstedeværelsen av EhV vanligvis finner sted sammen med verten *E. huxleyi* (T. Castberg et al., 2002). Visst EhV og *E. huxleyi* er sammen vil dette trolig føre til at *O. dioica* fanger dem begge, noe som igjen fører til økt infeksjonsrate

på grunn av økt kontakt mellom vert og virus. Det er også usikkert i hvor stor grad zooplankton kan påvirke algeoppblomstringen da konsentrasjonen av EhV vanligvis øker etter en sterk økning i *E. huxleyi* oppblomstring (G. Bratbak et al., 1993). Zooplanktons fjerning av EhV etter økt oppblomstring av *E. huxleyi* vil trolig derfor ha større påvirkning på oppblomstringens varighet fremfor omfang.

### 4.3 Veien videre

Dette studiet har vist at interaksjonen mellom *O. dioica* og EhV kan være en viktig del av det marine mikrobielle næringsnett, men at kvantifisering av denne effekten ble ikke fullført på grunn av utfordringer tilknyttet målingsmetoder. Videre ville det være interessant å finne mer ut av hvilken betydning en slik interaksjon har for *O. dioica*, for EhV og for marin virusøkologi. Det har tidligere blitt funnet at *O. dioica* kan forekomme med en tetthet på 53 individer per liter og at de kan filtrere 20 mL ind<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (J. Lawrence et al., 2017; S. Uye & K. Kaname, 1994). Dette betyr at *O. dioica* potensielt kan fjerne 10<sup>6</sup> EhV mL<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, og dermed kan være en betydelig virkning på både EhV og *E. huxleyi* populasjoner. Det er usikkert hvorvidt EhV fungerer som næring for dyrene eller om de kun blir filtrert sammen med matpartikler uten å tjene en større hensikt. Visst EhV viser seg å være en del av næringsopptaket til *O. dioica*, ville det være interessant å finne ut om dyrene aktivt beiter på (dvs. selekterer) viruspartikler eller om viruspartikler supplerer deres vanlige kosthold av marine snø, bakterier og mikroalger.

På andre siden, hvor stor påvirkning har *O. dioica* på EhV-partikler? Appendikulariene har tilpasset seg å leve på steder med lite/reduert mat helt ned til størrelsesorden som kan regnes som støv (0.1-0.2 µm) (A. W. Bedo et al., 1993; J. L. Acuña & Kiefer, 2000; P. R. Flood & D. Deibel, 1998). Dette har de trolig kompensert for ved å filtrere store mengder vann (C. Troedsson et al., 2007). Dette gjør at de har evnen til å filtrere store mengder partikler i løpet av kort tid. Visst større mengder av viruspartiklene blir filtret opp av vannet og ender i hus og fekalpellets, vil dette fungere som en slags beskyttelseskapsel over tid for virusene? Visst dette er tilfellets, kan trolig kontakten øke sannsynligheten for at EhV kommer i kontakt med

sin vertsorganisme *E. huxleyi* visst de blir fanget sammen i husene. Dette igjen ville gi økt infeksiositet og spredning for EhV. Da MPN- analysen ikke klarte å fremvise infeksiositeten til EhV, er derfor fremdeles usikkert hvor stor påvirkning *O. dioica* har på EhV infeksiositet og persistens. EhV er et stort dobbeltrådig DNA-virus med en diameter på 160-180 nm (T. Castberg et al., 2002). Det er derfor usikkert i hvor stor grad forsøkets resultater er gjeldende for andre virus med andre egenskaper. For eksempel vil filtrasjonsevnen endres med mindre/større virus eller virus med andre ytre strukturer? Det er derfor også interessant i fremtiden å gjennomføre de samme forsøkene med ulike typer virus.

Under forsøkene ble det tatt i bruk et veletablert fôringsregime som skulle sikre en normal fôringsaktivitet (J. Bouquet et al., 2009). Det er derfor usikkert i hvor stor grad dette har påvirket filtrasjonen av EhV. Hvordan ville resultatet se ut visst *O. dioica* hadde fått begrenset med mat? Trolig kan dette føre til tre ulike skjebner. Den første skjebnen kan være at det ikke hadde hatt noen stor innvirkning på resultatet og filtrasjonen av EhV hadde vært tilsvarende likt med eller uten underskudd av mat. Skjebne nummer to kan være at *O. dioica* hadde opptatt en mer aktiv beiting av EhV under matunderskudd, slik at filtrasjonen av EhV hadde blitt høyere. Den siste skjebnen kan være at filtrasjonen av EhV hadde gått ned. Denne hypotesen tar for seg at viruspartiklene fester seg til andre matpartikler og tilstoppede hus. Dermed ville en lavere konsentrasjon av mat medført at det også hadde vært færre EhV-partikler som blir filtrert og fanget i hus eller fekalpellets.

## 5 Konklusjon

I dette studiet har det kun blitt funnet at utviklingsstadiet dag 5 av *O. dioica* filtrerer EhV, men at viruspartiklene utgjør en svært liten del av den totale beitingen til *O. dioica*. Dette skiller seg fra tidligere studier som har funnet en effektiv filtrasjon av EhV ved flere utviklingsstadier av *O. dioica* (J. Lawrence et al., 2017). Forskjellen mellom resultatene skyldes mest sannsynlig valg av forsøksoppsettet og målemetoden. Deriblant har støy i prøvematerialet, instrumentelle forhold og populasjonstettheten til *O. dioica* trolig hatt innvirkning på signalstyrken til målemetoden og ført til at det ikke har vært mulig å detektere den eventuelle filtrasjonen som trolig finner sted i forsøksbegrene. Da det kun ble observert filtrasjon ved et av utviklingsstadiene til *O. dioica*, har forsøket ikke klart å påvise endringer i filtreringshastigheten av *O. dioica* for EhV over tid og ved forskjellige utviklingsstadier av *O. dioica*.

En total nedbrytning av fekalpellets ble funnet etter ~48 dagers inkubering i mørke ved 8°C, mens det ikke ble observert en total nedbrytning av *O. dioica* hus etter 64 dagers inkubering. Ved at viruspartikler blir fanget i disse husene og fekalpelletsene kan dette være en påvirkningsfaktor på deres frigjøring og spredning. Dette kommer av at hus/fekalpellets både kan beskytte viruspartiklene mot fysiske og kjemiske nedbrytningsprosesser i havet, samt øke kontakten mellom virusene og deres vertsceller visst begge blir fanget i samme hus/fekalpellets. Ved resuspensjon av sedimentene i havbunnen under vinter- og vårmiksing kan også hus/fekalpellets bidra til økt spredning av viruspartikler og infiserte vertsceller (J. E. Lawrence et al., 2002; T. Garstecki et al., 2002). Ved at algevirus blir fanget i hus/fekalpellets kan dette også medføre at algevirusene blir ført bort fra overflatevannet, og dermed minsker deres påvirkningskraft på algeoppblomstringene som finner sted ved vannoverflaten. Selv om EhV, som er brukt som eksempel i dette studiet, kan bli fanget i hus/fekalpellets er det usikkert hvorvidt disse virusene er infeksiose eller ikke, da dette studiets målemetode ikke har klart å detektere dette.

# Kilder og litteratur

- A. Edwards, R. Rohwer, & Forest. (2005). *Viral Metagenomics* (Vol. 3).
- A. Hall, P. Jepson, S. Goodman, & T. Härkönen. (2006). *Phocine distemper virus in the North and European Seas – Data and models, nature and nurture* (Vol. 131).
- A. L. Alldredge. (1976). *Discarded appendicularian houses as sources of food, surface habitats, and particulate organic matter in planktonic environments* (Vol. 21).
- A. Lopez-Urrutia, & J. L. Acuña. (1999). Gut throughput dynamics in the appendicularian *Oikopleura dioica*. *Marine Ecology Progress Series*(191), 195-205.
- A. Ortmann, & C. Suttle. (2005). *High abundance of viruses in a deep-sea hydrothermal vent system indicates viral mediated microbial mortality* (Vol. 52).
- A. W. Bedo, J. L. Acuña, D. Robins, & R. P. Harris. (1993). Grazing in the Micron and the Sub-Micron Particle Size Range: The Case of *Oikopleura Dioica* (Appendicularia). *Bulletin of Marine Science*, 53(1), 2-14.
- B. H. Robison, K. R. Reisenbichler, & R. E. Sherlock. (2005). Giant larvacean houses: rapid carbon transport to the deep sea floor. *Science*, 308(5728), 1609-1611. doi:10.1126/science.1109104
- B. Jarvis, C. Wilrich, & P. T. Wilrich. (2010). Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), 1660-1667. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04792.x
- C. A. Suttle, & A. M. Chan. (1994). Dynamics and Distribution of Cyanophages and Their Effect on Marine *Synechococcus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 60(9), 3167-3174.
- C. Brussaard, B. Kuipers, & M. Veldhuis. (2005). *A mesocosm study of Phaeocystis globosa population dynamics: I. Regulatory role of viruses in bloom control* (Vol. 4).
- C. Gobler, D. Hutchins, L. Nicholas, N. Fisher, E. M. Cosper, & S. A. Safiudo. (1997). *Release and bioavailability of C, N, P, Se, and Fe following viral lysis of a marine chrysophyte* (Vol. 42).
- C. M. Short, O. Rusanova, & S. Short. (2010). *Quantification of virus genes provides evidence for seed-bank populations of phycodnaviruses in Lake Ontario, Canada* (Vol. 5).
- C. P. D. Brussaard, R. S. Kempers, A. J. Kop, R. Riegman, & M. Heldal. (1996). *Virus like particles in a summer bloom of Emiliana huxley in the North Sea* (Vol. 10).
- C. Suttle. (2005). *Viruses in the sea* (Vol. 437).
- C. Suttle. (2007). *Marine viruses—Major players in the global ecosystem* (Vol. 5).
- C. Suttle, & F. Chen. (1992). *Mechanisms and Rates of Decay of Marine Viruses in Seawater* (Vol. 58).
- C. Troedsson, J. Bouquet, D. Aksnes, & E. Thompson. (2002). *Resource allocation between somatic growth and reproductive output in the pelagic chordate Oikopleura dioica allows opportunistic response to nutritional variation* (Vol. 243).
- C. Troedsson, M. E. Frischer, J. C. Nejtgaard, & E. M. Thompson. (2007). Molecular quantification of differential ingestion and particle trapping rates by the appendicularian *Oikopleura dioica* as a function of prey size and shape. *Limnology and Oceanography*, 52(1), 416-427. doi:10.4319/lo.2007.52.1.0416

- C. Troedsson, O. Grahl-Nielsen, & E. M. Thompson. (2005). Variable fatty acid composition of the pelagic appendicularian *Oikopleura dioica* in response to dietary quality and quantity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 289, 165–176.
- C. Troedsson, P. Ganot, J. Bouquet, D. Aksnes, & E. Thompson. (2008). *Endostyle Cell Recruitment as a Frame of Reference for Development and Growth in the Urochordate Oikopleura dioica* (Vol. 213).
- D. Deibel. (1986). *Feeding mechanism and house of the appendicularian Oikopleura vanhoeffeni* (Vol. 93).
- D. Fernández, A. Lopez-Urrutia, & A. Fernández. (2004). Retention efficiency of 0.2 to 6 mm particles by the appendicularians *Oikopleura dioica* and *Fritillaria borealis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 266, 89 – 101.
- D. J. Mayor, R. Sanders, S. L. C. Giering, & T. R. Anderson. (2014). Microbial gardening in the ocean's twilight zone: Detritivorous metazoans benefit from fragmenting, rather than ingesting, sinking detritus. *BioEssays*, 36(12), 1132-1137. doi:doi:10.1002/bies.201400100
- D. Marie, C. P. D. Brussaard, R. Thyraug, G. Bratbak, & D. Vaultot. (1999). Enumeration of Marine Viruses in Culture and Natural Samples by Flow Cytometry. *Appl Environ Microbiol*, 65(1), 45-52.
- E. K. Wommack, J. Ravel, R. Hill, & R. Colwell. (1999). *Hybridization Analysis of Chesapeake Bay Virioplankton* (Vol. 65).
- E. K. Wommack, & R. Colwell. (2000). *Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems* (Vol. 64).
- E. M. Thompson, T. Kallesoe, & F. Spada. (2001). Diverse genes expressed in distinct regions of the trunk epithelium define a monolayer cellular template for construction of the oikopleurid house. *Dev Biol*, 238(2), 260-273. doi:10.1006/dbio.2001.0414
- F. Azam. (1998). *Microbial Control of Oceanic Carbon Flux: The Plot Thickens* (Vol. 280).
- F. Azam, T. Fenchel, J.G. Field, J.S. Gray, L.A. Meyer-Reil, & F. Thingstad. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 10(3), 257-263.
- F. Broms, & P. Tiselius. (2003). Effects of temperature and body size on the clearance rate of *Oikopleura dioica*. *Journal of Plankton Research*, 25(5), 573-577. doi:10.1093/plankt/25.5.573
- F. Delsuc, H. Brinkmann, D. Chourrout, & H. Philippe. (2006). *Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates* (Vol. 439).
- F. Spada, H. Steen, C. Troedsson, T. Kallesoe, E. Spriet, M. Mann, & E. M. Thompson. (2001). Molecular patterning of the oikoplasmic epithelium of the larvacean tunicate *Oikopleura dioica*. *J Biol Chem*, 276(23), 20624–20632. doi:10.1074/jbc.M100438200
- G. Berge. (1962). Discoloration of the sea due to *Coccolithus huxleyi* I “bloom”. *Sarsia*, 6(1), 27-40. doi:10.1080/00364827.1962.10410259
- G. Bratbak. (1995). *Viral activity in relation to Emiliana huxleyi blooms: a mechanism of DMSP release?* (Vol. 128).
- G. Bratbak, A. Jacobsen, M. Heldal, K. Nagasaki, & T. F. Thingstad. (1998). *Virus production in Phaeocystis pouchetii and its relation to host cell growth and nutrition* (Vol. 16).
- G. Bratbak, J. Egge, & M. Heldal. (1993). *Viral mortality of the marine alga Emiliana huxleyi (Haptophyceae) and termination of algal blooms* (Vol. 93).
- G. Di Guardo, G. Marruchella, U. Agrimi, & S. Kennedy. (2005). *Morbillivirus Infections in Aquatic Mammals: A Brief Overview* (Vol. 52).
- G. Gorsky, M. J. Chrétiennot-Dinet, J. Blanchot, & I. Palazzoli. (1999). Picoplankton and nanoplankton aggregation by appendicularians: Fecal pellet contents of *Megalocercus*

- huxleyi in the equatorial Pacific. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 104(C2), 3381-3390. doi:10.1029/98JC01850
- G. Gorsky, N. S. Fisher, & S. W. Fowler. (1984). Biogenic debris from the pelagic tunicate, *Oikopleura dioica*, and its role in the vertical transport of a transuranium element. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 18(1), 13-23. doi:[https://doi.org/10.1016/0272-7714\(84\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0272-7714(84)90003-9)
- H. J. Nanninga, & T. Tyrrell. (1996). *Importance of light for the formation of algal blooms by Emiliana huxleyi* (Vol. 136).
- H. Nishida. (2008). Development of the appendicularian *Oikopleura dioica*: culture, genome, and cell lineages. *Dev Growth Differ*, 50 Suppl 1, S239-256. doi:10.1111/j.1440-169X.2008.01035.x
- J. B. Waterbury, & F. W. Valois. (1993). *Resistance to Co-Occurring Phages Enables Marine Synechococcus Communities To Coexist with Cyanophages Abundant in Seawater* (Vol. 59).
- J. Bouquet, E. Spriet, C. Troedsson, H. Otterå, D. Chourrout, & E. M. Thompson. (2009). Culture optimization for the emergent zooplanktonic model organism *Oikopleura dioica*. *Journal of Plankton Research*, 31(4), 359-370. doi:10.1093/plankt/fbn132
- J. C. Nejtgaard, M. E. Frischer, C. L. Raule, R. Gruebel, K. E. Kohlberg, & P. G. Verity. (2003). Molecular detection of algal prey in copepod guts and fecal pellets. *Limnology and Oceanography: Methods*, 1(1), 29-38. doi:10.4319/lom.2003.1.29
- J. E. Lawrence, A. M. Chan, & C. A. Suttle. (2002). Viruses causing lysis of the toxic bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) are widespread in coastal sediments of British Columbia, Canada. *Limnology and Oceanography*, 47(2), 545-550.
- J. E. Lawrence, & C. Suttle. (2004). *Effect of viral infection on sinking rates of Heterosigma akashiwo and its implications for bloom termination* (Vol. 37).
- J. Etten, M. Graves, D. G. Müller, W. Boland, & N. Delaroque. (2002). *Phycodnaviridae - Large DNA algal viruses* (Vol. 147).
- J. Fuhrman, & C. Suttle. (1993). *Viruses in Marine Planktonic Systems* (Vol. 6).
- J. H. Paul, J. Rose, S. Jiang, C. A. Kellogg, & L. Dickson. (1993). *Distribution of viral abundance in the reef environment of Key Largo, Florida* (Vol. 59).
- J. L. Acuña, & Kiefer. (2000). Functional response of the appendicularian *Oikopleura dioica*. *Limnology and Oceanography*, 45(3), 608-618. doi:10.4319/lo.2000.45.3.0608
- J. L. S. Hansen, T. Kjørboe, & A. L. Alldredge. (1996). *Marine snow derived from abandoned larvacean houses: Sinking rates, particle content and mechanisms of aggregate formation* (Vol. 141).
- J. L. Van Etten, D. E. Burbank, Y. Xia, & R. H. Meints. (1983). Growth cycle of a virus, PBCV-1, that infects *Chlorella*-like algae. *Virology*, 126(1), 117-125. doi:[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90466-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90466-X)
- J. Lawrence, J. Töpfer, E. Petelenz-Kurdziel, G. Bratbak, A. Larsen, E. Thompson, . . . J. Ray. (2017). Viruses on the menu: The appendicularian *Oikopleura dioica* efficiently removes viruses from seawater. *Limnology and Oceanography*.
- J. Martínez, D. C. Schroeder, A. Larsen, G. Bratbak, & W. Wilson. (2007). *Molecular Dynamics of Emiliana huxleyi and Cooccurring Viruses during Two Separate Mesocosm Studies* (Vol. 73).
- J. O. Britt, A. Z. Nagy, & E. B. Howard. (1979). Acute viral hepatitis in California sea lions. *J Am Vet Med Assoc*, 175(9), 921-923.
- J. R. Geraci, D. J. St Aubin, I. Barker, R. G. Webster, V. Hinshaw, W. J. Bean, . . . R. Schooley. (1982). *Mass Mortality of Harbor Seals: Pneumonia Associated with Influenza A Virus* (Vol. 215).



- K. O. Rothhaupt. (1990). Differences in particle size-dependent feeding efficiencies of closely related rotifer species. *Limnology and Oceanography*, 35(1), 16-23.  
doi:doi:10.4319/lo.1990.35.1.0016
- K. Burek-Huntington, F. M. D. Gulland, G. Sheffield, K. Beckmen, E. Keyes, T. Spraker, . . . A. Trites. (2005). *Infectious disease and the decline of Steller sea lions (Eumetopias jubatus) in Alaska, USA: Insights from serologic data* (Vol. 41).
- K. Nagasaki, M. Ando, S. Itakura, I. Imai, & Y. Ishida. (1994). *Viral mortality in the final stage of Heterosigma akashiwo (Rahidophyceae) red tide* (Vol. 16).
- K. Nagasaki, Y. Tomaru, K. Nakanishi, N. Hata, N. Katanozaka, & M. Yamaguchi. (2004). *Dynamics of Heterocapsa circularisquama (Dinophyceae) and its viruses in Ago Bay, Japan* (Vol. 34).
- K. Nagasaki, Y. Tomaru, K. Tarutani, N. Katanozaka, S. Yamanaka, H. Tanabe, & M. Yamaguchi. (2003). *Growth Characteristics and Intraspecies Host Specificity of a Large Virus Infecting the Dinoflagellate Heterocapsa circularisquama* (Vol. 69).
- K. Nagasaki, Y. Tomaru, N. Katanozaka, Y. Shirai, K. Nishida, S. Itakura, & M. Yamaguchi. (2004). *Isolation and Characterization of a Novel Single-Stranded RNA Virus Infecting the Bloom-Forming Diatom Rhizosolenia setigera* (Vol. 70).
- K. Tarutani, K. Nagasaki, & M. Yamaguchi. (2000). *Viral Impacts on Total Abundance and Clonal Composition of the Harmful Bloom-Forming Phytoplankton Heterosigma akashiwo* (Vol. 66).
- L. C. M. Mackinder, C. A. Worthy, G. Biggi, M. Hall, K. P. Ryan, A. Varsani, . . . D. C. Schroeder. (2009). *A unicellular algal virus, Emiliana huxleyi virus 86, exploits an animal-like infection strategy* (Vol. 90).
- L. Poorvin, J. Rinta-Kanto, D. Hutchins, & S. Wilhelm. (2004). *Viral release of Fe and its bioavailability to marine plankton* (Vol. 49).
- L. Poulsen, & M. Iversen. (2008). *Degradation of copepod fecal pellets: Key role of protozooplankton* (Vol. 367).
- L. Poulsen, M. Moldrup, T. Berge, & P. Hansen. (2011). *Feeding on copepod fecal pellets: A new trophic role of dinoflagellates as detritivores* (Vol. 441).
- L. R. Pomeroy. (1974). The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience*, 24(9), 499-504.
- L. Z. Holland. (2016). Tunicates. *Current Biology*, 26(4), R146-R152.  
doi:10.1016/j.cub.2015.12.024
- M. Breitbart, & F. Rohwer. (2005). Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology*, 13(6), 278-284. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.04.003>
- M. G. Weinbauer, & F. Rassoulzadegan. (2004). Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology*, 6(1), 1-11. doi:doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00539.x
- M. J. Frada, D. Schatz, V. Farstey, J. E. Ossolinski, H. Sabanay, S. Ben-Dor, . . . A. Vardi. (2014). Zooplankton may serve as transmission vectors for viruses infecting algal blooms in the ocean. *Curr Biol*, 24(21), 2592-2597. doi:10.1016/j.cub.2014.09.031
- M. R. Landry, & R. Hassett. (1982). *Estimating the grazing impact of marine microzooplankton. Marine Biol* 67: 283-288 (Vol. 67).
- M. T. Cottrell, & C. Suttle. (1995). *Dynamics of lytic virus infecting the photosynthetic marine picoflagellate Micromonas pusilla* (Vol. 40).
- N. Guixaboixereu, D. Vaqué, J. Gasol, J. Sanchezcamara, & C. Pedrosalio. (2002). *Viral distribution and activity in Antarctic waters* (Vol. 49).
- P. M. Holligan, M. Viollier, D. S. Harbour, P. Camus, & M. Champagne-Philippe. (1983). *Satellite and ship studies of coccolithophore production along a continental shelf edge* (Vol. 304).

- P. R. Flood, & D. Deibel. (1998). The appendicularian house. *The Biology of Pelagic Tunicates*. Oxford University Press, New York, In Bone, Q. , 105–124.
- P. R. Flood, D. Deibel, & C. C. Morris. (1992). Filtration of colloidal melanin from sea water by planktonic tunicates. *Nature*, 355(6361), 630-632.
- P. Thor, H. Dam, & D. Rogers. (2003). *Fate of organic carbon released from decomposing copepod fecal pellets in relation to bacterial production and ectoenzymatic activity* (Vol. 33).
- P. Tiselius, J. Petersen, T. Nielsen, M. Maar, E. Møller, S. Satapoomin, . . . C. Vargas. (2003). Functional response of *Oikopleura dioica* to house clogging due to exposure to algae of different sizes. *Marine Biology*, 142(2), 253-261. doi:10.1007/s00227-002-0961-z
- R. Fenaux. (1985). *Rhythm of secretion of Oikopleurid's houses* (Vol. 37).
- R. Fenaux. (1986). The house of *Oikopleura dioica* (Tunicata, Appendicularia): Structure and functions. *Zoomorphology*, 106(4), 224-231. doi:10.1007/BF00312043
- R. Fenaux, & G. Gorsky. (1985). Nouvelle technique d'levage des appendiculaires. *Rapports et Procès-Verbaux des Réunions (Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée)*, 29, 291 – 292.
- R. Fenaux, Q. Bone, & D. Deibel. (1998). *The Biology of Pelagic Tunicates* (In Bone, Q ed.). New York: Oxford University press.
- R. Noble, & J. Fuhrman. (1997). *Virus Decay and Its Causes in Coastal Waters* (Vol. 63).
- S. Ackleson, W. Balch, & M. P. Holligan. (1988). *White Waters of the Gulf of Maine* (Vol. 1).
- S. Fujii, T. Nishio, & H. Nishida. (2008). Cleavage pattern, gastrulation, and neurulation in the appendicularian, *Oikopleura dioica*. *Development Genes and Evolution*, 218(2), 69-79. doi:10.1007/s00427-008-0205-4
- S. Jacquet, M. Heldal, D. Iglesias-Rodriguez, A. Larsen, W. Wilson, & G. Bratbak. (2002). *Flow cytometric analysis of an Emiliana huxleyi bloom terminated by viral infection* (Vol. 27).
- S. Kimura, C. Ohshima, E. Hirose, J. Nishikawa, & T. Itoh. (2001). Cellulose in the house of the appendicularian *Oikopleura rufescens*. *Protoplasma*, 216(1-2), 71-74.
- S. Short. (2012). *The ecology of viruses that infect eukaryotic algae* (Vol. 14).
- S. Short, & C. M. Short. (2009). *Quantitative PCR reveals transient and persistent algal viruses in Lake Ontario, Canada* (Vol. 11).
- S. Uye, & K. Kaname. (1994). Relations between fecal pellet volume and body size for major zooplankters of the Inland Sea of Japan. *Journal of Oceanography*, 50(1), 43-49. doi:10.1007/bf02233855
- S. Uye, & S. Ichino. (1995). Seasonal variations in abundance, size composition, biomass and production rate of *Oikopleura dioica* (Fol) (Tunicata: Appendicularia) in a temperate eutrophic inlet. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 189(1), 1-11. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00004-B](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00004-B)
- S. Wilhelm, M. Weinbauer, C. Suttle, R. J. Pledger, & D. L. Mitchell. (1998). *Measurement of DNA damage and photoreactivation imply that most viruses in marine surface waters are infective* (Vol. 14).
- T. Castberg, R. Thyrhaug, A. Larsen, R. A. Sandaa, M. Heldal, J. L. Van Etten, & G. Bratbak. (2002). Isolation and characterization of a virus that infects *Emiliana Huxleyi* (Haptophyta) *Journal of Phycology*, 38(4), 767-774. doi:10.1046/j.1529-8817.2002.02015.x
- T. Garstecki, S. A. Wickham, & H. Arndt. (2002). *Effects of Experimental Sediment Resuspension on a Coastal Planktonic Microbial Food Web* (Vol. 55).
- T. Tyrrell, & A. Merico. (2004). *Emiliana huxleyi: Bloom observations and the conditions that induce them*.

- T. Yamada, T. Higashiyama, & T. Fukuda. (1991). *Screening of Natural Waters for Viruses Which Infect Chlorella Cells* (Vol. 57).
- U. Båmstedt, H. J. Fyhn, M. Martinussen, O. Mjåavatten, & O. Grahl-Nielsen. (2004). *Seasonal distribution, diversity and biochemical composition of appendicularians in Norwegian fjords*.
- Y. Tomaru, K. Tarutani, M. Yamaguchi, & K. Nagasaki. (2004). *Quantitative and qualitative impacts of viral infection on a Heterosigma akashiwo (Raphidophyceae) bloom in Hiroshima Bay, Japan* (Vol. 35).
- Y. Tomaru, N. Fujii, S. Oda, K. Toyoda, & K. Nagasaki. (2011). *Dynamics of diatom viruses on the western coast of Japan* (Vol. 63).
- Y. Tomaru, N. Hata, T. Masuda, M. Tsuji, K. Igata, Y. Masuda, . . . K. Nagasaki. (2007). Ecological dynamics of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and its infectious viruses in different locations of western Japan. *Environmental Microbiology*, 9(6), 1376-1383. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01252.x
- Ø. Bergh, Y. Børsheim, G. Bratbak, & M. Heldal. (1989). *High abundance of viruses found in aquatic environments* (Vol. 340).

# Vedlegg A: Protokoll FCM

## Prøve forberedelser

- Ta ut prøvene fra -80°C fryseren i tredje-etasje (Lokalisasjon: fryser Nr. 2 skuff 8D, fryser Nr. 3 skuff 12E og 12F). La de tine i 15 min.

## Bakterie/virus-prøver

- Steriliser TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0, Lokalisasjon: hylle over flowcytometeret) ved å filtrere 50 mL TE buffer i en stor sprøyte og presse bufferen gjennom et filter med porestørrelse 0.2 µm.
- Forbered 4 rør med fortynningene 10x, 100x, 1000x og 10000x for hver prøve + 3 kontroller og marker dem.
- Pipetter 900 µL TE buffer til hver av tubene.
- Ta prøvene med til avtrekkskapet.
- Gjør en seriefortynning med 100 µL av den fikserte prøven til røret som er merket med 10x, bland ved å pipetere opp og ned, overfør 100 µL fra 10x prøven til 100x osv.
- Tilsett 10 µL SYBR Green I DNA dye (Lokalisasjon: kjøleskap i samme rom som FCM, visst det er tomt, finnes det mer i fryseboks ved siden av kjøleskap) til hvert prøverør (inkludert kontrollene).
- Inkuber 10 min i vannbad (80°C), minimum 10 min avkjøling (romtemperatur) oppbevart i mørke med sølvfolie, deretter overfør til skuff beregnet for FCM-prøver frem til analysering (skuff Nr. 2).

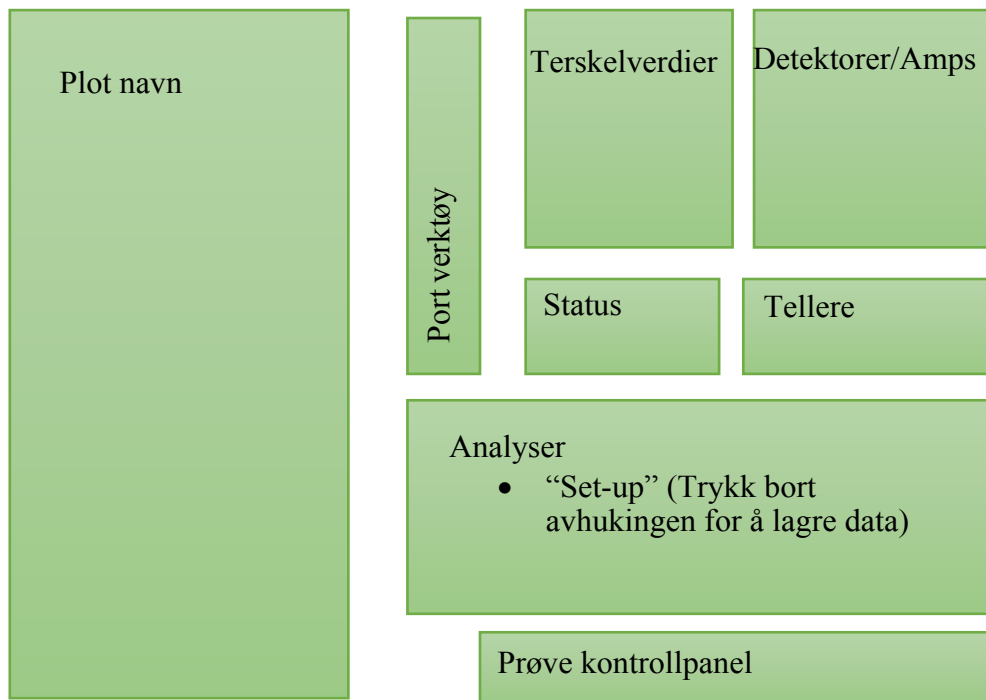
## Algeprøver

- Overfør prøvene til flowcytometerør (visst de ikke allerede er det), bland prøven forsiktig ved vending og tell prøvene uten noen videre forberedelser.
- Gjør en foreløpig vurdering: last inn prøven og kjør den på høy strømningshastighet i minimum 15s før analysering av data (for at strømmen skal være i likevekt).
- Den foretrukne hendelsesfrekvensen er 45-1000 algeceller per sekund. Visst prøven er for tett, fortynn med filtrert TE-buffer på samme måte som bakterie/virus-prøvene. Vanligvis er ufortynnet eller 10x fortynning det optimale for å telle algeprøver.

## Starte instrumentet

- Sjekk væskeskuffen, tanken med MilliQ-vann skal være full, mens avfallstanken skal være tom. Visst ikke, tøm avfallstanken ut i vasken og fyll den andre tanken med MQ-vann opp til merke. Husk å skru til korkene skikkelig og forsikre at det svarte metall dekselet sitter fast.
- Skru på instrumentet ved å trykke på den grønne knappen til høyre.
- Skru på trykk ved å skyve over den svarte spaken i væskeskuffen.
- Ta ut røret fra innsugningsporten.
- Skru på datamaskinen.
- Prime instrumentet 5 ganger ved å åpne innsugningsporten (ALDRI lukk denne når det ikke er noen prøve der). Tørk bort alle dråper som kommer ut under hver prime, til det ikke lenger er noen bobler igjen. Boblene er et resultat av at væsken i instrumentet blir ført i motsatt retning under prime i forhold til hva de vanligvis gjør under analysering.
- Sett inn rør med MilliQ-vann.
- Press "Run" (starter strømmen).
- Start Software (CellQuestPro).
- Sett strømningshastigheten til "High" og kjør i 10 min. Press "Standby" når fullført.
- Åpne plottet ved å klikke på desktopfolder ("Appy Virus").
- Tilknytt instrumentet til datamaskinen ved å klikke "Acquire" → "Connect to Cytometer".
- Åpne vinduene:
  - "Cytometer" → "Detectors/Amps" (cmd+1)
  - "Cytometer" → "Threshold" (cmd+2)
  - "Cytometer" → "Status" (cmd+4)
  - "Acquire" → "Counters"

- Arranger vinduene i følgende rekkefølge:



- Velg mappen for å lagre resultatene. Filnavn: prefiks + startnummer, deretter fyll i navnet til hver enkelt prøve. Operatør IDen bør være uforandret gjennom hele analyseringen.
- Importer parameterne: “Cytometer” → “Instrument setting” → \*Åpne innstillinger i mappe fra foregående analysering av bakterier/virus og alger. Når riktig fil har blitt valgt, trykk “Set” → “Done”.
- Sett prøvetiden og antall event som skal telles: “Acquire” → “Acquisition and storage” → “Collection criteria” → “event count” or “time”.  
Tid: 60s (hastighet høy).  
Event: Set til maksimum  $10^6$  (mulighet for at dette må justeres).
- Mål strømningshastigheten (v): for å vite konsentrasjonen av partikkelen man er interessert i. Dette blir gjort ved å fylle et rør med TE-buffer. Vei røret for innledende vekt ( $W_i$ ), deretter kjør røret i 10 minutter med tidtaking og de samme innstillingene som prøvene. Deretter vei røret igjen for å få endelig vekt ( $W_f$ ). Kalkuler forskjellen i

vekt:  $\Delta W = W_i - W_f$ , deretter multipliser med  $\rho = 1000 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$  (ved å forutsette at væsken har samme tetthet som vann),  $\Delta V = \Delta W \times \rho$ . Divider de oppnådde resultatene med tid og multipliser med 60, for å få resultatet i  $\mu\text{lxmin}^{-1}$ ,  $v = (\Delta V / \Delta t) \cdot 60$ . Fyll inn følgende tabell.

Tabell A.1. Noteringstabell for strømningshastighetsberegninger på FACS Calibur flowcytometer.

	$W_i$ (g)	$W_f$ (g)	$\Delta W$ (g)	$\Delta t$ (s)	$\Delta V$ ( $\mu\text{l}$ )	$V$ ( $\mu\text{lxmin}^{-1}$ )
<b>Bakterier/virus</b>						
<b>Alger</b>						

- Sett inn bakterie/virus-prøven eller algeprøven og tell.

### **Pause i analyseringen**

- Sett inn rør med MilliQ-vann og sett strømningshastigheten til “Low” (ved pauser opp til 10 minutter).
- Sett inn rør med MilliQ-vann og press “Stand-by”, skru av trykk ved å skyve over den svarte spaken i væskeskuffen (ved pauser opp til en time).

NB! Det er viktig at du har nok MilliQ-vann i røret (2/3 fylt rør bør holde).

### **Skru av instrumentet**

- Sett inn rør med FACS Clean, la den kjøre i 10 min på høy strømningshastighet.
- Visst det har blitt gjort endringer til plottet, lagre dette under et nytt filnavn: “File” → “Save Document As”.
- Skru av Software: “Acquire” → “Disconnect from the cytometer” → “File” → “Quit” → “Computer: Shut Down”
- Sett inn rør med FACS rinse, la den kjøre i 10 min på høy strømningshastighet, la den stå i innsugningsporten.
- Skru av strøm ved å trykke “Stand-by”.
- Skru av trykk ved å skyve over den svarte spaken i væskeskuffen.
- Skru av instrumentet ved å trykke på den grønne knappen til høyre.
- Tøm avfallstank.

- Fyll tank Nr. 2 med MilliQ-vann.

Tabell A.2. Bakterieinnstillinger

	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3	Terskelverdi	Hovedplot
<b>Spenning</b>	E02	620	530	500	700	52, FL1-H	FL1 vs SSC
							FL1 vs FL3
<b>60s @50 µl/min</b>							SSC histogram

Tabell A.3. Algeinnstilliger

	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3	Terskelverdi	Hovedplot
<b>Spenning</b>	E01	360	400	550	450	52, FL3-H	FL1 vs SSC
							FL2 vs FL1
<b>60s @50 µl/min</b>							FL1 histogram

*Denne protokollen er en modifisert versjon av Elzbieta Petelenz-Kurdziel protokoll for FCM ved Universitet i Bergen 2016.*



## Vedlegg B: IMR medium

70 % sjøvann (700 mL filtrert eldet sjøvann) blandes med 300 mL MilliQ-vann og autoklaveres. Næringsstoffene under lages hver for seg, autoklaveres og deretter tilsettes enkeltvis til mediet.

Tabell B.1. Oppskrift til IMR medium.

IMR/2-medium	Består av	Stamløsning	Tilsats til 1 i 70 % SW
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.68 g / 100 ml MQ	0.5 ml
KNO <sub>3</sub>		5 g / 100 ml MQ	0.5 ml
Spormetall løsning	Na <sub>2</sub> EDTA (3.0 g) NaFeEDTA (800 mg) MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O (410 mg) ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (125 mg) Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O (65 mg) MilliQ-vann (500ml) CuSO <sub>4</sub> /CoCl <sub>2</sub> -løsning (0.5 ml) - CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O (0.4 g) - CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (0.4 g) - MilliQ-vann (100 ml)		0.5 ml
Vitamin løsning	Thiamin (50 mg) Biotin (0.5 mg) B12-løsning (0.5 ml) -100mg B12/ 100ml MilliQ MilliQ-vann (500 ml)		0.5 ml

*Oppskriften til IMR mediet er laget av Hilde Stabell ved Universitet i Bergen 2017.*