



Zooplanktoni tuvastamine morfoloogia ja keskkonna DNA põhjal

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Laura Johanna Kadak

Üliõpilaskood: 213028LAAB

Juhendajad: Sirje Sildever, TalTech meresüsteemide instituut, nooremprofessor
Maria Cecilia Sarmiento Guerin, TalTech keemia ja biotehnoloogia instituut, vanemteadur

Lenne Nigul, TalTech keemia ja biotehnoloogia instituut, insener

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia



Zooplankton identification based on morphology and environmental DNA

Bachelor thesis

Student: Laura Johanna Kadak

Student code: 213028LAAB

Supervisors: Sirje Sildever, Department of Marine Systems, assistant professor
Maria Cecilia Sarmiento Guerin, Department of Chemistry and Biotechnology, senior researcher

Lenne Nigul, Department of Chemistry and Biotechnology, engineer

Curriculum: Applied chemistry, food and gene technology

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Laura Johanna Kadak
[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.
Juhendaja: Sirje Sildever
[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Lühendid.....	6
Sissejuhatus.....	7
1 Kirjanduse ülevaade	8
1.1 Zooplankton	8
1.2 Zooplanktoni seire	9
1.3 Keskkonna DNA põhine zooplanktoni tuvastamine	10
2 Töö eesmärgid	12
3 Metoodika	13
3.1 Proovivõtt.....	13
3.2 Proovide analüüs	13
3.2.1 Morfologia	13
3.2.2 Keskkonna DNA (eDNA).....	14
4 Tulemused	16
4.1 Morfologia-põhine analüüs	16
4.2 Keskkonna DNA põhine analüüs	18
4.2.1 Võrguproovide keskkonna DNA põhine analüüs	18
4.2.2 Veeproovide keskkonna DNA põhine analüüs.....	19
4.3 Zooplanktoni liikide tuvastamine erinevate meetoditega ja erinevatest proovidest	19
5 Arutelu.....	21
Kokkuvõte.....	24
<i>Abstract</i>	25
Tänuavaldused.....	26
Kasutatud kirjandus.....	27
Lisad.....	30
Lisa 1. Morfologia-põhisel analüüsil tuvastatud liigid.....	30
Lisa 2. Morfologia-põhise analüüsi proovide mesozooplanktoni arvukus ja biomass	31
Lisa 3. Morfologia-põhise analüüsi proovide kõige arvukamad liigid, nende arvukus ja suhteline arvukus	32
Lisa 4. Keskkonna DNA põhisel analüüsil võrguproovidest tuvastatud liigini määratud molekulaarsed taksonoomilised ühikud (MOTU-d).....	33
Lisa 5. Võrguproovidest enim tuvastatud liigid, nende DNA järjestuste arv ja suhteline järjestuste arv.....	35

Lisa 6. Keskkonna DNA põhisel analüüsil veeproovidest tuvastatud liigini määratud molekulaarsed taksonoomilised ühikud (MOTU-d)	36
Lisa 7. Veeproovidest enim tuvastatud liigid, nende DNA järjestuste arv ja suhteline järjestuste arv.....	38
Lisa 8. Keskkonna DNA põhisel analüüsil võrgu- ja veeproovidest tuvastatud liigid	39

Lühendid

COI – tsütokroom oksüdaas I (*cytochrome oxidase I*)

DNA – desoksüribonukleiinhape

eDNA – keskkonna DNA (*environmental DNA*)

HELCOM – Helsingi Komisjon (*Helsinki Commission*), Läänemere merekeskkonna kaitse komisjon

MOTU – molekulaarne taksonoomiline ühik (*Molecular Taxonomic Unit*)

MSTS – zooplanktoni keskmise suuruse ja koguhulga indikaator (*Zooplankton Mean Size and Total Stock*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

psu – praktiline soolsuse skaala (*practical salinity unit*)

rRNA – ribosomaalne ribonukleiinhape

sp. – liik (*species*)

spp. – mitmed liigid (*several species*)

TAE – tris-atsetaat-etüleendiamiintetraädikhape

Sissejuhatus

Zooplankton koosneb vees vabalt hõljuvatest mikro- ja makroskoopilistest loomadest, kes on oluliseks lülis toiduahelas: zooplankton toitub primaarsetest tootjatest ning on ise toiduks kõrgemal troofilistel tasemetel olevatele organismidele. Läänemeres esineb mage-, riimveelisi ja merelisi zooplanktoni liike, madala soolsusega Soome lahes leidub peamiselt mage- ja riimveelisi liike. Läänemeres on bioloogiline mitmekesisus madal ning suur osa Läänemeres registreeritud võõrliikidest on siin juba kanda kinnitanud. Üheks selliseks võõrliigiks on näiteks vesikirbuline *Cercopagis pengoi*, mida tuvastati esimest korda Eesti planktoniproovides 1991. aastal.

Zooplanktoni seirel kirjeldatakse mesozooplanktoni ehk 0,2 kuni 20 mm kehasuurusega loomhõljumi liigilist koosseisu, arvukust ja biomassi. Läänemeres järgitakse zooplanktoni seirel Läänemere keskkonnakaitse komisjoni (HELCOM) avaldatud metoodikat. Seire põhineb mesozooplanktoni isendite morfoloogilisel analüüsil, mille käigus tuvastatakse nad mikroskoobi abil võimalikult madala taksonoomilise rühmani. Eesti riikliku mereseire raames toimub zooplanktoni seire nii rannikumere kui ka avamere veekogumites.

Zooplanktoni morfoloogia-põhine tuvastamine on ajamahukas ning mõningaid proovis leiduvaid isendeid ei ole morfoloogiliste erisuste puudumise tõttu võimalik perekonna või liigi tasemeni tuvastada. Traditsioonilise, morfoloogia-põhise tuvastamisele lisaks on hakatud kasutama ka DNA-põhised meetodeid, mis aitavad tuvastada proovides leiduvaid isendeid hoolimata nende morfoloogiliste tunnuste olemasolust või nende puudumisest. Isendite tuvastamiseks võib kasutada nii spetsiifilisi kui universaalseid molekulaarseid markereid. Üheks võimaluseks, kuidas uurida keskkonnas leiduvaid või seal olnud isendeid on kasutada nende poolt keskkonda jäetud DNA-d ehk keskkonna DNA-d (eDNA). Näiteks võimaldab selline lähenemine varakult tuvastada võõrliike.

Käesoleval bakalaureusetööl oli kaks eesmärki. Üheks eesmärgiks oli võrrelda, milline on traditsioonilise morfoloogia-põhise ning eDNA-põhise zooplanktoni liikide tuvastamise võimekus. Teiseks eesmärgiks oli hinnata, kas zooplanktoni eDNA põhiseks seireks on sobivam kasutada võrguproovi või paralleelselt samal ajal kogutud vee pinnakihist pärinevat proovi.

Käesolevas bakalaureusetöös kasutati Eesti riiklikus mereseires kasutatavaid zooplanktoni proove ning paralleelselt kogutud veeproove.

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Zooplankton

Zooplankton koosneb erinevates suuruses loomadest, kes hõljuvad vabalt veekeskkonnas. Zooplankton omab tähtsat rolli toiduvõrgustikus, olles ühenduslüliks primaarsete tootjate, fütoplanktoni, ning kõrgemate troofiliste tasemetel vahel (Harris et al., 2000; HELCOM, 2021a). Toitudes fütoplanktonist, reguleerib zooplankton nende arvukust ja kasvu ning takistab seeläbi ka fütoplanktoni õitsenguid (Harris et al., 2000; Lipssewers & Spilling, 2018). Kuna zooplankton on toiduks kalavastsetele ja noortele kaladele, mõjutab zooplanktoni kooslus, arvukus ja suurus kalavarusid ning seeläbi ka kalatööstust (Harris et al., 2000; HELCOM, 2021a). Zooplanktoni hulka kuuluvad aerjalalised ja hiilgevähilised toituvad nii fütoplanktonist kui ka detriidist ehk surnud orgaanilisest ainest ning on oma laia leviku ja suure arvukuse tõttu ühed olulisemad sekundaarsed tootjad (Harris et al., 2000).

Läänemeri on riimveeline sisemeri, kus keskmine soolsus on palju madalam kui Atlandi ookeani põhjaosas ning Põhjameres. Läänemere zooplanktoni koosseisu kuuluvad nii mage- ja riimveelised liigid kui ka mereliigid (O'Brien et al., 2013). Läänemeres esineb soolsuse gradient, kus soolsus väheneb suunal edelast kirdesse ning erinevused Läänemere alambasseinide soolsuses mõjutavad nende zooplanktoni kooslust. Näiteks on vee pinnakihi keskmine soolsus Kattegati väinas 22,3 psu ehk 22,3 grammi soola tuhande grammi merevee kohta, seevastu Soome lahes on keskmine soolsus 4,6 psu (Ojaveer et al., 2010; O'Brien et al., 2013). Mida lähemal Taani väinadele, Lääne- ja Põhjameri kohtumispaigale, seda rohkem esineb mereliike. Arkona basseinis, Läänemere lõunaosas, on domineerivad erinevad keriloomad ja aerjalalised *Acartia* spp., *Pseudocalanus* spp. ning *Temora longicornis* (O'Brien et al., 2013). Soome lahes on valdavalt mage- ja riimveelised aerjalalised, vesikirbulised ning keriloomad (Raateoja & Setälä, 2016). Eesti vetes domineerivad aerjalaliste liigid *Acartia bifilosa* ning *Eurytemora affinis*, arvukaim vesikirbuline on *B. coregoni* (O'Brien et al., 2013). Kõige arvukamaks zooplanktoni rühmaks Eesti rannikumeres on keriloomad ja nende arvukus on eriti kõrge Tallinna lahes (Raateoja & Setälä, 2016).

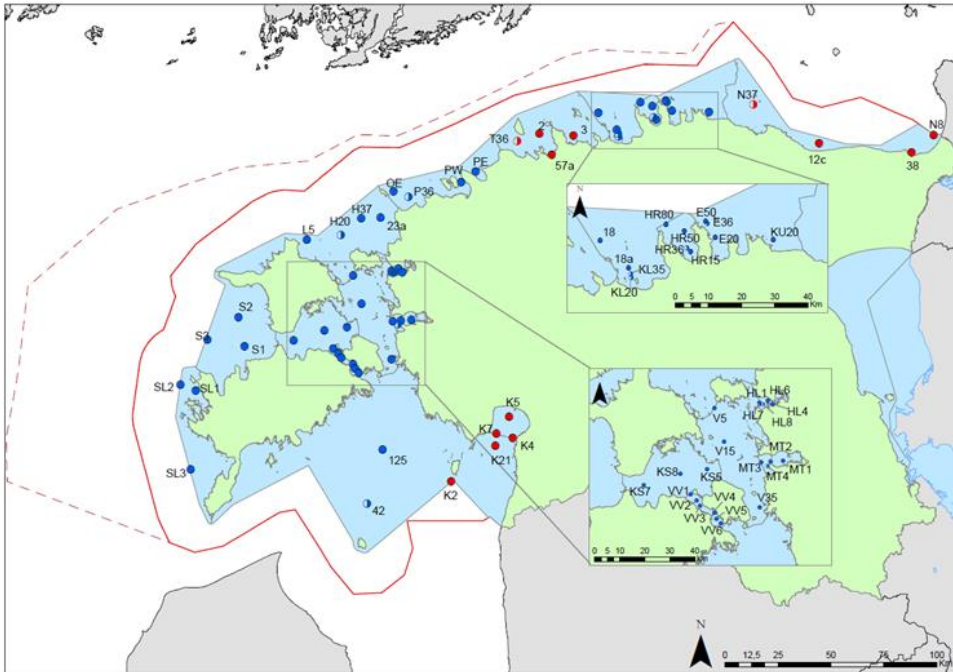
Läänemeri kui madala bioloogilise mitmekesisusega süsteem on eriti haavatav võõrliikide invasioonide suhtes: umbes 70 siin registreeritud 100 võõrliigist on loonud endale kohalikud paljunemisevõimelised populatsioonid (Põllumäe & Kotta, 2007; Põllumäe, 2011). Läänemeres on tiheda laevaliikluse ning üle poole eelmise kahe sajandi jooksul Läänemeres registreeritud võõrliikidest on levinud siia laevaliikluse abil (Raateoja & Setälä, 2016). Levinuimad invasiivsed zooplanktoni liigid Läänemeres on *C. pengoi*, *Evadne anonyx* ning *Mnemiopsis leidyi* (O'Brien et al., 2013). Vesikirbulised *C. pengoi* ja *E. anonyx* on muutunud suvekuudel püsivateks liikideks Läänemere kesk- ja põhjaosas ning kammlooma *M. leidyi* täheldatakse igal aastal lõuna- ja läänes osas (O'Brien et al., 2013). Vesikirp *C. pengoi*, üks hilisematest võõrliikidest, on pärit Ponto-Kaspia vesikonnast ning Eesti rannikumeres planktoniproovides ilmus ta esimest korda aastal 1991 (Kotta et al., 2006). *Cercopagis pengoi* mõjutab pelaagilist toiduvõrgustikku toitudes peamiselt väiksematest zooplanktoni liikidest ning olles ise saagiks kaladele (Kotta et al., 2006; Raateoja & Setälä, 2016). *Cercopagis pengoi* konkureerib seeläbi kohalike liikidega toidu pärast ning vähendab energia ülekandumise efektiivsust ülemistele troofilistele tasemetel (Kotta et al., 2006; Raateoja & Setälä, 2016).

1.2 Zooplanktoni seire

Mesozooplankton on suuruspõhine zooplanktoni grupp, kuhu kuuluvad kõik taksonid ning erinevate loomorganismide eluetapid, milles nende suurus jääb vahemikku 0,2 kuni 20 mm. Läänemere keskkonnakaitse komisjon (HELCOM) on välja töötanud ühtse meetodika mesozooplanktoni seireks Läänemeres (HELCOM, 2021a). Seiramise eesmärgiks on kirjeldada mesozooplanktoni liigilist koosseisu, arvukust, biomassi ning nende muutust ajas. Seire tulemuste põhjal määratakse alambasseinide zooplanktoni keskmise suuruse ja kogubiomassi indikaator (*Zooplankton Mean Size and Total Stock*, MSTS) (HELCOM, 2021a; Keskkonnaagentuur, 2023a). MSTS hindab merekeskkonna staatust zooplanktoni koosluse struktuuri ja hulga järgi. Reeglina väljendub hea keskkonna staatus suuremõõtmeliste zooplankterite rohkes arvukuses planktonikoosluses (HELCOM, 2023; Keskkonnaagentuur, 2023a).

Seire toimub vastavalt riigile erineva regulaarsusega. HELCOM-i (2021a) meetodika põhjal kogutakse mesozooplanktoni proove seirejaamades vertikaalsete tõmmetega läbi veesamba ning proove säilitatakse 4% formaldehüüdi lahuses. Mesozooplanktoni seire põhineb isendite morfoloogilisel analüüsil mikroskoobi abil ning zooplanktoni taksonoomiliseks tuvastamiseks ja loendamiseks vaadatakse läbi kogu proov. Isendid tuvastatakse võimalikult madala taksonoomilise kategooriani. Loendatud isendite arv teisendatakse arvukuseks (isendid/m³) võttes arvesse vee kogust, mis proovivõtmise ajal läbi võrgu filtreeriti. Proovides esinevad isendid, kes on mesozooplanktonist suuremad, loendatakse samuti vastavalt mesozooplanktoni meetodikale (HELCOM, 2021a). Mesozooplanktonist väiksemad loomorganismid, suurusega 20 kuni 200 µm, kuuluvad mikrozooplanktoni hulka. Mikrozooplanktonit zooplanktoni seiresse ei kaasata, kuid tsiliaat *Mesodinium rubrum*-i loendatakse fütoplanktoni ehk taimhõljusti seire käigus (Lipsewers & Spilling, 2018; HELCOM, 2021b).

Eesti riikliku mereseire käigus määratakse rannikumere ja avamere veekogumite füüsikalise-keemilise omadusi, hüdrobioloogilisi näitajaid ning zooplanktoni näitajaid ja indikaatorit (Keskkonnaagentuur, 2023a; b). Zooplanktoni proovid kogutakse vertikaalsete tõmmetega põhjast pinnani, kasutades Juday või WP2 tüüpi planktonivõrku, mille suu pindala on vastavalt 0,1 või 0,25 m² (Keskkonnaagentuur, 2023a; b). Zooplanktoni püsiseiret teostatakse kolmes rannikumere veekogumis: Narva-Kunda lahes, Muuga-Tallinna-Kakumäe lahes ning Pärnu lahes (Joonis 1). Igas veekogumis on kolm seirejaama, kus määratakse zooplanktonit vähemalt kümme korda aastas, vahemikus aprillist oktoobrini. Võõrliikide seiret teostatakse Muuga ja Sillamäe sadama aladel ning Muuga sadama territooriumi kaidelt (Keskkonnaagentuur, 2023b). Mõlema sadama piirkonna seirejaamadest kogutakse proove kümme korda aastas, aprillist oktoobrini. Muuga sadama kolmelt kaitl võetakse zooplanktoni proove kolm korda aastas, kahe eri tihedusega võrguga. Liivi lahes asuvas kahest seirejaamast määratakse zooplanktonit korra aastas (Keskkonnaagentuur, 2023b). Avamere seire käigus kogutakse zooplanktoni proove kuueteistkümnest seirejaamast kaks korda aastas (Keskkonnaagentuur, 2023a). Zooplanktoni proovide analüüsimisel järgitakse HELCOM (2021a) meetodikat. Kogutud proovid fikseeritakse formaliiniga ning zooplanktoni määramiseks vaadatakse mikroskoobi all läbi kogu proov. Zooplanktoni proovidel määratakse liigiline koosseis, arvukus (isendid/m³), biomass (mg/m³) ning arvutatakse indikaatori MSTS näitaja (Keskkonnaagentuur, 2023a; b).



Joonis 1. Eesti mereseire pelaagiliste näitajate ja põhjaloomastiku seirekohad. Punasega on märgitud püsiseirejaamad, sinisega rannikuveekogumite seirejaamad. Zooplanktoni seirejaamad: 38, 12c, N8, 2, 3, 57a, K2, K21, K4, K5 ja K7. (Keskkonnaagentuur, s.a.; 2019)

1.3 Keskkonna DNA põhine zooplanktoni tuvastamine

Morfoloogia-põhine zooplanktoni tuvastamine on aeganõudev ning tömahukas protsess, mis nõuab kogemusi ja oskusi. Kulu- ja ajatõhusama variandina liikide tuvastamiseks ning bioloogilise mitmekesisuse uurimiseks on järjest enam hakatud kasutama DNA-põhiseid meetodeid (Panksep et al., 2021). Keskkonna DNA-ks ehk eDNA-ks nimetatakse keskkonnas leiduvat DNA-d, mida organismid enda elu jooksul keskkonda maha jätavad ning mikroorganismide puhul ka terveid organisme, mis proovis leiduvad (Panksep et al., 2021; Jerney et al., 2023). eDNA meetodika põhiastapud on proovide kogumine, DNA eraldamine proovidest, PCR ja sekveneerimine ning andmete analüüs (Panksep et al., 2021).

Võrreldes traditsioonilise zooplanktoni tuvastamisega on eDNA meetodil mitmeid eeliseid. DNA-põhine meetod võimaldab täpsemini tuvastada morfoloogia põhjal raskesti eristatavaid organismide arengustaadiumeid (Panksep et al., 2021; Jerney et al., 2023). Samuti saab eDNA meetodit kasutada võõrliikide varajaseks tuvastamiseks, sest organismide DNA-d saab tuvastada madalate kontsentratsioonide juures ning traditsioonilist meetodit kasutades on isendite tuvastamine madala arvukuse korral keeruline (Panksep et al., 2021). eDNA-põhisel meetodil on ka puudusi: meetodiga ei saa määrata isendite suurust, elutsükli etappi ega kaalu ning meetod nõuab kõrge kvaliteediga referentsandmebaase (Lipsewers & Spilling, 2018; Panksep et al., 2021; Jerney et al., 2023).

Hetkel peetakse morfoloogia- ja DNA-põhise tuvastamise kombinatsiooni parimaks lahenduseks, kuidas zooplanktoni hulka kuuluvaid isendeid tuvastada (Lipsewers & Spilling, 2018; Panksep et al., 2021; Jerney et al., 2023).

eDNA-põhist tuvastamist on zooplanktoni uurimiseks kasutatud juba paljudes erinevates meredes ja ookeanites. Näiteks võrdlesid Hirai ja teised (2017) Ohhoota merest kogutud proovidega DNA- ja morfoloogia-põhist zooplanktoni tuvastamise meetodit: DNA meetodiga tuvastati 561 molekulaarset taksonoomilist ühikut ehk MOTU-t, mis on tuvastatud perekonna tasemeni ning morfoloogilise analüüsiga tuvastati 201 morfoloogilist rühma. DNA-põhise meetodiga suudeti tuvastada ka koorikloomade vastseid ning meroplanktonit ehk organisme, kes on planktilised vaid osa oma elutsüklist (Hirai et al., 2017). Hirai ja teised (2020) uurisid ka Vaikse ookeani ja Põhja-Jäämere aerjalaliste koosluse struktuuri ja mitmekesisust kasutades eDNA-põhist meetodit. Läänemeres tuvastasid Sildever ja teised (2021) eDNA-põhise meetodiga 29 mesozooplanktoni liiki, samas kui morfoloogia-põhise meetodiga tuvastati ainult 7 mesozooplanktoni liiki. eDNA-põhise meetodiga tuvastati ka 15 uut zooplanktoni liiki, nendest 8 olid mikrozooplanktoni ja 7 mesozooplanktoni liigid.

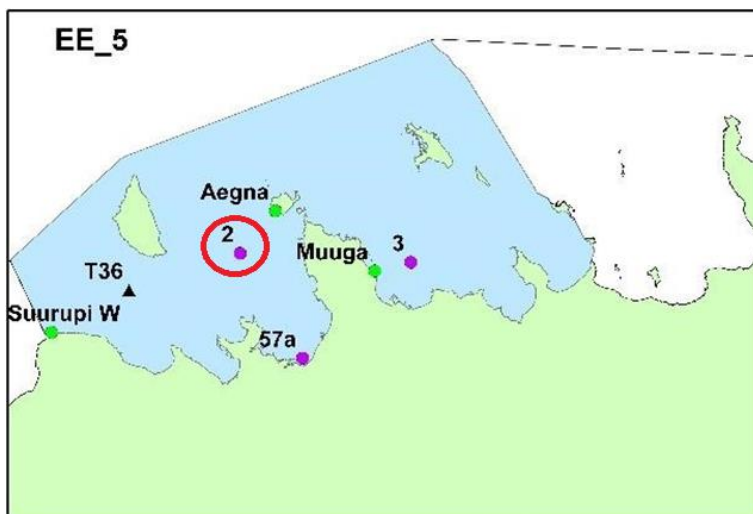
2 Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli tuvastada, milline on traditsioonilise morfoloogia-põhise ning keskkonna DNA põhise zooplanktoni liikide tuvastamise võimekus, kasutades selleks Eesti riiklikus seires kasutatavaid proove. Bakalaureusetöö teiseks eesmärgiks oli hinnata, kas zooplanktoni keskkonna DNA põhiseks seireks on sobivam kasutada võrguproovi või paralleelselt samal ajal kogutud vee pinnakihist pärinevat proovi.

3 Metoodika

3.1 Proovivõtt

Antud bakalaureusetöös kasutatud zooplanktoni vee- ja võrguproovid on kogutud Eesti rannikumere püsiseirejaamast 2 (Joonis 2). Jaam 2 asub Muuga-Tallinna-Kakumäe lahes (59,5392°N 24,6864°E) ning jaama sügavus on 45 meetrit (Keskkonnaagentuur, s.a.; 2023b).



Joonis 2. Eesti rannikumere zooplanktoni püsiseirejaamad Muuga-Tallinna-Kakumäe lahes (tähistatud lillaga), proovivõtupaik märgitud punase ringiga (muudetud Keskkonnaagentuur 2023b põhjal).

Proove koguti 2022. aasta Eesti rannikumere seire käigus kümme korda, vahemikus aprill-oktoober, Tartu Ülikooli Eesti mereinstituudi töötajate poolt. Proovide kogumiseks kasutati Juday tüüpi planktonivõrku, mille suu pindala on 0,1 m² ja fikseeriva osa tihedus on 0,1 mm (Keskkonnaagentuur, 2023b).

3.2 Proovide analüüs

3.2.1 Morfoloogia

Zooplanktoni taksonoomiliseks tuvastamiseks fikseeriti proov formaliiniga ning vähemalt 100x suurendusega mikroskoobi all vaadati läbi kogu proov. Isendid tuvastati võimalikult madala taksonoomilise kategooriani. Keriloomad määrati reeglina perekonnani, vesikirbuliste ja aerjalgsete esindajad määrati enamasti liigini. Aerjalgsete puhul määrati ka isased ja emased isendid ning isendi arengustaadium. Meroplankton tuvastati seltsi või klassini (HELCOM, 2021a; Keskkonnaagentuur, 2023b). Proovide morfoloogilise analüüsi viis läbi kaasprofessor Arno Põllumäe (Tartu Ülikooli Eesti mereinstituut).

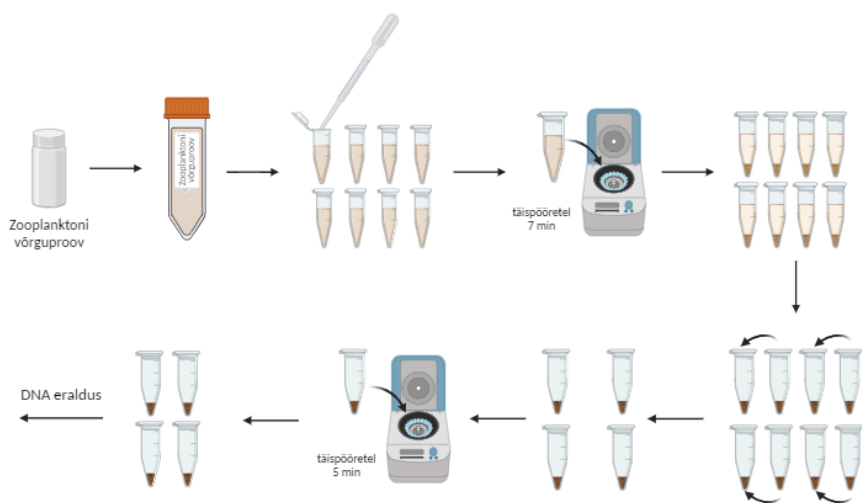
3.2.2 Keskkonna DNA (eDNA)

Keskkonna DNA eraldati kümnest veeproovist ning kümnest võrguproovist (Joonis 3).



Joonis 3. Võrguproovi võrguriide tükk Petri tassil. Pildi autor: Sirje Sildever.

Enne eDNA eraldamist koguti võrguproove sisaldavast proovipudelist kogu proovimaterjal (Joonis 4). Selleks korjati võrgult kogu zooplanktoni mass 50 ml tsentrifuugituubi, võrguriide tükk ja proovivõtupudel loputati 96% etanooliga ning koguti samasse tuubi, seejärel võeti tuubist ühekordse pipetiga kaheksa kuni kümme alamproovi. Selleks tõsteti 1,5 ml tuubidesse umbes 1 ml proovi, proove tsentrifuugiti lauatsentrifuugil Eppendorf Centrifuge 5415 D täispööretel 7 minutit ning etanool eemaldati ettevaatlikult pipeteerides. Alamproovid tõsteti kokku kolme kuni nelja 1,5 ml tuubi, et oleks piisavalt proovimaterjali, kust eDNA-d eraldada. Peale seda tsentrifuugiti proove täispööretel 5 minutit, etanool eemaldati pipeteerides ning seejärel alustati eDNA eraldamisega.



Created in BioRender.com

Joonis 4. Võrguproovi ettevalmistus eDNA eraldamiseks, joonise koostamiseks on kasutatud BioRender programmi.

Võrgu- ja veeproovide eDNA eraldamiseks kasutati DNeasy Blood & Tissue Kit-i (QIAGEN). Mõlema proovitüübi puhul lüüsi proove üleöö. DNA-d elueeriti proovist kaks korda: proovile lisati 100 µl puhver AE-d, inkubeeriti üks minut, seejärel tsentrifuugiti proovi täispööretel üks minut ning protsessi korrati veel üks kord. Proovide eDNA kontsentratsioon mõõdeti kasutades Thermo Scientific NanoDrop 2000c. Võrguproovide eDNA eraldamisel järgiti tootjapoolset protokollit, veeproovide puhul kasutati tootjapoolsest protokollist erinevaid reagentide koguseid.

Veeproovide filtreerimiseks kasutatud filtrid lõigati enne eDNA eraldamist steriilsete kääridega väiksemateks tükkideks. Et filtrid oleksid erinevate puhverlahustega täielikult kaetud, suurendati eDNA eraldamise tootjapoolses protokollis (DNeasy Blood & Tissue Kits, 2023) järgnevalt välja toodud reagentide mahtusid 2,8 korda. Proovile lisati 500 µl puhver ATL-i, seejärel segati proovi üks minut (sagedusega 30 Hz) kasutades QIAGEN TissueLyser II ning lisati 55,6 µl proteinaas K-d (20 mg/ml). Peale proovi lüüsimist, lisati 11,1 µl RNAas A-d (100 mg/ml) ning lisati 556 µl puhver AL-i ja 556 µl etanooli.

Polümeraasi ahelreaktsioonis (PCR) kasutati 18S ribosomaalse RNA (rRNA) geeni V7-V9 regiooni amplifitseerimiseks praimereid 18S-F1289-sn ja 18S-R1772-sn (Dzhembekova et al., 2018), millele olid lisatud Illumina indekspraimeritega seonduvad adapterid (Illumina, 2014) ning PCR-i kokteili komplekti HOT FIREPol Blend Master Mix (Solis BioDyne). PCR reaktsioon viidi läbi 25 µl mahus proovi kohta kasutades HOT FIREPol (5x), praimereid (0,4 µM), 2 µl DNA proovi ning destilleeritud vett reaktsioonisegu mahu täitmiseks. PCR-i esimeseks etapiks oli polümeraasi aktivatsioon 15 minutit 95°C juures. Sellele järgnesid 25 kuni 30 tsüklit: DNA denaturatsioon 20 sekundit 95°C juures, praimerite DNA hübridisatsioon 30 sekundit 58°C juures ning komplementaarse DNA ahela elongatsioon 40 sekundit 72°C juures. Viimasena pikendati amplifitseeritud DNA fragmente 5 minutit 72°C juures.

PCR-i tulemusi kontrolliti geelelektroforeesiga. Selleks valmistati 1% agarooši geel (TAE puhvis ehk tris-atsetaat-etüleendiamiintetraädikhappe puhvis). eDNA visualiseerimiseks lisati etiidumbromiidi (0,5 µg/ml, Naxo OÜ). Enne proovide geelile laadimist, lisati 5 µl proovile 1 µl laadimispuhvrit (6x Loading Dye, Thermo Scientific). Geeli jooksutati 120 V 50 minutit. Sobiva pikkusega PCR-i produktid (umbes 570 aluspaari) saadeti puhastamiseks ja sekveneerimiseks Tartu Ülikooli genoomika instituudi Genoomika tuumiklaborisse. Proovid sekveneeriti kasutades Illumina sekvenaatorit MiSeq ja komplekti v3 600 tsüklit (2 x 300 aluspaari).

Sekveneerimistulemuste bioinformaatiline analüüs viidi läbi Jaapani riikliku kalandusuuringute ja hariduse agentuuri juhtivteaduri Satoshi Nagai poolt, kasutades nende poolt välja arendatud bioinformaatilise analüüsi süsteemi (Nagai et al., 2022). Saadud DNA järjestuste taksonoomiline kirjeldamine toimus NCBI andmebaasi põhjal nagu kirjeldatud Nagai jt. (2022) poolt.

4 Tulemused

4.1 Morfoloogia-põhine analüüs

2022. aasta zooplanktoni seire andmete (Keskkonnaagentuur, 2023c) põhjal tuvastati terve proovivõtu perioodi jooksul kokku 21 erinevat liiki (Lisa 1). Taksonoomilise määramise tulemusena esines kõige rohkem liike keriloomade hõimkonnas, kuhu kuulus 6 tuvastatud liiki. Viis liiki tuvastati nii aerjalaliste alamklassis kui ka vesikirbuliste seltsis. Ripikloomade klassi kuulus 2 liiki.

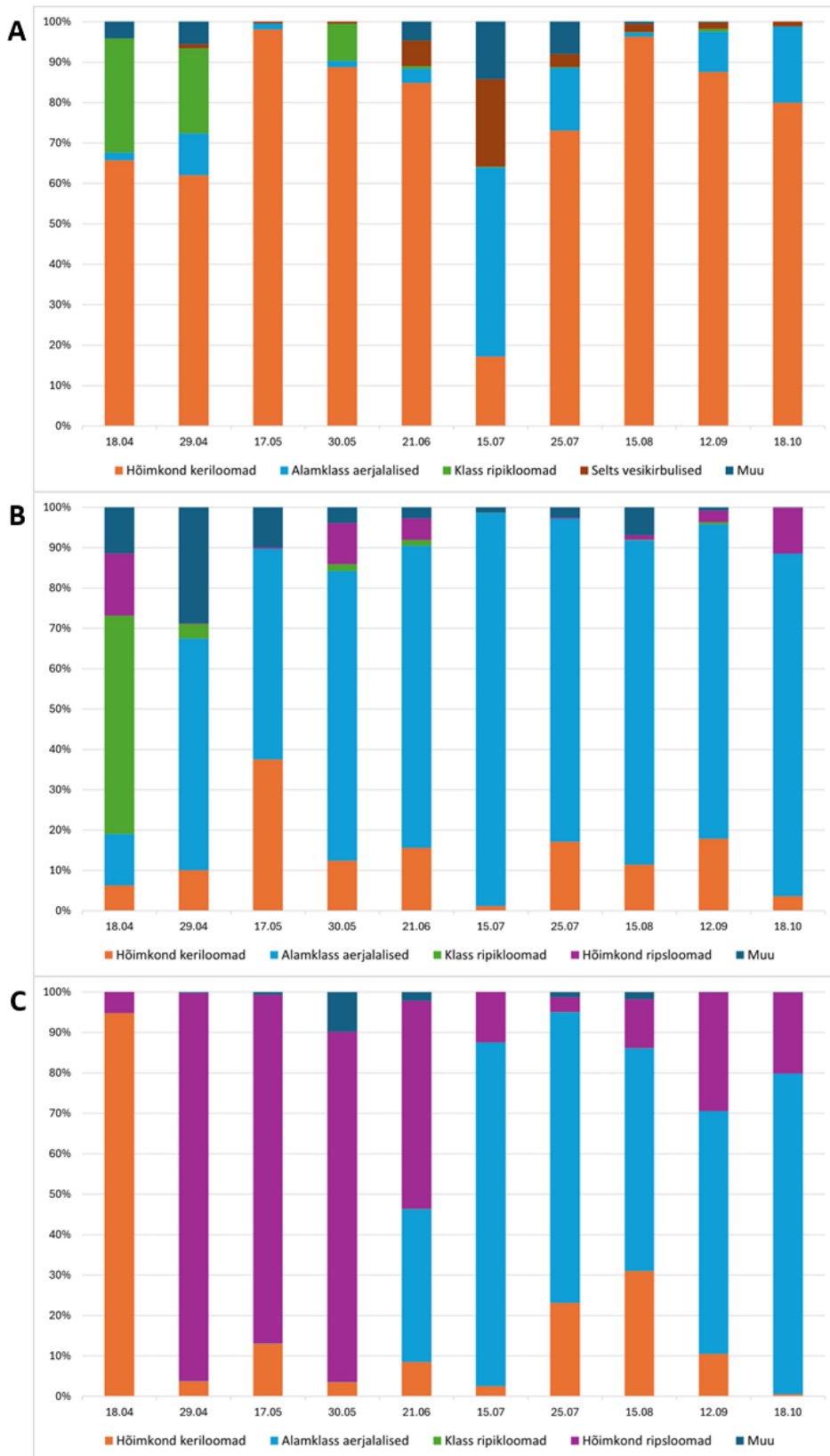
Kõige arvukamad liigid olid *Keratella quadrata*, *Synchaeta baltica* ning *E. affinis*. Keriloom *K. quadrata* moodustas 51% kogu zooplanktoni arvukusest. *Synchaeta baltica* ja *E. affinis* moodustasid vastavalt 25% ja 7% kogu arvukusest. *Keratella quadrata* esines proovides juulist oktoobrini ning oli arvukaim juuli lõpus ja augustis. *Synchaeta baltica* domineeris aprillist juulini ning *E. affinis* oli kõige arvukam liik juuli alguses. Kõige suurema mesozooplanktoni arvukuse ja biomassiga kuu oli august, kus arvukus oli 239714 isendit/m³ ning biomass 464 mg/m³ (Lisa 2). Mais ja juulis oli zooplanktoni arvukus ja biomass samuti kõrged, seevastu aprillis olid väärtused kõige väiksemad.

Aprillis esines kõige rohkem keriloomi, *Synchaeta baltica* domineeris arvukuselt terve kuu (Lisa 3). Kogu aprillikuu vältel esines suure arvukusega ripiklooma *Fritillaria borealis* ning hulkharjasussi pelaagilisi vastseid. Mais ja juunis domineerisid keriloomad, mõlemal kuul oli arvukaim liik *S. baltica*. Arvukuselt teine liik mais oli *Synchaeta curvata*, juunis aga *Synchaeta monopus*. Maikus esines arvukalt karpide pelaagilisi vastseid ja ripiklooma *F. borealis* ning juunis vesikirpu *Pleopis polyphemoides*. Mõlemal kuul leidis rohkelt ka aerjalalist *E. affinis* ja vesikirpu *E. nordmanni*.

Juulis olid kõige arvukamad aerjalaline *E. affinis* ja keriloom *K. quadrata*. Suure arvukusega esines ka vesikirpu *P. polyphemoides*, võõrliiki *Amphibalanus improvisus* ja kerilooma *S. baltica*. Augustist oktoobrini domineerisid arvukuselt keriloomad: augustis oli arvukaim liik *K. quadrata*, septembris *S. monopus* ja *S. baltica* ning oktoobris taas *S. baltica*. Kõigil kolmel kuul esines rohkelt aerjalalisi, peamiselt *Acartia* sp. ning *E. affinis*. Septembris esines arvukalt ka teisi keriloomi: *K. quadrata*, *Keratella cochlearis* ning *Keratella cruciformis*.

Võõrliikidest domineeris arvukuselt *A. improvisus*, tõruvähi pelaagilisi vastseid esines vahemikus juuni-september, olles suurima arvukusega juulis ja augustis. Vesikirbulised *C. pengoi* ja *Evadne anonyx* esinesid madala sagedusega: *C. pengoi* esines ainult juuli keskel ning *E. anonyx* juuli keskel ja oktoobris. Kammlooma *Mertensia ovum* esines vaid aprillis ja septembris, olles aprillis suurema arvukusega.

Enamustel proovivõtu kuupäevadel olid domineerivaks keriloomad, kelle suhteline arvukus oli > 60% (Joonis 5A). Erandiks on 15. juulil võetud proov, kus keriloomade arvukus jäi alla 20% ja domineerivaks olid aerjalalised (Joonis 5A). Teine dominantne rühm varieerus palju olenevalt proovivõtu kuupäevast (Joonis 5A). Näiteks olid kolmes proovis teiseks dominantseks rühmaks ripikloomad, neljas proovis aerjalalised ja kolmes proovis vesikirbulised.



Joonis 5. A Morfoloogia-põhisel analüüsil tuvastatud taksonoomiliste rühmade suhteline arvukus. **B** Võrguproovide eDNA analüüsil tuvastatud taksonoomiliste rühmade suhteline arvukus. **C** Veeproovide eDNA analüüsil tuvastatud taksonoomiliste rühmade suhteline arvukus. X-teljel on näidatud proovivõtu kuupäevad, Y-teljel tuvastatud organismide või DNA järjestuse suhteline arvukus. Kategooria “muu” põhineb liikidel või MOTU-del, mis ei kuulunud mainitud taksonoomilistesse rühmadesse ning mis liideti tulemuste lihtsamaks tõlgendamiseks kokku üheks gruppiks.

4.2 Keskkonna DNA põhine analüüs

eDNA-põhiseks analüüsiks kasutati molekulaarseid taksonoomilisi ühikuid (MOTU), mille sarnasusprotsent NCBI andmebaasist saadud taksonoomilise vastega oli > 99%. eDNA analüüsi tulemusena tuvastati kogu proovivõtu perioodil kokku 57 erinevat zooplanktoniga seotud MOTU-t, mis olid liigi tasemeni määratud. Kõige rohkem MOTU-sid esines ripsloomade hõimkonnas, kuhu kuulus 24 MOTU-t. Keriloomade hõimkonda kuulus 15, aerjalaliste alamklassi 6 MOTU-t ning ripikloomade klassi 1 MOTU. Ülejäänud 11 zooplanktoniga seotud MOTU-t ei kuulunud eelmainitud taksonoomilistesse rühmadesse ning kategoriseeriti rühma “muu”.

Kõige enam tuvastati proovidest aerjalalise *E. affinis* DNA järjestusi. Kõikidest proovidest saadud DNA järjestustest oli aerjalalise *E. affinis*-ega seotud 53%. Palju tuvastati ka aerjalaliste *Acartia tonsa*, *Temora stylifera* ja keriloomade *S. baltica*, *Keratella serrulata* DNA järjestusi. Aerjalalist *E. affinis* ja kerilooma *S. baltica* DNA järjestusi esines kõikides võrgu- ja veeproovides.

eDNA-põhisel analüüsil tuvastati lisaks zooplanktonile ka vetikaid, seeni ja taimi. Kõige rohkem tuvastati vetikaid: 24 ja 78 MOTU-t oli määratud vastavalt perekonna ja liigi tasemeni. Seentel tuvastati 2 ning taimedel 6 perekonnani määratud MOTU-t.

4.2.1 Võrguproovide keskkonna DNA põhine analüüs

Võrguproovide eDNA-põhisel analüüsil tuvastati kogu proovivõtu perioodil kokku erinevat 40 MOTU-t, mis olid liigini määratud (Lisa 4). Ripsloomade hõimkonnas tuvastati 13 ja keriloomade hõimkonnas 10 MOTU-t. Aerjalaliste alamklassis tuvastati 6 ning ripikloomade klassis 1 MOTU. Ülejäänud 10 MOTU-t liigitati rühma “muu”.

Võrguproovides esines kõige rohkem aerjalalise *E. affinis* DNA järjestusi. Rohkelt tuvastati ka keriloomade *S. baltica*, *K. serrulata* ning aerjalaliste *A. tonsa*, *T. stylifera* DNA järjestusi. 59% kõikidest võrguproovidest saadud DNA järjestustest oli seotud *E. affinis*-ega ning 9% järjestustest oli seotud *S. baltica*-ga. 8% DNA järjestustest oli seotud nii *A. tonsa* kui ka *T. stylifera*-ga, *K. serrulata*-ga oli seotud vaid 3% järjestustest. Kõige rohkem DNA järjestusi saadi juulis võetud võrguproovidest, palju järjestusi saadi ka mai ja oktoobri proovidest. Kõige vähem DNA järjestusi saadi aprilli võrguproovidelt.

Aprilli alguses tuvastati kõige rohkem ripiklooma *F. borealis typica* (Lisa 5). Taksonoomilistest rühmadest esines kõige rohkem aerjalalistega seotud MOTU-sid ning aerjalalised domineerisid aprilli lõpust oktoobri lõpuni ehk proovivõtu perioodi lõpuni (Joonis 5B). Erandiks on 18. aprillil kogutud proov, milles domineerisid ripikloomad. Liikidest esines enim aerjalalist *E. affinis*. Aprilli lõpus esines rohkelt ka kammlooma *M. ovum* ja aerjalalist *T. stylifera*.

Mai ja juunis esines rohkelt keriloomi, mõlemal kuul domineeris keriloomadest *S. baltica*. Mai alguses tuvastati palju *S. gyrina*-t, maikuu lõpus ripslooma *Cothurnia parva*-t ning juunis aerjalalist *T. stylifera*-t. Juulis oli rohkelt aerjalalisi: juuli alguses esines enim *T. stylifera*, kuu lõpus aga *A. tonsa*. Juulikuu alguses esines palju ka võõrliiki *A. improvisus*, kuu lõpus kerilooma *K. serrulata*. Augustis ja septembris tuvastati rohkelt aerjalalisi *A. tonsa*, *T. stylifera* ning keriloomi *K. serrulata* ja *S. baltica*. Oktoobris esines palju kerilooma *S. baltica* ning ripsloomi, peamiselt *Epicarchesium sinense*-t.

4.2.2 Veeproovide keskkonna DNA põhine analüüs

Veeproovide eDNA-põhisel analüüsil tuvastati kogu proovivõtu perioodi jooksul kokku 51 liigini määratud MOTU-t (Lisa 6). Ripsloomade hõimkonda kuulus 22 ning keriloomade hõimkonda 15 MOTU-t. Aerjalaliste alamklassis tuvastati 5 ning ripikloomade klassis 1 MOTU. Ülejäänud 8 MOTU-t kuulusid erinevatesse klassidesse.

Veeproovides esines kõige rohkem aerjalalise *E. affinis* DNA järjestusi. Suure arvukusega esines ka aerjalaliste *A. tonsa* ja *T. stylifera* ning keriloomade *K. serrulata* ja *Notholca acuminata* DNA järjestusi. *E. affinis*-ega olid seotud 37% kõikidest veeproovidest saadud DNA järjestustest, *A. tonsa* ja *K. serrulata*-ga oli seotud vastavalt 13% ja 9% järjestustest. Kaheksa protsenti DNA järjestustest oli seotud *N. acuminata*-ga ning 5% järjestustest *T. stylifera*-ga. Kõige rohkem DNA järjestusi tuvastati oktoobri veeproovi põhjal, palju järjestusi oli ka augustis ning juunikuu lõpus võetud veeproovides. Vähe DNA järjestusi oli juuni ja mai alguses võetud veeproovides, kõige vähem järjestusi oli aprillikuu lõpus.

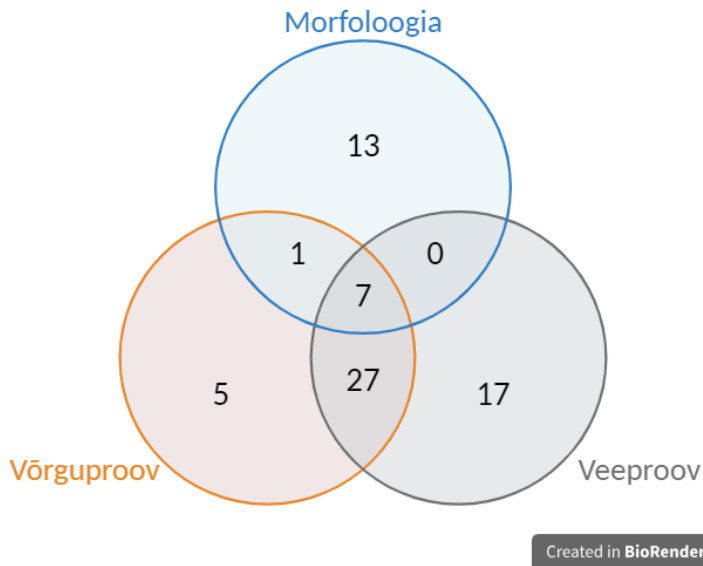
Aprilli alguses esines enim keriloomi, peamiselt *N. acuminata*, *Colurella colurus* ja *Acyclus inquietus* (Lisa 7). Aprilli lõpust mai keskpaigani tuvastati kõige rohkem ripsloomi: domineerisid liigid *Pelagostrobilidium neptuni*, *Mesodinium rubrum* ja *Mesodinium major*. Maikuu lõpust kuni oktoobrini, proovivõtu perioodi lõpuni, esines kõige enam aerjalalisi. Kõige rohkem tuvastati aerjalaliste liike *E. affinis*, *T. stylifera* ja *A. tonsa*.

Keriloomi esines rohkelt mai lõpus ning ka juuli lõpust septembrini. Keriloomadest esines kõige enam *S. baltica* ja *K. serrulata*. Juunis ja oktoobris tuvastati rohkelt ripsloomi: juunis esines palju *M. rubrum*-it ning oktoobris *E. sinense* ja *M. major*-it. Juuli lõpus tuvastati palju võõrliiki *A. improvisus*.

Erinevate taksonoomiliste rühmade suhteline arvukus oli veeproovide puhul erinev võrguproovide omast (Joonis 5 B, C). Kui võrguproovide puhul oli enamustes proovides domineerivaks aerjalalised, siis veeproovides olid olenevalt proovivõtu kuupäevast domineerivaks keriloomad, ripsloomad või aerjalalised (Joonis 5C).

4.3 Zooplanktoni liikide tuvastamine erinevate meetoditega ja erinevatest proovidest

eDNA-põhise analüüsiga tuvastati rohkem liike kui morfoloogia-põhise analüüsiga (Joonis 6; Lisa 8). eDNA meetodiga tuvastati 24 ripsloomade hõimkonda kuuluvat liiki, kes kuuluvad mikrozooplanktoni hulka. Kuna zooplanktoni seires analüüsitakse morfoloogia-põhise meetodiga mesozooplanktonit, siis nendest väiksemaid loomorganisme, mikrozooplanktonit, tavapäraselt seireproovidest ei loendata (Lipsewiers & Spilling, 2018; HELCOM, 2021a).



Joonis 6. Morfoloogia-põhise analüüsiga ning võrgu- ja veeproovi eDNA-põhise analüüsiga tuvastatud liikide arv. Joonise koostamiseks on kasutatud BioRender programmi.

Seitse liiki tuvastati kõigi kolme proovitüübi puhul. Nendeks liikideks olid *A. improvisus*, *Centropages hamatus*, *E. affinis*, *Fritillaria borealis*, *K. cochlearis*, *M. ovum* ning *S. baltica*. Morfoloogia-põhise analüüsiga tuvastati 13 liiki, mida teiste meetoditega ei tuvastatud. Tuvastatud liikidest 5 kuulus vesikirbuliste seltsi ning 4 liiki määrati keriloomade hõimkonda. Vörguproovide eDNA analüüsil määrati 5 ainult võrguproovides tuvastatud liiki: 2 liiki kuulus ripsloomade hõimkonda ja 3 liiki määrati rühma “muu”. Veeproovide eDNA analüüsiga tuvastati 17 teiste meetoditega määramata jäänud liiki. Tuvastatud liikidest 11 kuulus ripsloomade hõimkonda ning 5 keriloomade hõimkonda.

Morfoloogia-põhisel analüüsil tuvastati 5 liiki vesikirbuliste seltsis ning kõige arvukamad liigid olid *K. quadrata* ja *S. baltica*. eDNA-põhisel analüüsil ei tuvastatud ühtegi vesikirbulist. Morfoloogia-põhise analüüsiga tuvastati kerilooma *K. quadrata* ning aerjalalisi *Pseudocalanus acupes* ja *L. macrurus*, sarnaselt vesikirbulistele, neid liike eDNA analüüsil ei tuvastatud.

5 Arutelu

Käesolevas töös kasutati zooplanktoni tuvastamiseks kolme erinevat meetodit: morfoloogia-põhist analüüsi ning eDNA-põhist analüüsi võrguproovide ja veeproovidega. Saadud tulemustes esines meetodite vahel erinevusi suurima zooplanktoni arvukusega (isendid/m³) kuu määramisel, tuvastatud liikide arvus ning ka taksonoomiliste rühmade suhtelises arvukuses.

Morfoloogia-põhise meetodiga kujunes suurima zooplanktoni arvukusega (isendid/m³) kuuks august. Võrguproovide eDNA põhisel analüüsil oli suurima DNA järjestuste arvuga kuuks juuli, veeproovide puhul oli selleks oktoober. Kõigi kolme meetodi puhul oli väiksema zooplanktoni arvukusega/DNA järjestuste arvuga üks aprillikuus kogutud proovidest: morfoloogia-põhisel ja võrguproovi eDNA analüüsil oli selleks kuu keskel võetud proov, veeproovi puhul aprilli lõpus kogutud proov. Vähese arvukuse/DNA järjestuste arvu seletuseks aprillis on ilmselt asjaolu, et paljude zooplanktoni liikide areng sõltub temperatuurist ning enamus liike on Läänemeres esindatud juulist septembrini (Jan et al., 2024), mistõttu võis nende arvukus proovivõtu hetkel olla veel mõjutatud madalast veetemperatuurist. Seda toetavad ka proovivõtuga samal ajal mõõdetud veetemperatuurid erinevatel sügavustel läbi veesamba. 18.04.22 olid veetemperatuurid erinevatel sügavustel vahemikus 1.7-3.3°C, samas kui 29.04.22 oli veetemperatuuride erinevus juba väiksem (2.3 -3.2 °C) (Keskkonnaagentuur, 2023c).

Erinevusi esines ka taksonoomiliste rühmade suhtelises arvukuses. Morfoloogia-põhisel analüüsil olid keriloomad peaaegu kogu proovivõtu vältel domineeriv rühm, ainult juulis esines aerjalalisi rohkem. Võrguproovide puhul esines aprilli alguses kõige rohkem ripikloomi ning aprilli lõpust proovivõtu perioodi lõpuni esines enim aerjalalisi. Veeproovide puhul esines rohkem domineerivaid taksonoomilisi rühmi: aprilli alguses esines kõige enam keriloomi, ripsloomad domineerisid aprilli lõpust mai keskpaigani ning taas juunis, aerjalalisi esines kõige rohkem mai lõpus ning juuli keskpaigast proovivõtu perioodi lõpuni. Taksonoomiliste rühmade suhtelise arvukuse erinevusi meetodite vahel võis põhjustada asjaolu, et morfoloogia-põhisel analüüsil ripsloomi ehk mikrozooplanktoni ei tuvastata. Samuti võis erinevusi põhjustada eDNA meetodite võimekus rohkem liike tuvastada. Morfoloogia-põhisel analüüsil on keeruline madalate kontsentratsioonide juures isendeid liigini tuvastada ning erinevate organismide arengustaadiumite identifitseerimine on ühtlasi ka keerukas. Lisaks võib keriloomade suurem suhteline arvukus võrguproovides tuleneda ka sellest, et võrguga proovivõtt aitab väiksemaid organisme rohkem kontsentreerida võrreldes tavalise veeprooviga (A. Põllumäe, suuline kommunikatsioon).

eDNA analüüs võimaldas meroplanktonit ehk organisme, kes on planktilised vaid osa elutsüklist, tuvastada perekonna või liigi tasemeni. Morfoloogia-põhises analüüsis määrati meroplankton klassini (näiteks *Bivalvia* ja *Polychaeta*), erandiks on võõrliigid *A. improvisus* ja *M. ovum*, kelle pelaagilised vastsed tuvastati liigini (Keskkonnaagentuur, 2023b). eDNA-põhisel analüüsil tuvastati karpide (*Bivalvia*) klassis üks perekond, *Mytilus*, ning kaks liiki, *Limecola balthica* ja *Mya arenaria*. Hulkharjasusside ehk *Polychaeta* klassis tuvastati kaks liiki: *Marenzelleria arctica* ja *Marenzelleria viridis*. eDNA-põhisel analüüsil tuvastati veel meroplanktoni liike nagu *A. improvisus*, *Aurelia aurita*, *Gonothyrrea loveni*, *Limapontia nigra*, *M. ovum*, *Oncholaimus brachycercus* ning *Peringia ulvae*. Võrreldes käesoleva tööga tuvastasid Sildever ja teised (2021) eDNA põhjal rohkem meroplanktoni liike kui morfoloogia-põhise analüüsiga. Lisaks tuvastasid nad eDNA abil kaks uut meroplanktoni liiki,

G. loveni ja *Halicryptus spinulosus* ning ka kahe *Marenzelleria* liigi vastseid. *Gonothyraea loveni*, *M. arctica* ja *M. viridis* tuvastati proovidest ka käesolevas töös.

Morfoloogia-põhisel analüüsil tuvastati 5 vesikirbuliste liiki, kuid eDNA põhjal ei tuvastatud 99% sarnasusega ühtegi vesikirbuliste liiki. Kaks vesikirbu liiki, *Bosmina longirostris* ja *Evadne spinifera*, tuvastati 97% sarnasusega. *Bosmina longirostris* esines ainult võrguproovides, samas kui *E. spinifera*-t tuvastati nii vee- kui ka võrguproovides. Vesikirbuliste vähese tuvastamise põhjuseks võib olla nende 18S rRNA geenijärjestuste väike arv või nende puudumine andmebaasidest nagu mainitud ka Sildeveri jt. poolt et al., (2021). NCBI andmebaasis oli morfoloogia põhjal tuvastatud vesikirbulistel enim vasteid *Cercopagis pengoi* ja *Evadne nordmanni*-l, vastavalt 11 ja 5 vastet. Enamus morfoloogia põhjal tuvastatud vesikirbuliste DNA järjestused NCBI andmebaasis põhinesid 18S rRNA geeni teistest piirkondadel (V1-V7), mis ei soodusta antud rühma tuvastamist kasutatud markeritega (18S rRNA V7-V9). Edaspidi peaks vesikirbuliste paremaks tuvastamiseks kasutama ka molekulaarseid markereid, mis iseloomustaksid 18S rRNA geeni algust.

Morfoloogia-põhisel analüüsil tuvastati kerilooma *K. quadrata*, aerjalalisi *P. acuspes* ja *L. macrurus*, kuid eDNA põhisel analüüsil neid liike ei tuvastatud. Selle põhjuseks võib sarnaselt vesikirbulistele olla 18S rRNA V7-V9 piirkonna geenijärjestuste puudumine rahvusvahelistest andmebaasidest. Kõigil kolmel eelnevalt mainitud liigil oli NCBI andmebaasis üks vaste, kuid need järjestused olid samuti saadud kasutades teisi molekulaarseid markereid, mille tõttu neid liike käesolevas töös ei tuvastatud. Sarnaseid põhjuseid on mainitud ka varasemates töödes. Näiteks selgus Hirai ja teiste (2017) poolt läbi viidud DNA- ja morfoloogia-põhise analüüsi võrdlusel, et DNA analüüs võimaldab zooplanktoni mitmekesisust paremini kirjeldada, kuid mõne zooplanktoni taksonoomilise rühma puhul pole piisavalt andmeid liigi tasemel, mis muudab täpse tuvastamise raskeks. Läänemere zooplanktoni puhul on Lipsewers ja Spilling (2018) leidnud, et suurim rühm, mis planktoni seire andmetes puudus, on ripsloomad.

Täpsemaks zooplanktoni liigilise koosseisu määramiseks eDNA põhjal võib lisaks kasutada ka tsütokroom oksüdaas I (COI) markerit (Sildever et al., 2021; Bucklin et al., 2022). eDNA analüüsi tulemustest puudunud liikidel *C. pengoi*, *E. nordmanni*, *K. quadrata*, *L. macrurus*, *P. polyphaemoides* ning *P. acuspes* oli NCBI andmebaasis COI geeni põhinevaid järjestusi rohkem saadaval kui 18S rRNA geeni põhinevaid järjestusi. Lisaks sellele oli eelmainitud liikidel zooplanktonile keskenduv andmebaasis MetaZooGene¹ saadaval rohkem järjestusi kui NCBI andmebaasis. Seetõttu võib COI markerit kasutades kaaluda ka MetaZooGene andmebaasi kasutamist. Samuti tuleks andmebaase liikide täpsemaks tuvastamiseks täiendada morfoloogia põhjal tuvastatud liikide DNA järjestustega.

Antud töö tulemused näitasid, et zooplanktoni liigilise koosseisu kirjeldamiseks on lisaks morfoloogia-põhisele liikide tuvastamisele sobilik kasutada ka eDNA-põhist meetodit, kuna see võimaldas tuvastada rohkem liike, võimaldas meroplanktoni puhul täpsemat taksonoomilist määratlust ning andis infot ka mikrozooplanktoni liikide kohta, mida tavaliselt seires ei tuvastata. Võrgu- ja veeproovide eDNA analüüsil esines vähem erinevusi kui veeproovide ja morfoloogia-põhise tuvastamise vahel. Samas tuvastati veeproovide eDNA analüüsil rohkem liike kui võrguproovidest. Neist enamus kuulus rips- ja keriloomade hulka, keda morfoloogia-põhises analüüsis on raskem liigini tuvastada. Kuna erinevate proovitüüpide puhul tuvastati liike, mida

¹ <https://metazoogene.org/>

teistest proovidest ei tuvastatud, on mõistlik kõiki kolme tüüpi proovide analüüsimisega jätkata, et saada põhjalik ülevaade Eesti vetes leiduvatest zooplanktoni liikidest.

Kokkuvõte

Zooplankton ehk loomhõljum on veeökosüsteemides oluline toiduahela lüli. Traditsiooniliselt tuvastatakse zooplanktoni liike nende morfoloogia põhjal valgusmikroskoobi all. Samal ajal pole paljusid zooplanktoni proovides esinevaid organisme nende välimuse põhjal usaldusväärselt liigini tuvastada. Käesoleva bakalaureusetöö üheks eesmärgiks oli võrrelda morfoloogia-põhise ning keskkonna DNA põhise zooplanktoni liikide tuvastamise võimekusi. Bakalaureusetöö teiseks eesmärgiks oli hinnata, kas zooplanktoni keskkonna DNA põhiseks seireks on sobivam kasutada võrguproovi või paralleelselt samal ajal kogutud vee pinnakihist pärinevat proovi.

Töös kasutati Eesti riiklikus seires kasutatavaid proove, mis olid kogutud 2022. aasta Eesti rannikumere seire raames Muuga-Tallinna-Kakumäe lahest. Keskkonna DNA ehk eDNA-põhises analüüsis kasutati võrgu- ja veeproove, mida uuriti 18S rRNA V7-V9 molekulaarse markeri põhjal.

Zooplanktoni morfoloogia-põhisel analüüsil kirjeldatakse ainult mesozooplanktoni liigilist koosseisu. Mesozooplankton ja nendest suuremad isendid määratakse võimalikult madala taksonoomilise kategooriani, mesozooplanktonist väiksemaid isendeid ehk mikrozooplanktonit ei loendata. Zooplanktoni eDNA põhisel analüüsil on võimalik rohkem liike tuvastada: näiteks lubab see tuvastada ka mikrozooplanktonit ning võimaldab meroplanktoni täpsemat taksonoomilist identifitseerimist. Tänu sellele sobib eDNA-põhine analüüs zooplanktoni morfoloogial põhinevat analüüsi täiendama.

Zooplanktoni keskkonna DNA põhisel seirel on võimalusel parim kasutada nii vee- kui võrguproove, kuna mõlemat tüüpi proovidest tuvastati unikaalseid MOTU-sid, mida teist tüüpi proovist ei tuvastatud.

Abstract

Zooplankton, also known as planktonic animals, are an important part of the food web in aquatic ecosystems. They are traditionally identified based on their morphology using light-microscopy. However, a number of organisms present in the zooplankton samples lack the morphological characteristics to allow their identification to species level. The aim of this Bachelor's thesis was to determine the capabilities of morphology-based and environmental DNA-based zooplankton species identification. The second aim was to assess whether it is more suitable to use a net sample or a sample collected from the surface layer of water at the same time for environmental DNA (eDNA)-based monitoring of zooplankton.

Zooplankton samples from the Estonian national marine monitoring were used. The samples were collected from Muuga-Tallinn-Kakumäe bay as a part of the 2022 Estonian coastal sea monitoring. For eDNA analysis, net and water samples were analyzed based on the 18S rRNA V7-V9 molecular marker.

In morphology-based zooplankton analysis, the species composition of mesozooplankton and specimens larger than them are described. eDNA-based zooplankton analysis can identify more species as microzooplankton is also counted and more meroplankton species can be identified to the species level.

For eDNA-based monitoring of zooplankton, it would be better to use both sample types: net and water samples, as both types facilitate the detection of unique species not identified from the other type of samples.

Tänuavaldused

Käesoleva bakalaureusetöö autor soovib tänada töö juhendajaid Sirje Sildeveri suurepärase juhendamise eest, Lenne Nigulit juhendamise eest laboris ning Maria Cecilia Sarmiento Guerini sisukate kommentaaride eest.

Töö valmimisele aitasid kaasa Marlene Kaljumäe ja Pille Leesmäe, rakenduskeemia ja biotehnoloogia esimese kursuse tudengid, ning Kristian Pärt, rakenduskeemia ja geenitehnoloogia kolmanda kursuse tudeng. Suured tänusõnad ka Arno Põllumäele (Tartu Ülikooli Eesti mereinstituut), Satoshi Nagaile (Jaapani riikliku kalandusuuringute ja hariduse agentuur) ning keemia ja biotehnoloogia ning meresüsteemide instituutide töötajatele.

Töö autor soovib keelekorrektuuri eest tänada Ingrid Luike, Urmas Kadakut ning Mari Antonit.

Aitäh teile!

Kasutatud kirjandus

- Bucklin, A., Batta-Lona, P. G., Questel, J. M., Wiebe, P. H., Richardson, D. E., Copley, N. J., & O'Brien, T. D. (2022). COI Metabarcoding of Zooplankton Species Diversity for Time-Series Monitoring of the NW Atlantic Continental Shelf. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.867893>
- Dzhembekova, N., Moncheva, S., Ivanova, P., Slabakova, N., & Nagai, S. (2018). Biodiversity of phytoplankton cyst assemblages in surface sediments of the Black Sea based on metabarcoding. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32(6), 1507–1513. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1532816>
- Harris, R., Wiebe, P., Lenz, J., Skjoldal, H. Ru., & Huntley, M. (2000). *ICES Zooplankton Methodology Manual*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-327645-2.X5000-2>
- HELCOM. (2021a). *Guidelines for monitoring of mesozooplankton (2021)*. <https://helcom.fi/wp-content/uploads/2019/08/Guidelines-for-monitoring-of-mesozooplankton.pdf> [kõlastatud 23.05.2024]
- HELCOM. (2021b). *Guidelines for monitoring of phytoplankton species composition, abundance and biomass (2021)*. <https://helcom.fi/wp-content/uploads/2020/01/HELCOM-Guidelines-for-monitoring-of-phytoplankton-species-composition-abundance-and-biomass.pdf> [kõlastatud 24.05.2024]
- HELCOM. (2023). *Zooplankton mean size and total stock (MSTS)*. <https://indicators.helcom.fi/indicator/zooplankton/> [kõlastatud 23.05.2024]
- Hirai, J., Katakura, S., Kasai, H., & Nagai, S. (2017). Cryptic zooplankton diversity revealed by a metagenetic approach to monitoring metazoan communities in the coastal waters of the Okhotsk Sea, northeastern Hokkaido. *Frontiers in Marine Science*, 4(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00379>
- Hirai, J., Tachibana, A., & Tsuda, A. (2020). Large-scale metabarcoding analysis of epipelagic and mesopelagic copepods in the Pacific. *PLoS ONE*, 15(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233189>
- Illumina. (2014). *High-Speed, Multiplexed 16S Microbial Sequencing on the MiSeq® System*. Illumina. https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/appnote_miseq_16S.pdf [kõlastatud 23.05.2024]
- Jan, K. M. G., Serandour, B., Walve, J., & Winder, M. (2024). Plankton blooms over the annual cycle shape trophic interactions under climate change. *Limnology And Oceanography Letters*. <https://doi.org/10.1002/lol2.10385>

- Jerney, J., Hällfors, H., Jakobsen, H., Jurgensone, I., Karlson, B., Kremp, A., Lehtinen, S., Majaneva, M., Meissner, K., Norros, V., Sildever, S., Suikkanen, S., & Teeveer, K. (2023). *DNA metabarcoding. Guidelines to monitor phytoplankton diversity and distribution in marine and brackish waters*. Nordic Council of Ministers, TemaNord 505. <https://pub.norden.org/temanord2023-505/> [külastatud 23.05.2024]
- Keskkonnaagentuur. (s.a.). *Mereseire allprogrammi lisad*. https://keskkonnaagentuur.ee/sites/default/files/documents/2021-06/lisad_5.1.-5.5._mereseire_allprogramm.docx [külastatud 23.05.2024]
- Keskkonnaagentuur. (2019). *Lisa 5. Riikliku keskkonnaseire programmi mereseire allprogramm*. <https://keskkonnaagentuur.ee/media/813/download> [külastatud 23.05.2024]
- Keskkonnaagentuur. (2023a). *Avamereseire 2022 Aruanne*. TÜ Eesti mereinstituut, Tallinna Tehnikaülikool meresüsteemide instituut. <https://kese.envir.ee/kese/downloadReportFile.action?fileUid=30478897&monitoringWorkUId=26776067> [külastatud 23.05.2024]
- Keskkonnaagentuur. (2023b). *Mereseire 2022 Aruanne Osa 2. Rannikumere seire*. TÜ Eesti mereinstituut. <https://kese.envir.ee/kese/downloadReportFile.action?fileUid=30473639&monitoringWorkUId=26776081> [külastatud 23.05.2024]
- Keskkonnaagentuur. (2023c). Riikliku keskkonnaseire allprogramm „Mereseire“. *Zooplanktoni andmestik (2022)*. TÜ Eesti mereinstituut. <https://kese.envir.ee/kese/welcome.action> [külastatud 23.05.2024]
- Kotta, J., Kotta, I., Simm, M., Lankov, A., Lauringson, V., Põllumäe, A., & Ojaveer, H. (2006). Ecological consequences of biological invasions: Three invertebrate case studies in the north-eastern Baltic Sea. *Helgoland Marine Research*, 60(2), 106–112. <https://doi.org/10.1007/s10152-006-0027-6>
- Lipsewers, T., & Spilling, K. (2018). Microzooplankton, the missing link in Finnish plankton monitoring programs. *Boreal Environ. Res.* 23, 127-137. <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-402>
- Nagai, S., Sildever, S., Nishi, N., Tazawa, S., Basti, L., Kobayashi, T., & Ishino, Y. (2022). Comparing PCR-generated artifacts of different polymerases for improved accuracy of DNA metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics*, 6, 27–39. <https://doi.org/10.3897/MBMG.6.77704>
- O'Brien, T. D., Wiebe, P. H., & Falkenhaus, T. (2013). *ICES Zooplankton Status Report 2010/2011*. ICES Cooperative Research Report No. 318., 1- 208. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.5487> [külastatud 23.05.2024]
- Ojaveer, H., Jaanus, A., Mackenzie, B. R., Martin, G., Olenin, S., Radziejewska, T., Telesh, I., Zettler, M. L., & Zaiko, A. (2010). Status of biodiversity in the Baltic sea. *PLoS ONE*, 5(9), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012467>

- Panksep, K., Kisand, V., & Vasemägi, A. (2021). *eDNA meetodi väljaarendamine (krüptiliste) võõrliikide varajaseks tuvastamiseks*. Aruanne projekti "Eesti mereala keskkonna ja loodusväärtuste hindamise ja seire innovaatilised lahendused" raames. Eesti Maaülikool, 1-40. <https://doi.org/10.23673/re-334> [külastatud 23.05.2024]
- Põllumäe, A. (2011). *Spatio-temporal patterns of native and invasive zooplankton species under changing climate and eutrophication conditions*. Doktoritöö, Tartu Ülikool, 1-56. [University of Tartu]. <http://hdl.handle.net/10062/18182> [külastatud 23.05.2024]
- Põllumäe, A., & Kotta, J. (2007). Factors describing the distribution of the zooplankton community in the Gulf of Finland in the context of interactions between native and introduced predatory cladocerans. *Oceanologia*, 49 (2), 277-290.
- QIAGEN. (2023). *DNeasy Blood & Tissue Kits*. <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit> [külastatud 23.05.2024]
- Raateoja, M., & Setälä, O. (2016). *The Gulf of Finland assessment*. Reports of the Finnish Environment Institute, 27, 1-368. <http://hdl.handle.net/10138/166296> [külastatud 23.05.2024]
- Sildever, S., Laas, P., Kolesova, N., Lips, I., Lips, U., & Nagai, S. (2021). Plankton biodiversity and species co-occurrence based on environmental DNA – a multiple marker study. *Metabarcoding and Metagenomics*, 5, 175–197. <https://doi.org/10.3897/MBMG.5.72371>

Lisad

Lisa 1. Morfoloogia-põhisel analüüsil tuvastatud liigid

Taksonoomiline rühm	Liik
Hõimkond keriloomad	<i>Keratella cochlearis</i>
	<i>Keratella cruciformis</i>
	<i>Keratella quadrata</i>
	<i>Synchaeta baltica</i>
	<i>Synchaeta curvata</i>
	<i>Synchaeta monopus</i>
Selts vesikirbulised	<i>Bosmina (Eubosmina) coregoni</i>
	<i>Cercopagis pengoi</i>
	<i>Evadne anonyx</i>
	<i>Evadne nordmanni</i>
	<i>Pleopis polyphaemoides</i>
Alamklass aerjalalised	<i>Centropages hamatus</i>
	<i>Eurytemora affinis</i>
	<i>Limnocalanus macrurus</i>
	<i>Pseudocalanus acuspes</i>
	<i>Temora longicornis</i>
Klass ripikloomad	<i>Fritillaria borealis</i>
	<i>Oikopleura dioica</i>
Muu	<i>Amphibalanus improvisus</i>
	<i>Mertensia ovum</i>
	<i>Podon intermedius</i>

Lisa 2. Morfoloogia-põhise analüüsi proovide mesozooplanktoni arvukus ja biomass

Andmed pärinevad KESE andmebaasist (Keskkonnaamet, 2023c).

Proov	Mesozooplanktoni arvukus (isendid/m ³)	Mesozooplanktoni biomass (mg/m ³)
18.04.2022	1561	12
29.04.2022	1645	10
17.05.2022	75932	323
30.05.2022	26803	111
21.06.2022	18068	71
15.07.2022	46306	365
25.07.2022	38917	152
15.08.2022	239714	464
12.09.2022	24604	98
18.10.2022	35986	114

Lisa 3. Morfoloogia-põhise analüüsi proovide kõige arvukamad liigid, nende arvukus ja suhteline arvukus

Andmed pärinevad KESE andmebaasist (Keskkonnaamet, 2023c).

Kuupäev	Arvukaim liik	Liigi arvukus (isendid/m ³)	Liigi suhteline arvukus (%)
18.04.2022	<i>Synchaeta baltica</i>	480	31
29.04.2022	<i>Synchaeta baltica</i>	360	22
17.05.2022	<i>Synchaeta baltica</i>	37376	49
30.05.2022	<i>Synchaeta baltica</i>	20768	77
21.06.2022	<i>Synchaeta baltica</i>	11225	62
15.07.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	17043	37
25.07.2022	<i>Keratella quadrata</i>	14500	37
15.08.2022	<i>Keratella quadrata</i>	187600	78
12.09.2022	<i>Synchaeta monopus</i>	8000	33
18.10.2022	<i>Synchaeta baltica</i>	16000	44

Lisa 4. Keskkonna DNA põhisel analüüsil võrguproovidest tuvastatud liigini määratud molekulaarsed taksonoomilised ühikud (MOTU-d)

Taksonoomiline rühm	Liigini tuvastatud MOTU-d
Hõimkond keriloomad	<i>Acyclus inquietus</i>
	<i>Collotheca pelagica</i>
	<i>Keratella cochlearis</i>
	<i>Keratella serrulata</i>
	<i>Notholca acuminata</i>
	<i>Synchaeta baltica</i>
	<i>Synchaeta gyrina</i>
	<i>Synchaeta tremula</i>
	<i>Synchaeta triophthalma</i>
	<i>Synchaeta vorax</i>
Alamklass aerjalalised	<i>Acartia bifilosa</i>
	<i>Acartia tonsa</i>
	<i>Centropages hamatus</i>
	<i>Eurytemora affinis</i>
	<i>Temora longicornis</i>
	<i>Temora stylifera</i>
Klass ripikloomad	<i>Fritillaria borealis typica</i>
Muu	<i>Amphibalanus improvisus</i>
	<i>Aurelia aurita</i>
	<i>Limapontia nigra</i>
	<i>Limecola balthica</i>
	<i>Marenzelleria arctica</i>
	<i>Marenzelleria viridis</i>
	<i>Mertensia ovum</i>
	<i>Mya arenaria</i>
	<i>Oncholaimus brachycercus</i>
	<i>Peringia ulvae</i>
Hõimkond ripsloomad	<i>Antetintinnidium mucicola</i>
	<i>Cothurnia parva</i>
	<i>Epicarchesium sinense</i>
	<i>Euplotes daidaleos</i>
	<i>Halodinium verrucatum</i>
	<i>Helicostomella subulata</i>
	<i>Hexasterias problematica</i>
	<i>Mesodinium major</i>
	<i>Mesodinium pulex</i>
	<i>Mesodinium rubrum</i>
	<i>Pelagostrobilidium neptuni</i>
	<i>Rimostrobilidium veniliae</i>
	<i>Strombidium biarmatum</i>
	<i>Strombidium caudispina</i>

	<i>Zoothamnium intermedium</i>
--	--------------------------------

Lisa 5. Võrguproovidest enim tuvastatud liigid, nende DNA järjestuste arv ja suhteline järjestuste arv

Toorandmed kättesaadavad kokkuleppel töö juhendajatega.

Kuupäev	Enim tuvastatud liik	Liigi DNA järjestuste arv	Liigi suhteline järjestuste arv (%)
18.04.2022	<i>Fritillaria borealis typica</i>	536	54
29.04.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	2697	30
17.05.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	8375	38
30.05.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	17207	64
21.06.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	11515	64
15.07.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	27045	91
25.07.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	15444	54
15.08.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	10063	39
12.09.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	14854	61
18.10.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	21785	79

Lisa 6. Keskkonna DNA põhisel analüüsil veeproovidest tuvastatud liigini määratud molekulaarsed taksonoomilised ühikud (MOTU-d)

Taksonoomiline rühm	Liigini tuvastatud MOTU-d
Hõimkond keriloomad	<i>Acyclus inquietus</i>
	<i>Collotheca pelagica</i>
	<i>Colurella adriatica</i>
	<i>Colurella colurus</i>
	<i>Encentrum marinum</i>
	<i>Euchlanis dilatata</i>
	<i>Keratella cochlearis</i>
	<i>Keratella serrulata</i>
	<i>Notholca acuminata</i>
	<i>Proales reinhardti</i>
	<i>Synchaeta baltica</i>
	<i>Synchaeta gyrina</i>
	<i>Synchaeta tremula</i>
	<i>Synchaeta triophthalma</i>
	<i>Synchaeta vorax</i>
Alamklass aerjalalised	<i>Acartia bifilosa</i>
	<i>Acartia tonsa</i>
	<i>Centropages hamatus</i>
	<i>Eurytemora affinis</i>
	<i>Temora stylifera</i>
Klass ripikloomad	<i>Fritillaria borealis typica</i>
Muu	<i>Amphibalanus improvisus</i>
	<i>Aurelia aurita</i>
	<i>Gonothyraea loveni</i>
	<i>Limapontia nigra</i>
	<i>Limecola balthica</i>
	<i>Marenzelleria arctia</i>
	<i>Mertensia ovum</i>
	<i>Peringia ulvae</i>
Hõimkond ripsloomad	<i>Antetintinnidium mucicola</i>
	<i>Colpoda steini</i>
	<i>Cothurnia parva</i>
	<i>Epicarchesium sinense</i>
	<i>Halodinium verrucatum</i>
	<i>Helicostomella subulata</i>
	<i>Hemiophrys procera</i>
	<i>Hemiurosomoida longa</i>
	<i>Hexasterias problematica</i>
	<i>Mesodinium major</i>
	<i>Mesodinium pulex</i>
	<i>Mesodinium rubrum</i>

	<i>Pelagostrobilidium neptuni</i>
	<i>Pseudotontonia simplicidens</i>
	<i>Rimostrombidium veniliae</i>
	<i>Strombidium basimorphum</i>
	<i>Strombidium biarmatum</i>
	<i>Strombidium caudispina</i>
	<i>Strombidium conicum</i>
	<i>Strombidium rassoulzdegani</i>
	<i>Strombidium tropicum</i>
	<i>Vorticella fusca</i>

Lisa 7. Veeproovidest enim tuvastatud liigid, nende DNA järjestuste arv ja suhteline järjestuste arv

Toorandmed kättesaadavad kokkuleppel töö juhendajatega.

Kuupäev	Enim tuvastatud liik	Liigi DNA järjestuste arv	Liigi suhteline järjestuste arv (%)
18.04.2022	<i>Notholca acuminata</i>	7469	63
29.04.2022	<i>Pelagostrobilidium neptuni</i>	1062	44
17.05.2022	<i>Mesodinium rubrum</i>	2667	46
30.05.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	5273	36
21.06.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	1441	27
15.07.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	5148	43
25.07.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	4668	45
15.08.2022	<i>Acartia tonsa</i>	7801	37
12.09.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	3559	44
18.10.2022	<i>Eurytemora affinis</i>	17357	77

Lisa 8. Keskkonna DNA põhisel analüüsil võrgu- ja veeproovidest tuvastatud liigid

<i>Acartia bifilosa</i>
<i>Acartia tonsa</i>
<i>Acyclus inquietus</i>
<i>Antetintinnidium mucicola</i>
<i>Aurelia aurita</i>
<i>Collotheca pelagica</i>
<i>Cothurnia parva</i>
<i>Epicarchesium sinense</i>
<i>Halodinium verrucatum</i>
<i>Helicostomella subulata</i>
<i>Hexasterias problematica</i>
<i>Keratella serrulata</i>
<i>Limapontia nigra</i>
<i>Limecola balthica</i>
<i>Marenzelleria arctia</i>
<i>Mesodinium major</i>
<i>Notholca acuminata</i>
<i>Pelagostrobilidium neptuni</i>
<i>Peringia ulvae</i>
<i>Rimostrombidium veniliae</i>
<i>Strombidium biarmatum</i>
<i>Strombidium caudispina</i>
<i>Synchaeta gyrina</i>
<i>Synchaeta tremula</i>
<i>Synchaeta triophthalma</i>
<i>Synchaeta vorax</i>
<i>Temora stylifera</i>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks²

Mina, Laura Johanna Kadak

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Zooplanktoni tuvastamine morfoloogia ja eDNA põhjal,

mille juhendaja on Sirje Sildever, Maria Cecilia Sarmiento Guerin ja Lenne Nigul,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna
Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse
tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu,
sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse
tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete
kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

29.05.2024

² Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktile 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.