LÕPPARUANNE

Laevade ballastvee mikroorganismide ja viiruste uuring

Leping 4-1/19/128; 27.06.2019

2020 aasta

Projekti täitnud organisatsioonid:
TTÜ Loodusteaduskonna Meresüsteemide instituut ja TÜ tehnoloogiainstituut
Projekti vastutavad täitjad: Dr. Kai Künnis-Beres ja Veljo Kisand
E-mail: kai.kunnis-beres@taltech.ee, kisand@ut.ee
Tel.: 55605156

TARTU ÜLIKOOL
tehnoloogiainstituut

TAL TECH
MERESÜSTEEMIDE INSTITUUT

Sisukord

Töö kokkuvõte 2

Summary 3

Kasutatud lühendid ja mõisted 4

Sissejuhatus 5

1. Teoreetiline taust 7

2. Metoodika 10
- 2.1 Laevade valik ja laevale pääsu korraldamine 10
- 2.2 Laeva dokumentide ülevaatus 10
- 2.3 Ballastvee proovide kogumine 11
- 2.4 Kogutud proovide käitlemine 11
- 2.5 Veeproovide analüüsimine epifluorestsentsmikroskoobiga ja bakterite arvukuse määrmine 12
- 2.6 DNA kontsentreerimine filtratsiooni meetodil 13
- 2.7 DNA puhastamine, märklaud-geeni paljundamine ning selle sekveneerimine 13
- 2.8 Sekveneerimistulemuste analüüs 13
- 2.9 Liigiliste koosluste statistiline analüüs 14
- 2.10 Liigirikkuse analüüs 14
- 2.11 Bakterite kooslustele ballastvee päritolu ja erinevate tegurite mõju analüüs 14
- 2.12 Tuumkoosluse taksonite analüüs 14
- 2.13 Üksikute OTUde üle- ja alaesindatuse analüüs 14
- 2.14 Võimalike patogeensete bakteriperekondade esinemise analüüs 14
- Viirused ballastvees 15

3. Tulemused ja nende analüüs 15
- 3.1 Ballastvee käitlus ja proovide võtmise valmidus külastatud laevadel 15
- 3.2 Ballastvee töötlus külastatud laevadel 17
- 3.3 Epifluorestsentmikroskoopiline uuring 18
- 3.4 Sekveneerimisandmete analüüs 22
- 3.5 Proovidest leitud mikroobikoosluste üldiseloomustus 23
- 3.6 Mikroobikoosluste erinevused sõltuvalt UV töötlusest ja geograafilisest päritolust 24
- 3.7 Liikide üle- ja alaesindatus Põhjamere erineva töötluse läbinud proovides 25
- 3.8 Mikroobikoosluste aastaajaline muutlikkus 25
- 3.9 Potentsiaalselt patogeensed bakterid 26

4. Praktilised soovitused 29

Kasutatud kirjanduse loetelu 32

Lisad 34
- Lisa 1 34
- Lisa 2 35
- Lisa 3 36

Töö kokkuvõte

Käesoleva uurimistöö raames viidi läbi 15-ne kaubalaeva ballastvee mikrobioloogiline analüüs. Töösse kaasatud laevad olid läbimas Muuga või üht Sillamäe sadamaid. Enamus uuringusse kaasatud laevu olid keskmisest suuremad, aga ka väiksemad alused, olid seotud Läänemere-sisese kaubaveoga. Analüüsitud ballastvee proovid varieerusid oma päritolu (Läänemeri, Põhjameri ja Atlandi ookean) ja töötluse poolest (peamiselt töötlemata või UV-töödeldud). Lisaks koguti ja analüüsiti iga külastuse ajal sadama akvatooriumilt kogutud kohalikku merevett iseloomustavad referentsproovid.

Uurimistööd viidi läbi kasutades uurimismeetoditena epifluorestsentsmikroskoopiat ja molekulaarseid analüüse. Mikroskoopiliselt on võimalik mikroorganismide kooslust iseloomustada fenotüübiliselt, määrata mikroorganismide arvukus ja biomass, molekulaarselt saab miroorganismid identifitseerida ning analüüsida kooslust süvitsi. Kumbagi metoodikat seni rutiinses ballastvee kontrollis ei rakendata.

Mikroobikoosluste liigirikkus oli kõikides proovides normaalselt kõrge, bakterite üldarvukuse (mikroskoopiline loendus) ja liigirikkuse olulist vähenemist ei täheldatud ka UV-töödeldud ballastvee proovides. Mikroobikoosluste mitmekesisus erinevused sõltusid proovi algsest päritolust (sh soolsusest) ning ballastvee töötlemises,t aga ilmselt ka aastaajalisest muutlikkusest. Viimase kohta koguti usaldusväärsed andmed Muuga sadamast. Patogeensete bakterite esinemist hinnat võimalike patogeensete perekondade esinemise alusel, samas on selge, et enamus neist perekondades on esindatud ka tavapäraste kahjutute liikidega. Selgus, et UV töötlus ei mõju eelistatult patogeensete perekondade liikidele, vaid võib neile ja teistele toitainete rikast keskkonda eelistavatele bakterite hoopis kasvueelised anda. Seetõttu on tõenäoline, et ballastvee mahutid võivad olla selliste organismidele soodsaks kasvulavaks. Seega ei suuda taksonoomial põhinev metoodika ei tuvastada bakterite tegelikku patogeensust ning selleks tuleks täiendavalt analüüsida virulentsete geenide esinemissadedust ja teostada kogu mikroobikoosluse *shotgun metagenomics* analüüs, mis võimaldab tuvastada ka haigusi tekitavaid viirusi. Fluorestsentsmikroskoopia osutus sobilikuks meetodiks ballastvee seisundi operatiivseks hindamiseks ja ballasveele rakendatava veetöötluse tõhususe kontrollimiseks.

Summary

Over a course of nearly one year (13.07.2019 – 3.05.2020), the microbial communities found in ballast water of fifteen commercial ships were analyzed. These ships were routed through Sillamäe and Muuga harbours, where the samples were collected. Microbial communities were analyzed using fluorescence microscopy and massively parallel tag (16S rRNA gene as a marker) sequencing approaches. In addition, reference samples from the port were also collected and analyzed.

The microbial communities were significantly influenced by salinity, treatment (mainly non-treated or UV treated) and the point of origin for the water. Re-occurring taxa in individual ship tanks confirmed results of previous studies that indicate certain bacterial taxa colonize the water, sediment and surfaces (biofilm) of the tank surfaces. Special attention was paid to potentially pathogenic bacterial genera. Over a hundred of these bacterial taxa were found in relatively high abundances, included in ballast water that had received UV treatment. Although a large fraction of these bacteria are likely naturally occurring non-pathogenic representatives of these genera of interest, potentially pathogenic bacteria were also found in few of the tanks. The results hint that members of these taxa are more likely to survive the UV treatment than the native marine bacteria and therefore linger and/or colonize in the tank, which is a worrisome sign.

The results of this study reaffirm the potential of modern molecular methods in use for survey of the ballast water. It enables to identify all members of the microbial communities and allow detection of potential problems other than occurrence of few pathogenic groups. For example, detection of ineffective treatment or oil contamination in the tank. Furthermore, shotgun sequencing of the ballast water metagenomes would be the best approach to identify functional genes, thus definitively identifying pathogens and toxic cyanobacteria, and viruses found in the samples. This would greatly enhance our understanding of ecological impact and dangers that ballast water tanks as a vector have for marine ecosystems, which would allow better protection of the environment and ballast water management. Fluorescence microscopy proved to be a suitable method for operational assessing the condition of ballast water and for checking the effectiveness of the treatment applied to ballast water.

Kasutatud lühendid ja mõisted

APT	-	ingl k *after peak tank*, laeva ninas asuvast mahutist järgmine mahuti
ballastvesi	-	veekogu vesi, mis võetakse ajutiselt laeva ballastvee mahutitesse, et kontrollida laeva trimmi, kreeni, süvist ja püstuvust
batomeeter	-	vahend, mis võimaldab (veest) kindlalt sügavuselt proove võtta, harilikult silindrikujuline ja valmistatud metallist, klaasist, plastist
Bulk Carrier	-	eesti k-s kaubalaeva tüüp - puitlastlaev
dbRDA	-	ingl k *distance based redundancy analysis*, kauguse põhine redundantsuse analüüs, mis võimaldab hinnata tegurite mõju koosluse varieeruvusele
DBT	-	ingl k *double bottom tank,* topeltpõhja vaheline ballastvee mahuti
DWT	-	ingl k *dead weight tonnage,* laeva tühimass tonnides; laevanduses on käibel teisendus inglise keelest „tedweit“
FPT	-	ingl k *forepeak tank,* laevaninas (laevakere esiosas) asuv mahuti
General Cargo	-	eesti k-s kaubalaeva tüüp - üldine kaubalaev
IMO	-	Rahvusvaheline Mereorganisatsioon
in-line	-	ingl k ballastvee väljavõtmise võimalus torust
NMDS	-	ingl k *non-metric multidimensional scaling*, mittemeetriline mitmemõõtmeline skaleerimine-ordinatsioonimeetod
manhole	-	eeski k-s kaev, kaevu või mahuti luuk
OTU	-	ingl k *operational taxonomic unit*
sounding pipe	-	eesti k-s helitoru - toru vedeliku sügavuse mõõtmiseks laeva vee- või õlipaagis
TBT	-	ingl k *top ballast water tank*, ülemine ballastvee mahuti
UV	-	ultraviolettkiirgus
WBT	-	ingl k *wing double bottom tank*, külgmine topeltpõhja mahuti
WTR	-	ingl k *wing tank right*, külgmine-parempoolne mahuti
WTL	-	ingl k *wing tank left*, külgmine-vasakpoolne mahuti
IBWMC	-	ingl k *International Ballast Water Management Certificate*, rahvusvaheline ballastvee käitlemise tunnistus
BWMP	-	ingl k *Ballast Water Management Plan*, ballastvee käitlemise kava
BWMS	-	*ingl k Ballast Water Management System,* ballastvee käitlussüsteem
BWRB	-	*ingl k Ballast Water Record Book,* ballastvee toimingute registreerimise päevik

Sissejuhatus

Juba pikemat aega ollakse teadlikud, et väljastpoolt Läänemerre saabuvad lasti vedavad laevad on toonud ja toovad jätkuvalt meile võõrliike. Sellest hoolimata pole Eesti territoriaalvetesse ja sadamatesse saabuvate laevade ballastvett seni uuritud/analüüsitud. Seni on puudunud selleks vastav kohustus ja seetõttu puuduvad ka andmed ballastvee kaudu Eesti rannikumerre toodavate mikroorganismide, sealhulgas inimesele ja kaladele patogeensete mikroobide kohta. Info ballastvees sisalduvate mikroorganismide ja viiruste osas on puudulik ka globaalselt. Eesti mereala mikrobioloogilise seisundi selgitamiseks viidi aastatel 2018 - 2020 läbi Euroopa Majandus ja Kalandusfondi toetatud projekt „Mikroorganismide roll Eesti rannikumere ökoloogilise seisundi, aineringe tüübi ning isepuhastumisvõime määratlemisel“, mille raames TTÜ Meresüsteemide instituudi mereökoloogialabori teadlased uurisid veisiviljeluseks potensiaalselt sobilike merealade mikroobikooslusi ning nende ajalis-ruumilist muutlikkust. Nimetatud uuring on heaks toeks laevade ballastvee mikroorganismide uuringule.

Käesoleva uuringu eesmärk on ballastvee mahutites esinevate mikroorganismide koosluste kohta alusteabe kogumine – koosluste mitmekesisus ning võimalike patogeenide esinemise tuvastamine, ettepaneku koostamine mikroobsete koosluste järelevalveks ballastvee mahutitest väljapumbatavas ballastvees ja lahenduste välja töötamine, mida oleks võimalik hiljem rakendada ballastvee järelevalves ja mereseisundi hindamise valdkonna arendamisel.

Käesolev uuring annab pistelise ülevaate ballastveega Eesti territoriaalvetesse toodava mikrobioloogilise sissekande potentsiaalsest ohust ning mõjust kohalikule mikroobikooslusele, mis omakorda on esimeseks lüliks mere toiduahelas ja -võrgustikes. Lisaks annab uuring hinnangu kaubalaevadele kui patogeensete mikroobide importijatele.

Käesoleva uuringu eesmärk on Eestisse saabuvate kaubalaevade ballastvee mahutites esinevate mikroorganismide koosluste kohta alusteabe kogumine – koosluste mitmekesisuse ning võimalike patogeenide esinemise tuvastamine, ettepaneku koostamine mikroobsete koosluste järelevalveks ballastvee mahutitest väljapumbatavas ballastvees ja lahenduste väljatöötamine, mida oleks võimalik hiljem rakendada ballastvee järelevalves ja mereseisundi hindamise valdkonna arendamisel.

Uuring teostati TTÜ meresüsteemide instituudi ja TÜ tehnoloogiainstituudi ühispakkumisena. Projekti töögrupi põhitäitjad on meremikrobioloogilise tausta ja meremikrobioloogiliste uuringute kogemusega Kai Künnis-Beres (TTÜ), Peeter Laas (TTÜ), Veljo Kisand (TÜ) ning zooplanktoloogilise taustaga ja bioloogiliste uuringute ja proovivõtu kogemusega Ivan Kuprijanov (TTÜ). Uuringus osalesid veel molekulaargeneetilise analüüsioskustega teadlased Helen Tammert (TÜ) ja doktorant Liisi Talas (TÜ). Uuringu meeskonda kuuluv Ivan Kuprijanov läbis vahetult enne projekti algust ballastvee proovivõtu väljaõppe rahvusvahelisel kursusel Saksamaal (COMPLETE project *workshop on sampling and analysis of ballast water 8-10.05.2019 / Dr. M. David and Dr. S. Gollasch*).

Teema on seotud Euroopa Parlamendi ja Nõukogu Direktiiviga 2008/56/EÜ (merestrateegia raamdirektiiv - MSRD), mis sätestab EL liikmesriikidele kohustuse säilitada või saavutada oma

merealade hea keskkonnaseisund (HKS) aastaks 2020. Võõrliigid on MSRD üheks tunnuseks, mille alusel keskkonna seisundit hinnatakse.

Uuring aitab täpsustada kaubalaevade ballastveega seotud keskkonnaalaseid probleeme ja sihte, st mõju keskkonnaseisundile ning välja pakkuda suunatud meetmeid, mida oleks võimalik hiljem rakendada ballastvee järelevalves.

1. Teoreetiline taust

Ballastvesi on merevesi, mis on laeva pumbatud laeva stabiliseerimiseks. Laevad võivad ballastvett transportida üle väga pika vahemaa, läbides erinevaid kliimavööndeid ja okeanoloogilisi taustasid ning puutudes kokku erinevaid mikrobioloogilisi kooslusi sisaldava mereveega. Merevee mikroobsed kooslused on suure mitmekesisusega, nt 1 ml merevett võib sisaldada miljoneid mikroorganisme, mis kuuluvad sadadesse kuni tuhandetesse liikidesse (Sunagawa et al. 2020). Kõiki liike korraga kultiveerida ja isoleerida on praktiliselt võimatu ning kahjuks ei saa erinevaid mikroorganisme tuvastada ka nende väliste tunnuste abil. Küll aga on võimalik mikroobseid kooslusi suhteliselt kiiresti ja täielikult uurida molekulaargeneetiliste meetodite abil. Tänu mass-sekveneerimise meetodite arengule saab korraga analüüsida terve mikroobse kooslust (nn mikrobioomi) kasutades geneetilist varieeruvust teatud markergeenides, selleks kasutatakse laialdaselt ribosomaalse RNA geeni varieeruvaid alasid (Yang et al. 2016).
Et võõrliikide sissetoomisest tingitud ökosüsteemide ja tervisekahjustusi vältida, on Rahvusvaheline Mereorganisatsioon (IMO) 2004. aastal vastu võtnud laevade ballastvee ja -setete kontrolli ning käitlemise rahvusvahelise konventsiooni ehk ballastvee käitlemise konventsiooni (*Ballast Water Management Convention),* edaspidi konventsioon. Eestis jõustus konventsioon 2018. aastal. Konventsiooni kohaselt tuleb uude veekogusse sisenemisel mujalt kaasa võetud ballastvesi enne sadamasse sõitmist rannast 200 meremiili (370 km) kaugusel ja ca 200 m sügavusel asendada kohaliku mereveega. Kuna Läänemeres sellistele tingimustele vastav mereala puudub (avaosa laius ca 300 km), siis on siinkohal realistlik meede ballastvee järkjärguline vahetamine avamerel ning ballastvee deballastimine sadamates.

Ballastvee konventsiooni artikkel 4 reguleerib laevade ballastvee ja selle setete kaudu kahjulike veeorganismide ja haigustekitajate ülekandumise kontrolli. Selles artiklis sätestatakse standardid ja nõuded, et vältida laevade ballastvee ja selle setete kaudu kahjulike veeorganismide ja haigustekitajate ülekandumist. Konventsiooni kohustusega laevadel peab olema rahvusvaheline ballastvee käitlemise tunnistus ehk sertifikaat (*International Ballast Water Management Certificate - IBWMC*), ballastvee käitlemise kava (*Ballast Water Management Plan - BWMP*), *ballastvee toimingute registreerimise päevik* (*Ballast Water Record Book - BWRB*) ning toimiv ballastvee käitlussüsteem (*Ballast Water Management System - BWMS*).
Vastavalt konventsioonile peavad ballastvett kasutavad laevad hakkama kõige hiljemalt 2023. aastast merre pumbatavat ballastvett töötlema, mis tähendab, et laevadele tuleb paigaldada puhastussüsteemid (ballastvee töötlus kiirgusega ja/või kemikaalidega). Konventsiooniga ühinenud riigid saavad taotleda ballastvee käitlemise nõudest vabastamist vaid konkreetsetele laevadele, mis sõidavad ühe mere piires kindlaksmääratud sadamate vahel. Konventsiooni kohaselt peab sadamas olema isik, kes võtab laevadelt ballastvee proove. Samuti peavad riigid määrama asutuse, kes analüüsib eri suurusega organismide arvukust väljastatavas ballastvees ning määrab vajadusel organismide liigilise kuuluvuse. Kuna ballastvee töötlemine võõrliikide hävitamiseks peab konventsiooni kohaselt olema laevadel rakendatud alates 2023. aastast, siis võib konventsiooni rikkumine põhjustada lähitulevikus laeva kinnipidamist ja trahve.

Ballastvee proovide võtmiseks on IMO välja andnud üldised juhised ning kehtestanud merre juhitavale ballastveele piirkontsentratsioonid inimesele ohtliku patogeeni *Vibrio cholerae* ja fekaalset reostust kajastavate indikaatorbakterite *Escherichia coli ja* soole enterokokkide osas. Enne proovivõttu on tungivalt soovituslik uurida laevade tausta ja pöörata erilist tähelepanu infole sadamate kohta, mida laev on eelnevalt külastanud.
Konventsiooni reeglis D-2 on sätestatud, et konventsiooni nõuetele vastavad need laevad, mille merre suunatav ballastvesi sisaldab ≥50 µm organisme vähem kui 10 elujõulist organismi kuupmeetri kohta; <50 µm (minimaalses mõõtmes) kuid ≥10 µm vähem kui 10 elujõulist organismi milliliitri kohta (vt. Lisa 1). Inimese tervist ohustava toksikogeense *Vibrio cholerae* (serotüübid O1 ja O139) eluvõimelist rakku ei tohi merre juhitavas ballastvee 100 ml-s proovis esineda (vastaval söötmel kasvavate tüüpiliste *V. cholerae* kolooniat moodustavate ühikute arv peab olema 0 KMÜ/100 ml). *Escherichia coli* arvukus peab olema <250 KMÜ/100 ml ja soole-enterokokkide sisaldus <100 KMÜ/100 ml. Nii *E. coli* kui ka soole-enterokokid on klassikalised fekaalse reostuse indikaatorbakterid.

Olukorra teeb keeruliseks asjaolu, et ühtset ballastvee ja setete proovivõtu metoodikat pole praeguseks veel olemas. Lisaks IMO üldistele juhistele on ISO Tehniline Komisjon koostanud ISO standardi 11711 „*Ships and marine technology – Aquatic nuisance species – Part 1: Ballast water discharge sample port*“, mis muuhulgas esitab metodoloogiat proovide analüüsimiseks ja merre juhitava ballastvee nõuete täitmiseks. Vastavalt konventsiooni standarditele (D1;D2) tuleb ballastvee proovi võtmise käigus mõõta ballastvee mahutite vee soolsus ja temperatuur.

Ballastvees leiduvad organismid ei pruugi mahutis ühtlaselt jaotuda, st organismide kontsentratsioon väljutatavas ballastvees võib varieeruda. Ballastvee organismide sisalduse võimalikult representatiivseks proovide võtmiseks on Saksa firma Hydrobios (www.hydrobios.de) välja töötanud proovivõtu seadme, mis võimaldab proove võtta pidevalt kogu ballastvee väljutamise vältel. Selle proovivõtumeetodi abil saadakse ballastveest tõenäoliselt representatiivsem proov nii nõuetele vastavuse kui ka ballastvee töötlemise süsteemide tõhususe kontrollimiseks.

Väikesemahulisi proove (50 kuni mõnisada milliliitrit), mis sobivad mikrobioloogiliste külvide tegemiseks, on võimalik võtta selleks konstrueeritud spetsiaalse metallist batomeetriga läbi nn. helitoru (ingl. *sounding pipe*), mis ühendab ballastvee mahutit ja laevatekki (*joonis 1*). Läbi helitoru saab mõõta ka ballastvee soolsust ja temperatuuri, mille järgi saab esmase teabe, kas veevahetus ballastvee mahutites on toimunud või mitte (MEPC 65; Standard Operating Procedures 2017). Suuremamahulisi ballastvee proove saab vastavalt laeva võimalustele võtta kas otse ballastvee mahutist (avaneb tekile - õhutusluugi/vaatlusluugi kaudu) või väljalasu kohast, need jäävad ainsaks variandiks kui helitoru on deformeerunud, läbiroostetanud või puudub vastav väikese läbimõõduga batomeeter. Väljalasu kohast saab võtta esinduslikke proove nii zooplanktoni indikatiivse kui mikrobioloogilise analüüsi jaoks, seejuures on oluline registreerida vee vooluhulka (fikseerida vee maht, mida proov esindab). Proovi sekundaarse saastumise vältimiseks ning suurema veemahu analüüsimiseks on soovitav võtta integreeritud mikrobioloogiline veeproov. Seda on võimalik teha proovivõtuseadmega, mille põhivooliku seinast lähtub peenike voolik, mille kaudu saab proovi koguda suuremate mahtude kõrvalt (*joonis 2*). Peenikese toru kaudu juhitakse juhitakse osa veejoast steriilsesse mikrobioloogilisse proovipudelisse (SOP for Inline Ballast Water Sampling...2017).

*Joonis 1***.** Veeproovi võtmine läbi laeva helitoru (helitoru avaneb põrandale must-kollaselt viirutatud ruudu keskelt). Läbi helitoru ballastvee proovi võtmise väikesemahuline torujas metallist batomeeter on näha fotol all-vasakul.

*Joonis 2***.** Ballastvee proovi kogumise seade: voolik, voolumõõtja, ventiil ja integreeritud mikrobioloogilise proovi koguja (peenike voolik, tähistatud punase noolega).

2. Metoodika

2.1 Laevade valik ja laevale pääsu korraldamine

Sadamate külastamise loa, külastavate laevade nimekirja ja ajakava saamiseks pöörduti kõigepealt telefoni teel Tallinna Sadama Kvaliteedi- ja Keskkonnajuhtimise osakonna juhataja (E. Kaasik) ja Tallinna sadama peakapteni poole ning seejärel peakapteni asetäitja (S. Seeman, Vanasadam), Paldiski Lõunasadama sadamakapteni (A. Kungla) ja Sillamäe sadamakapteni (R. Sirol) poole. Sadamakaptenite korraldusel vormistati tähtajalised sadamakülastuse load.

Külastatava laeva valiku põhikriteeriumiks oli laeva Läänemere-väline päritolu ehk laev pidi enne sadamasse saabumist olema külastanud sadamaid väljaspool Läänemerd. Informatsiooni laeva ning eelnevalt külastatud sadamate kohta sai veebilehtedelt MarineTraffic (*https://www.marinetraffic.com/*), VesselFinder (*https://www.vesselfinder.com*) ja FleetMon (*https://www.fleetmon.com/*). Reeglina tutvuti mitme veebilehega, mis võimaldas saada piisavat informatsiooni. Veebilehed võimaldasid lisaks laeva andmetele fikseerida ka kaardil laeva asukohta ning näha kellaajaliselt viie viimase sadama külastuse kohta ja aega.

Laeva külastamiseks tuli ühendust võtta sadamateenistusega, kust saadi informatsiooni laeva saabumise ja sadamas viibimise aja kohta. Kuna laevade sadamasse saabumine olenes ilmaoludest, laeva tehnilisest seisust ja sadama täituvusest (vaba kai koha olemasolust), siis tuli laeva saabumise ja külastamise aega korduvalt täpsustada ning olla valmis koheseks laevale minekuks. Sadamasse sisenemise loa saamiseks tuli sadama turvateenistusele saata personaalsed andmed proovivõtja(te) ja transpordivahendi kohta, mille alusel vormistati ühekordne sadama territooriumile pääsemise luba. Lõpliku loa laevale pääsemiseks andis ainuisikuliselt laevakapten. Üldjuhul käis laevadelt proove kogumas TTÜ meresüsteemide instituudi teadur Ivan Kuprijanov, kes oli eelnevalt läbinud Saksamaal ballastvee proovide võtmise teoreetilis-praktilise koolituse. Sõltuvalt laeva saabumisest sadamasse tuli proove laevalt koguda laevaperele sobilikul ajal kellaajast sõltumata. Luba tuli hankida ka referentsproovi võtmiseks sadama kailt. Sillamäe sadama puhul seda luba ei antud. Paldiski sadamas peatuvatelt laevadelt ballastvee proove võtta ei õnnestunud ja seda kahel põhjusel: a) Paldiskis maabuvad laevad ei külastanud sadamaid väljaspool Läänemerd; b) laevad viibisid sadamas suhteliselt lühikest aega, mistõttu laevakapteni luba proovide võtmiseks ei õnnestunud kordagi saada. Laevade külastamise muutis 2020. aastal keeruliseks ka COVID-19 puhangust tingitud eriolukorra kehtestamine.

2.2 Laeva dokumentide ülevaatus

Enne proovivõttu uuriti internetist laevade tausta, andmeid, marsruuti ja eelnevalt külastatud sadamaid. Laevakülastuse ajal tutvuti ballastvee käitlemist puudutava dokumentatsiooniga ning küsitleti laeva kaptenit ja meeskonda, et saada ülevaade ballastveega seotud toimingutest, sh töötlemise meetoditest ja praktikast. Kontrolliti, kas laeval on olemas rahvusvaheline ballastvee käitlemise sertifikaat (*International Ballast Water Management Certificate).*

2.3 Ballastvee proovide kogumine

Üldjuhul võeti iga laeva kohta üks referentsproov (sadama kailt) ja kolm kuni neli ballastvee proovi erinevatest mahutitest, mis eelistatult sisaldasid erineva päritoluga ballastvett.

Vastavalt konventsiooni standarditele (D1; D2) on ballastvee proovi võtmise käigus vaja kindlaks teha (mõõta) ballastvee mahutite vee soolsus ja temperatuur. Soolsuse proovi ja külvideks mõeldud mikrobioloogiliste ballastvee proovide võtmiseks on kirjanduses soovitatud kasutada metallist spetsiaalset väikese läbimõõdu ja mahuga batomeetrit. Sellist batomeetrit projekti raames kasutada polnud võimalik ning see poleks ka kavandatud analüüside läbiviimiseks väikese proovimahu tõttu sobinud (proovi maht pidi olema vähemalt liiter). Proovivee soolsuse ja temperatuuri mõõtmiseks kasutati elektrijuhtivuse, soolsuse ja temperatuuri mõõtjat YSI EC300ACC-04.

Mikrobioloogiliste ja molekulaargeneetiliste veeproovide nõuetekohaseks võtmiseks konstrueeriti raske põhjaga metallist pudeliraam *(joonis 3*), mida sai koos steriilse proovipudeliga nöörile märgitud meeterskaalat kasutades uputada ballastvee mahutisse soovitud sügavusele ning seejärel eemaldada pudelilt ajutine kork sinna kinnitatud nööri abil.

*Joonis 3***.** Mikrobioloogiliste proovide (ballastvesi, referentsproovid) kogumiseks TTÜ MSI konstrueeritud proovivõtu raam vahetatava pudeliga.

Suurema mahuga (≥ 1 liiter) proovide võtmiseks on enamikel laevadel võimalik kasutada ballastvee mahuti kohal dekile avanevat ventilatsiooniava, mis normaalolekus on kaanega suletud. Ventilatsiooniavad on üldjuhul piisavalt suured, et proove võtta kas klassikalise batomeetriga või spetsiaalsesse raami paigutatud steriilse proovivõtu pudeliga.

2.4 Kogutud proovide käitlemine

Kõik laevalt (ballastvee) ja sadamast (referents) kogutud proovid asetati külmkehadega termokasti ning toodi koheselt TTÜ Meresüsteemide instituudi laborisse. Lähtudes proovide

laborisse saabumise kellaajast alustati proovide eeltöötlusega kohe või siis järgmise päeva hommikul (kui proovid laekusid eelmise päeva hilisõhtul). Vastavalt lepingus kirjeldatule jaotati veeproov esialgu kolmeks osaks:

1) 50ml osaproov fikseeriti 1,25ml osakestevaba formaliiniga (38%) ning säilitati jahedas ja pimedas kuni epifluorestsentsmikroskoopilise uuringuni;
2) 4.5ml osaproov fikseeriti 0,5ml osakestevaba paraformaldehüüdi ja glutaarhaldefüüdi seguga ning analüüsiti samal päeval voolutsütomeetriliselt. Kui koheselt polnud proove võimalik analüüsida säilitati need külmikus temperatuuril 4 ºC;
3) ülejäänud proovis (940-1000ml) leiduv geneetiline materjal konsentreeriti filtreerimise meetodil - molekulaargeneetilise analüüsi esimene etapp (vt. *DNA kontsentreerimine filtratsiooni meetodil*).

Algselt oli lepingus kirjas ühe osaproovi analüüsimine patogeensete- ja indikaatorbakterite (*Escherichia coli*, soole enterokokid, *Vibrio cholerae*) arvukuste määramiseks külvimeetodil Terviseameti laboris (Paldiski mnt 81, Tallinn). Praktilise proovivõtmise käigus osutus aga Terviseameti reeglitekohane kaasamine proovide analüüsi keeruliseks ning sellest tuli loobuda. Terviseameti kaasamise eesmärgiks oleks olnud klassikaliste patogeenide ja indikaatorbakterite analüüsitulemuste ja molekulaargeneetilise analüüsiga saadud tulemuste võrdlemine, kuna viimane pole seni ballastvee ega ka näiteks suplusvee hügieenilises kontrollis praktilist kasutust leidnud. Samas on molekulaargeneetiline analüüs oluliselt informatiivsem, s.t annab informatsiooni kõigi vees leiduvate bakterite, sh patogeenide ja potentsiaalsete patogeenide ning ka toksiliste tsüanobakterite kohta. Samuti on see maailmas üha laiemalt kasutatav mikrobioloogiline analüüsimeetod, mille kasutusele võtmine järelvalvega tegelevates laborites on ainult aja küsimus. Külvimeetoodikaid kasutades, tuleb mikrobioloogilisi analüüse alustada kuue tunni jooksul peale proovide võtmist. Kuna laevadelt proovide võtmist polnud võimalik täpselt paika panna, see olenes laeva tegelikust sadamasse saabumisest, siis polnud võimalik ka laboriga töid planeerida, mis Terviseameti ja muude analoogseid analüüse teostavate laborite puhul on obligatoorne. Laevade tegelik saabumise ja proovide võtmise aeg olenes nii ilmast, sadama täituvusest, laeva tehnilisest seisundist, sadamateenistuselt laevale mineku lubade saamisest, laevakapteni laevale lubamise otsusest. Laevakapteni negatiivne otsus saab ballastvee proovide võtmise (võõraste laevale lubamise) tühistada, isegi juhul kui muud tingimused on täidetud.

2.5 Veeproovide analüüsimine epifluorestsentsmikroskoobiga ja bakterite arvukuse määrmine

Esialgu oli projekti kavas mikroorganismide (bakterite) arvukused loendada voolutsütomeetrilisel meetodil ning proovide visuaalseid omadusi, proovis leiduvate mikroorganismide fenotüüpilist koostist ja seisundit hinnata epifluorestsentsmikroskoopilisel vaatlusel. Kuna töö käigus ilmnes, et UV-töödeldud ballastvesi sisaldab sadet (mõnel juhul suurtes kogustes), mis oleks voolutsütomeetri ummistanud, siis tuli peale vahearuande esitamist voolutsütomeetriline bakterite loendus asendada otsese epifluorestsents-mikroskoopilise loendusega (Hobbie et al., 1977). Ballastvee proovist sademe eemaldamine muudaks proovi mitterepresentatiivseks, kuna osa baktereid oleks proovist kõrvaldatud. Kõneallolevat meetodit on soovitatud HELCOM COMBINE-s bakterite arvukuse ja biomassi

määramiseks Läänemeres ning see meetod oli Läänemere mikrobioloogilises seires kasutusel 1980. aastatel.

Epifluorestsentsmikroskoopilise meetodi puhul filtreeritakse eelnevalt formaliiniga fikseeritud veeproovist mõõdetud kogus (10 ml) läbi 0,2 µm poorsusega polükarbonaatse membraanfiltri. Filtri pinnale kontsentreerunud osakesed värvitakse DNA/RNA-ga seonduva fluoresseeruva rakuvärvi akridiinoranžiga (AO). Värv eemaldatakse filtrilt vaakumiga, seejärel filter loputatakse osakestevaba veega, kuivatatakse ning valmistatakse mikroskoobi preparaat. Filtritel oleva materjali uurimiseks kasutati AO vastavate optiliste filtrite komplekti ning kaameraga varustatud epifluorestsentsmikroskoopi Olympus IX51 (üldsuurendus 1000x).

Bakterite loendamiseks ja mikroskoobi pildi digitaalseks jäädvustamiseks kasutati *cellCens* tarkvara. Meetod on kiire ja võimaldab saada visuaalse ülevaade kõigist vees olevatest osistest, nii elusatest kui elututest (orgaaniline aine, mineraalosakesed). Meetod võimaldab näha ja tuvastada ka neid vees leiduvaid mikroskoopilisi eluvorme (bakterid, vetikad, algloomad jne), mis bakterite analüüsimisel kultiveerimismeetoditega (söötmetes või söötmetel) ilmsiks ei tule. Bakterite üldarvukuse saamiseks loendati baktereid 20-30 juhuslikult valitud filtri pinnaühikul ning nende andmete alusel arvutati bakterite arvukus 1 ml veeproovis.

2.6 DNA kontsentreerimine filtratsiooni meetodil

Vees leiduva DNA kontsentreerimiseks filtreeriti proov (850-980 ml) steriilsetes tingimustes läbi 0,2 µm pooriga membraanfiltri (Supor, S-Pack, diam. 47 mm). Filter võeti koos sinna kogunenud materjaliga steriilsete pintsettidega filtreerimisseadmelt ja paigutati kokku rullitult spetsiaalsetesse tuubidesse. Proovid koodistati, märgistati ja sügavkülmutati temperatuuril -84 ºC, kus neid säilitati kuni Tartusse saatmiseni. Proovid transporditi kuivjääl kiirkulleriga projektipartnerile Tartusse, kus TÜ tehnoloogiainstituudi töörühm nende proovide analüüsideks ettevalmistamist ja analüüsimist jätkas.

2.7 DNA puhastamine, märklaud-geeni paljundamine ning selle sekveneerimine

Membraanfiltritele kogutud veeproovist puhastati DNA kommertsiaalse *Power Water* kitiga (Qiagen) ning DNA kogus määrati spektrofotomeetriliselt (Nanodrop). Seejärel paljundati mitmekesisuse määramiseks kasutatavat marker-geeni (16S rRNA geen, Herlemann et al. 2011) PCR metoodika abil. Paljundatud materjal valmistati ette Illumina platvormil põhinevaks mass-sekveneerimiseks ning sekveneerimine telliti Asper Biogene LLC'lt (Tartu).

2.8 Sekveneerimistulemuste analüüs

Toorandmed töödeldi Tartu Ülikooli tehnoloogiainsituudi mikrobioloogialaboris kasutusel olevate bioinformaatiliste töövahendite abil. Kvaliteetsed DNA järjestused grupeeriti järjestuse sarnasuse alusel nn OTUdeks (ing keeles *operational taxonomic units*) ja OTU järjestuse taksonoomiline kuuluvus, st liigiline kuuluvus määrati nende võrdlusel SILVA andmebaasiga (https://www.arb-silva.de/). OTUdel põhinev andmestik võimaldab kirjeldada koosluste liigirikkust ning kaudselt ka liigilist mitmekesisust arvestades järjestuste arvu ühes OTUs.

2.9 Liigiliste koosluste statistiline analüüs

Statistilise analüüsi läbiviimiseks kasutati programmeerimiskeelt R (versioon 3.5.1) ja keskkonda RStudio (versioon 1.1.463) ning tulemuste visualiseerimiseks paketti *ggplot2*.

2.10 Liigirikkuse analüüs

Ballastvee proovides esineva liigirikkuse hindamiseks arvutati Chao indeksid kasutades Ri paketti *vegan* (*estimateR* funktsiooni) ning tulemuste visualiseerimiseks kasutati *boxplot* ja *ggplot* pakette.

2.11 Bakterite kooslustele ballastvee päritolu ja erinevate tegurite mõju analüüs

Asukoha, soolsuse ja töötluse (UV-töödeldud vrs töötluseta proovid) mõju hindamiseks ballastvee proovides kasutati NMDS (ingl. *Non-metric multidimensional scaling*) ordineerimist ja dbRDA (ingl. *distance based redundancy analysis*) analüüsi. NMDS ordineerimiseks kasutati paketti *microbiome* (funktsioon *ordinate*; *"bray" distants*), mis võimaldab visuaalselt hinnata ballastvee proovide grupeerumist. dbRDA analüüsiks kasutati Ri paketti *vegan* (funktsioon *capscale*), mille abil hinnati, kui suur osa koosluste vahelisest varieeruvusest on seletatav asukoha, soolsuse või töötluse mõjuga.

2.12 Tuumkoosluse taksonite analüüs

Erinevatest asukohtades pärit ballastvee koosluste võrdlemiseks leiti esmalt proovides esinenud tuumikooslus (ingl k. *core community*). Selleks kasutati *microbiome* paketi funktsiooni *core*, mis arvestab põhikoosluste hulka liigid, mille levimus proovides suhtelise arvukuse alusel on 0,5 (esineb vähemalt 50% proovides).

2.13 Üksikute OTUde üle- ja alaesindatuse analüüs

Seejärel analüüsiti ballastvee koosluste vahelisi erinevusi OTUde kvantitatiivse üle- või alaesindatuse näol võrreldes erinevaid töötlusi omavahel erinevates asukohtades. Selleks kasutati Limma mudelit (*Linear models for microarrays*; pakett *limma*), mis võrdleb kahte gruppi (nt töötlused) omavahel ning annab efekti suurused (logFC - *fold change*) ja p väärtused OTUdele arvestades masssekveneerimise andmestiku omapärasid. Tulemused visualiseeriti *volcano plot*-ga. Statistiliselt üleesindatud liikideks vastavas töötluses arvestati OTUd, millel esines efekt (logFC) > 1 ja korrigeeritud p-väärtus < 0.05.

2.14 Võimalike patogeensete bakteriperekondade esinemise analüüs

Võimalike patogeensete perekondade vaatlemiseks erinevates ballastvee asukohtades, arvutati enamlevinud potentsiaalsete patogeensete perekondade suhteline arvukus proovis. Nendeks perekondadeks olid: *Escherichia-Shigella, Enterococcus, Staphylococcus, Vibrio, Listeria, Acinetobacter, Mycobacterium, Salmonella, Shewanella, Serratia, Mycoplasma, Streptococcus, Legionella, Rickettsiella, Carnobacterium, Neisseria, Parachlamydia, Haemophilus, Paeniclostridium, Leptospira, Corynebacterium, Prevotella, Neochlamydia, Rickettsia, Chlamydia, Yersinia, Klebsiella, Ehrlichia, Flavobacterium*.

Viirused ballastvees

Viirusi käesoleva projekti raames ei analüüsitud kuna patogeensuse aspektis on merevesi viiruste nakkuvuse säilimiseks ebasoodus keskkond. Viirused on merekeskonnas küll väga arvukad, kuid nad on valdavalt bakteriofaagid. Mereviirusi võib teatud juhtudel esineda merevees kümneid kordi rohkem kui baktereid, kuni 10^8 virioni ml^{-1} (Middelboe ja Brussaard 2017). Tulenevalt viiruste suurest mitmekesisusega teiste mikroorganismidega võrreldes, puuduvad nende uurimiseks tänaseni universaalsed markergeenid. Nende geneetilise info kandjaks võib olla DNA või RNA, mis mõlemal puhul võib olla nii üheahelaline kui kaheahelaline. Seetõttu on nende uurimine bakterite uurimisest tunduvalt keerulisem ja kallim, seda alates proovide kogumisest, geneetilise materjali ekstraheerimisest kuni lõppanalüüsini välja. Mõnigast edu on selles valdkonnas saavutatud kasutades koosluse metagenoomi *shotgun* sekveneerimise metoodikat (Lymperopoulou ja Dobbs 2017).

3. Tulemused ja nende analüüs

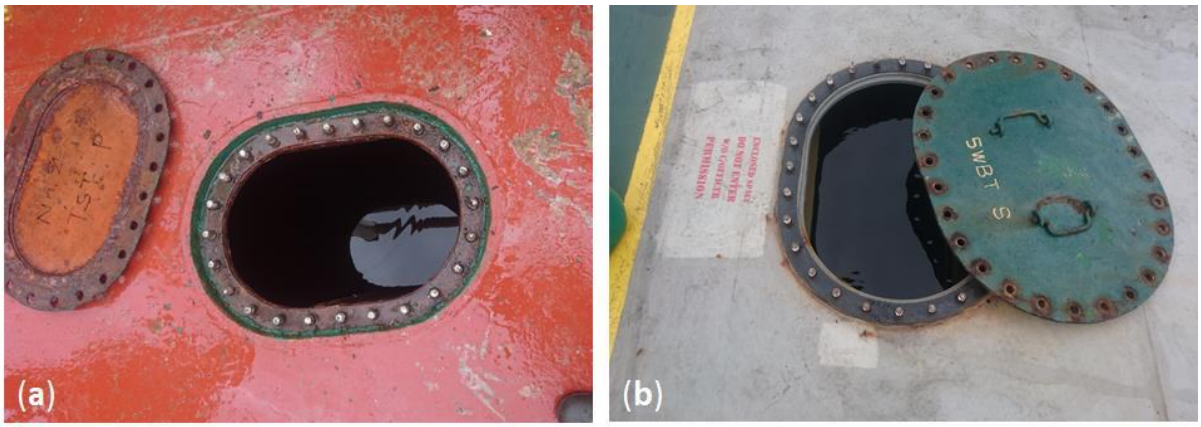
3.1 Ballastvee käitlus ja proovide võtmise valmidus külastatud laevadel

Kokku külastati ajavahemikul 13.07.2019 - 3.05.2020 15 kaubalaeva, neist 14 Muuga sadamas ja üht Sillamäe sadamas. Paldiski sadamas ei õnnestunud laevakaptenilt laevalemineku korduvalt luba saada, kuigi Tallinna Sadamalt oli luba olemas. Üheks põhjenduseks oli laeva liialt lühiajaline viibimine sadamas. Enamus külastatud laevu olid keskmisest suuremad (tabel Lisa 2): kandevõimega (DWT) üle 60000 tonni - kaks laeva (maks. 63475 t), 50000-60000 t - üks laev, 40000-50000 t - üks laev, 30000-40000 t -seitse laeva, 20000-30000 t kolm laeva ja alla 10000 t - üks laev (5050 t).Suurtel laevadel võis olla üle 20 ballastvee mahuti, kõige väiksemal külastatud laeval (vedas kaupa üksnes Läänemere piires) oli üks ballastvee mahuti.

Kõikidel külastatud lavadel oli kohustuslik ballastvee käitlemise kava, mille järgi ballasti toimingud teostati, olemas, kuigi erinevas vormis ja tasemel. Kõik toimingud pandi kirja spetsiaalsetesse ballastvee arvestusraamatutesse, täites selleks spetsiaalselt selleks otstarbeks väljatöötatud protokolle (väljastatud IMO poolt, D-1 ballastvee vahetamise standard järgimiseks) või pannes see kirja vabas vormis. Erineva täpsusastmega oli leitav informatsioon millal, kus ja kuidas ballastvee mahuteid täideti/tühjendati. Külastatud laevadest viiel (Providana, Helga Bulker, Argo B, Port Imabari, Yangtze DIgnity) oli olemas nii töökorras ballastvee töötlemistehnoloogia kui ka tehniline võimalus ballastvee proovide nõuetekohaseks kogumiseks.

Kaheteistkümnelt laevalt oli võimalus proovid võtta otse ballastvee mahutist (ingl. *in-tank*), kas siis läbi vaatluskaevu/õhutusluugi (ingl. *manhole*) *(joonis 4*), kasutades selleks batomeetrit, või voolikuga läbi helitoru (ingl. *sounding pipe*) (*joonis 5*). Luukide avamine sõltus vanade laevade puhul ka laevameeskonna heast tahtest ja koostöövalmidusest, sest kaevu kattis vana roostetanud kaas, mille eemaldamiseks kulus aega ja täiendavaid tööriistu. Proovide võtmine läbi helitoru oli mitme laeva puhul raskendatud, kuna laeval puudusid selleks vajalik pump ja voolikud. Mõnel juhul oli võimalik ballastvee proovi võtta üksnes ületäitumise meetodil

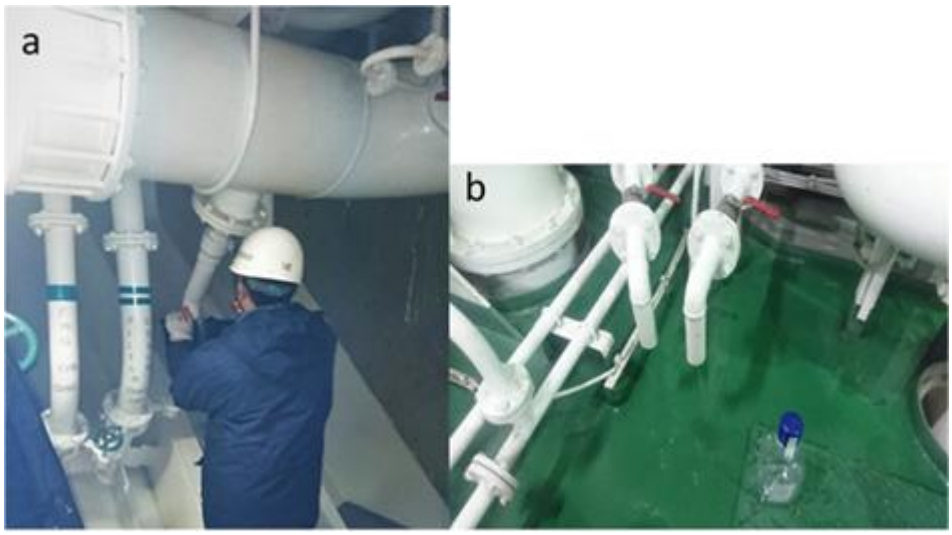
(ingl. *overflow*). Sel juhul käivitati erakorraliselt laeva veepumbad, mille tulemusena vesi väljus kas helitorust või mõnest ventilatsiooniks mõeldud kaevust (protsess imiteeris lühiajalist deballastimist). Ühel juhul tuli proovid võtta laevakere küljel paiknevate ballastvee väljutamise luukide avamisel väljapurskuvast veejoast.



Joonis 4. Proovi võtmiseks avatud ballastveemahuti ventilatsiooniavad: (a) *Cape York*; (b) *Medi Atlantica*.

Joonis 5. Veeproovi võtmine voolikuga läbi laeva helitoru (vajalik nii voolik kui pump): (a) Hong Kongi lipu all sõitev laev *Cape York* Muuga sadamas (laeva dedveit ehk täielik kandevõime 28471 t, ehitatud 2001.a.); (b) Libeeria lipu all sõitev laev *Medi Atlantica* (laeva dedveit 60550 t, ehitatud 2016).

Viielt laevalt oli võimalik ballastvee proovid võtta laeva masinaruumist, kasutades selleks spetsiaalset ballastvee proovivõtu kohta (ingl. *in-line; joonis 6)*. Selline võimalus esines laevadel, mille omanikud olid vastavalt IMO konventsiooni nõuetele tehnilise võimaluse loomisesse investeerinud.



Joonis 6. Proovi kogumine masinaruumis laevadelt : a) Helga Bulker, b) Port Imabari

Sellise süsteemi olemasolul on sadamas seisvalt laevalt proovide kogumiseks vaja käivitada ballastvee töötlemise süsteem, valida automaatjuhtpuldilt proovivõtuks vajalik ballastvee mahuti, lasta pumbata vett (5-10 min) läbi torudesüsteemi, et puhastada torustik seisma jäänud veest, ning spetsiaalse kraani kaudu teostada proovivõtt (*joonis 6*).

3.2 Ballastvee töötlus külastatud laevadel

Kuuel laeval viieteistkümnest puudus ballastvee töötluse vahendid (Cape York, Trapezitza, Fluvius Taw -väike laev, Argo B, Monterose, African Ibis). Need laevad olid suhteliselt vanad ning ehitatud 2010. aastal või varem. Laevale paigaldatud ballastvee töötlussüsteem polnud kasutuses kahes laevas: Interlink Nobility (ehitatud 2017) ja Port Imabari (eh. 2019). Neilt kaheksalt laevalt oli proove võimalik võtta üksnes mittetöödeldud ballastveest. Töötluse puudumist põhjendati kohustuse puudumisega, ressursside kokkuhoiu vajadusega ja tehniliste probleemidega. Suhteliselt uue laeva Interlink Nobility esindaja seletusest tuli välja, et ballastvett töödeldakse nõuetekohaselt USA vetesse minekul, sest seal on see kohustuslik. Laeval Medi Atlantico (eh. 2016) töödeldi mahutitesse sisenevat vett ilmselt tehnilise rikke tõttu madalate UV annusega. Kahe laeva puhul (Providana, Medi Atlantico) oli ballastvee mahutites korraga nii töödeldud kui töötlemata vesi ehk osaliselt töödeldud vesi. Viietestkümnest laevast seitsmelt (Providana, Helga Bulker, Medi Atlantico, Nordmosel, Saga Enterprise, Charisma GR, Yangtze Dignity) oli võimalus saada UV töödeldud ballastvett, millet ühel, Sillamäe sadamas peatunud laeval Helga Bulker, oli olemas lisaks ballastvee UV-töötlusele ka keemiline töötlus naatriumvesiniksulfaadiga ($NaHSO_4$).

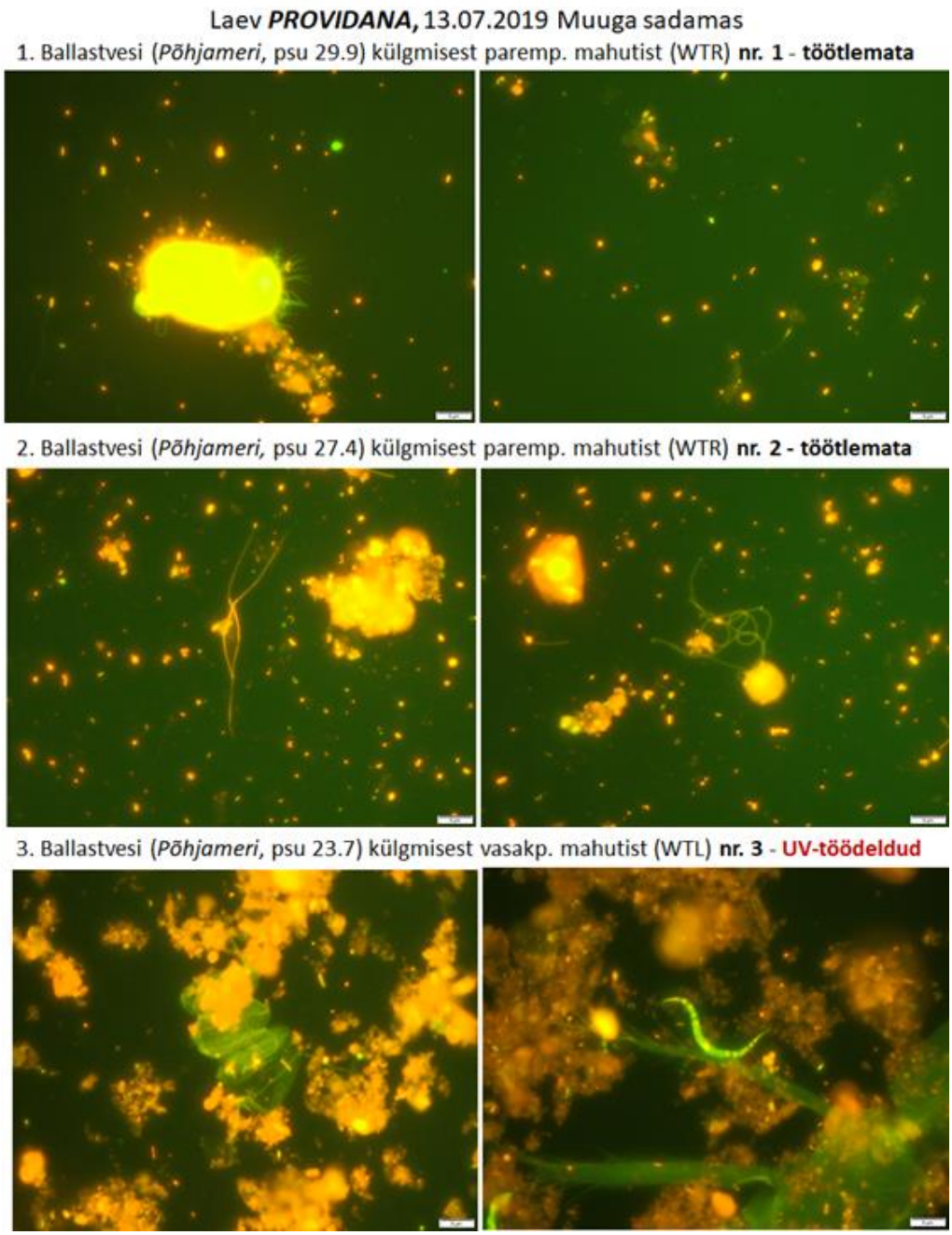
3.3 Epifluorestsentmikroskoopiline uuring

Proovide mikroskoopiline vaatlus võimaldas selgesti eristada töötlemata ja töödeldud merevett/ballastvett. Ballastvee UV kiirgusega töötlus põhjustab vees leiduvatel organismidel kahjustustusi ja vees leiduva detriidi lagunemist, mille tulemusena on veeproovis visuaalselt näha pruuni sadet, mikroskoobi all aga amorfset sadet ning surnud ja lagunenud rakke. Nukleiinhapete marker AO seostub rakkudes RNA ja DNA-ga ning kui rakk on füsioloogiliselt aktiivne (rakus on ülekaalus RNA), annab see rakule oranž-kollase helenduse. Kui rakk on aga kahjustunud ning raku valgusüntees on peatunud (RNA-d on rakus vähe ja ülekaalus on DNA), paisab see epifluorestsentsmikroskoobis lühilainelises sini-lillas valguses rohelisena. Mikroskoopiline uuring võimaldab kogemuse olemasolul eristada fenotüübilise pildi alusel ka erineva päritoluga vett, näiteks Läänemere, Põhjamere ja Atlandi ookeani vett ning hinnata vee mikrobioloogilist mitmekesisust ja üldist reostustaset. Fenotüübi alusel taksonoomiline identifitseerimine on bakterite puhul võimalik vaid väga piiratud juhtudel, mistõttu on projektis suurt tähelepanu pööratud bakterite molekulaargeneetilisele analüüsile.

Järgnevalt on esitatud näitlikustamiseks mõnede laevade epifluorestsentsmikroskoopilise ballastvee uuringu tulemused. Sama meetodiga saadud bakterite loenduse tulemused, bakterite üldarvukus (BÜA) 1 ml uuritavas proovis, on esitatud aruande lisas olevas tabelis (Lisa 3).

Laeva ***PROVIDANA*** külastuse käigus kogutud proovide epifluorestsentsmikroskoopilise uuringu tulemused. Proovid koguti 13.07.2019 laeva ballastvee (BV) mahutitest WTR (nr.1), WTR (nr. 2) ja WTL (nr. 3). Kõigi kolme Põhjamere veega täidetud mahuti vesi erines nii soolsuse kui ka mikrobioloogilise koostise poolest (*järeldus*: vesi pumbatud mahutitesse erinevatest kohtadest). Kahe BV mahuti vett ei oldud laevakapteni info põhjal töödeldud, mida kinnitas ka mikroskoopiline uuring (vt joonis 7, ballastvesi nr. 1 ja nr. 2). Seda, et töötlus puudus näitab fotodel pruunakas taustahägu puudumine (selge taust) ja mikroorganismide iseloomulik kuju, terviklikkus ja erekollane ravumus (ballastvee nr. 1 vasakpoolsel fotol proovivõtul elus olnud *ripsloom* - intensiivselt kollane ripsmetega ääristatud ovaal; ballastvee nr. 2 parempoolsel fotol on näha proovivõtu ajal elus olnud kera kujuline kahe viburiga viburloom). Erkkollane värvus näitab nende organismide aktiivset metabolismi (rohket RNA sisaldust rakus), selgelt eristatavad ripsmed/viburid aga deformatiivse teguri puudumist. Kolmandast mahutist võeti ballastvee proov vahetult peale UV-töötlust (joonis 7, ballastvesi nr. 3). Proovis esineb kollakaspruuni amorfset sadet - lagunenud orgaaniline materjal, mille vahel on näha roheliselt värvunud surnud vetikate (vasakpoolne foto). Parempoolsel foto keskel on surnud kaarekujulist vetikas ning ka fragment vähjalaadse zooplankteri kestast. Samadel fotodel on näha mõõdukas koguses baktereid, keda UV-kiirgus pole hävitanud. Käsitletud proovide BÜA tulemused on näha alljärgneva tabeli viimases veerus (täielik tabel asub aruande lisas, Lisa 3)

Kuupäev	*Laev*	*Sadam*	*Ballastvee päritolu*	*Proovi nr*	*Soolsus psu**	*Proovivõtu koht*	*Töötlus*	*BÜA, rakku/ml*
13.07.2019	**Providana**	Muuga	Põhjameri	1	29,9	torust (*in-line*),WTR	puudub	462 490
			Põhjameri	2	27,4	torust (*in-line*),WTR	puudub	880 000
			Põhjameri	3	23,7	torust (*in-line*),WTL	UV-töötlus	410 540

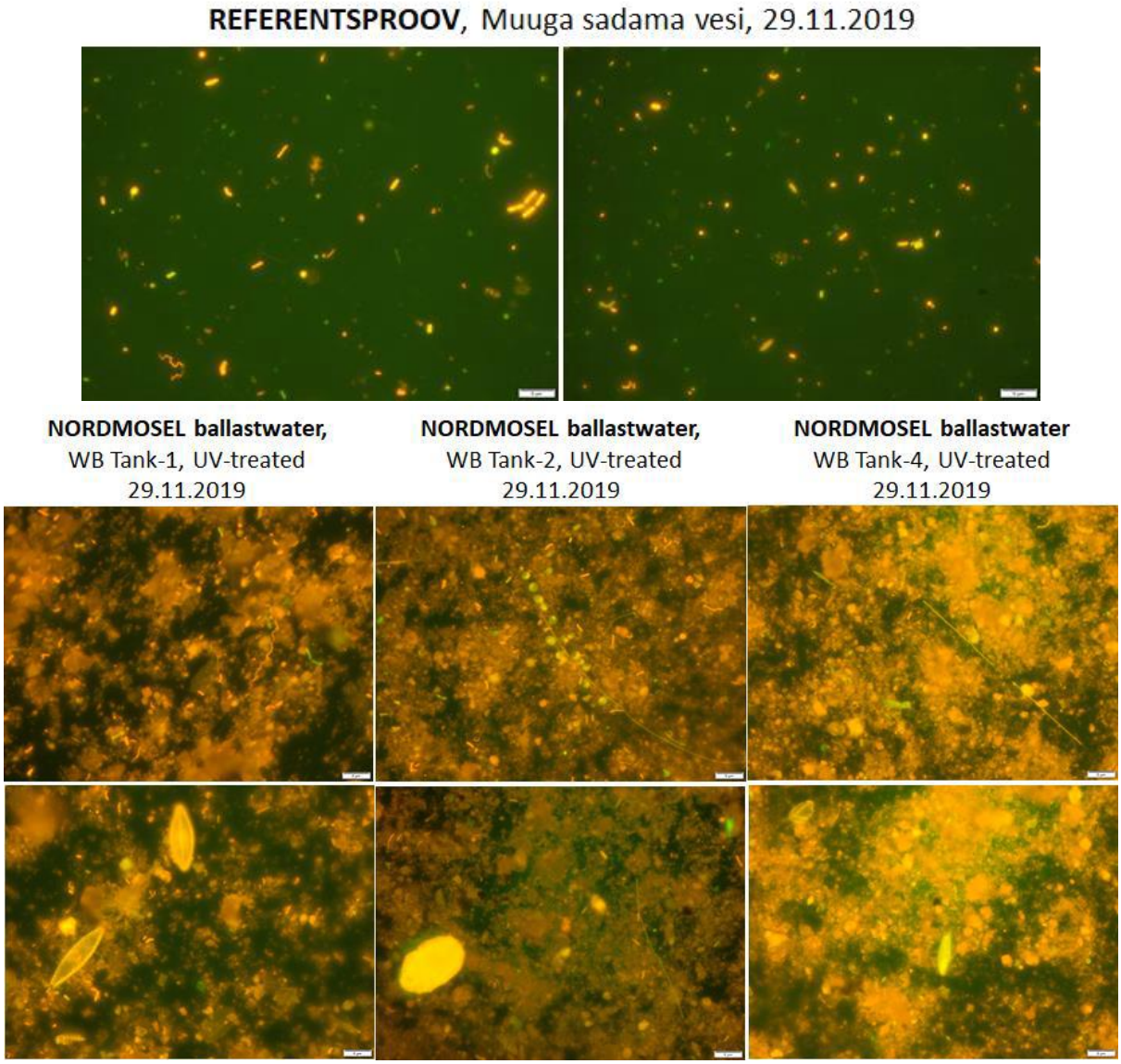


Joonis 7. Laeva *PPROVIDANA* (Muuga sadamas 13.07.2019) kolmest ballastvee mahutist (nr. 1, WTR - töötlemata Põhjamere vesi; nr. 2, WTR - töötlemata Põhjamere vesi; nr. 3, WTL - UV-töödeldud) võetud veeproovide epifluorestsentsmikroskoopilise uuringu digifotodele jäädvustatud tulemused.

Laeva ***NORDMOSEL*** proovid koguti 29.11.2019 kolmest ballastvee mahutist, mille vesi oli UV-töödeldud sissepumpamisel, mahutid WB tank-1, WB tank-2, WB tank-4 ja referentsproov Muuga sadama kailt 1m sügavuselt (referentsproov). Kõigi mahutite vesi oli merevee sissepumpamise ajal UV-töödeldud, teistkordselt läbis ballastvesi UV-töötluse väljapumpamisel. Ballastvesi oli laevapäeviku põhjal pärit Põhjamerest Ühenkuningriikide rannikult. Vee soolsuse järgi oli ballastvesi võetud erinevatest kohtades või siis oli osades

ballastvee mahutites seguvesi. Sooluse andmed koos bakterite üldarvukuse andmetega on esitatud alljärgnevas tabelis.

Kuupäev	*Laev*	*Sadam*	*Ballastvee päritolu*	*Proovi nr*	*Soolsus psu**	*Proovivõtu koht*	*Töötlus*	*BÜA, rakku/ml*
29.11.2019	**Nordmosel**	Muuga	Soome laht	1	6,4	Muuga sadama kai		488470
			Põhjameri	2	8,6	mahutist, WBT4ps	UV-töötlus	954132
			Põhjameri	3	10,2	mahutist, WBT2ps	UV-töötlus	446022
			Põhjameri	4	14,3	mahutist, WBT1ps	UV-töötlus	747594



Joonis 8. Muuga sadama kailt (referents proov) ja sadamas seisva laeva *NORDMOSEL* kolmest külgmisest ballastvee mahutist (WPT-1, WPT-2 ja WPT-4) 29.11.2019 kogutud proovide epifluorestsentsmikroskoopilise uuringu digifotodele jäädvustatud tulemused.

Fotodelt on näha suur erinevus töötlemata (Muuga merevesi) ja UV kiirgusega kahekordselt töödeldud merevee (ballastvee) vahel. Kahekordne UV-töötluse tulemusena oli ballastvees rohkesti pruuni orgaanilist heljumit/sadet, mis oli näha ka visuaalsel veeproovi vaatlusel.

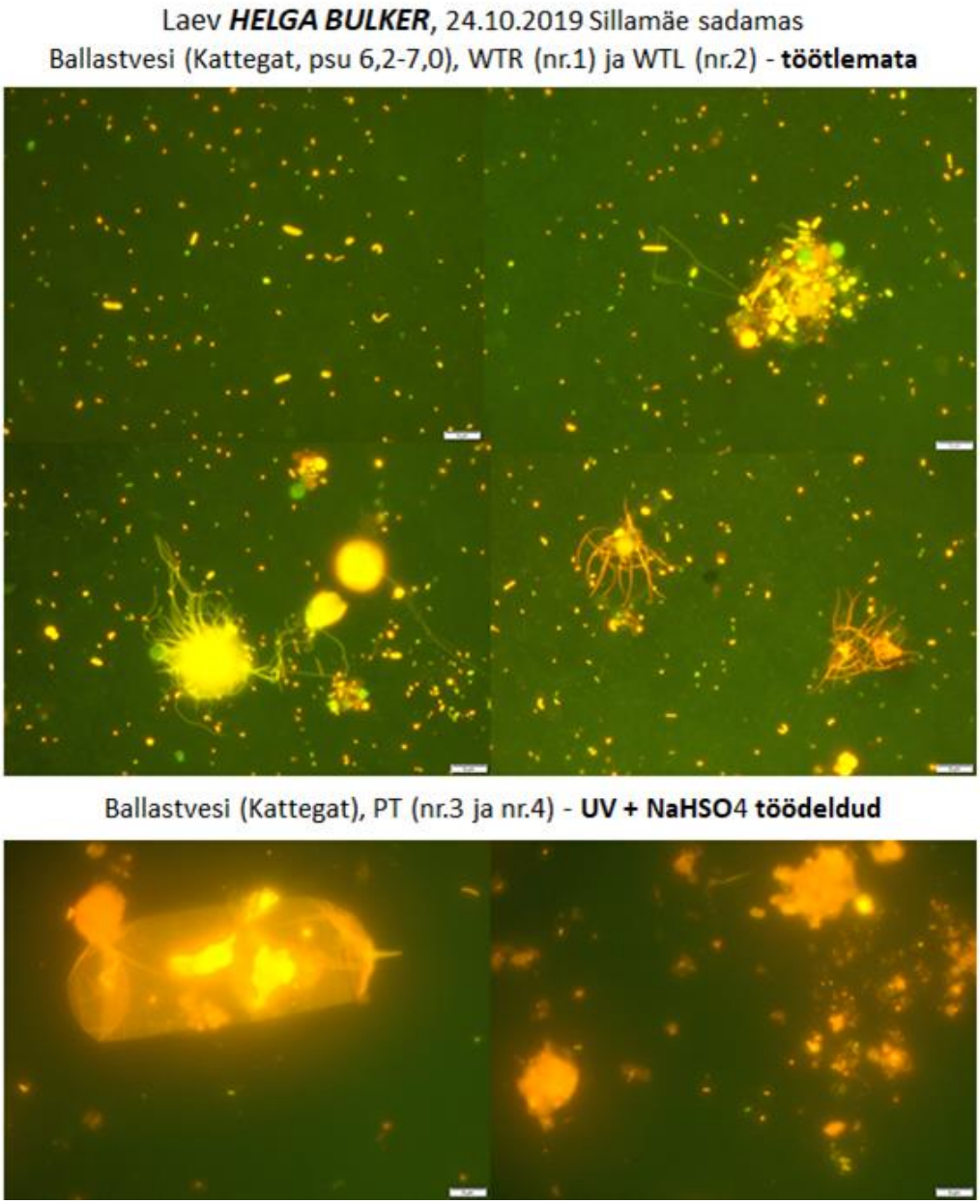
Sademe hulk sõltud vees leiduvate organismide hulgast, kellest peale lagundamist tekib detriit. Elusrakkude lõhkumise tulemusena vabaneb vette kergesti tarbitavaid toitaineid. Kuigi enamus veeorganismidest on kiirituse toimel hävitatud, säilitab osa zooplanktonist siiski eluvõime. Läbiviidud uuring näitas, et sellised organismid on eelkõige ripsloomad, nagu on näha *joonis 8* alumisel keskmisel fotol (intensiivselt kollane ovaal). Alumise rea vasakpoolsel fotol on amorfse orgaanilise heljumi tausta kahe ränivetika tühjad rakukestad (pantserid), mis tõestab, et nad on kiirguse toimel hävitatud.

Kolmas pikemalt analüüsitav laev on Sillamäe sadamas kaupa vahetanud ***HELGA BULKER,*** proovid koguti laevalt 24.10.2019. Laev saabus Sillamäele Taanist Studstrup`i sadamast (Kattegat). Ballastvee mahutites oli kahte tüüpi ballastvett: UV-töödeldud (WTL, WTR) ning UV- ja keemiliselt naatriumvesiniksulfaadiga ($NaHSO_4$) töödeldud (PT) merevett. Sooluse andmed koos bakterite üldarvukuse andmetega on esitatud alljärgnevas tabelis.

Kuupäev	*Laev*	*Sadam*	*Ballastvee päritolu*	*Proovi nr*	*Soolsus psu**	*Proovivõtu koht*	*Töötlus*	*BÜA, rakku/ml*
24.10.2019	**Helga Bulker**	Sillamäe	Kattegat	1	6,2	mahutist, WTL	UV-töötlus	**1587053**
			Kattegat	2	7,0	mahutist, WTR	UV-töötlus	
			Kattegat	3	6,8	*in-line*, PT	UV+$NaHSO_4$	**230455**
			Kattegat	4		*in-line*, PT	UV+$NaHSO_4$	

Peale proovide analüüsimist selgus, et esialgselt UV-töödelduks arvatud ballastvee proovid nr.1 (WTL) ja nr.2 (WTR) osutusid siiski töötlemata proovideks. Sellele viitas bakterite suhteliselt kõrge arvukus (1,5 milj/ml), mikroorganismide ja algloomade elulisus ja oksüdeerunud materjali puudumine (*joonis 9*, ülemine fotoseeria).

Seevastu ballastvee topelttöötlus UV-kiirgusega ja $NaHSO_4$ osutus organismide hävitamisel väga efektiivseks - kõik elus peale osade bakterite oli tugevalt kahjustunud (*joonis 9*, alumised kaks fotot). Siit võib järeldada, et UV kiiritamise ja keemilise töötluse on eukarüootsete mikroorganismide puhul hävitav, kuid osa baktereid jääb ka sellise põhjaliku töötluse puhul eluvõimelisteks. See tulemus on oluline patogeenseid baktereid ja nende ballastveega transportimise seisukohalt ning vajaks täiendavat uurimist. Kirjanduse andmetel on teada, et soolebakterid on enamasti keemilistele mõjuritele oluliselt vastupidavamad kui looduslikud bakteritüved.



Joonis 9. Laeva ***HELGA BULKER*** (Sillamäe sadam, 24.10.2019) kahest töötlemata merevett sisaldavast ballastvee mahutist (nr.1 ja nr.2, ülemine fotoseeria) ja kahest kahekordse töötluse (UV+$NaHSO_4$) läbinud ballastvee mahutist (nr.3 ja nr.4, alumised fotod) võetud veeproovide epifluorestsentsmikroskoopilise uuringu tulemused. Ülemistel fotodel on Kattegatist pärit merevesi, mis mikroorganismide liigiliselt koostiselt erineb Läänemere veest, kuigi ballastvee proovide soolsus Läänemere soolsusest ei erinenud.

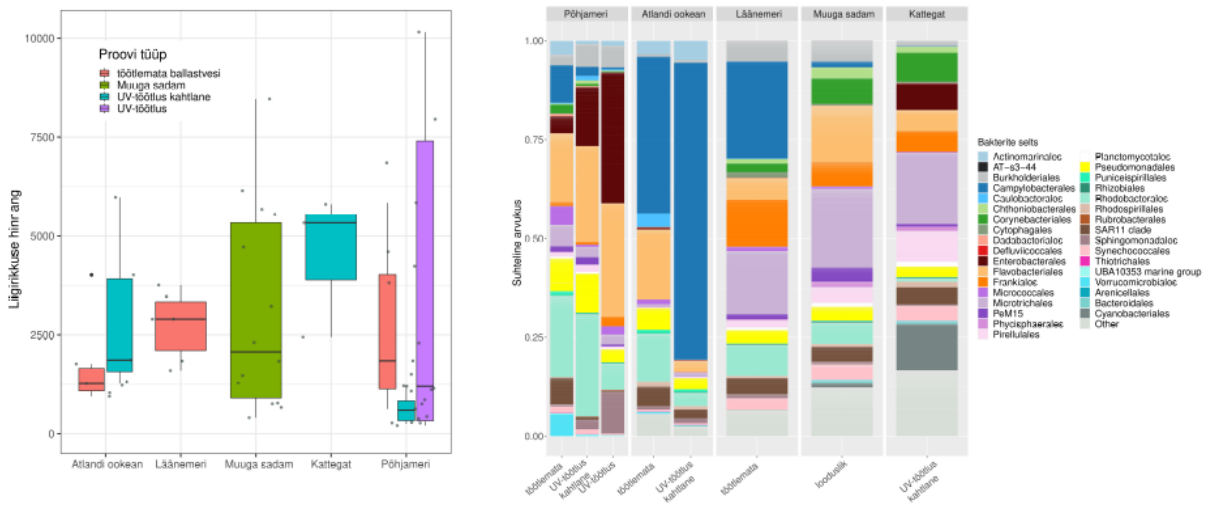
3.4 Sekveneerimisandmete analüüs

Illumina platvormil mass-sekveneerimise tulemusel saadi ~8 Gb andmeid, mis seejärel läbisid bioinformaatilise töövoo. Peale kvaliteedikontrolli jäi alles 582 024 unikaalset lugemit, mis grupeeriti järjestuse 97% sarnasuse alusel 51 580 OTUks. Nende võrdlemisel SILVA andmebaasiga, oli võimalik taksonoomiline kuuluvus määrata 51 336 OTUle. Lisaks eemaldati

OTUd, millel esines vaid 1 lugem, jättes edasiseks analüüsiks 32 734 OTUt. Selline lähenemine võimaldas luua tabeli proovides esinenud liigilise mitmekesisuse ning nende suhtelise arvukuse kohta.

3.5 Proovidest leitud mikroobikoosluste üldiseloomustus

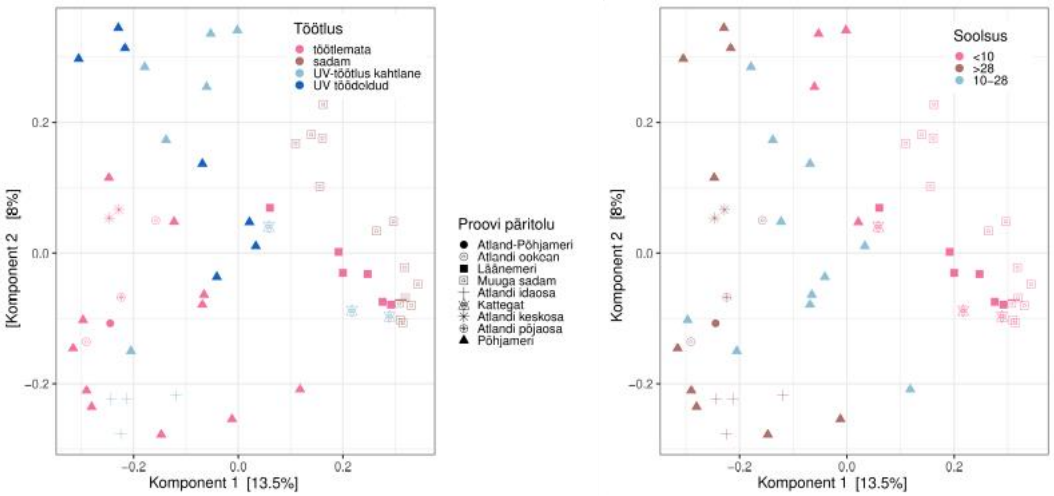
Mikroobide liigirikkus erinevatest asukohtadest pärit ballastvee proovides on näidatud *joonisel 10A*. Liigirikkuse hindamiseks arvutati Chao indeks (liigirikkuse hinnang), mis ennustab tegelikku liigilist mitmekesisust proovides. *Jooniselt 10A* näeme, et suurem liigirikkuse varieeruvus esineb eelkõige Põhjamere (UV-töödeldud) proovides, Atlandi ookeani (UV-töödeldud kahtlastes) ballastproovides ning Muuga sadama proovides. Need tulemused viitavad eelkõige liikide arvu muutlikusele UV-töödeldud ja UV-töödeldud kahtlastes proovides. Samas on liigirikkuse tase üldjoontes kõikides proovides, ka UV-töödeldud proovides, sarnane ning pigem kõrgem kui proove oli sellest kohast kogutud, suurem nagu Muuga sadam ja Põhjamerest pärinevas ballastvees.
Seejärel vaadeldi lähemalt erinevatest asukohtadest pärit ballastvee tuumkooslust (*core cummunity*, *joonis 10B*), mis kirjeldab mikroobikoosluses enamesinenud taksoneid. *Joonisel 11B* on välja toodud enamesinenud bakterite seltsid ning nende suhteline arvukus vastava asukoha ballastvee proovides. Muuga sadama tuumkooslus sarnanes kõige enam Läänemere ja Kattegati ballastvee tuumkooslustega, sisaldades enim seltside *Microtrichales*, *Frankiales*, *Flavobacteriales* ja *Corynebacteriales* esindajaid. Samuti erines Muuga sadama tuumkooslus Läänemere omast vaid *Campylobacteriale*s seltsi bakterite arvukuse poolest. Kõige enim eristusid aga Põhjamere ja Atlandi ookeani ballastvee tuumkooslused, kus Atlandi ookeani ballastvees oli domineerivaks seltsiks *Campylobacteriales* ning Põhjamere ballastvees esines arvukalt *Enterobacteriales* esindajaid.



Joonis 10. Mikroobikoosluste liigirikkus (paneel A; vasakul) ja tuumkoosluste taksonoomiline koosseis seltsi tasemel (paneel B; paremal).

3.6 Mikroobikoosluste erinevused sõltuvalt UV töötlusest ja geograafilisest päritolust

Koosluste erinevusi analüüsiti detailsemalt kasutades mitmemõõtmeliste andmetele sobivat statistilist analüüsi. Näiteks ordineerimine võimaldab visualiseerida erinevate proovide grupeerumist, nagu on näha *joonisel 11* (NMDS joonis).



Joonis 11. Mikroobikoosluste mitteparameetriline ordinatsioonanalüüs (NMDS). Sümbolid määravad ballastvee päritolu ja värvid vastavalt töötlust (vasakul) või soolust (paremal).

Erinevate gruppide seoseid teiste tunnustega (ballastvee päritolu, soolsus, eeltöötlemine või selle puudumine) analüüsiti mitteparameetrilistele ja mitmemõõtmelistele andmetele sobiva mitteparameetrilise PERMANOVA testi abil (Tabel 1). Proovide jaotumine ordineerimise ruumis järgib eelkõige proovi päritolu ning sellega seotud soolsuse taset. Ballastvee UV-ga töötlemise mõju selgelt välja ei joonistu.

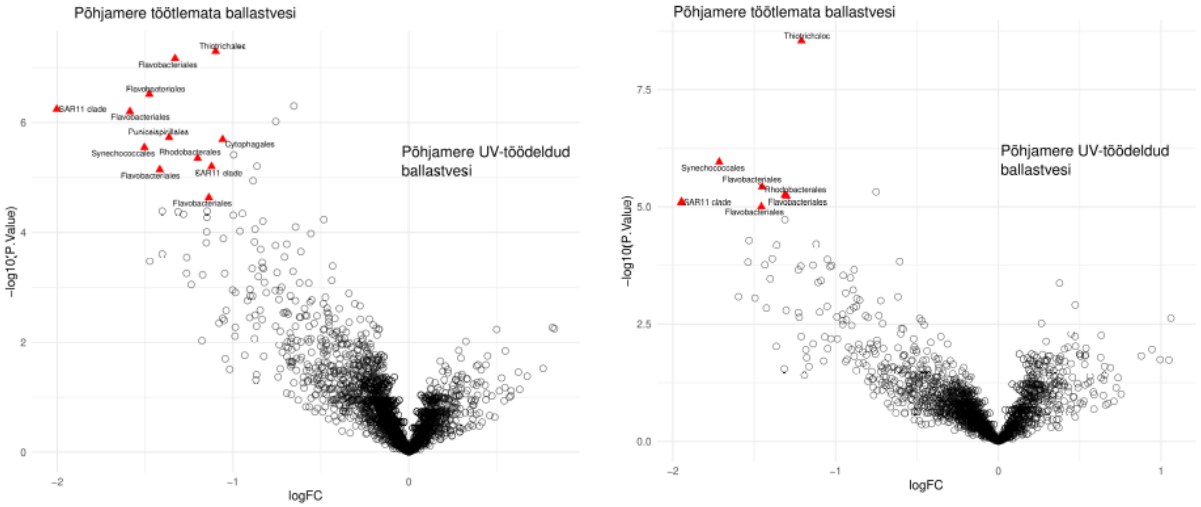
Tabel 1. PERMANOVA analüüsi tulemused (VA- vabadusastmete arv, Rs- ruutude summa).

Testitud tunnus	**VA**	**Rs**	**Keskruut**	**F**	**R^2**	**Pr(>F)**
Töötlus	4	3.59	0.898	3.220	0.166	0.001
Asukoht (päritolu)	4	2.62	0.655	2.349	0.121	0.001
Soolsus	2	1.09	0.546	1.956	0.050	0.001
Töötlus x Asukoht	1	0.63	0.629	2.254	0.029	0.001
Töötlus x Soolsus	2	0.92	0.458	1.642	0.042	0.003
Residuals	46	12.83	0.279	0.592		
Total	59	21.69	1			

Siiski on statistilise analüüsi tulemustest näha, et UV-töötlusel on oluline mõju. See tulemus saadi aga alles peale seda, kui kahtlased UV töötlusega ballastvee proovid eristati tegelikest UV töötlust saanud proovidest. Enne seda oli töötluse efekt korrelatsioonikordaja R^2=0.103. Tugevam mõju bakterite koosluse struktuurile oli proovide päritolul.

3.7 Liikide üle- ja alaesindatatus Põhjamere erineva töötluse läbinud proovides

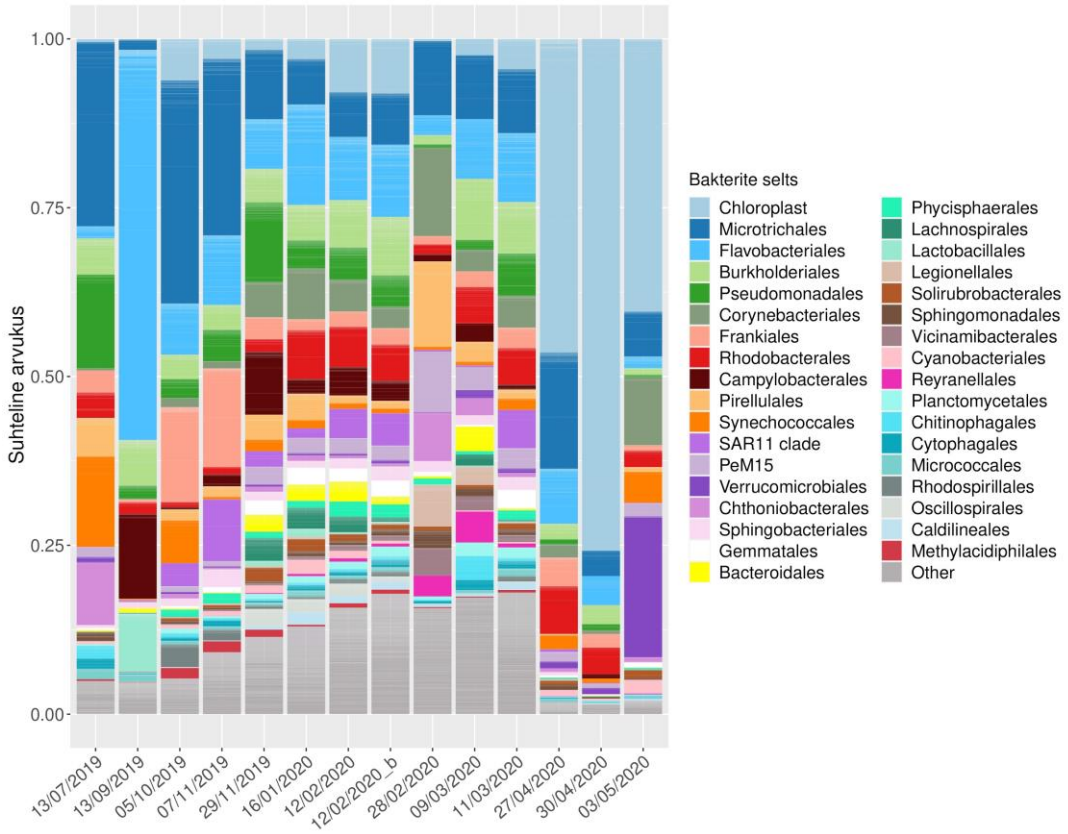
Põhjamere ballastvee koosluste vahelised erinevused üksikute OTUde üle- või alaesindatuse näol erinevate töötluste vahel on nähtavad vulkaani diagrammidelt *(joonis 12*). Välja on toodud diagrammid just Põhjamere kohta, kuna sellest asukohast võeti kõige enam erineva töötlusega proove ning seetõttu oli ka võimalik töötluste vaheline võrdlus. J*ooniselt 12* näeme, et UV töötluse puhul puuduvad üleesindatud OTUd ning UV töötluse läbinud ballastvee mikroobikooslus varieerub pigem vastavalt proovi päritolule või laevale (*joonis 10B*). Lisaks näeme *jooniselt 12*, et Põhjamere töötlemata proovides esinevad mõned sellele iseloomulikud taksonid (nt *Flavobacteriales*, *SAR11 clade*, *Thiotrichales*), mis jäid alles ka peale "UV-töötlus kahtlane" proovide eemaldamist (*joonis 12B*).



Joonis 12. Üksikute bakteriliikide kvantitatiivne üle- ja alaesindatus Põhjamere ballastvee proovides (nn *volcano plot*). A paneel (vasakul) tähistab OTUde esinemist UV töötluse läbinud ja töötlemata proovide vahel ("UV töötlus kahtlased" proovid sisalduvad UV töötluse grupis); B paneel (paremal) näitab OTUde esinemist töötluste vahel peale "UV töötlus kahtalsed" proovide eemaldamist.

3.8 Mikroobikoosluste aastaajaline muutlikkus

Aastaaegade vaheldumise tõttu muutuvad ka merebakterite kooslused, mis sõltuvad väga paljudest teguritest. Läänemere bakterite aastaajalist muutlikkust on küll varasemalt kirjeldatud (Andresson et al 2010), aga see sõltub palju konkreetsest asukohast ja ka vaatluse all olevast aastast. Antud uuringus ei olnud mikroobikoosluste aastaajalise muutlikkuse hindamine eesmärgiks ja puudus ka võimalus erinevate ballastvee allikate aastaajalisi muutusi analüüsida, samas on oluline seda arvestada. Muuga sadama bakterikoosluse muutlikust illustreerib *joonis 13.* Kuigi enamus proove on kogutud jahedamal perioodil (sügis 2019 ja talv-varakevad 2020), on näha, et kooslus muutub ajas palju. Seetõttu mõjutab aastaaeg ka ballastveega sisse toodud bakterite ellujäämist ning edasist levikut.

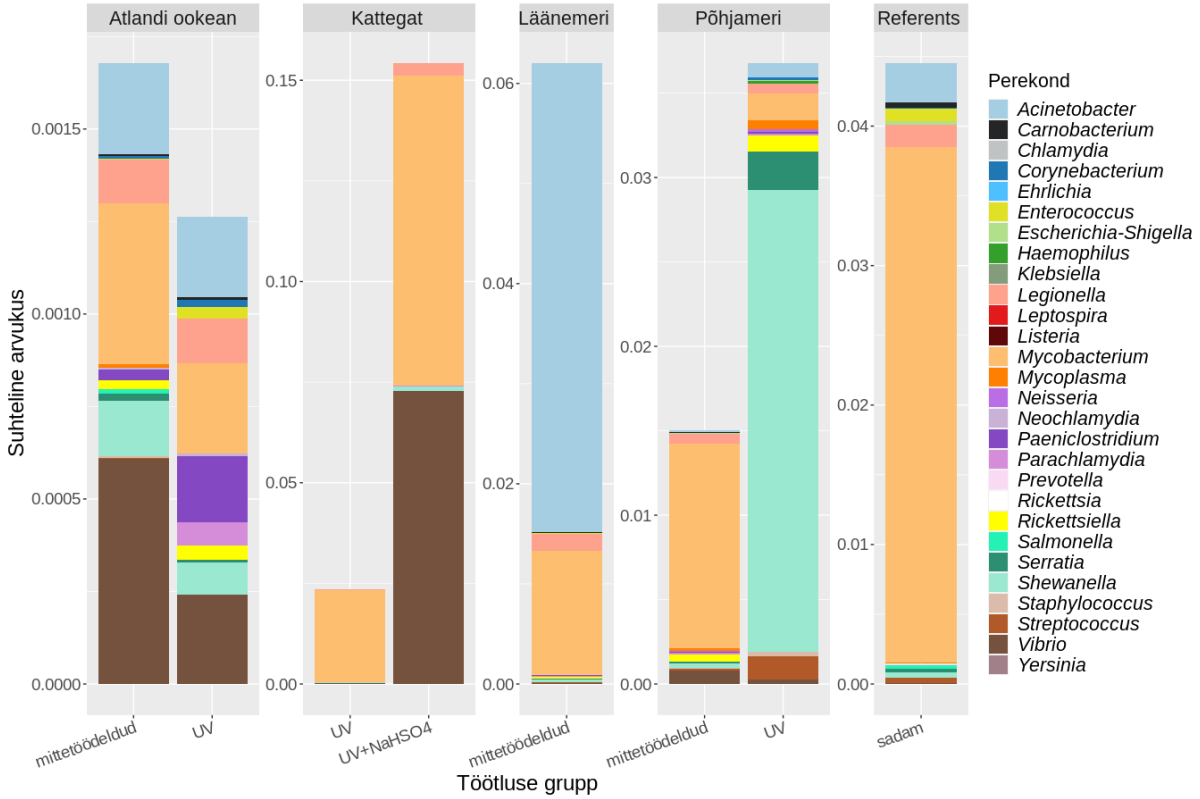


Joonis 13. Bakterikoosluse aastaajaline muutlikkus Muuga sadamast kogutud proovides.

3.9 Potentsiaalselt patogeensed bakterid

Klassifikatsiooni alusel analüüsiti mikroobikooslustes potensiaalste patogeenide esinemist ballastevee ja referentsproovides. Tuvastati 1260 OTUt, mis kuulusid patogeene sisaldavatesse perekondadesse (*joonis 14*). Nendest osad perekonnad omavad ka merekeskkonnale tavapäraseid mitte-patogeenseid liike, näiteks *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Shewanella* ja *Vibrio*. Suurem osa *Flavobacterium* liikidest on mittepatogeensed ja selle perekonna esinemine meres on väga tavapärane. Eriti tõuseb nende arvukus fütoplanktoni õitsengute ajal, sest neil on oluline roll vastava biomassi lagundamisel (Mühlenbruch *et al.*, 2018). Seetõttu jäeti see perekond *jooniselt 13* välja.
Patogeenne sisaldavad perekonnad olid arvukad ka UV-töödeldud proovides. Põhjamerest pärineva ballastvee puhul esines neid perekondi töödeldud proovides suhteliselt rohkem kui töötlemata ballastvees. Kuigi need bakterid ei ole enamuses suure tõenäosusega patogeensed, võib nende andmete alusel järeldada, et nendesse perekondadesse kuuluvad bakterid suudavad UV töötluse üle elada. Suurem suhteline arvukus ei tähenda, et neid baktereid on numbriliselt rohkem kui töötlemata ballastvees, aga tõenäoliselt suudavad need perekonnad UV töötluse edukamalt üle elada võrreldus teisete mereliikidega. Samuti võivad

ballastvee mahutis valitsevad tingimused olla neile sedavõrd soodsad, et nad suudavad ballastvee mahuteid edukamalt koloniseerinud kui teised liigid.

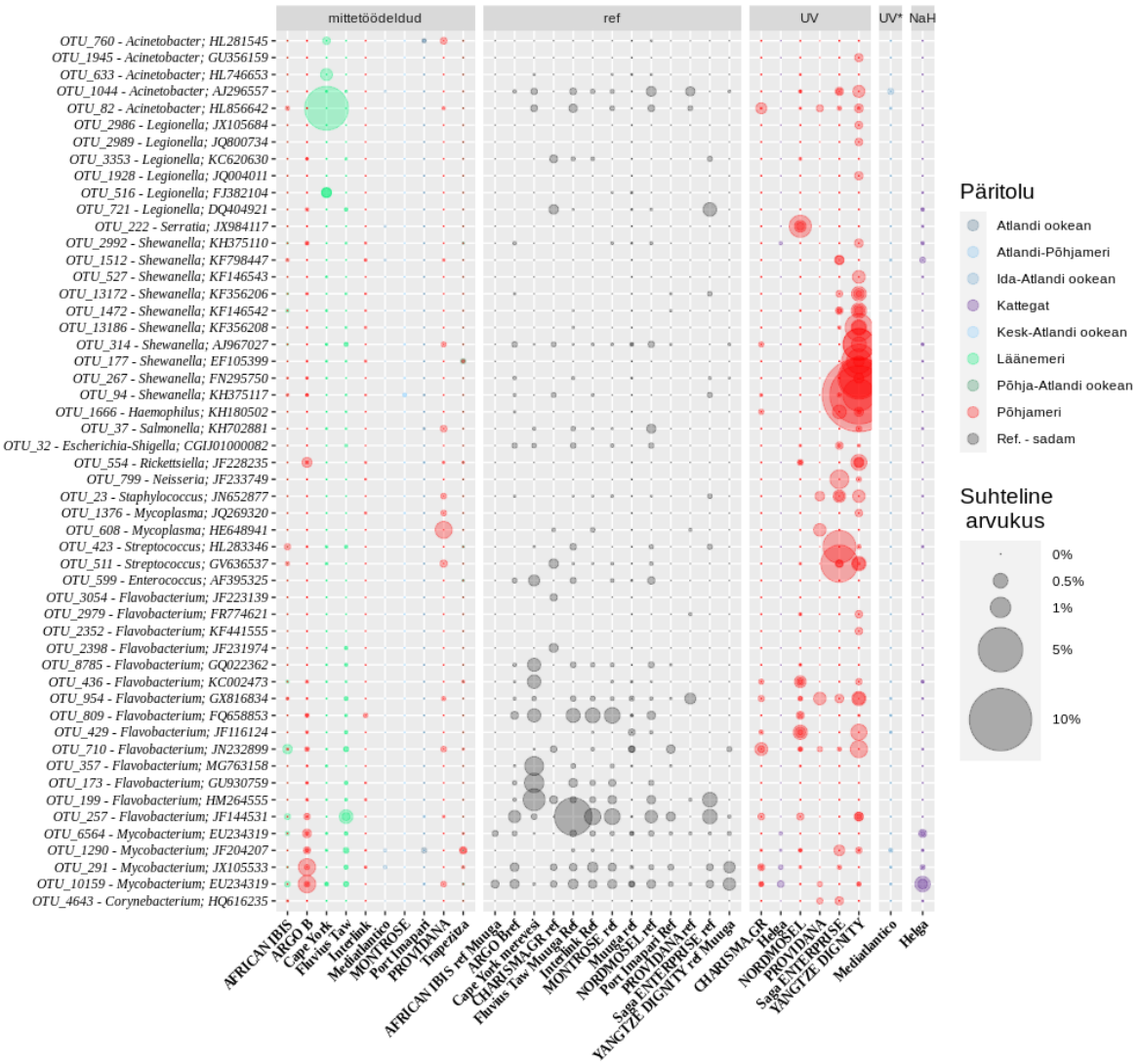


Joonis 14. Potentsiaalselt patogeensete bakteriperekondade suhteline hulk erinevates proovirühmades.

Nendest 102 OTUt olid patogeensete mikroobide mõistes suhteliselt arvukad ehk panustasid rohkem kui 0,1% kooslusest vähemalt ühes proovis. Neid OTUsid filtreeriti omakorda *Genbank* andmebaasi lähimate vastete alusel ning eemaldati grupid, mis omasid suurimat sarnasust keskkonnast (meri, järved, muld) pärinevate bakterite 16S rRNA geenijärjestustega, misläbi eemaldati 50 OTUt. Nende OTUde hulka kuulusid ka *joonisel 15* suure fraktsiooni panustanud *Acinetobacter*, *Mycobacterium* ja *Vibrio* esindajad. Küll jäeti sisse OTUd, mida võis seostada saastunud keskkonnaga, näiteks reovesi, tugeva antropogeense surve all olevad jõed ja naftareostusega merevesi jt.

Ka ülejäänud 52 OTU hulka kuulusid taksonid, mis esinesid arvukalt sadamavees (eriti *Flavobacterium*) ja suure tõenäosusega patogeensed ei ole (*joonis 15*). *Yangtze Dignity* ballastvee proovides esinesid korduvalt ja arvukalt *Shewanella* esindajad ning nende lähim fülogeneetiline afiliatsioon kuulus nafta reostusega seotud isolaatidega, mis võib viidata reostusele ballastvee tangis. Sarnane seis esines *Cape York* ballastvee proovis, kus arvukalt esinev *Acinetobacter* on suure tõenäosusega alkaane lagundav bakter.

Laeva *Saga Enterprise* ballastveest tuvastatud *Neisseria, Staphylococcus* ja *Streptococcus* esindajad on lähedased inimese mikrofloora liikide ja haigustekitajatega. Sellelt laevalt koguti proove mitmel korral (UV töötlus kasutusel) ja neid potensiaalselt ohtlikke baktereid esines seal korduvalt, mis viitab asjaolule, et nad on püsivalt vastava ballastvee mahuti koloniseerinud; püsides selle vee, sette või biokile kooslustes.



Joonis 15. Potentsiaalselt patogeensete OTUde esinemine erinevate laevade ballastvee tankides. UV* - madal UV töötlus. NaH - UV + $NaHSO_4$.

4. Praktilised soovitused

Käsunduslepingus oli ettenähtud proovide kogumine eri liiki/suurusklassi laevadelt Eesti suurimatest sadamates: Tallinna Vanasadam, Muuga sadam, Sillamäe sadam ja Paldiski sadam. Kuna Läänemerest väljastpoolt tangitud ballastvett esineb vaid suurtes kaugsõidu laevades, siis sai ka ballastvee proove koguda suurtelt kaubalaevadelt, mis lastisid oma laadungi maha ja võtsid uue peale valdavalt Muuga ja Sillamäe sadamas. Tallinna vanasadamas kaubalaevad ja tankerid ei maabu, mistõttu jäi selle sadama külastamine ära. Paldiski sadamas peatuvatelt laevadelt ballastvee proove koguda on keeruline, kuna takistuseks saab laevade lühiajaline viibimine sadamas ja sellest tulenev soovimatus võõrastega tegeleda (laevakapten ei anna laeva külastamiseks nõusolekut). Silmas peab pidama, et keeldumise põhjuseks saab olla ka liiga hiline külastussoovist teatamine. Lisaks ajanappusele võivad proovivõtust keeldumise põhjuseks olla ka lossimise ja laadimistööde tööohutuse nõuded, mis ei soosi kõrvaliste isikute viibimist kail ja laevadekil või muud ebaselged põhjused.

Käsundusleping nägi ette ballastvee proovide kogumist sadamas peatuvatelt laevadelt enne ja pärast ballastvee väljutamist. Seda ülesannet ei õnnestu reaalelus täita, kuna selle ülesande täitmine nõuaks pikka või korduvat laeval viibimist ja pidevat sekkumist laevatöösse, mis ei olnud käesoleva uuringu raames teostatav. Samuti polnud võimalik ballastvee proove koguda erineva suurusega laevadelt nagu tööleping eeldas, kuna väikesed ja suur osa keskmistest laevadest tegutseb üksnes Läänemere piires (uurida tuli ennast väljaspool Läänemerd ballastinud laevu). Seetõttu tuleb ballastvee proove koguda vaid suhteliselt suurtelt laevadelt, mille DW on üle 30000 tonni ning ballastvett rohkem 1500 m^3.

Lisaks laeva suurusele on oluline, millist ballastvee käitlemise kava järgitakse. Uuemad laevad (*näit.* 2016.a. ehitatud *Medi Atlantica,* 2017.a. ehit. *Mordmosel,* 2017. a. ehit. *Interlink Nobility,* 2017.a. ehit. *Helga Bulker;* 2019.a. ehit. *Port Imabari*) olid ballastvee proovide nõuetekohaseks võtmiseks tehnika ja vahenditega oluliselt paremini varustatud kui enam kui kümme aastat tagasi ehitatud alused (*näit.* 2001.a. ehit. *Montrose*, 2001.a. ehit. *Cape York,* 2004.a. ehit. *African Ibis*). Suurema mahuga mikrobioloogiliste proovide võtmiseks on vanematel laevadel võimalik kasutada ballastvee mahuti kohal dekile avanevat luugiga suletavat ventilatsioonikaevu, uuematel laevadel on mootoriruumi välja ehitatud ballastvee proovide võtmine kraani kaudu torude süsteemist (*in-line*).

Kuna praegu kehtib konventsiooni täitmisega seotud järelevalve katseaeg (laevu konventsiooni rikkumise eest praegu veel ei karistata) on soovitatud proovivõtu kogemuse saamiseks igal liikmesriigil katsetada võimalusel erinevaid ballastvee proovivõtu ja analüüsimise tehnikaid ning protseduure, valida neis tõhusamaid ja jagada oma kogemust teistega.

Käesolevas uuringus on kasutatud epifluorestsentsmikroskoopililist ja molekulaargeneetilist uurimismeetodit. Neist esimest võib pidada klassikaliseks, teist suhteliselt uueks ja kiiresti arenevaks. Kumbagi meetodit pole seni rutiinses ballastvee kontrollis kasutatud, kui siis üksnes teaduslikel eesmärkidel. Epifluoressentsmikroskoopia on tavalise mikroskoopia edasiarendus ning sobilik meetod mikroorganismide kogumi fenotüüpiliseks iseloomustamiseks, arvukuse ja biomassi määramiseks. Molekulaargeneetilised meetodid (sekveneerimine) võimaldab organisme genoomi põhiselt identifitseerida ja sellest tulenevaid

omadusi iseloomustada. Koos kasutamisel on need meetodid teineteist täiustavad ning väga informatiivsed. Mikroskoopilist analüüsi (vaatlust) on suhteliselt lihtne läbiviia: proovi maht on väike, seda saab kohapeal fikseerida, mistõttu proovid säilivad pikalt muutumatuna. Veeproovist mikroskoobi preparaadi valmistamine võtab aega 15-20 minutit. Epifluorestsentsmikroskooplilne meetod on paindlik ning võimaldab kiiresti visuaalsete tunnuste alusel eristada töötlemata merevett töödeldust, ning merevees leiduvate organismide koosluse alusel (tüüpliikide alusel) ka ühe veekogumi vett teise veekogumi veest (*näit.* Atlandi ookeani vett Läänemere veest). Samuti on spetsiaalseid nulleiinhapete markervärve (AO) kasutades hinnata vees leiduvate mikroorganismide elulisust. Selgus, et UV-töötlemise käigus oksüdeeritakse vees leiduv partikulaarne detriit amorfseks orgaanikaks ning tapetakse valdav osa fütoplanktonist, ellu jääb osa bakteritest ja algloomadest (eelkõige ripsloomad).

Viimastel aastatel on üha enam ballastvee uuringutes kasutatud molekulaarsete metoodikaid ning see on esile toonud sellise lähenemise suure potensiaali vastavaks seireks (nt Darlinga ja Frederick, 2018). Molekulaargeneetilised meetodid võimaldavad ühelt poolt uurida terveid elusorganismide kooslusi (st mitte ainult mikroorganisme) ja teisalt analüüsida väga spetsiifilisi tunnuseid (näiteks patogeenide serotüüpe). Käesolevas analüüsis kasutati esimest lähenemist et saada esialgne ülevaade mikroobsete koosluste varieeruvusest ning muutustest Eesti sadamaid külastavate laevade ballastvees.

Antud uuringus kasutati molekulaarset lähenemist, mis võimaldab saada üldisema ülevaate mikroorganismide mitmekesisusest uuritavates proovides. Eeldatult olid kooslused erinevad sõltuvad sellest kust ballastvesi pärines (geograafiline asukoht ja soolsus), samuti mõjutas kooslusi aastaaeg. Ballastvee UV töötluse mõju jäi mitmel põhjusel ebaselgeks, samuti ei saa väga täpselt hinnata kui oluliseks patogeensete bakterite allikaks võib laevade ballastvesi olla, kuna kasutatud metoodika ei võimalda täpselt määrat millised tüved omavad virulentsust. Siiski viitab tehtud uuring hetkeseisus UV töötluse madalale efektiivsusele, mis võib olla tingitud ka sellest, et tingituna kohustuse puudumisest ei viidud ballastvee töötlust nõuetekohase rezhiimis ja võimsusega. UV-töötlus, et see ka reaalsuses toimiks, on väga energiakulukas (see oli ka üks UV-töötluse mitterakendamise põhjendus laevameeskonna poolt) ning tuleks mõelda alternatiivsetele meetoditele. Arvatavsti annaks parimaid tulemusi mitme erineva meetodi kombineerimine. UV-töötlusest efektiivsem oleks kindlasti osoneerimine. Praktilise proovivõtu käigus ja saadud andmete alusel saab öelda, et oluline on ka ballastvee tankide korraline hooldamine, mis hõlmaks mahuti täielikku tühjendamist, sette eemaldamist ja pindade puhastamist. Selle abil saaks vältida olukorda kus ballastvee mahutid funktsioneerivad mereorganismide ja bakterite kasvatamise “inkubaatoritena”. Toitaineterikkas keskkonna võivad ellujäämise eelised saada ka potentsiaalselt ohtlikud mikroorganismid ning toimuda patogeensete geenide horisontaalne transport - tekkida ebatüüpiliste tunnustega haigustekitajad. Sellest aspektist on eriti ohtlik ballastvee töötlemine ballastvee mahutite täitmisel, sissepumpamisel, mille tulemusena tagundatakse vees leiduv materjal kergesti omastavateks toitaineteks.

Kokkuvõtteks soovitame edasiste uuringute planeerimisel arvestada:

- erinevatel viisidel kogutud väikesemahuline ballastvee proov ei pruugi olla esinduslik, et kirjeldada kogu mahutit, selle põhjas leiduvad settekihti, tangi seintel leiduvat biokilet ning ballastvee erinevaid kihte. Seetõttu tuleks leida võimalused kogutavate proovide diapasooni laiendamiseks;

- Taksonoomial põhinev metoodika ei suuda tuvastada bakterite patogeensust, selleks tuleks läbi viia kogu mikroobse koosluses leiduva geneetilise materjali analüüs (ingl. *shotgun metagenomics*) et oleks võimalk leida virulentsete geenide sagedust;

- viiruste uurimiseks sobib samasugune eelpool viidatud metoodika, viiruste fraktsioon tuleb siiski eraldi välja filtreerida;

- raku ja viiruste vabast filtraadist saab uurida keskkonna DNA järjestusi, mis annab ülevaate kõikide veeorganismide (plankton, kalad jne) jälgedest ballastvees. See võimaldab hinnata ühest küljest ballastvee võõrliikide sissekande ohtu, teisest küljest täpsustada ja kontrollida ballastvee päritolu;

- ballastvee töötlemise järelvalveks on sobilik kasutada fluorestsentsmikroskoopiat;

- konventsioonis nõutud ühe patogeense (*Vibrio cholerae*) ja kahe fekaalse indikaatori (*Escherichia coli,* soole enterokokid) olemasolu tuvastamiseks ballastvees on turul saadaval spetsiaalsed portatiivsed testikomplektid, mis on kasutatavd vahetult peale proovide võtmist laeval. Nende kasutamist tuleks katsetada ja nende sobivust täiendavalt valideerida. Selline testikomplekt kõrvaldaks statsionaarse labori teenuse kasutamise vajaduse, mis käesoleva projekti raames osutus väga keeruliseks.

- edasised uuringud peaksid hõlmama lisaks mikroorganismidele ka suuremamõõduliste võõrliikide (zooplankton, fütoplankton) tuvastamise metodoloogilisi ja tehnoloogilisi katsetusi koos laevade proovivõtuvalmiduse uuringuga.

Kasutatud kirjanduse loetelu

Andersson, A., Riemann, L. and S. Bertilsson, 2010. Pyrosequencing reveals contrasting seasonal dynamics of taxa within Baltic Sea bacterioplankton communities. *ISME J* 4, 171–181.

Bradie, J., Broeg, K., Gianoli, C., He, J., Heitmüller, S., Curto, A. L., ... and J. V. Byllaardt, 2018a. A shipboard comparison of analytic methods for ballast water compliance monitoring. *Journal of sea research*, 133, 11-19.

Bradie, J., Gianoli, C., Linley, R. D., Schillak, L., Schneider, G., Stehouwer, P., and S. Bailey, 2018b. Catch me if you can: Comparing ballast water sampling skids to traditional net sampling. *Journal of Sea Research*, *133*, 81-87.

Darling, J.A. and R.M. Frederick, 2018. Nucleic acids-based tools for ballast water surveillance, monitoring, and research. *Journal of sea research*, *133*, pp.43-52.

Drake, L.A., Meyer, A.E., Forsberg, R.L. *et al.* Potential Invasion of Microorganisms and Pathogens via 'Interior Hull Fouling': Biofilms Inside Ballast Water Tanks. *Biol Invasions* 7, 969–982 (2005). https://doi.org/10.1007/s10530-004-3001-8

Gollasch, S. (2006). A new ballast water sampling device for sampling organisms above 50 micron. *Aquatic Invasions*, *1*(1), 46-50.

Guidance on ballast water sampling and analysis for trial use in accordance with the BWM Convention and Guidelines (G2).International Convention for the Control and Management of Ships' ballast Water and Sediments, 2004. BWM.2/Circ.42 http://www.imo.org/en/KnowledgeCentre/IndexofIMOResolutions/Marine-Environment-Protection-Committee-(MEPC)/Documents/MEPC.173(58).pdf

Herlemann, D., Labrenz, M., Jürgens, K. *et al.* Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J* 5, 1571–1579 (2011). https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41

Hobbie, J. E., Daley, R.J. and S. Jasper, 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol*. 33: 1225-1228.

Lymperopoulou, D.S. and F.C. Dobbs, 2017. Bacterial diversity in ships' ballast water, ballast-water exchange, and implications for ship-mediated dispersal of microorganisms. *Environmental Science & Technology*, 51(4), pp.1962-1972.

MEPC 65 (13 to 17 May 2013) approved the Guidance on ballast water sampling and analysis for trial use in accordance with the BWM Convention and Guidelines (G2), as agreed by BLG 17 (4 to 8 February 2013), set out in the annex.

Middelboe, M. and C.P. Brussaard, 2017. Marine viruses: key players in marine ecosystems. *Viruses*. Oct; 9(10): 302.

Mühlenbruch, M., Grossart, H.P., Eigemann, F. and M. Voss, 2018. Mini- review: Phytoplankton- derived polysaccharides in the marine environment and their interactions with heterotrophic bacteria. Environmental microbiology, 20(8), pp.2671-2685.

Sutherland, T.F and C.D. Levings, 2013. Quantifying non-indigenous species in accumulated ballast slurry residuals (swish) arriving at Vancouver, British Columbia. Progress in Oceanography,115,211-218, https://doi.org/10.1016/j.pocean.2013.05.015

Sunagawa, S., Acinas, S.G., Bork, P. *et al. Tara* Oceans: towards global ocean ecosystems biology. *Nat Rev Microbiol* 18, 428–445 (2020). https://doi.org/10.1038/s41579-020-0364-5

SOP for Inline Ballast Water Sampling_ICES/IOC/IMO Working Group on Ballast and Other Ship Vectors (WGBOSV). Version 1.0. Copenhagen, 2017

Standard Operating Procedures. Collection of Treated Ballast Water Samples using an Inline Sample Port. Version 1.0 ICES/IOC/IMO Working Group on Ballast and Other Ship Vectors (WGBOSV), Copenhagen, Denmark, 2017

Yang, B., Wang, Y. and P.Y. Qian, (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC bioinformatics*, *17*, 135. https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y

Lisad

Lisa 1 **Konventsiooni reeglis D-2 sätestatud nõuded merre suunatavale ballastveele** (*MEPC 65 (13 to 17 May 2013) approved the Guidance on ballast water sampling and analysis for trial use in accordance with the BWM Convention and Guidelines (G2), as agreed by BLG 17 (4 to 8 February 2013)*

Name	Size	D2 standard	How to detect them
Bacteria	<10 µm	Less than 3 CFU (Colony forming units) per milliliter of water.	Bacteria can only be identified by growing them ("colonies") in Petri boxes or equivalent. Small sample but several hours or even days are necessary.
Phytoplankton	> 10 µm < 50 µm	Less than 10 viable organisms per milliliter of water.	Phytoplankton or Algae uses chloro-phyll like other plants. In dead organisms the chlorophyll degrades rapidly. A small sample can be tested in a matter of minutes using fluoroscopy.
Zooplankton	>50 µm	Less than 10 viable organisms per cubic meter of water.	A large quantity of water (typ. > 1/2 m3) must be filtered and the living or viable organisms identified from the dead/non-viable. Needs several minutes of pumping, laboratory tools and qualified personnel. Some organisms may have been killed during pumping or transportation making the detection less accurate & reliable.
Phytoplankton	<10 µm	Not covered.	A future evolution of the Ballast Water Convention will probably include those, similar to the bigger ones.

Lisa 2 **Külastatud laevade iseloomustus suuruse ja kandevõime järgi.**

Laeva DWT, t *vahemik*	***Arv***	***Laeva nimi***	***Ehitus -aasta***	***Laeva tüüp***	***Lipu riik***	***Laeva pikkus x laius, m***	***Laeva DWT, t***
>60 tuh.	2	*Medi Atlantico*	2016	Puistlastilaev	Liberia	199.98 × 32.26	60550
		Port Imabari	2019	Puistlastilaev	Marshalli saared	199.9 x 32	63475
50-60 tuh	1	*Providana*	2007	Üld-kaubalaev	Singapur	213 x 32	54810
40-50 tuh	1	*Saga Enterprise*	2006	Üld-kaubalaev	Hong Kong	199.2 x 30.6	46550
30-40 tuh	7	*Helga Bulker*	2017	Puistlastilaev	Marshalli saared	179.97 × 30	34483
		Nordmosel	2017	Puistlastilaev	Malta	180 × 32	38625
		Argo B	2010	Puistlastilaev	Marshalli saared	179.9 x 28.4	35314
		Charisma GR	2019	Puistlastilaev	Marshalli saared	179.9 x 30	37295
		Interlink Nobility	2017	Puistlastilaev	Marshalli saared	179.95 x 32	38748
		African Ibis	2004	Puistlastilaev	Bahama saared	177 x 28.4	32347
		Yangtze Dignity	2012	Puistlastilaev	Hong Kong	179.9 x 28.4	32414
20-30 tuh	3	*Cape York*	2001	Üld-kaubalaev	Hong Kong	170 x 28	28471
		Trapezitza	2004	Puistlastilaev	Malta	168 x 25	21454
		Montrose	2001	Puistlastilaev	Marshalli saared	178.4x 26	27028
< 10 tuh	1	*Fluvius Taw*	2000	Kaubalaev	Barbados	95.0 x 13.2	5050

Lisa 3. Külastatud laevad, ballstvee päritolu, soolsu, töötlus ja bakterite sisaldus (BÜA)

Nr	Kuupäev	Laev	Sadam	Ballastvee päritolu	Proovi nr	Soolsus psu*	Proovivõtu koht	Töötlus	BÜA, rakku/ml	Varieeru-vus,
1	13.07.2019	Providana	Muuga	Põhjameri	1	29,9	*in-line*,WTR	puudub	462494	27,6
				Põhjameri	2	27,4	*in-line*,WTR	puudub	880006	23,0
				Põhjameri	3	23,7	*in-line*,WTL	UV-töötlus	410543	27,0
				Muuga laht	4	6,1	referents	referents	6262681	17,8
2	13.09.2019	Cape York	Muuga	Muuga s.	1	4,9	referents	referents	6659919	35,4
				Klaipeda s.	2	6,5	otse mahutist, TBT	puudub	2574763	33,9
				Klaipeda s.	3	6,1	otse mahutist, DBT	puudub	2546887	35,0
				Klaipeda s.	4	6,5	otse mahutist, TBT	puudub	1760013	43,0
3	04.10.2019	Trapezitza	Muuga	Muuga s.	1	5,5	referents	referents	1741006	21,4
				Põhjameri	2	19,1	otse mahutist, FPT	puudub	511278	31,8
				Põhjameri	3	19,1	otse mahutist, FPT	puudub	358845	47,6
				Atland	4	31,6	otse mahutist, WT	puudub	421947	49,1
				Atland	5	31,6	otse mahutist, WT	puudub	793210	82,8
4	24.10.2019	Helga Bulker	Sillamäe	Kattegat	1	6,2	otse mahutist, WTL	UV-töötl.(?)	1587053	19,7
				Kattegat	2	7,0	otse mahutist, WTR	UV-töötl.(?)	1528132	19,9
				Kattegat	3		*in-line*, PT	UV+$NaHSO_4$	230455	45,5
				Kattegat	4		*in-line*, PT	UV+$NaHSO_4$	129245	58,4
5	07.11.2019	Medi Atlantico	Muuga	Muuga s.	1	5,8	referents	referents	560695	26,9
				Atland	2	30,7	helitorust, WBT3p	UV-töötlus	539788	77,0
				Atland	3	29,7	helitorust, WBT3s	UV-töötlus	815384	66,6
				Atland	4	32,0	mahutist, WBT5s	puudub	935126	19,7
				Atland	5	30,9	mahutist, WBT p	UV-töötlus	148252	71,7
6	29.11.2019	Nordmosel	Muuga	Muuga s.	1	6,4	referents	reference	488470	22,8
				Põhjameri	2	8,6	helitorust, WBT4ps	UV-töötlus	954132	31,7
				Põhjameri	3	10,2	helitorust, WBT2ps	UV-töötlus	446022	42,9
				Põhjameri	4	14,3	helitorust, WBT1ps	UV-töötlus	747594	32,7
7	16.01.2020	Fluvius Taw	Muuga	Muuga s.	1	5,3	referents	referents	629119	28,0
				Põhjalaht	2	4,5	otse mahutist, WTR	puudub	973139	42,1
				Põhjalaht	3	4,6	otse mahutist, WTR	puudub	710848	37,4
				Põhjalaht	4	4,6	otse mahutist, WTR	puudub		
8	12.02.2020	Argo B	Muuga	Muuga s.	1	5,7	referents	referents	292702	38,9
				Põhjameri	2	28,7	rõhuventiilist, DBT2	puudub	332616	29,6
				Põhjameri	3	31,0	rõhuventiilist, DBT3	puudub	420046	34,3
				Põhjameri	4	21,4	rõhuventiilist, DBT4	puudub	575901	23,6
9	17.02.2020	Montrose	Muuga	Muuga s.	1	5,6	reference	referents	301572	25,6
				Atland, Dakar	2	32,5	otse mahutist, TST2	puudub	501775	20,4
				Atland, Dakar	3	32,1	otse mahutist, TST2	puudub	548658	33,6
				Atland, Dakar	4	31,9	otse mahutist, TST2	puudub	651293	34,0
10	28.02.2020	Saga Enterprise	Muuga	Muuga s.	1	5,6	referents	referents		
				Põhjameri	2	29,2	otse mahutist, 11p I	UV-töötlus		
				Põhjameri	3	29,5	otse mahutist, 11p I	UV-töötlus		
				Põhjameri	4	29,6	otse mahutist, 11p I	UV-töötlus		
11	09.03.2020	Charisma GR	Muuga	Muuga s.	1	5,8	referents	Referents		
				Põhjameri	2	27,8	helitorust, WBT3p	UV-töötlus		
				Põhjameri	3	27,8	helitorust, WBT3p	UV-töötlus		
				Põhjameri	4	27,8	helitorust, WBT3p	UV-töötlus		
12	11.03.2020	Interlink Nobility	Muuga	Muuga s.	1	6,0	referents	referents	547391	21,5
				Põhjameri	2	31,6	otse mahutist, WT4	puudub	420046	14,5
				Põhjameri	3	31,6	otse mahutist, WT4	puudub	355424	22,3
				Põhjameri	4	31,6	otse mahutist, WT4	puudub	387735	24,0
13	27.04.2020	Port Imabari	Muuga	Muuga s.	1	5,1	referents	Referents	3307152	28,8
				Atland	2	31,9	*in-line*, APT	puudub	622467	23,2
				Põhjameri	3	29,4	*in-line*, WBT5	puudub	1099850	25,8
				Atland	4	28,9	*in-line*, WBT1	puudub	694375	20,2
14	30.04.2020	African Ibis	Muuga	Muuga s.	1	5,4	referents	referents	3029655	19,4
				Põhjalaht	2	5,4	otse mahutist, FPT	puudub	1775218	28,1
				Põhjameri	3	27,2	otse mahutist, WBT	puudub	1144198	44,2
				Põhjameri	4	28,4	otse mahutist, WBT	puudub	1406490	24,8
15	03.05.2020	Yangtze Dignity	Muuga	Muuga s.	1	5,4	referents	referents	1360874	22,3
				Põhjameri	2	8,1	*in-line*, DBT1	UV-töötlus	564497	25,9
				Põhjameri	3	8,1	*in-line*, DBT1	UV-töötlus	1140397	23,1
				Põhjameri	4	8,0	*in-line*, DBT1	UV-töötlus	771669	25,1