



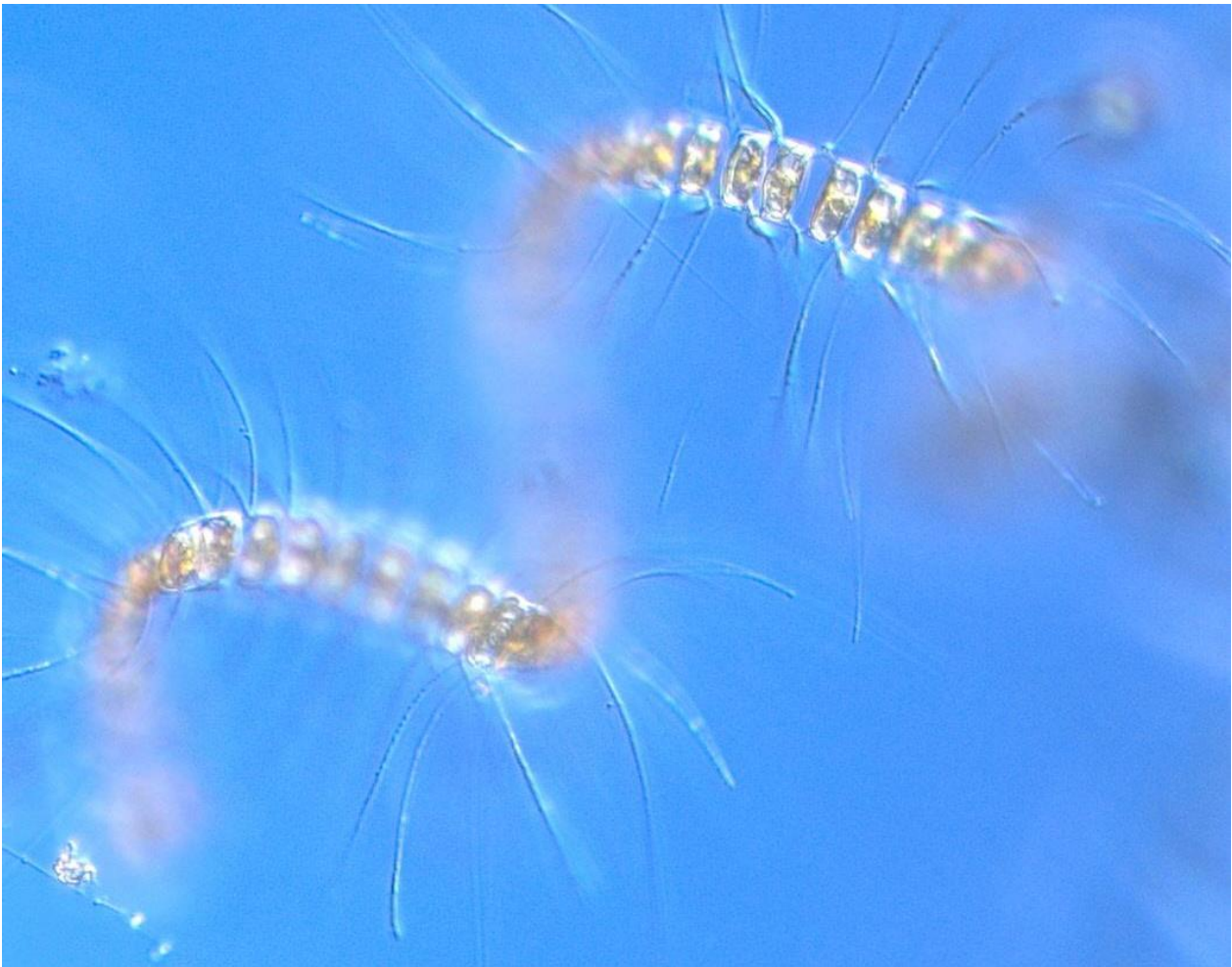
SciLifeLab

SMHI

Havs
och Vatten
myndigheten

Miljöövervakning av växtplankton i Kattegatt och Östersjön med rDNA-barcoding och mikroskopi

En jämförelse av molekylärbiologisk metodik och mikroskopi



Detta är en rapport som har tagits fram på uppdrag av Havs- och vattenmyndigheten. Rapportförfattarna ansvarar för innehållet och slutsatserna i rapporten och innebär inte något ställningstagande från Havs- och vattenmyndighetens sida

Havs- och vattenmyndigheten

Datum: 2018-07-05

Omslagsfoto: Kiselalgen *Chaetoceros curvisetus*, foto Ann-Turi Skjevik

ISBN 978-91-88727-13-8

Havs- och vattenmyndigheten

Box 11 930, 404 39 Göteborg

www.havochvatten.se

Miljöövervakning av växtplankton i Kattegatt och Östersjön med rDNA-barcoding och mikroskopi

En jämförelse av molekylärbiologisk metodik och mikroskopi

Bengt Karlson, Malin Mohlin, Yue O. O. Hu och Anders F.
Andersson

Havs- och vattenmyndighetens rapport 2018:22

SAMMANFATTNING	7
ABSTRACT	8
INLEDNING	9
Syftet med rapporten	9
Bakgrund	9
Om metodik för analys av planktonprover	9
Mikroskop-baserad analys av växtplanktonprover	9
Molekylärbiologisk teknik för analys av planktonprover	10
MATERIAL OCH METODER	12
Provtagning och lagring av prover	12
Klorofyll a	13
Mikroskopi-baserad analys	13
Extraktion av DNA, PCR amplifiering och sekvensiering av rDNA.....	13
Från sekvenser till biodiversitet	13
RESULTAT	14
Salthalt, temperatur och klorofyll.	14
Resultat från mikroskopi och rDNA.....	15
Översikt biodiversitet	15
Cellantal, biovolym och biomassa	22
Översikt - totalt antal taxa och "Operational Taxonomic Units"	24
Cyanobakterier	27
Eukaryota plankton.....	30
Metazooplankton.....	51
DISKUSSION OCH SLUTSATSER	52
REKOMMENDATIONER	55
Förslag	56
Referensmaterial	56
Utökad pilotstudie.....	56
Provtagning inom nationell miljöövervakning	56
Sekvensering och upparbetning av rDNA data	56
Ackrediterade laboratorier	56
Dataflöde och databaser.....	57
Övrigt internationellt samarbete	58
ERKÄNNANDEN.....	58
FÖRKORTNINGAR OCH ORDFÖRKLARING.....	58
REFERENSER	59

Sammanfattning

Växtplankton utgör en viktig del av den marina näringsväven. Därför pågår nationell och regional övervakning av växtplanktons utbredning i tid och rum, antal, biomassa och biodiversitet i haven runt Sverige. EU-direktiv och mellanstatliga konventioner influerar övervakningens utformning. Vissa algbloomningar kan vara skadliga, därför finns ett visst fokus på alger som producerar gifter eller är skadliga på annat sätt. För att utföra övervakningen på ett kostnadseffektivt sätt behöver flera olika metoder kombineras. I den här rapporten presenteras resultat från en jämförelse av mikroskopbaserad analys av växtplanktonprover med resultat baserad på rDNA-metabarcoding. Provtagning skedde med hjälp av ett så kallat FerryBox-system i juli 2013 på arton platser längs en salthalts-gradient (ca 3-24 promille) från Bottenviken via Bottenhavet och Egentliga Östersjön till Kattegatt. Resultat från rDNA metabarcoding visade på en mycket större biodiversitet jämfört med data från mikroskopi. Totalt 89 olika organismer identifierades med mikroskop (Utermöhl-metoden). Bland dessa ingår samlingsgrupper som "oidentifierade flagellater" och "oidentifierade encelliga organismer". Baserat på rDNA data noterades totalt ca 2000 olika organismer (exklusive heterotrofa bakterier) vilket innebär att mer än 95% av biodiversiteten förbisågs med Utermöhl-metoden. För prokaryoter (16S rDNA) noterades 36 olika Operational Taxonomic Units (OTUs) för cyanobakterier och för eukaryoter (18S) noterades 1860 olika OTU. Flera organismer som noterades med mikroskopi saknades helt i rDNA data. Det tyder på att referensdatabaser för 16S och 18S rDNA saknar sekvenser för vanligt förekommande arter i haven runt Sverige. Det kan också bero på att just sekvensdelen 18S är identisk för vissa arter/släkten, varför klassificeringen hamnade på en högre taxonomisk nivå.

rDNA-barcoding ger inte samma typ av data som mikroskopi, det saknas bl.a. motsvarigheter till cellantal och biomassa. En alternativ molekylärbiologisk metod är så kallad kvantitativ PCR (qPCR). Med qPCR kan mängden DNA för enskilda organismer bestämmas, mängden DNA är relaterat till cellantal. Idag är det endast möjligt att utföra qPCR på ett fåtal organismer i ett prov.

Författarna föreslår att rDNA-barcoding av plankton införs i marina övervakningsprogram i Sverige som komplement till annan metodik. Förutom att rDNA-data ger högupplöst information om biologisk mångfald, så har rDNA barcoding ett lågt pris per prov om många prover analyseras och är inte beroende av mikroskopisters skicklighet att identifiera organismer. Införandet bör innehålla följande delmoment: 1. Pilotstudie – rDNA-data för ett helt år jämförs med mikroskopi och flödescytometri; 2: Sekvensering av vanligt förekommande arter som saknas i referensdatabaser; 3: Standardisering av provtagningsprotokoll; 4: Standardisering av metodik för sekvensering; 5: Utveckling av qPCR för utvalda skadliga arter; 6: Standardisering av dataflöden och jämförelser med internationella referensdatabaser; 7: Uppbyggnad av system för datahantering hos nationell datavärd och 8: Utveckling av bedömning av miljöstatus gällande t.ex. biodiversitet och invasiva arter baserat på rDNA data.

Abstract

Phytoplankton is a fundamental part of the marine food web. Therefore, a national monitoring programme that is focused on the spatial and temporal distribution of phytoplankton in the sea around Sweden is ongoing. The design of surveillance is based on EU directives and intergovernmental conventions. Since some algal blooms can be harmful, there is a special focus on the algae that produces toxins and are potentially harmful in other ways. To carry out the monitoring in a cost effective way, several methods are conducted. This report presents a comparison of the results yielded by microscope-based analysis and rDNA metabarcoding-based analysis. Sampling was done with the help of a Ferrybox system in July 2013 in eighteen locations along a salinity gradient (3 - 24‰) from the Bothnian Bay through the Bothnian Sea and the Baltic Proper to the Kattegat. Results of rDNA metabarcoding showed a much greater biodiversity compared to the result from microscopic counting (Utermöhl method). In total, only 89 organisms were identified by Utermöhl method and the rest were marked as "unidentified flagellates" and "unidentified unicellular organisms". rDNA metabarcoding recorded a total number of almost 2,000 different organisms (excluding heterotrophic bacteria), which means that more than 95% of biodiversity was overlooked by Utermöhl method. Altogether 36 Operational Taxonomic Units (OTUs) were identified as cyanobacteria from the prokaryotes data (16S rDNA) and 1860 different OTUs were found in eukaryotes data (18S rDNA). There were still several organisms missing from the list that microscopic counting yielded. This result suggests that the reference databases for the 16S and 18S rDNA sequences lack some species common in the seas surrounding Sweden. Another reason may be that the 18S rDNA is identical to other species or a genus leading to that the classification is at a higher taxonomic level.

Metabarcoding provides different types of data than microscopic counting. The rDNA-based data can offer a high resolution on biodiversity but cannot offer data on cell counts and biomass as microscopic counting does. An alternative molecular biological method is known as quantitative PCR (qPCR) which can determine the amount of DNA from individual organisms so that the cell count of the organisms can be inferred. At present it is only possible to perform qPCR on a small number of organisms in a sample.

The authors suggest introducing the rDNA metabarcoding approach of plankton analysis in Swedish marine monitoring programs as a complement to other methods. Besides its advantage regarding the high resolution on biodiversity, rDNA barcoding has a low price per sample when many samples are analysed in one go, and it is not dependent on the taxonomists' skill on identifying organisms. The plan includes the following elements: 1. Pilot study - rDNA data from a full year should be compared with microscopy and flow cytometry data; 2: Sequencing of the common species in the Baltic that are missing in the reference databases; 3: Standardization of sampling protocols; 4: Standardization of sequencing method; 5: Developing qPCR method targeting selected harmful species; 6: Standardization of sequencing data and comparing it with the available reference databases; 7: Structuring the data management system for the monitoring data and 8: Development of the assessment of the environmental status regarding biodiversity and invasive species based on rDNA data.

Inledning

Syftet med rapporten

Syftet med den här rapporten är att beskriva en jämförelse av mikroskopi-baserad analys av vattenprover med rDNA-baserad analys av samma prover och att ge rekommendationer gällande införande av molekylärbiologisk analysmetodik av plankton inom svensk marin miljöövervakning.

Bakgrund

Växtplankton utgör grunden i den marina näringsväven. Artsammansättning, cellantal och biomassa ingår i marina miljöövervakningsprogram sedan länge. Det finns många anledningar att övervaka växtplanktonsamhällets artsammansättning. I EU:s vattendirektiv (EU 2000) och Havsmiljödirektiv (EU 2008 och 2010) ingår växtplankton i indikatorer relaterade till biodiversitet, introducerade arter, födovävar, övergödning m.m. Skadliga algbloomningar kan påverka marina ekosystem kraftigt. Biotoxiner, som produceras av vissa växtplankton, kan ansamlas i bl.a. musslor, och utgöra en hälsofara för människor. Inom HELCOM-COMBINE programmet för Östersjön (HELCOM 2015) pågår växtplanktonövervakning sedan slutet av 1970-talet. Även inom OSPAR-området, i vilket Kattegatt och Skagerrak ingår, är övervakning av växtplankton en viktig del. Riktlinjer för växtplanktonövervakningen inom OSPAR är under revision. Livsmedelsverket ansvarar för övervakning av algtoxiner i tvåskaliga skaldjur som skördas för konsumtion samt för övervakning av växtplankton som producerar dessa algtoxiner. Utöver nationell miljöövervakning pågår regional övervakning av växtplankton längs Sveriges kuster. En av flera anledningar är att uppfylla EU:s vattendirektiv (EU 2000). Denna övervakning administreras ofta av Länsstyrelser eller vattenvårdsförbund (Karlson 2014).

Om metodik för analys av planktonprover

I en skrift i Havs- och vattenmyndighetens rapportserie beskrivs olika typer av provtagningsutrustning och analysmetoder för plankton relativt detaljerat (Karlson 2014). En anledning till att olika metoder används är att det är önskvärt att fånga upp naturlig variabilitet i tid och rum på ett kostnads-effektivt sätt. I en rapport publicerad av UNESCO-IOC beskrivs olika metoder för växtplanktonanalys i detalj (Karlson et al. 2010).

Mikroskop-baserad analys av växtplanktonprover

Mikroskop har använts för att observera växtplankton i vattenprover sedan 1800-talet. Till en början användes planktonnät av silke för att koncentrera plankton men redan i början av 1900-talet noterade Lohmann (1911) att många planktonorganismer passerar genom nätet. Silke har ersatts av nylon men planktonnät är fortfarande inte ett kvantitativt sätt att koncentrera växtplankton. De mindre organismerna går rätt igenom nätet och många större

organismer trasas sönder. Utermöhl (1931 och 1958) använde sedimentationskammare för att koncentrera plankton. Denna metodik, kallad Utermöhl-metoden, är idag vanlig och har visat sig fungera mycket bra när den jämförts med andra metoder (Godhe et al. 2007). Edler och Elbrächter (2010) har beskrivet metodiken i detalj. Tyvärr fungerar Utermöhl-metoden inte för de minsta och talrikaste planktonorganismerna, så kallade nano- och pikoplankton. Nanoplankton (2-20 µm) är ofta svåra att identifiera med Utermöhl-metoden och kategorierna "unidentified flagellates" samt "unidentified unicells" används ofta. För pikoplankton (0.2-2 µm) använts vanligen fluorescensmikroskopi på prover som koncentrerats genom filtrering (MacIsac, 1993), alternativt används flödescytometri för analys av pikoplankton (Campbell, 2001).

De mikroskopibaserade metoderna ger information om biodiversitet, t.ex. vilka arter och hur många arter som finns i ett prov, abundans (t.ex. antal organismer per liter) och biomassa. Biomasse-bestämning utgår ifrån hur stor volym (cellvolym) en organism har (Olenina et al 2006). Utifrån cellvolym beräknas sedan kolinnehåll enligt omräkningsfaktorer som är specifika för olika grupper av plankton (Menden-Deuer och Lessard 2000).

Molekylärbiologisk teknik för analys av planktonprover

De flesta molekylärbiologiska tekniker för att identifiera plankton bygger på att det finns DNA sekvenser som är unika för en viss art eller ett släkte. Sekvenserna bör vara variabla mellan arter men konserverade inom arter. De behöver också omgärdas av låg-variabla regioner som möjliggör PCR-amplifiering av sekvensen med hjälp av PCR-primers som matchar DNAt hos en stor del av organismerna man vill identifiera. Det är också viktigt att det finns ett stort referensmaterial i form av sekvenser från kända organismer. Ofta används 16S rDNA (ribosomalt DNA) för bakterier, inklusive cyanobakterier, och 18S rDNA för eukaryota plankton. En fördel med dessa sekvenser, utöver vad som angivits ovan, är att de dessutom möjliggör analys av rRNA istället för rDNA. Det finns många fler kopior av rRNA i en cell jämfört med rDNA och analyserna blir därför enklare. En nackdel med att analysera rRNA är att antalet rRNA kopior per cell varierar stort mellan olika arter. I en och samma art kan antalet rRNA kopior variera beroende på fas i livscykel och beroende på tillväxtförhållanden. Dessutom är RNA mindre stabilt än DNA och är känsligare för nedbrytning.

Det finns flera olika typer av molekylärbiologiska metoder för planktonanalys. I så kallad Sandwich hybridisering används markörer som binder till rDNA eller rRNA i målorganismen. Ofta används fluorescerande markörer, i dessa fall används fluorescensmikroskop, eller annan utrustning som mäter fluorescens, för att detektera målorganismerna. En fördel med metoden är att samma organismer kan identifieras både utifrån morfologi och DNA om mikroskop används. The Environmental Sample Processor (ESP) är en sorts automatiserat minilaboratorium som bl.a. kan användas under vattnet och som automatiskt utför hybridisering av plankton koncentrerade på filter för att identifiera och räkna skadliga alger (Anderson et al 2012). En annan metod är så kallade

microarrays, eller "DNA-chip" där DNA eller RNA märks in med fluroforer och hybridiseras på ett chip som har "DNA prober" mot olika organismer i olika positioner på ytan. Med denna metod är det svårt att identifiera sekvenser som man inte visste fanns i provet på förhand. Precisionen av metoden blir också lidande av att DNAt till viss del kors-hybridiserar med prober för närbesläktade arter.

I den här rapporten används så kallad metabarcoding-teknik. Metoden har blivit populär sedan storskalig sekvensering (high throughput sequencing) utvecklats och blivit relativt billig att utföra. Alla organismer i ett vattenprov koncentreras på ett filter. Därefter amplifieras art-markör sekvensen (t.ex. en utvald del av rDNA) som man ska analysera m.h.a. PCR. Därefter sekvenseras ett stort antal av de PCR-amplifierade sekvenserna. Detta resulterar i ett stort antal "reads" av olika 16S och 18S sekvenser. Sekvenserna jämförs sedan med kända sekvenser i databaser. Ofta kan arter eller släkten identifieras men det finns även sekvenser som hör till organismer som saknas i referensdatabaserna, och vissa arter och t.o.m. släkten har identiska sekvenser vilket i dessa fall endast möjliggör klassificering på en högre taxonomisk nivå. Antalet sekvenser för en viss organism dividerat med totalantalet sekvenser ger en relativ abundans.

Medan sekvenseringen ger relativ abundans av olika sekvens-typer i provet ger den ingen absolut kvantifiering. Detta kan dock till viss del avhjälpas genom att räkna antalet växtplankton och/eller bakterieceller i provet med t.ex. flödes-cytometri och multiplicera de relativa abundanserna med totala antalet celler per volym. Alternativt kan man kvantifiera total mängd bakteriellt och/eller eukaryot rDNA i provet m.h.a. kvantitativ-PCR (q-PCR) och multiplicera de relativa abundanserna med dessa värden. Olika arter har dock olika antal kopior av rDNA-genen i cellen, vilket dessa metoder inte kan justera för. Genom att jämföra data för mikroskopiska kvantifieringar och (justerade) rDNA sekvenser för många prover så kan man troligtvis på sikt skapa art-specifika kalibreringskurvor. I Norge har man utvecklat q-PCR för några arter som orsakar fiskmortalitet (Engesmo 2016 och Engesmo et al. Manuskript).

Material och metoder

Provtagning och lagring av prover

Vattenprover samlades in 13-19 juli år 2013 i Kattegatt, Egentliga Östersjön och i Bottniska viken (Fig. 1). Ett så kallat Ferrybox-system ombord på lastfartyget TransPaper användes vid provtagning. Vatten pumpas in i fartyget från ca 3 m djup. Automatiska mätinstrument mäter temperatur, salthalt, syre, fluorescens från klorofyll m.m. Det finns även automatiska vattenprovtagare. Ferrybox-systemet är beskrivet i detalj av Karlson et al. (2016). Vattenproverna som användes i den här rapporterade studien samlades in genom att en kran öppnades, sedan fylldes en polykarbonatbehållare med ca 10 liter havsvatten vid varje provtagningstillfälle. Ur denna behållare togs sedan mindre provvolymen för vidare bearbetning. Vattnet i behållaren blandades om för att undvika att plankton sedimenterade till botten eller flöt upp till ytan. Prover för analys med Utermöhl-metoden konserverades med sur Lugols lösning och förvarades i rumstemperatur till dess att analysen startade. För rDNA sekvensering filtrerades en volym mellan 200 och 500 ml på 0.2 µm mixed cellulose ester membrane filters (Merck Millipore Inc.). Efter avslutad filtrering veks filtren ihop och stoppades ned i plastburkar (kryovialer) och frystes i flytande kväve. Filtren förvarades i flytande kväve eller vid -80 °C till dess att DNA-extraktion startade. För analys av klorofyll a filtrerades 200-500ml på Whatman GF/F filter med diametern 25 mm. Proverna förvarades på samma sätt som rDNA-proverna.

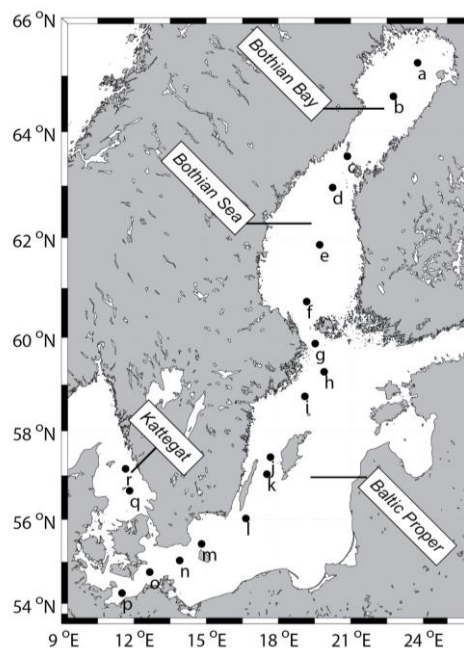


Fig. 1. Karta över provtagningspunkter. Källa för kartunderlag: <http://www.ngdc.noaa.gov/mgg/shorelines/data/gshhs/>

Klorofyll a

Fotosyntespigment analyserades med HPLC enligt Wright & Jeffrey (1997). Halterna av de flesta pigmenten, förutom klorofyll a, var så låga att de inte kunde kvantifieras. Endast klorofyll a koncentrationer rapporteras här.

Mikroskopi-baserad analys

Analysen utfördes enligt HELCOM-COMBINE (2015), se även Edler & Elbrächter 2010. Cellvolymen är enligt Olenina et al. (2006) med årliga uppdateringar av artlistor och cellvolymen enligt HELCOM Phytoplankton Expert Group. Artlistor med cellvolymen finns tillgängliga på www.ices.dk. Sedimentationskammare med en volym på 10 ml användes vid analyserna som utfördes med ett Nikon Diaphot inverterat mikroskop. Data har bearbetats med programvaran Plankton Toolbox (Karlson et al. 2015). Programvaran är gratis och finns tillgänglig på <http://nordicmicroalgae.org/tools>. Programvaran användes framförallt för aggregering till olika taxonomiska nivåer. Data från mikroskop-analys är fritt tillgängliga på Svenskt Oceanografiskt Datacentrum, www.smhi.se.

Extraktion av DNA, PCR amplifiering och sekvensiering av rDNA

DNA extraherades med PowerWater® DNA isolation kit (MO-BIO Laboratories Inc, Carlsbad CA, USA) enligt instruktioner från tillverkaren. V3-V4 regionerna av 16S rDNA PCR amplifierades med primrar 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) och 805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC) (Herlemann et al., 2011). V4-V5 regionerna av 18S rDNA amplifierades med primerar 574*F (CGGTAAYTCCAGCTCYV och 1132R (CCGTCAATTHCTTYAAR) (Hugerth et al., 2014). En tvåstegs PCR användes med totalt 35 respektive 38 PCR cykler för 16S och 18S rDNA. Sekvensieringen utfördes på Scilifelab i Stockholm med en Illumina MiSeq (Illumina Inc, USA). En mer detaljerad beskrivning finns i Hu et al. (2016).

Från sekvenser till biodiversitet

Utifrån de råa DNA sekvenserna togs så kallade Operational Taxonomic Units (OTU) fram. Metodiken för att ta fram OTU finns beskriven i <https://github.com/EnvGen/Tutorials>. USEARCH användes för ”quality trimming and OTU-clustering” (Edgar, 2010). För cyanobakterier användes 16S sekvenser av rDNA som jämfördes med databasen SILVA 119 SSU (Quast et al., 2013). För eukaryota organismer användes 18S sekvenser som jämfördes med sekvenser i databasen PR2 (baserad på GenBank 203 - October 2014, Guillou et al., 2013). En mer detaljerad beskrivning finns i Hu et al. (2016), tillgänglig här: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00679>

Resultat

Salthalt, temperatur och klorofyll.

I figur 2 finns kartor som visar salthalt, temperatur, klorofyllfluorescens och phycocyaninfluorescens från FerryBox-systemet. I Fig. 3 finns diagram över salthalt, temperatur och klorofyll. Salthalten varierade mellan 2.2 och 24.2. De lägsta salthalterna uppmättes i Bottenviken och de högsta i Kattegatt. Temperaturen varierade mellan 12.3 och 19.1 °C. Klorofyllhalten var låga, vilket är normalt för årstiden. Den lägsta halten uppmättes i Kattegatt (station r) och den högsta halten i Egentliga Östersjön (station m).

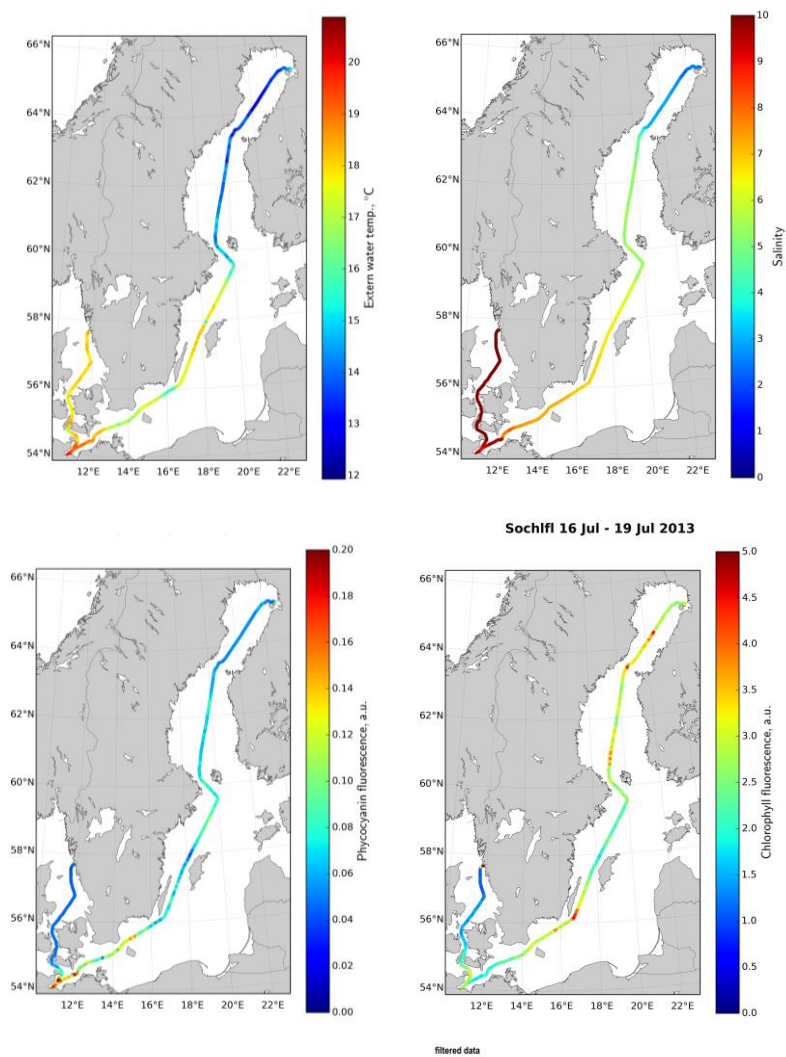


Fig. 2. Kartor som visar utvalda parametrar från de automatiska mätningarna med FerryBox-systemet. Källa för kartunderlag:

<http://www.ngdc.noaa.gov/mgg/shorelines/data/gshhs/>

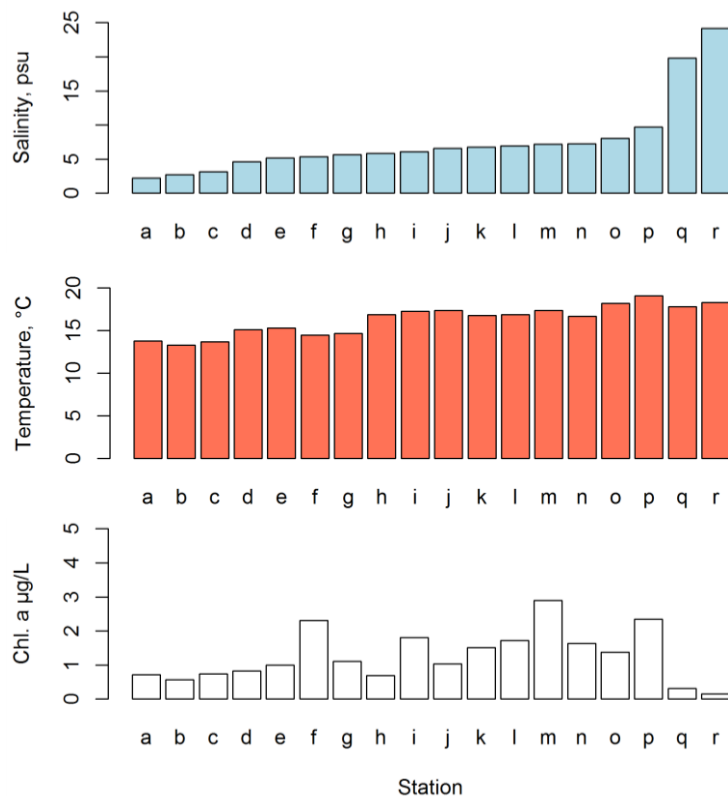


Fig. 3 Uppifrån och ned: Salthalt, temperatur och klorofyllkoncentration vid de olika provtagningspunkterna. Se Fig. 1 för karta.

Resultat från mikroskopi och rDNA

Översikt biodiversitet

Prover från arton stationer analyserades med både mikroskopi (Utermöhl-metoden) och rDNA-barcoding. Totalt 88 olika namn användes för organismer noterade med Utermöhlmetoden (tabell 1). Namnen innefattar arter, släkten, och ibland även andra taxonomiska nivåer samt namn på grupper av oidentifierade organismer. Trofityperna autotrof (benämns ofta fototrof), mixotrof och heterotrof användes. I gruppen "flagellates" ingick både autotrofa och heterotrofa organismer.

rDNA resultat, som sammanfattas i tabellerna 2-4, visar på att totalt 1860 olika Operational Taxonomic Units, OTU (unika 18S rDNA-gener) förekom i de arton proverna vilket indikerar 1860 olika eukaryota organismer. Etthundrafem (105) av dessa hörde till flercelliga djur (Metazoa), t.ex. större zooplankton. Övriga 1755 OTU representerar encelliga eukaryoter, ibland kallade protister. Resultat från 16S-data (prokaryota organismer) visar på totalt 1235 olika bakterier varav 156 cyanobakterier. Kompletta OTU-listor med DNA-sekvenser och namn finns som bilagor till Hu et al. 2016.

Tabell 1. Lista över organismer som noterades vid mikroskopyanalys av prover från 18 stationer.

Plankton Group	Class	Scientific name	Trophic type
Ciliophora	Gymnostomatea	Mesodinium rubrum	MX
Ciliophora	Oligotrichea	Helicostomella subulata	HT
Ciliophora	Prostomatea	Tiarina	HT
Ciliophora	Unidentified ciliates	Ciliophora	HT
Cryptophyta	Cryptophyceae	Hemiselmis	AU
Cryptophyta	Cryptophyceae	Leucocryptos marina	HT
Cryptophyta	Cryptophyceae	Plagioselmis prolonga	AU
Cryptophyta	Cryptophyceae	Teleaulax	AU
Cyanobacteria	Cyanophyceae	Anabaena	AU
Cyanobacteria	Cyanophyceae	Aphanizomenon	AU
Cyanobacteria	Cyanophyceae	Aphanizomenon flos-aquae	AU
Cyanobacteria	Cyanophyceae	Aphanocapsa	AU
Cyanobacteria	Cyanophyceae	Aphanothece paralleliformis	AU
Cyanobacteria	Cyanophyceae	Cyanodictyon	AU
Cyanobacteria	Cyanophyceae	Lemmermanniella	AU
Cyanobacteria	Cyanophyceae	Nodularia spumigena	AU
Cyanobacteria	Cyanophyceae	Pseudanabaena limnetica	AU
Cyanobacteria	Cyanophyceae	Snowella	AU
Cyanobacteria	Cyanophyceae	Woronichinia	AU
Bacillariophyta	Bacillariophyceae	Bacillariophyceae	AU
Bacillariophyta	Bacillariophyceae	Cylindrotheca closterium	AU
Bacillariophyta	Bacillariophyceae	Diatoma tenue	AU
Bacillariophyta	Bacillariophyceae	Nitzschia paleacea	AU
Bacillariophyta	Bacillariophyceae	Pseudo-nitzschia	AU
Bacillariophyta	Coscinodiscophyceae	Actinocyclus	AU
Bacillariophyta	Coscinodiscophyceae	Dactyliosolen fragilissimus	AU
Bacillariophyta	Coscinodiscophyceae	Guinardia delicatula	AU
Bacillariophyta	Coscinodiscophyceae	Guinardia flaccida	AU
Bacillariophyta	Coscinodiscophyceae	Leptocylindrus danicus	AU
Bacillariophyta	Coscinodiscophyceae	Leptocylindrus minimus	AU
Bacillariophyta	Coscinodiscophyceae	Proboscia alata	AU
Bacillariophyta	Coscinodiscophyceae	Thalassiosira levanderi	AU
Bacillariophyta	Mediophyceae	Attheya septentrionalis	AU
Bacillariophyta	Mediophyceae	Chaetoceros	AU
Bacillariophyta	Mediophyceae	Chaetoceros affinis	AU
Bacillariophyta	Mediophyceae	Chaetoceros ceratosporus var. ceratosporus	AU
Bacillariophyta	Mediophyceae	Chaetoceros crinitus	AU
Bacillariophyta	Mediophyceae	Chaetoceros danicus	AU
Bacillariophyta	Mediophyceae	Chaetoceros impressus	AU
Bacillariophyta	Mediophyceae	Chaetoceros pseudobrevis	AU
Bacillariophyta	Mediophyceae	Chaetoceros subtilis var. subtilis	AU
Bacillariophyta	Mediophyceae	Chaetoceros thronsenii var. thronsenii	AU
Bacillariophyta	Mediophyceae	Chaetoceros wighamii	AU
Dinophyta	Dinophyceae	Alexandrium ostenfeldii	AU
Dinophyta	Dinophyceae	Amphidinium sphenoides	HT
Dinophyta	Dinophyceae	Ceratium fusus	AU
Dinophyta	Dinophyceae	Ceratium longipes	AU
Dinophyta	Dinophyceae	Ceratium tripos	AU
Dinophyta	Dinophyceae	Cladopyxis claytonii	AU
Dinophyta	Dinophyceae	Dinophysis acuminata	MX
Dinophyta	Dinophyceae	Dinophysis norvegica	MX
Dinophyta	Dinophyceae	Gymnodiniales	HT
Dinophyta	Dinophyceae	Gymnodinium	HT
Dinophyta	Dinophyceae	Gymnodinium simplex	AU
Dinophyta	Dinophyceae	Heterocapsa rotundata	AU
Dinophyta	Dinophyceae	Heterocapsa triquetra	MX
Dinophyta	Dinophyceae	Katodinium glaucum	HT
Dinophyta	Dinophyceae	Oblea rotunda	HT
Dinophyta	Dinophyceae	Phalacroma rotundatum	HT
Dinophyta	Dinophyceae	Prorocentrum cordatum	AU
Dinophyta	Dinophyceae	Proto-peridinium	HT
Dinophyta	Dinophyceae	Proto-peridinium brevipes	HT
Dinophyta	Dinophyceae	Proto-peridinium steinii	HT
Dinophyta	Dinophyceae	Pyrophacus horologium	AU
Dinophyta	Dinophyceae	Scrippsiella	AU
Dinophyta	Dinophyceae	Scrippsiella hangoei	AU
Euglenozoa	Euglenophyceae	Eutreptiella	AU
Chlorophyta	Chlorophyceae	Desmodesmus armatus var. armatus	AU
Chlorophyta	Chlorophyceae	Eudorina elegans	AU
Chlorophyta	Chlorophyceae	Monoraphidium contortum	AU
Chlorophyta	Chlorophyceae	Monoraphidium griffithii	AU
Chlorophyta	Chlorophyceae	Monoraphidium minutum	AU
Chlorophyta	Prasinophyceae	Pyramimonas	AU
Chlorophyta	Prasinophyceae	Pyramimonas virginica	AU

Chlorophyta	Trebouxiophyceae	Oocystis	AU
Chlorophyta	Ulvophyceae	Planctonema lauterbornii	AU
Haptophyta	Prymnesiophyceae	Chrysochromulina	MX
Ochrophyta	Chrysophyceae	Dinobryon	MX
Ochrophyta	Chrysophyceae	Dinobryon divergens	MX
Ochrophyta	Chrysophyceae	Dinobryon faculiferum	MX
Ochrophyta	Chrysophyceae	Paraphysomonas	HT
Others	Cryptophyta, ordines incertae sedis	Katablepharis	HT
Ochrophyta	Dictyochophyceae	Dictyocha speculum	AU
Others	Ebriophyceae	Ebria tripartita	HT
Charophyta	Klebsormidiophyceae	Elakatothrix gelatinosa	AU
Unidentified	Unidentified cells without flaggella	Unicell	AU
Unidentified	Unidentified flagellates, autotrophic	Flagellates	AU
Unidentified	Unidentified flagellates, heterotrophic	Flagellates	HT

Tabell 2. Lista över de viktigaste organismgrupperna identifierade med 16S och 18S rDNA i arton prover.

Huvudgrupp (namn enligt SILVA- och PR2- databaserna)	Exempel på marina organismer i gruppen	Antal unika OTU
Bacteria	Bakterier inklusive cyanobakterier och kloroplaster	1243
Cyanobacteria	Cyanobakterier (blågrönalger)	36
Alveolata	Dinoflagellater, ciliater	415
Apusozoa	En grupp av flagellater som livnär sig på bakterier	1
Archaeplastida	Grönalger, rödalger	107
Hacrobia	Rekylalger (Cryptophyta) och häftalger (Haptophyta)	132
Opisthokonta	Bland annat högre djur och svampar (fungi) samt choanoflagellater	90
Stramenopiles	Kiselalger, "guldalger" m.m.	278
Rhizaria	Foraminiferer, radiolarier och amöbalika organismer.	169
Eukaryota organismer som inte kunde knytas till någon av ovanstående grupper		563
Summa encelliga eukaryoter		1755

Tabell 3. Antal unika OTU för några utvalda taxa på taxonomisk nivå 3 (~phylum) i PR2-databasen som observerats i de arton proverna.

Huvudgrupp (PR2-databasen)	Antal unika OTU
Chlorophyta	99
Rhodophyta	2
Ciliophora	168
Dinophyta	238
Ochrophyta	206
Haptophyta	67
Cryptophyta	19
Picobiliphyta	6
Choanoflagellida	23
Fungi	56

Tabell 4. Antal unika OTU för några utvalda taxa på taxonomisk nivå 4 (~klass) i PR2-databasen som observerats i de arton proverna.

Namn på grupp i PR2-databasen	Exempel på marina organismer eller kommentar	Antal unika OTU
Chlorophyceae	Vissa gröna flagellater och grönalger utan flageller	18
Eustigmatophyceae	Vissa gröna mikroalger, t.ex. <i>Nannochloropsis</i>	5
Mamiellophyceae	Vissa gröna mikroalger, t.ex. <i>Micromonas</i>	31
Trebouxiophyceae	Vissa gröna mikroalger, t.ex. <i>Chlorella</i> och <i>Planctonema</i>	24
Florideophyceae	Rödalger	2
Dinophyceae	Dinoflagellater, t.ex. släktena <i>Alexandrium</i> och <i>Dinophysis</i> .	144
Syndiniales	Organismer besläktade med Dinophyceae	93
Prymnesiophyceae	Häftalger, t.ex. släktena <i>Emiliana</i> , <i>Chrysochromulina</i> och <i>Prymnesium</i>	62
Pavlovophyceae	T.ex. släktet <i>Pavlova</i>	5
MAST	Marine Stramenopiles	30
Oomycota	Har tidigare förts till Fungi	9
Bacillariophyta (notera att detta phylum innehåller tre olika klasser av kiselalger)	Kiselalger, t.ex. släktena <i>Skeletonema</i> , <i>Coscinodiscus</i> och <i>Thalassiosira</i>	55
Chrysophyceae och Synurophyceae	<i>Paraphysomonas</i> , <i>Dinobryon</i>	100
Pelagophyceae	<i>Aureococcus</i>	5
Dictyochophyceae	<i>Dictyocha</i> , <i>Pedinella</i> , <i>Pseudopedinella</i> , <i>Pseudochattonella</i>	25
Cryptophyceae	<i>Cryptomonas</i> , <i>Hemiselmis</i> , <i>Rhodomonas</i> , <i>Teleaulax</i>	19
Chytridiomycota	Fördes tidigare till Fungi	20
Euglenozoa	<i>Euglena</i> , <i>Eutreptiella</i>	3

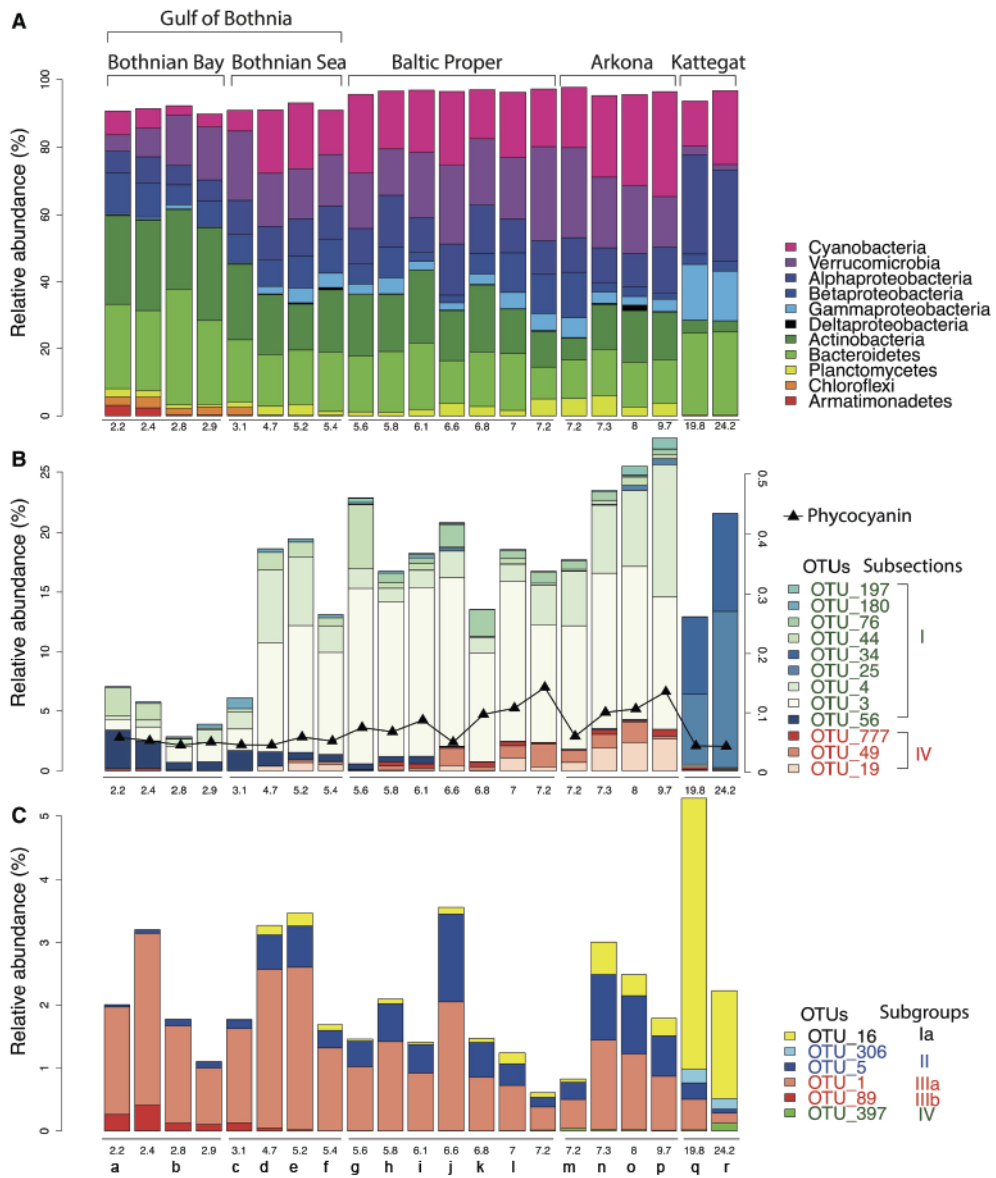


Fig. 5. Relativ abundans för bakterier baserad på metabarcoding av 16S rDNA. På x-axlarna visas salthalt och stationsnamn. A visar huvudgrupper av bakterier, B visar dominerande cyanobakterie-OTU:er (Subsection I innefattar pikocyanobakterier), OTU_56 är en *Microcystis* och Subsection IV innehåller filamentösa cyanobakterier, OTU_777, OTU_49 och OTU_19 hör till *Aphanizomenon*, *Nodularia* och *Dolichospermum* (syn. *Anabaena*). C visar Bakterieggruppen SAR11 (en av de vanligaste heterotrofa bakterie-grupperna). Figuren är modifierad efter en förlaga i Hu et al. 2016.

Cellantal, biovolym och biomassa

Utermöhl-metoden resulterade i ett totalt cellantal på max ca 1 miljon celler per liter (Fig. 4). Notera dock att så kallade pikoplankton förbises med Utermöhlmetoden. Sommartid observeras pikoplankton ofta i cellantal mellan 100 miljoner per liter och en miljard celler per liter och utgör en stor del av den totala växtplanktonbiomassan. Cryptophycéer och gröna flagellater samt oidentifierade mikroalger var de dominerande grupperna när det gäller cellantal i resultaten från Utermöhlmetoden. När det gäller biomassa beräknad som biovolym eller kolinnehåll per liter ser bilden helt annorlunda ut (Fig. 4). Cyanobakterier, kiselalger och dinoflagellater utgör störst biomassa. De oidentifierade organismerna utgör endast en liten del av biomassan. Det är värt att notera att kiselalger har en hög andel av biovolymen, framförallt i Kattegatt. Kolinnehåll ger en mer rättvisande bild av biomassa än biovolym som överskattar kiselalger jämfört med andra grupper.

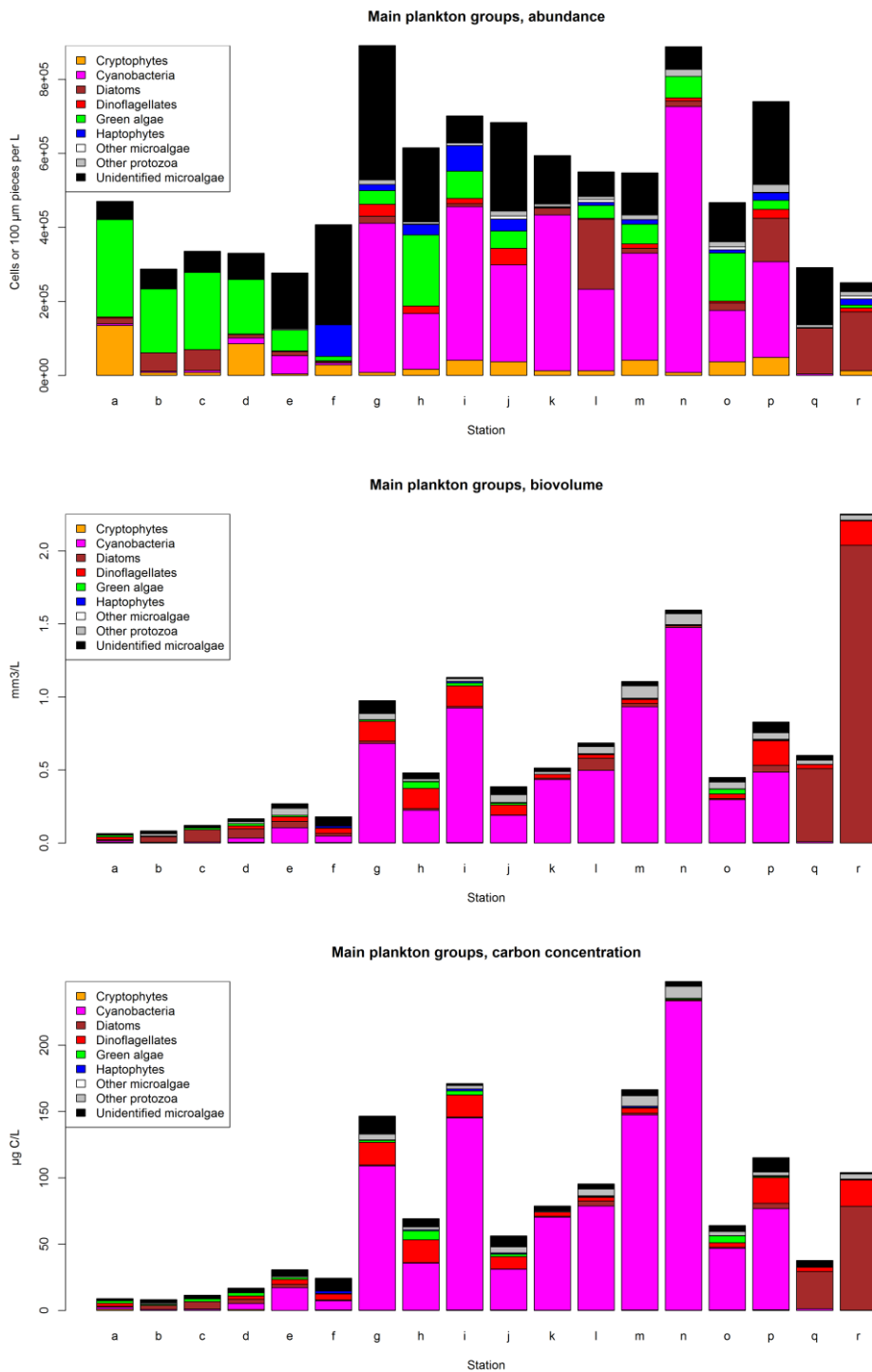


Fig. 4 Mikroskopi-data summerade till huvudgrupper av encelliga organismer. Uppifrån och ned: cellantal, biovolym och biomassa beräknat som kolinnehåll.

Översikt - totalt antal taxa och "Operational Taxonomic Units"

Totalt 89 olika organismer (Tabell 1) identifierades med mikroskop (Utermöhl-metoden). Bland dessa ingår samlingsgrupper som "oidentifierade flagellater" (flagellates) och "oidentifierade encelliga organismer" (unicells). Meta-barcoding data sammanfattas i tabellerna 2-4 och i figurerna 5 och 6. Baserat på rDNA data noterades totalt ca 2000 olika Operational Taxonomic Units, OTU, (exklusive heterotrofa bakterier). För prokaryoter (16S rDNA) noterades 156 olika Operational Taxonomic Units (OTU) för cyanobakterier och för eukaryoter (18S) noterades 1860 olika OTU. Biodiversiteten är starkt kopplad till salthalt och havsområde.

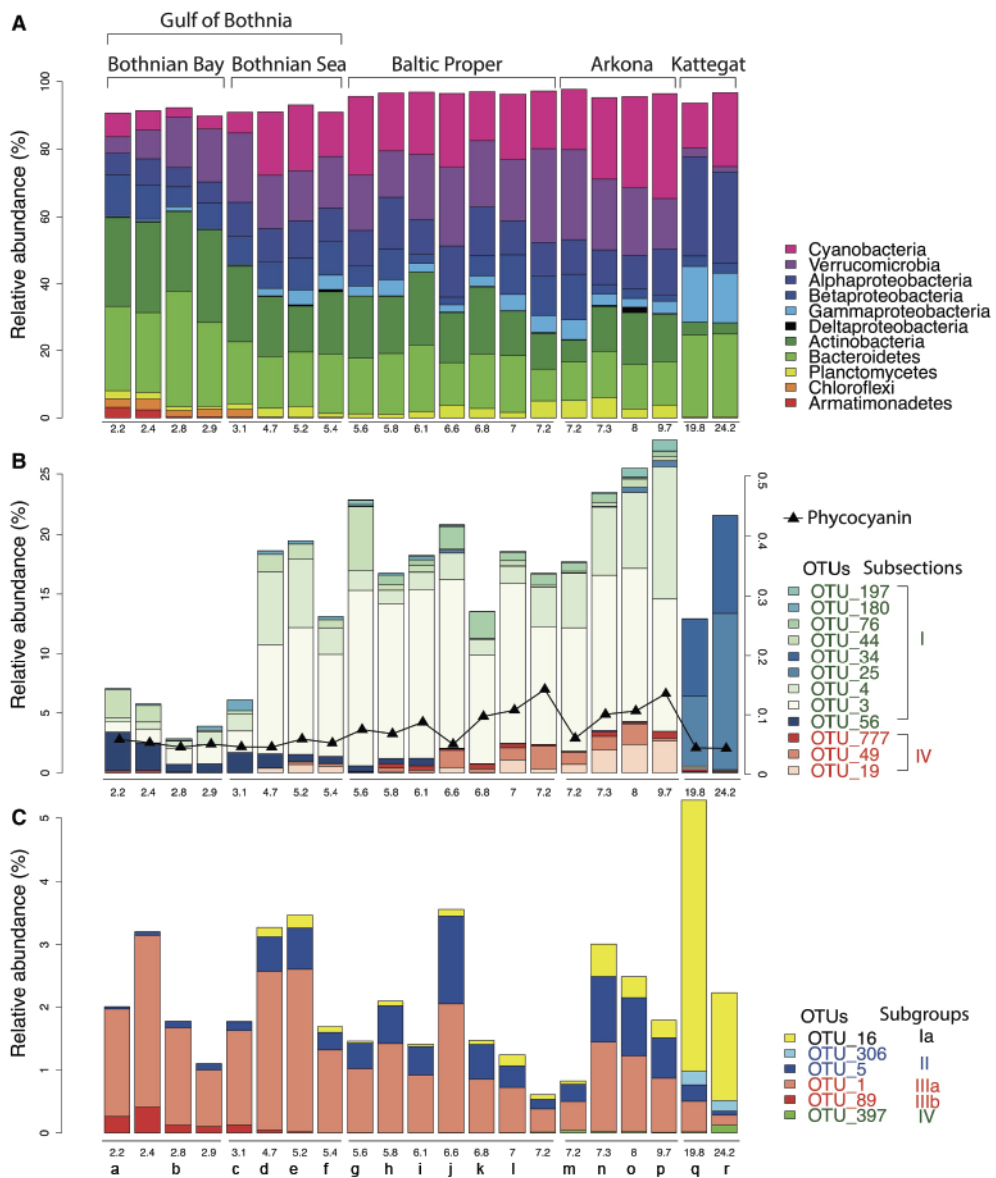


Fig. 5. Relativ abundans för bakterier baserad på metabarcoding av 16S rDNA. På x-axlarna visas salthalt och stationsnamn. A visar huvudgrupper av bakterier, B visar dominerande cyanobakterie-OTU:er (Subsection I innefattar pikocyanobakterier), OTU_56 är en *Microcystis* och Subsection IV innehåller filamentösa cyanobakterier, OTU_777, OTU_49 och OTU_19 hör till *Aphanizomenon*, *Nodularia* och *Dolichospermum* (syn. *Anabaena*). C visar Bakteriegruppen SAR11 (en av de vanligaste heterotrofa bakterie-grupperna). Figuren är modifierad efter en förlaga i Hu et al. 2016.

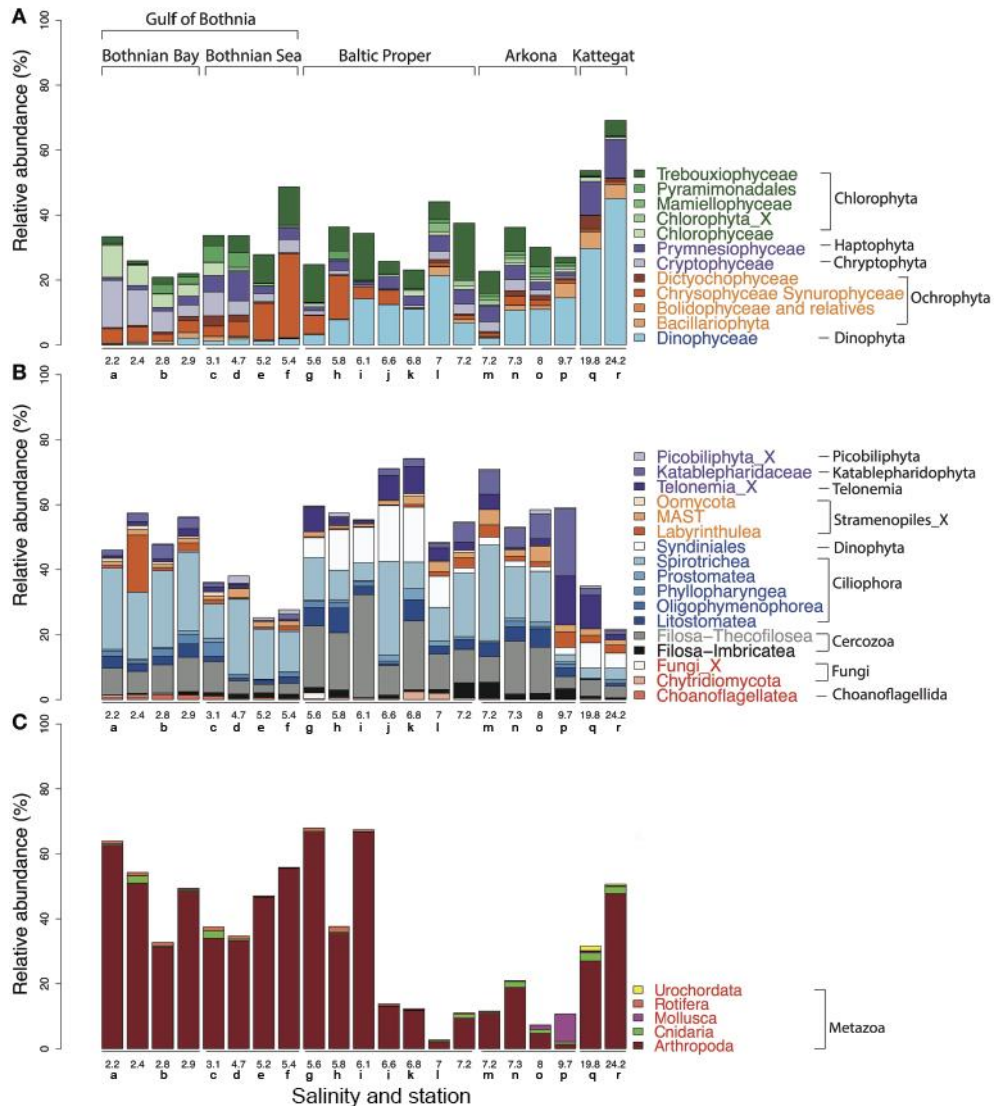


Fig. 6. Relativ abundans av eukaryota organismer identifierade med meta-barcoding. På x-axlarna visas salthalt och stationsnamn. A visar relativ abundans av olika klasser av huvudsakligen auto- och mixotrofa grupper av eukaryota plankton. Inom gruppen dinoflagellater (Dinophyceae) finns också många arter som är heterotrofa. B visar relativ abundans av huvudsakligen heterotrofa grupper av plankton. Inom gruppen ciliater förekommer dessutom flera arter som har kloroplaster och fungerar som växtplankton. C visar relativ abundans av metazoer (flercelliga djur). I A och B har de relativa abundanserna beräknats genom att dela antalet sekvenser för varje grupp med totalantalet sekvenser för encelliga organismer, i C genom att dela med totalantalet sekvenser (encelliga + flercelliga). Figuren är modifierad efter en förlaga i Hu et al. 2016.

Cyanobakterier

I tabell 1 listas de cyanobakterier som noterades med Utermöhl-metoden, sammanlagt 11 olika taxa observerades. I Fig. 5 ges en översikt över OTU av cyanobakterier. Trettiosex olika OTU för cyanobakterier observerades. Flera av dessa kunde inte knytas till någon sekvenserad cyanobakterie med namn. Det är värt att notera att 150 olika OTU knutna till kloroplaster hos eukaryota växtplankton noterades med 16S-metabarcoding. I Fig. 7-9 visas resultat för utvalda taxa av cyanobakterier baserade både på Utermöhlmetoden och metabarcoding. De olika observationsmetoderna är inte direkt jämförbara men resultaten ger information om vad som noterats med Utermöhl-metoden respektive rDNA metabarcoding. Mikroskopiresultat redovisas som räknade enheter per liter medan rDNA-resultat redovisas som relativ abundans, d.v.s. antal sekvenser för aktuellt taxon dividerat med totalt antal sekvenser för alla bakterie-taxa i provet. *Microcystis* noterades enbart med metabarcoding-teknik. Inte heller *Synechococcus* noterades med Utermöhlmetoden. Observationer av *Synechococcus* med metabarcoding redovisas i Fig. 10.

Aphanizomenon noterades huvudsakligen i egentliga Östersjön.

Dolichospermum (syn. *Anabaena*) noterades huvudsakligen i egentliga Östersjön och i Bottenhavet.

Nodularia observerades huvudsakligen i egentliga Östersjön.

Microcystis noterades framförallt i Bottenhavet men även i nordligaste delen av egentliga Östersjön.

Synechococcus var det vanligaste släktet bland cyanobakterier. Elva olika OTU observerades. Ett par av dessa förekom i stort sett uteslutande i Kattegatt medan andra förekom endast i egentliga Östersjön (se Fig. 10).

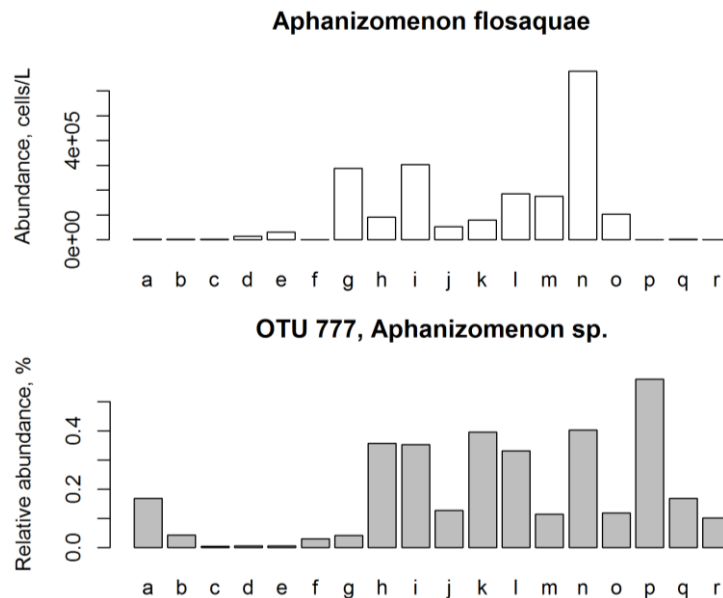


Fig. 7 Utbredningen av *Aphanizomenon*. Vita staplar: Utermöhl-metoden: abundans (100 μ m bitar per liter), grå staplar, rDNA.

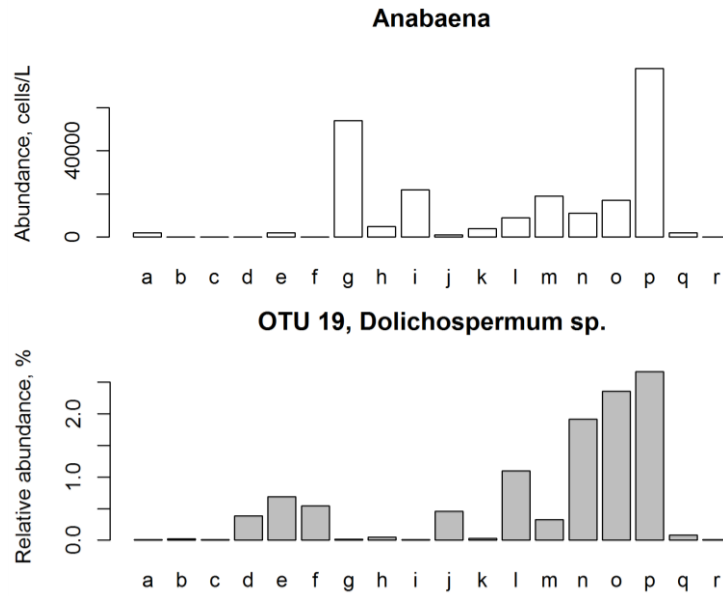


Fig. 8 Utbredningen av *Dolichospermum/Anabaena*. Vita staplar: Utermöhl-metoden: abundans (100 µm bitar per liter), grå staplar, rDNA. *Anabaena* är en synonym för *Dolichospermum*.

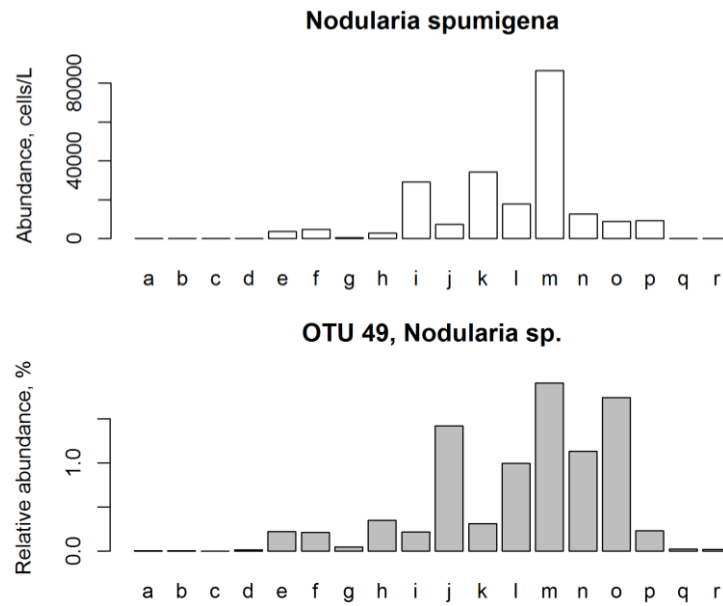


Fig. 9 Utbredningen av *Nodularia*. Vita staplar: Utermöhl-metoden: abundans (100 µm bitar per liter), grå staplar, rDNA.

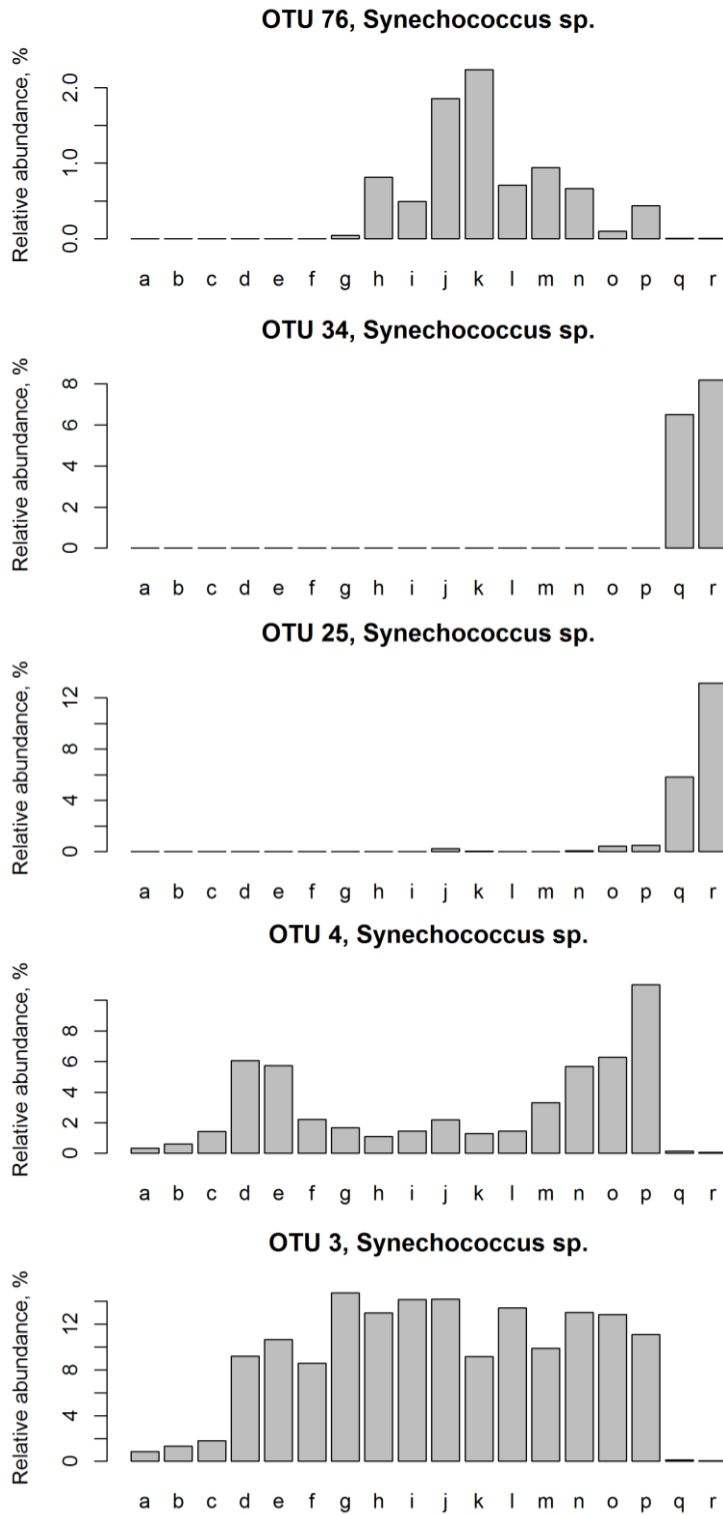


Fig. 10 Utbredningen av utvalda OTU för *Synechococcus*. Grå staplar, rDNA. *Synechococcus* observerades inte med Utermöhlmetoden.

Eukaryota plankton

Bland de eukaryota encelliga planktonorganismerna observerades totalt ca 77 olika taxa med Utermöhl-metoden (tabell 1). Några organismer noterades som varieteter, många som arter eller släkten och några på högre taxonomisk nivå, t.ex. klassen Bacillariophyceae (kiselalger). Dessutom noterades oidentifierbara flagellater (flagellates) och oidentifierbara organismer utan flagell (unicells). Metabarcoding-data sammanfattas i tabellerna 2-4 och i Fig. 6. Om man räknar bort flercelliga organismer fanns det ca 1755 olika eukaryota OTU. De olika observationsmetoderna är inte direkt jämförbara men resultaten ger information om vad som noterats med Utermöhl-metoden respektive rDNA metabarcoding. I diagram som visas i figurerna 11-34 redovisas mikroskopieresultat som räknade enheter per liter medan rDNA-resultat redovisas som relativ abundans, d.v.s. antal sekvenser för aktuellt taxon dividerat med totalt antal sekvenser för alla encelliga taxa i provet.

Kiselalger

I den här studien används en taxonomi där kiselalger (Bacillariophyta) placeras på phylum-nivå. Det innebär att följande klasser för kiselalger används: Bacillariophyceae, Mediophyceae och Coscinodiscophyceae. Arton arter och tolv släkten av kiselalger noterades med Utermöhlmetoden (Tabell 1). Flera av dessa saknades bland OTU baserad på metabarcoding. Metabarcoding-data resulterade i 55 olika OTU inom Bacillariophyta. Det är sannolikt att ett antal av dessa OTU hör till arterna som identifierades med mikroskopi men att sekvenser saknas i referensdatabasen PR2. Några exempel på arter eller släkten som observerades med Utermöhl-metoden men som saknades i metabarcoding data presenteras i figurerna 12-15. I Fig. 16 ges ett exempel på ett släkte (*Leptocylindrus*) där metabarcodingdata ger två unika OTU och mikroskopi visar på två arter. *Guinardia flaccida* är en art som är relativt enkel att känna igen i mikroskop. Utermöhl-metoden och metabarcoding gav likande resultat (Fig. 17). I Fig. 18 visas utbredningen av en unik OTU för *Rhizosolenia*. Detta släkte observerades inte med mikroskopi trots att det är relativt lätt att känna igen. En anledning kan vara att släktet inte kom med i de 10 ml som analyserades av slumpskäl.

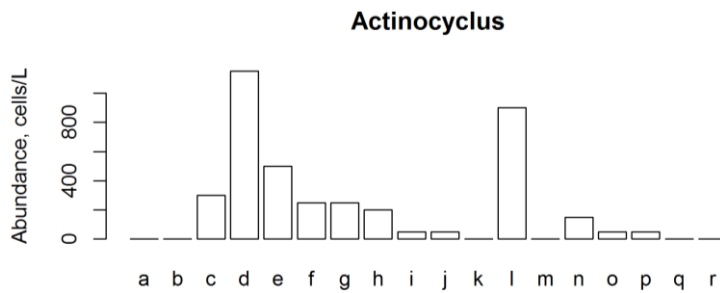


Fig. 11 Utbredningen av kiselalgssläktet *Actinocyclus* baserat på Utermöhlmetoden. Ingen OTU kunde knytas till detta släkte.

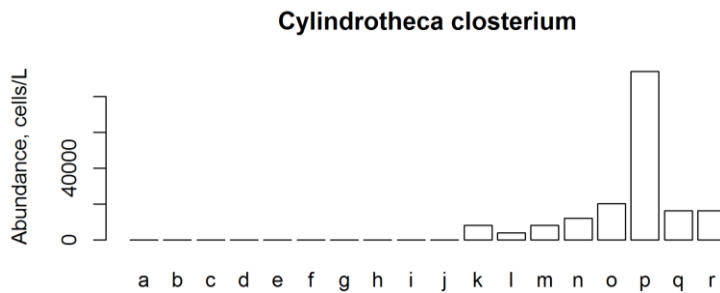


Fig. 12 Utbredningen av kiselalgen *Cylindrotheca closterium* baserat på Utermöhlmetoden. Ingen OTU kunde knytas till art eller till släktet *Cylindrotheca*. Det gällande namnet för *Cylindrotheca closterium* är *Ceratoneis closterium*.

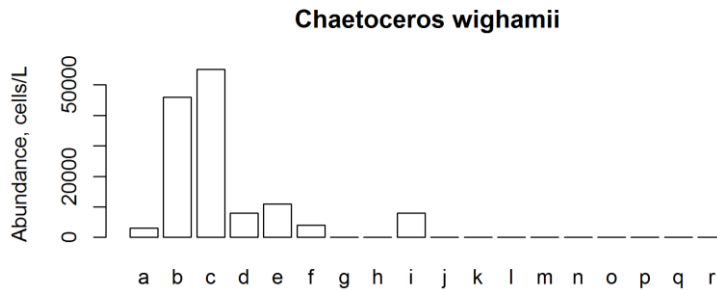


Fig. 13 Utbredningen av kiselalgen *Chaetoceros wighamii* baserat på Utermöhlmetoden. Ingen OTU kunde knytas till denna art men det finns 7 olika OTUs för släktet *Chaetoceros*.

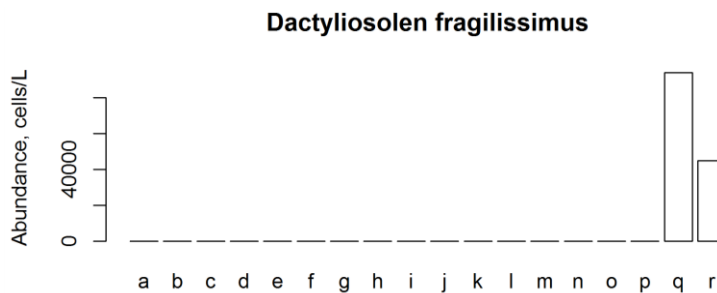


Fig. 14 Utbredningen av kiselalgen *Dactyliosolen fragilissimus* baserat på Utermöhlmetoden. Ingen OTU kunde knytas till art eller till släktet *Dactyliosolen*.

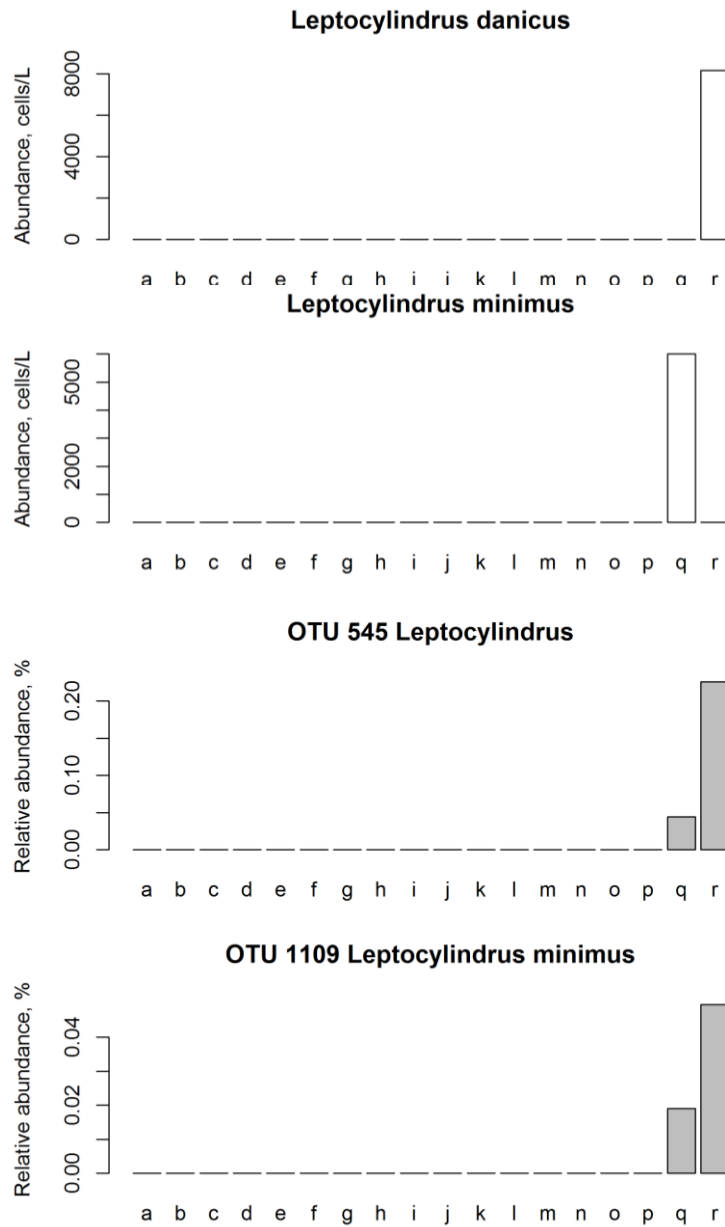


Fig. 15 Utbredningen av kiselalgerna *Leptocylindrus minimus* och *L. danicus* baserat på Utermöhl-metoden (vita staplar) samt en OTU för släktet *Leptocylindrus* (grå staplar) och en för *L. minimus* (grå staplar).

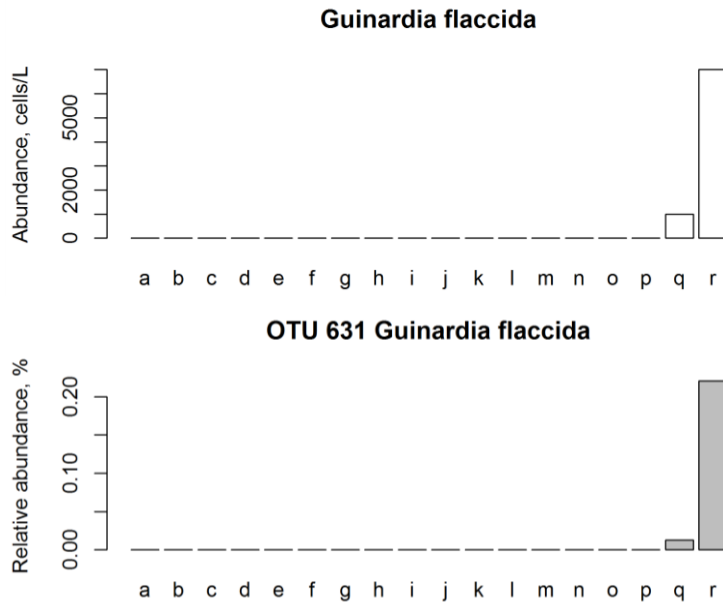


Fig. 16 Utbredningen av kiselalgen *Guinardia flaccida* baserat på Utermöhlmetoden (vita staplar) samt en OTU för samma art (grå staplar).

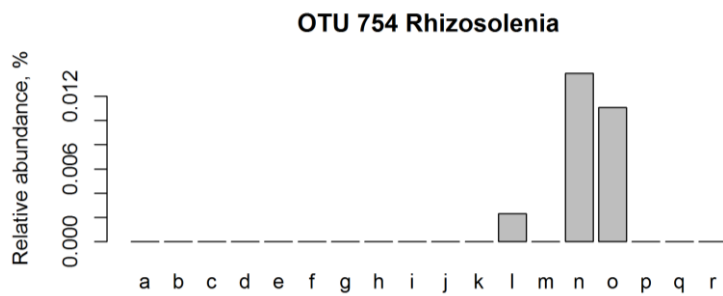


Fig. 17 Utbredningen av kiselalgen *Rhizosolenia* baserat på en unik OTU från metabarcoding (grå staplar). Släktet observerades inte med Utermöhlmetoden.

Dictyochophyceae

Den här gruppen av alger kallas ibland kiselflagellater och innehåller relativt välkända släkten som *Dictyocha* med ett karakteristiskt kiselskelett och *Pseudochattonella* som har orsakat fiskdöd i Västerhavet. Endast *Dictyocha speculum* observerades med Utermöhlmetoden medan metabarcoding resulterade i 25 olika OTU. I Fig. 18 presenteras resultat för *Dictyocha* och i Fig. 19 finns resultat för *Pseudochattonella*.

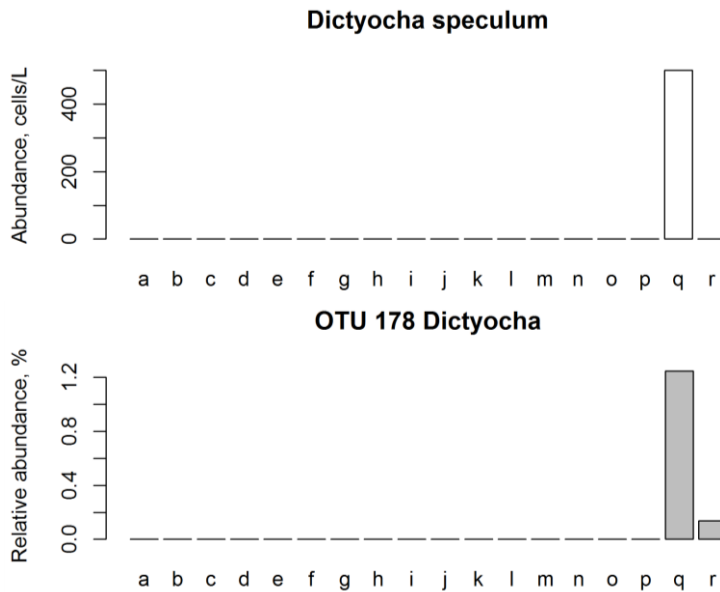


Fig. 18 Utbredningen av kiselflagellaten *Dictyocha speculum*, Dictyochophyceae och en OTU knuten till *Dictyocha*. Vita staplar representerar Utermöhl-data och grå rDNA-data.

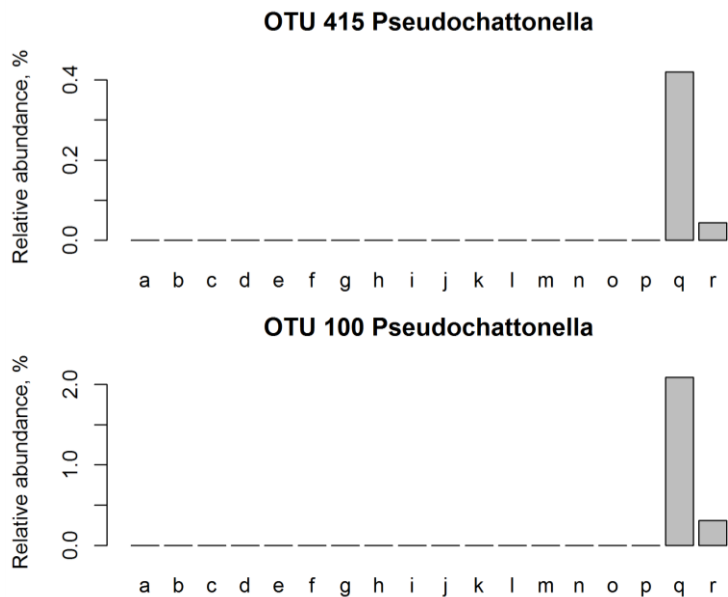


Fig. 19 Utbredningen av två OTU knutna till *Pseudochattonella*. Data är baserade på metabarcoding. *Pseudochattonella* noterades inte i Utermöhl-resultaten.

Chrysophyceae och *Synurophyceae*

Med Utermöhlmetoden observerades tre olika *Dinobryon*-arter och en *Paraphysomonas*. Etthundra (100) olika OTU observerades med metabarcoding. Bland dessa finns många oidentifierade organismer. Det är sannolikt att många av dessa är heterotrofer. Det fanns ingen OTU knuten till *Dinobryon*.

Raphidophyceae

Representanter för denna grupp observerades varken med Utermöhlmetoden eller med metabarcoding.

Pelagophyceae

Fem representanter för denna grupp observerades som unika OTU med metabarcoding-teknik. En av dessa är knuten till *Aureococcus anophagefferens* (Fig. 20), en art som orsakar skadliga algblomningar. Täta blomningar, t.ex. vid Long Island i USA, gör att musslor slutar äta och svälter. Inga Pelagophyceae noterades med Utermöhlmetoden.

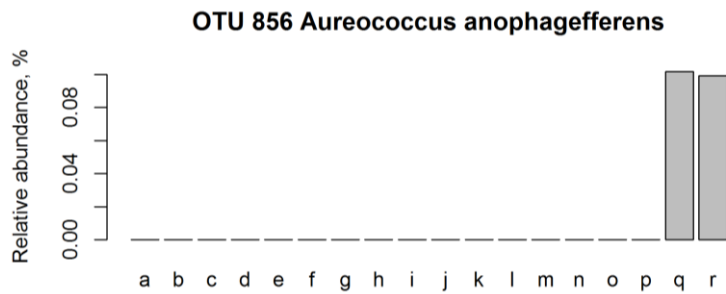


Fig. 20. Utbredningen av en OTU knuten till *Aureococcus anophagefferens*. Data är baserade på metabarcoding. *A. anophagefferens* noterades inte i Utermöhl-resultaten.

Dinoflagellater (Dinophyceae)

Tjugotre (23) olika taxa observerades med Utermöhlmetoden. Några är arter, några släkten och en organism har noterats på den taxonomiska nivån ordning. Etthundrafyrtiofyra (144) olika OTU observerades inom Dinophyceae. Det är värt att notera att totalt 238 OTU observerades inom Dinophyta. Totalt 93 OTU inom Dinophyta har förts till Syndiniales i PR2-databasen. Syndiniales innehåller bl.a. parasiter. Här följer några exempel på resultat från olika släkten av dinoflagellater:

Alexandrium

En art, *A. ostenfeldii*, observerades med Utermöhl.metoden. Metabarcoding resulterade i fem olika OTU, en av dessa är knuten till *A. ostenfeldii*. Exempel på resultat finns i Fig. 21.

Dinophysis och Phalachroma

Med Utermöhl-metoden observerades *D. acuminata*, *D. norvegica* och *Phalachroma rotundatum*. Några OTU direkt knutna till släktena *Dinophysis* eller *Phalachroma* observerades inte men två OTU knutna till ordningen som dessa tillhör, Dinophysiales, noterades. OTU-erna är specifika på familjenivå för familjerna Dinopsaceae/Oxyphysaceae. Detta innebär att 18S-rDNA inte skiljer *Dinophysis*-arter åt men de noteras på taxonomiska nivån familj. Resultat presenteras i Fig. 22.

Ceratium (syn. *Tripos*)

Marina representanter för släktet *Ceratium* har nyligen bytt namn till *Tripos*. Under en period har även namnet *Neoceratium* använts. Med Utermöhl-metoden observerades tre arter. Fem olika OTU noterades med metabarcoding. I Fig. 22 presenteras resultat för *Ceratium*.

Heterocapsa

Utermöhlmetoden visade att *Heterocapsa triquetra* var vanlig vid fyra stationer i Östersjön medan *H. rotundata* noterades vid en station. Metabarcoding resulterade i en OTU knuten till släktet *Heterocapsa*: *H. rotundata/nei*. I Fig. 23 finns exempel på resultat för *Heterocapsa*.

Protoceratium

Släktet observerades inte med Utermöhl-metoden. Metabarcoding visar på att arten *P. reticulatum* var vanligt förekommande, i Fig. 24 finns diagram.

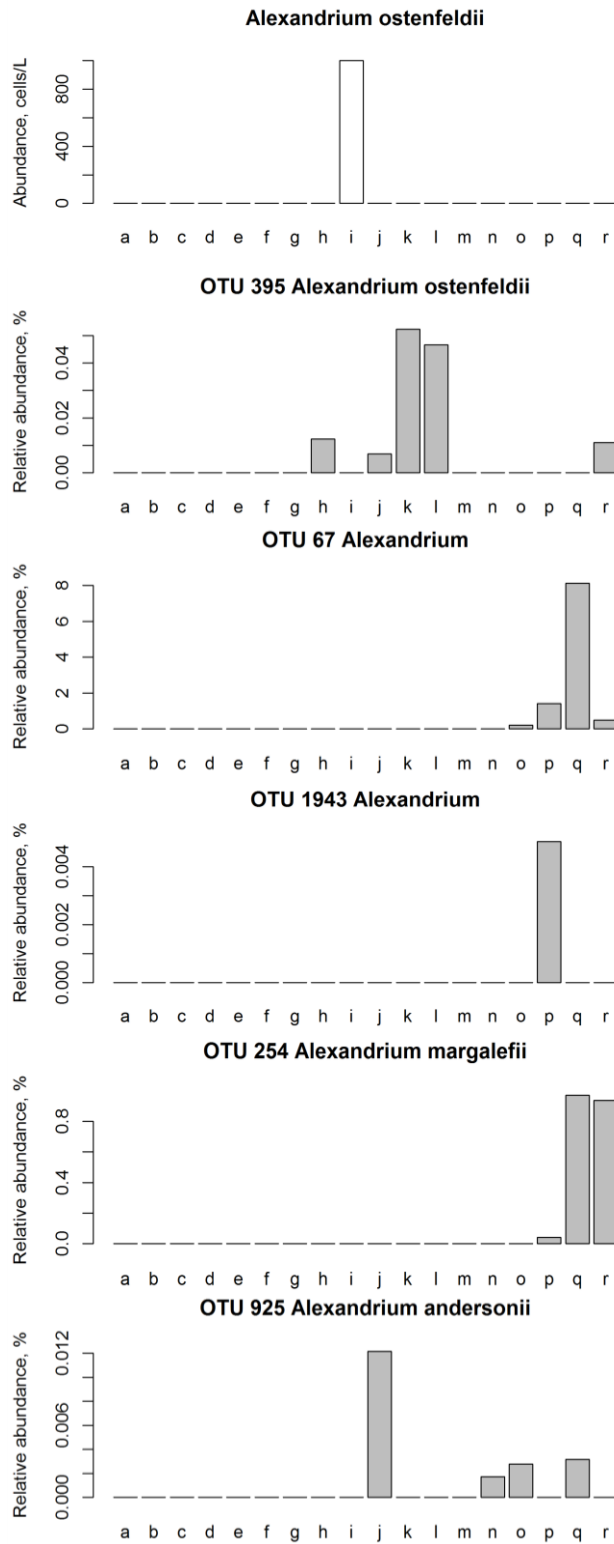


Fig. 21. Utbredningen av dinoflagellater från släktet *Alexandrium*. Vita staplar visar data från Utermöhlmetoden. Grå staplar visar data från metabarcoding.

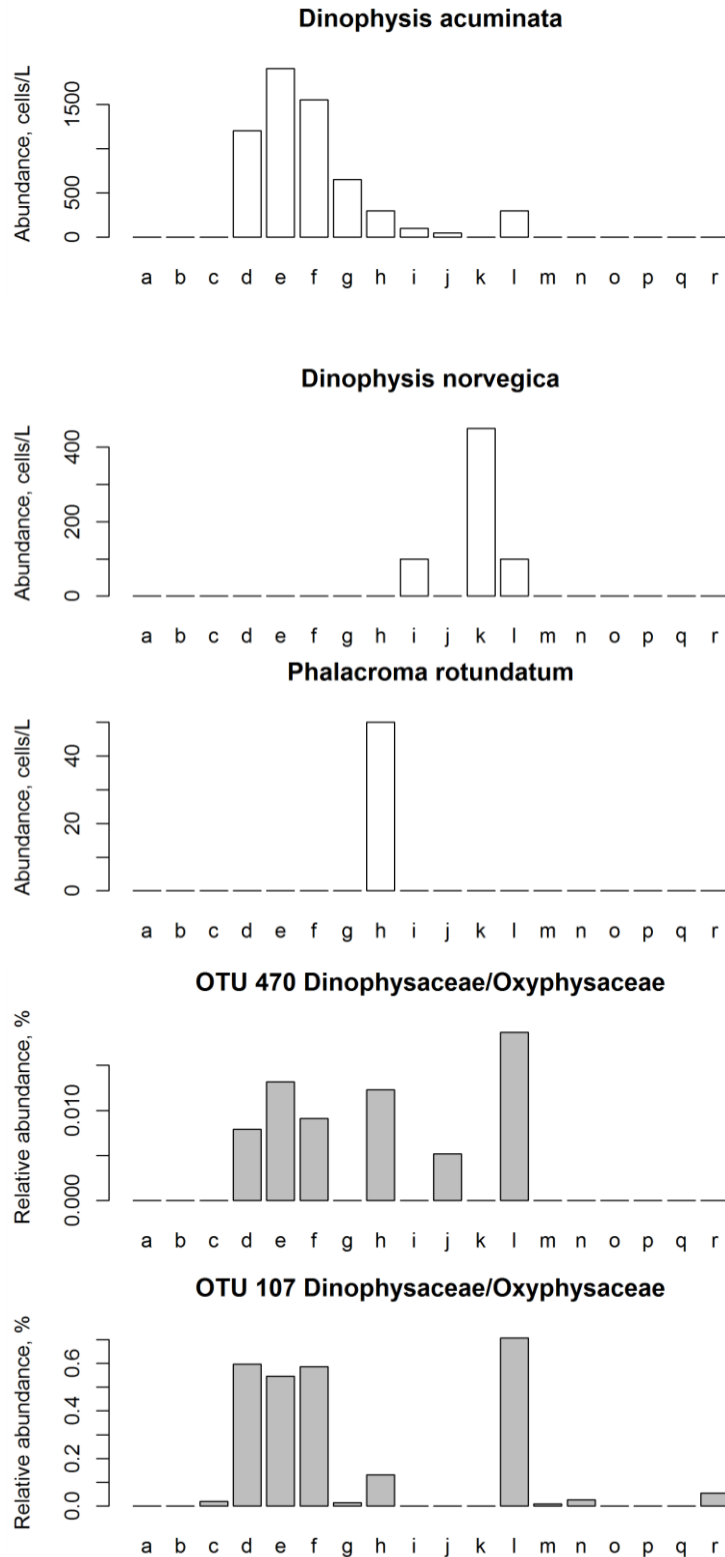


Fig. 22. Utbredningen av dinoflagellater inom ordningen Dinophysiales. Ofta används synonymen *Dinophysis rotundata* för *Phalacroma rotundatum*. Två unika OTU noterades, båda är specifika på familjenivå för Dinophysaceae/Oxyphysaceae. Vita staplar visar data från Utermöhlmetoden. Grå staplar visar data från metabarcoding.

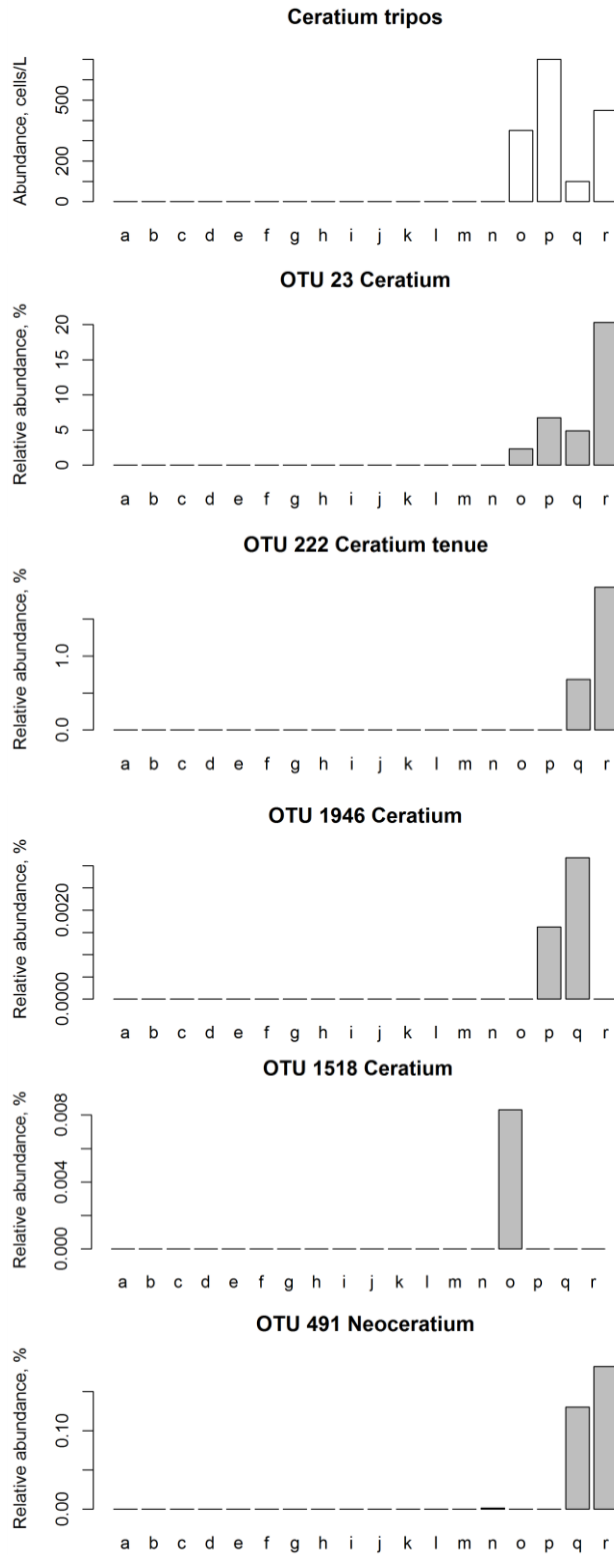


Fig. 23. Utbredningen av dinoflagellaten *Ceratium tripos* och fyra OTU knutna till släktet *Ceratium* samt en OTU knuten till släktet *Neoceratium* (syn. *Ceratium*). Vita staplar visar data från Utermöhlmetoden. Grå staplar visar data från metabarcoding.

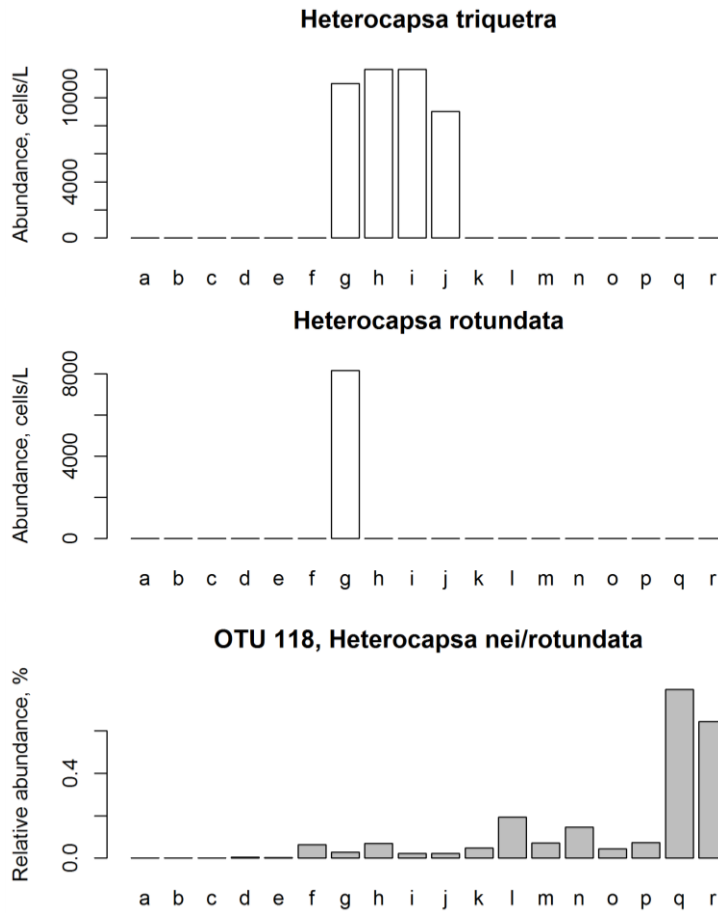


Fig. 24. Utbredningen av dinoflagellaten *Heterocapsa triquetra*, *H. rotundata* och *H. nei/rotundata*. Notera att detta är två olika arter inom samma släkte. De två arterna förväntas inte förekomma på samma plats. En OTU knuten till *H. triquetra* saknas i metabarcoding-data. Vita staplar visar data från Utermöhlmetoden. Grå staplar visar data från metabarcoding.

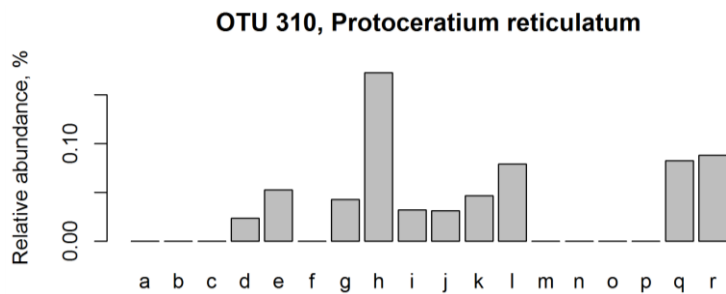


Fig. 25. Utbredningen av dinoflagellaten *Protoceratium reticulatum* baserat på metabarcoding (grå staplar). Arten observerades inte med Utermöhlmetoden.

Syndiniales

Syndiniales är en systergrupp till Dinophyceae inom Dinophyta. Namnet antyder att gruppen är en ordning men den ligger på samma nivå som Dinophyceae i PR2-databasen. Nittiotre (93) olika OTU för Syndiniales noterades i metabarcoding-data. Med Utermöhlmetoden observerades inte Syndiniales. Organismerna kan möjligen ingå i de oidentifierade flagellaterna eller oidentifierade organismerna utan flagell.

Ciliater (Ciliophora)

Med Utermöhlmetoden observerades tre olika ciliater: *Mesodinium rubrum*, *Helicostomella subulata* och släktet *Tiarina*. Dessutom räknades övriga ciliater under beteckningen Ciliophora. Metabarcoding resulterade i 168 olika OTU inom Ciliophora. Bland dessa fanns två olika OTU för *Mesodinium*.

”Gröna alger” (Chlorophyta)

I gruppen Chlorophyta ingår bl.a. Chlorophyceae, Mamiellophyceae och Eustigmatophyceae. Med Utermöhlmetoden noterades nio olika taxa, några som arter, andra som släkten. Metabarcoding-resultat innehåller 99 olika OTU för Chlorophyta. Några exempel visas i Fig. 26-30.

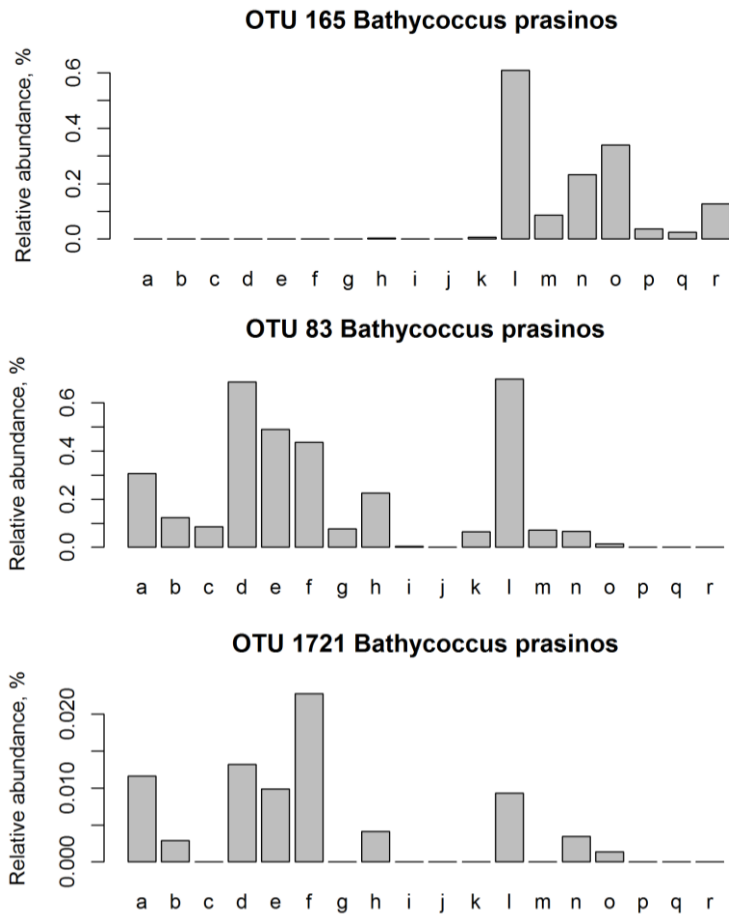


Fig. 26. Utbredningen av tre OTU knutna till *Bathycoccus* (Chlorophyta; Mamiellophyceae). Data är baserade på metabarcoding. *Bathycoccus* observerades inte med Utermöhlmetoden.

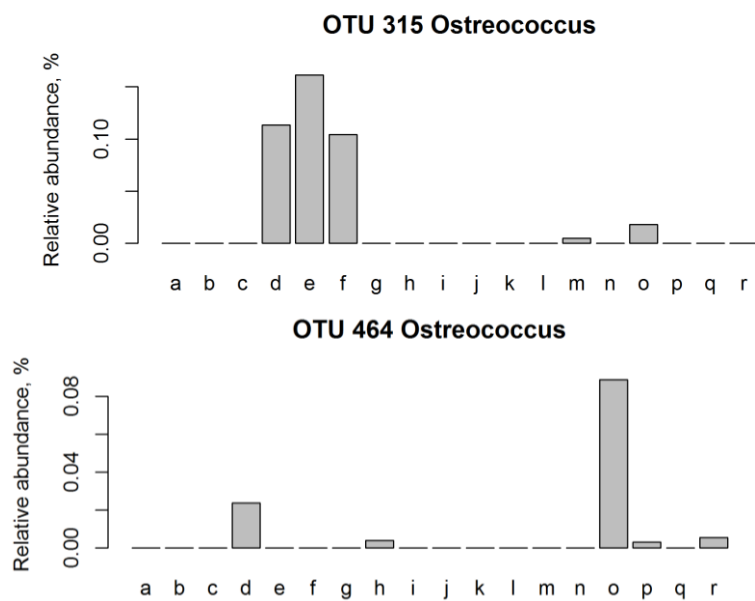


Fig. 27. Utbredningen av två OTU knutna till *Ostreococcus* (Chlorophyta; Mamiellophyceae). Data är baserade på metabarcoding. *Ostreococcus* observerades inte med Utermöhlmetoden.

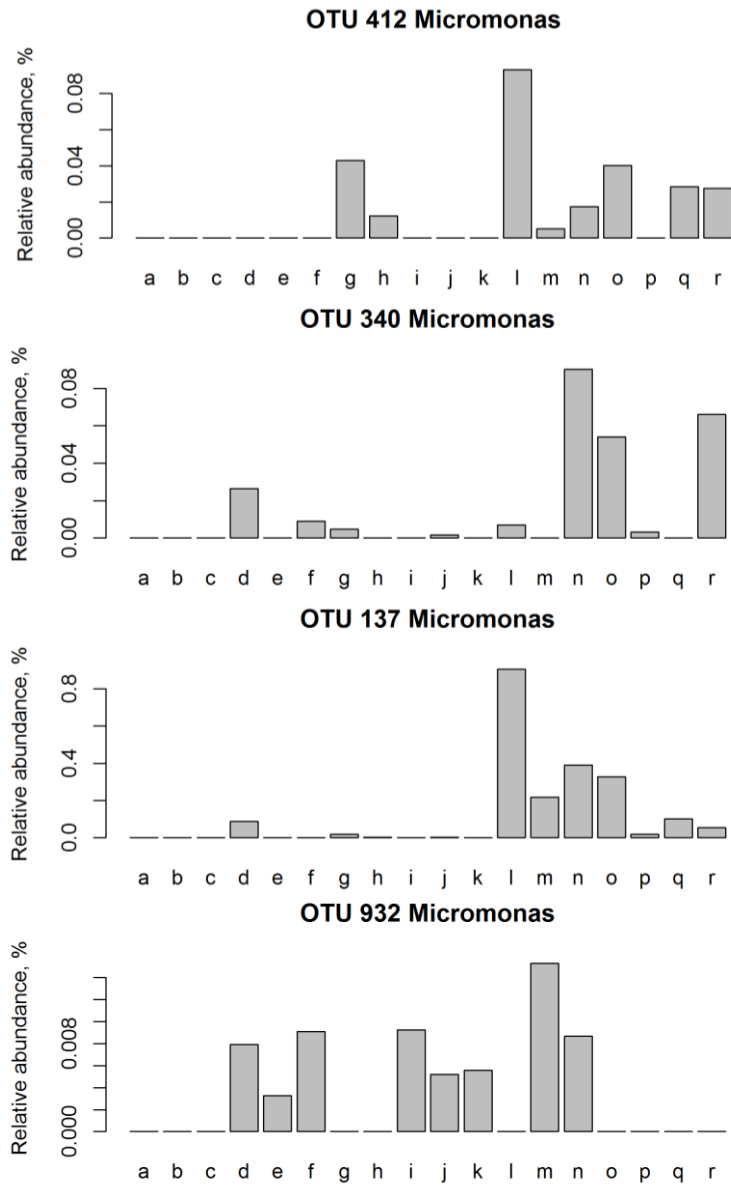


Fig. 28 Utbredningen av fyra OTU knutna till *Micromonas* (Chlorophyta; Mamiellophyceae). Data är baserade på metabarcoding. *Micromonas* observerades inte med Utermöhlmetoden.

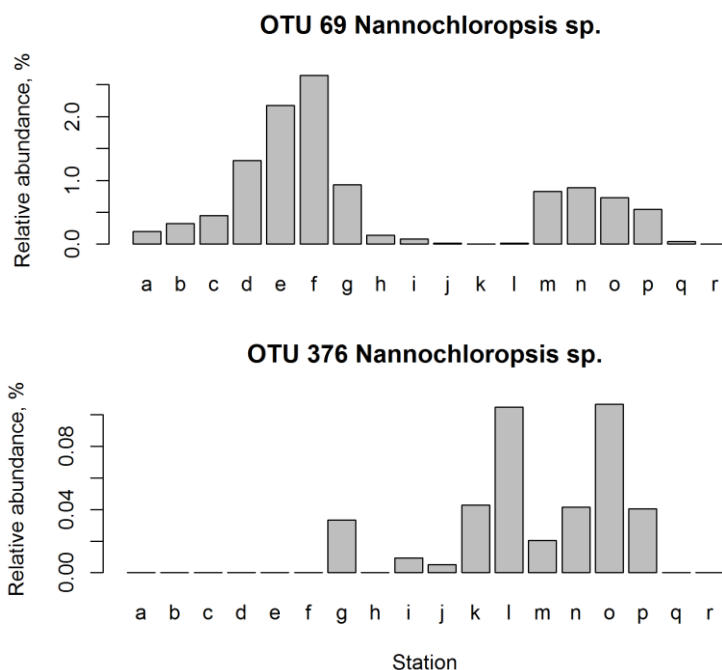


Fig. 29. Utbredningen av två OTU knutna till *Nannochloropsis* (Chlorophyta; Eustigmatophyceae). Data är baserade på metabarcoding. *Nannochloropsis* observerades inte med Utermöhlmetoden.

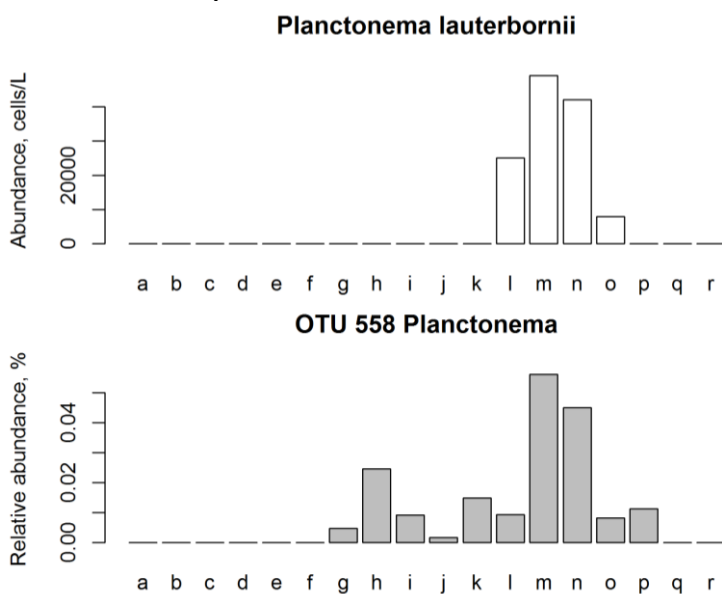


Fig. 30. Utbredningen av *Planctonema lauterbornii*, Chlorophyta, baserad på Utermöhlmetoden (vita staplar) och utbredningen av en OTU knuten till *Planctonema* (grå staplar).

Euglenophyceae

Ibland används beteckningen ögonalger för Euglenophyceae. Beteckningen Euglenozoa är också vanligt förekommande. Inom gruppen finns både heterotrofa och fototrofa representanter. Välkända fototrofa släkten är *Euglena* och *Eutreptiella*. En *Eutreptiella* noterades med Utermöhl-metoden. Metabarcoding resulterade i tre olika OTU. I Fig. 31 visas exempel.

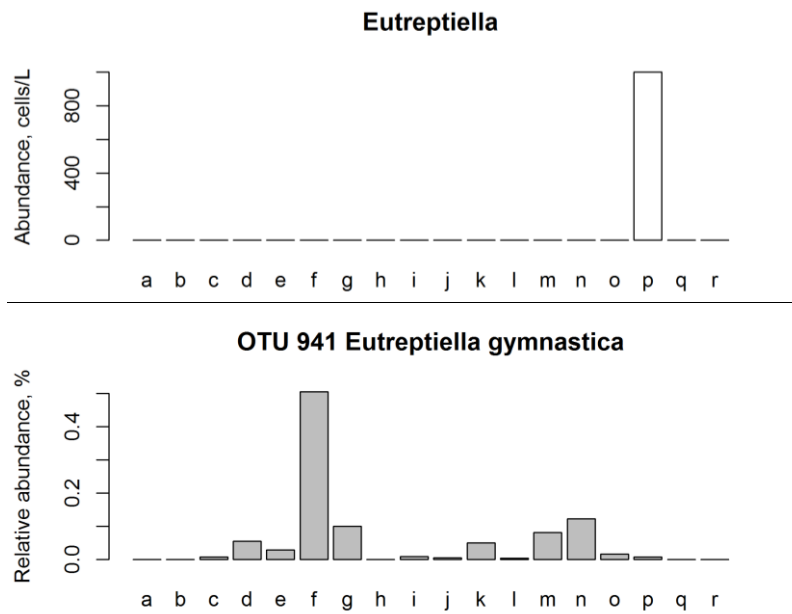


Fig. 31. Utbredningen av *Eutreptiella gymnastica*, Euglenophyceae, baserat på metabarcoding (grå staplar). En *Eutreptiella*, möjligen en annan art, observerades med Utermöhlmetoden (vita staplar).

Ebria

Släktet *Ebria* är heterotrofa flagellater som man tidigare trodde var nära släkt med dinoflagellater. Med Utermöhl-metoden noterades en art. Metabarcoding gav 15 olika OTU. I Fig. 32 visas exempel på data.

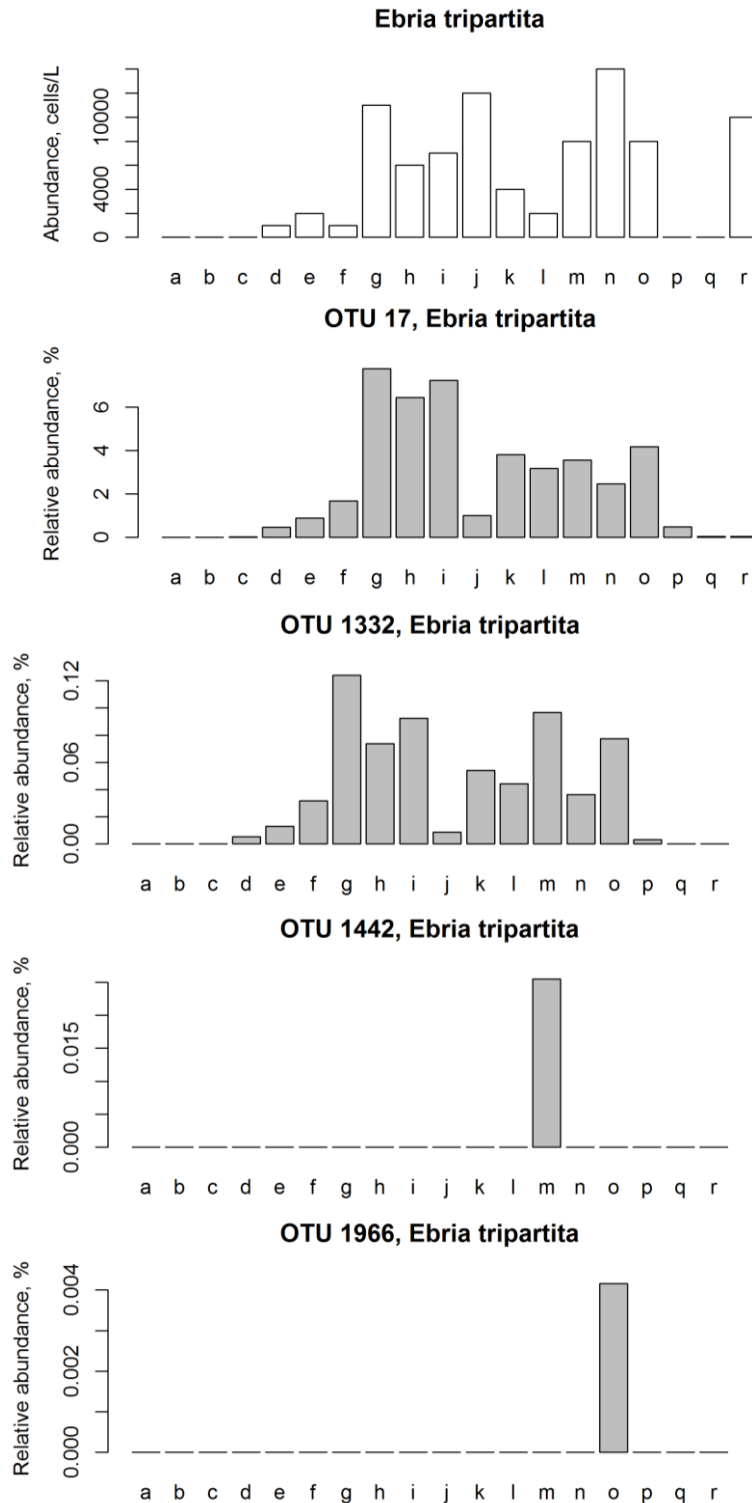


Fig. 32. Utbredningen av den heterotrofa flagellaten *Ebria tripartita* och fyra OTU knutna till arten. Vita staplar visar data från Utermöhl-metoden. Grå staplar visar data från metabarcoding.

Haptophyta

I gruppen ingår bl.a. Prymnesiophyceae. Kända representanter är coccolithophorider (kalkflagellater), t.ex. *Emiliana*. Andra välkända släkten är *Prymnesium* och *Chrysochromulina*. Flera arter av *Prymnesium* och *Chrysochromulina* är skadliga för fisk. En representant för Haptophyta räknades med Utermöhl-metoden. Totalt observerades 22 olika OTU för *Chrysochromulina*, två OTU för *Phaeocystis* och två OTU för *Haptolina*. För hela Haptophyta observerades 67 olika OTU med metabarcoding, 62 av dessa hörde till Prymnesiophyceae, övriga fem till Pavlovophyceae. Det är värt att notera att OTU från två coccolithophorider observerades. I Fig. 33 visas exempel på data.

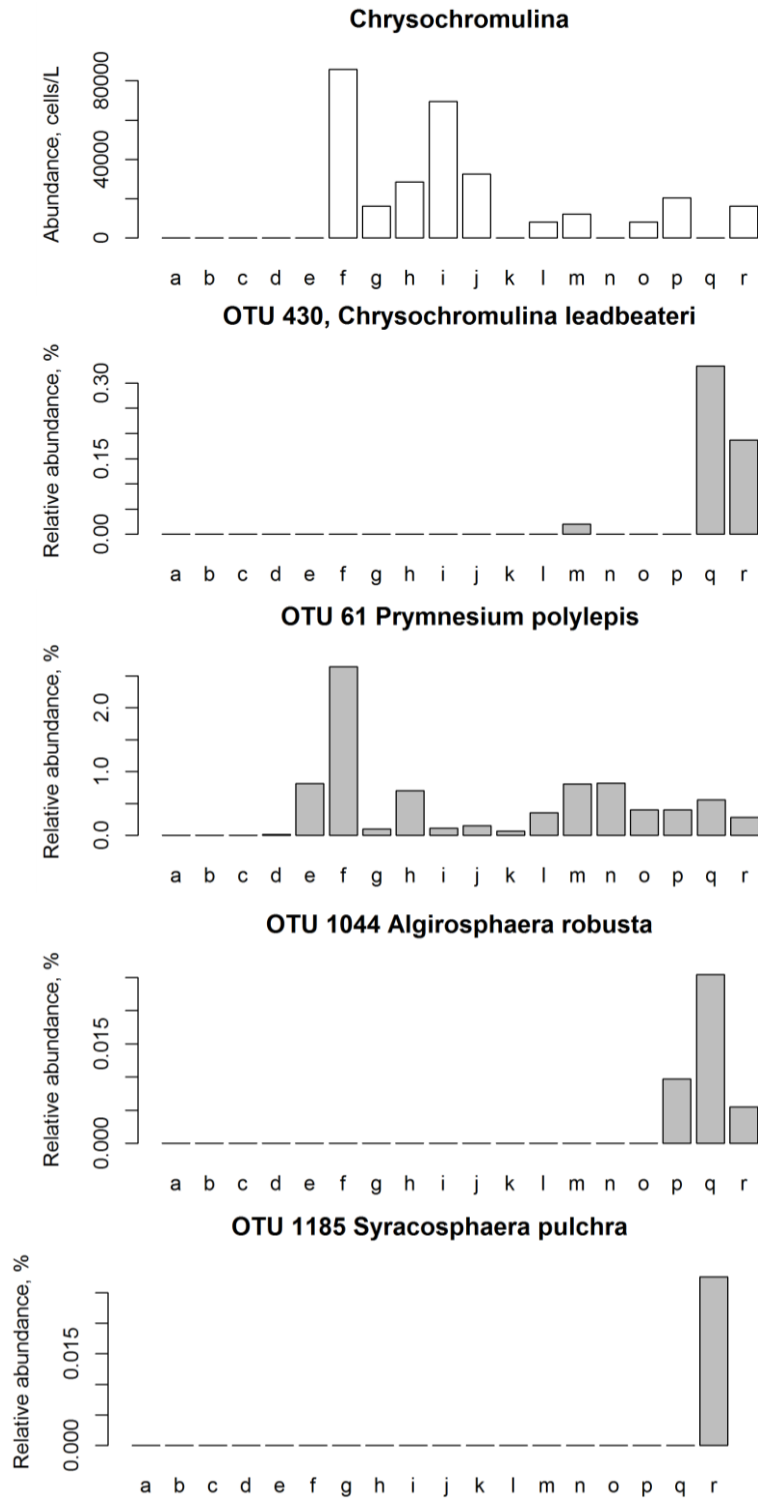


Fig. 33. Utbredningen av släktet *Chrysochromulina* (Haptophyta; Prymnesiophyceae) baserat på mikroskop-data (vita staplar). Metabarcoding data från utvalda Prymnesiophyceae visas med grå staplar. Totalt observerades 22 olika OTU för *Chrysochromulina*.

Cryptophyceae (rekylalger)

I gruppen ingår bl.a. släktena *Cryptomonas*, *Rhodomonas*, *Hemiselmis* och *Teleaulax*. Fyra representanter för *Cryptophyceae* räknades med Utermöhl-metoden. En av dessa (*Leuocryptos marina*) hör egentligen till en annan grupp. Totalt observerades 19 olika OTU för *Cryptophyceae*. I Fig. 34 visas exempel på data.

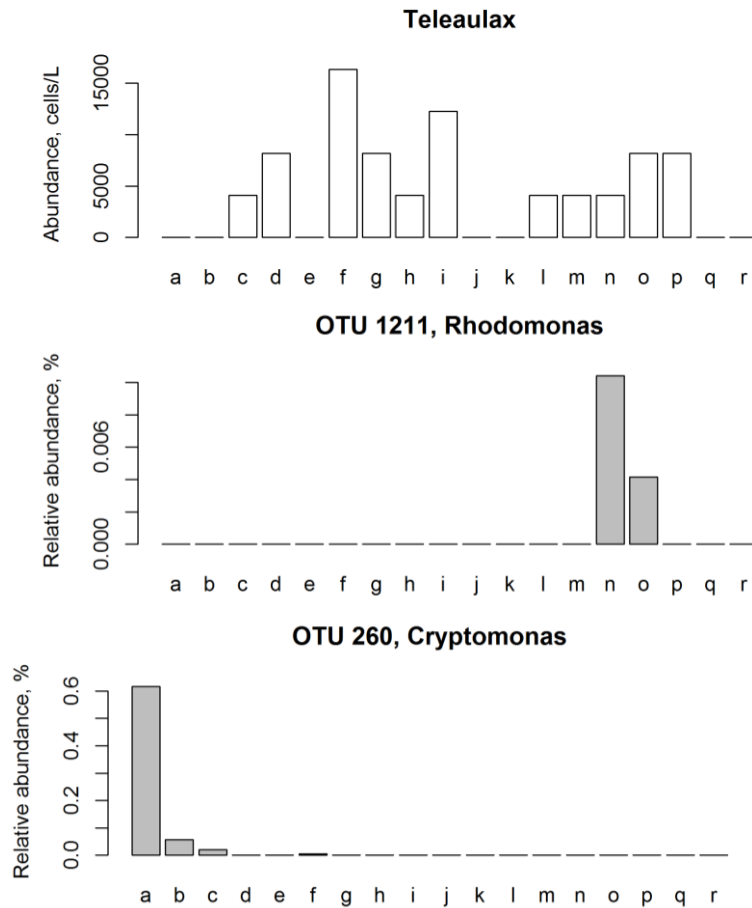


Fig. 34. Utbredningen av utvalda *Cryptophyceae*: *Teleaulax* (mikroskopi, vita staplar) samt OTU för en *Rhodomonas* och en *Cryptomonas* (grå staplar). Totalt observerades 19 olika OTU för *Cryptophyceae*.

Choanoflagellater (kragflagellater - Choanoflagellida)

Choanoflagellater är en grupp heterotrofa organismer som livnär sig av att äta andra encelliga plankton. Namnet Craspedophyceae har använts inom botaniken. På svenska används ibland beteckningen kragflagellater. Totalt 23 olika OTU noterades för choanoflagellater. Inga choanoflagellater noterades med Utermöhl-metoden.

MAST

Ett stort antal organismer noterades med metabarcoding men inte med Utermöhlmetoden. Ett exempel är MAST (Marine Stramenopiles) som är en tillfällig beteckning på en grupp i havet vanligt förekommande organismer. MAST har möjligen räknat som oidentifierbara flagellater (flagellates) med Utermöhlmetoden. Trettio olika OTU observerades för MAST.

MOCH

Marine Ochrophytes (MOCH) är en annan samlingsgrupp för oidentifierade OTU. Tre olika OTU för MOCH observerades.

Metazooplankton

rDNA sekvenser för flercelliga djurplankton noterades i metabarcoding-data. Det gäller bl.a. kräftdjur samt en appendicularie (Oikopleura). Ojaveer et al. (2010) har sammanfattat observationer i Östersjön. I Fig. 35 visas en jämförelse mellan OTU-data från denna studie med Ojaveers resultat.

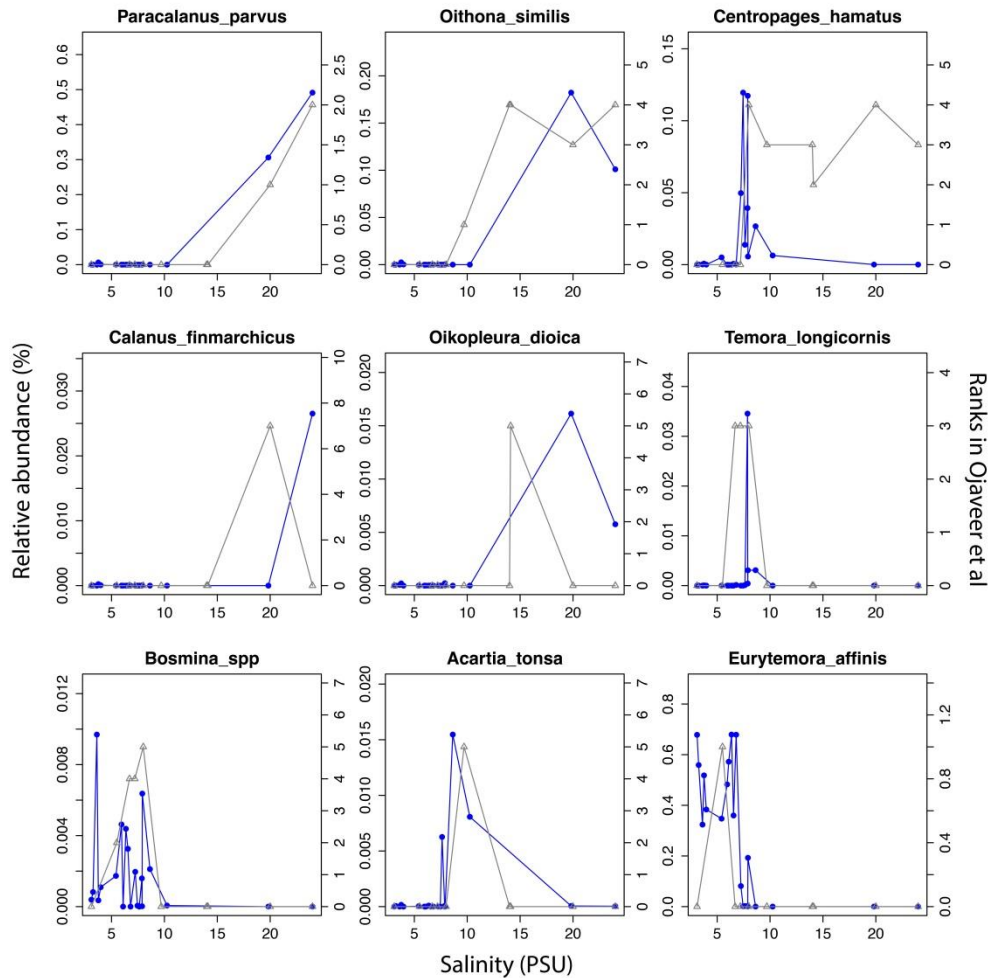


Fig. 35. Utbredningen av utvalda flercelliga djurplankton baserade på observerade OTU (blå prickar och linjer) och data från Ojaveer et al. (2010, grå trianglar och linjer). Figuren är modifierad efter en förlaga i Hu et al. 2016.

Diskussion och slutsatser

Den här studien är baserad på planktonprovtagning i Bottniska viken, Egentliga Östersjön och Kattegatt under sju dagar i juli 2013. Sammanlagt arton prover har analyserats både med mikroskop (Utermöhl-metoden) och genom att 16S och 18S rDNA sekvenserats. Proverna samlades in enbart i ytvattnet. Salthalten varierade från ca 3 till 24 psu och är därför representativa för haven runt Sverige. Klorofyllhalt, ett grovt mått på växtplanktonbiomassa, indikerade att provtagningen skedde under en period med låg total växtplanktonbiomassa. Med Utermöhl-metoden analyserades 10 ml per prov medan 200-500 ml användes för de enskilda rDNA-proverna. Detta innebär att sällsynta organismer kan ha missats i Utermöhl-proverna av slumpskäl medan sannolikheten är större att de kom med i rDNA-proverna. Trots att datamaterialet är relativt litet kan följande slutsatser göras:

1. Båda metoderna fångade biodiversiteten bland större växtplankton (>20 µm) på ett likartat sätt för vissa arter/släkten. För andra var skillnaderna betydande.
2. Med Utermöhl-metoden noterades en stor andel av organismerna som oidentifierbara flagellater eller oidentifierbara celler utan flagell ("flagellates" eller "unicells").
3. Utermöhlmetoden gav kvantitativa data vad gäller cellantal, biovolym och biomassa mätt som kol.
4. Med Utermöhl-metoden förbisågs plankton <2 µm fullständigt.
5. Med barcoding tekniken observerades en mycket större biodiversitet än med Utermöhl-tekniken.
6. Barcoding-tekniken påvisade att det finns organismer i Östersjön och Kattegatt som sannolikt inte har beskrivits tidigare.
7. Barcoding-resultat visar att organismer <2 µm har hög biodiversitet. Storleksgruppen innefattar ett antal olika eukaryota arter samt flera olika arter av cyanobakterier av *Synechococcus*-typ.

Resultat från Utermöhl-metoden visar hur cellantal och biomassa för plankton varierar i Östersjön och Kattegatt. Det finns en tydlig koppling till salthalt. Barcoding-resultat säger väldigt lite om fördelningen av biomassa. Resultaten för metabarcoding presenteras i form av relativ abundans. I tabell 5 sammanfattas för- och nackdelar med de olika metoderna.

Tabell 5. En sammanfattning av skillnader och för- och nackdelar med Utermöhl-metoden och metabarcoding.

	Utermöhl	rDNA barcoding
Kvantitativa data – celler per liter	Ja	Nej
Biomassa baserat på cellvolym	Ja	Nej
Volym analyserad	10-50 ml	~500 ml
Artsammansättning Organismer >20 µm	Ja	Ja
Artsammansättning Organismer 2-20 µm	Delvis	Ja
Artsammansättning Organismer <2 µm	Nej	Ja
Arbetstid per prov	3-4 h	Kort, om många prover analyseras
Kostnad per prov	Hög	Låg, om många prover analyseras
Kräver personal som kan identifiera plankton baserat på morfologi	Ja	Nej (men för att bestämma arter korrekt vilkas rDNA finns i referensdatabaser är kunskap om klassisk taxonomi och morfologi nödvändig)
Kräver personal som kan identifiera plankton baserat på rDNA	Nej	Ja
Utrustning	Sedimentationskammare och mikroskop	Filtreringsutrustning, flytande kväve, sekvenseringsutrustning
Standardiserade metoder och databaser	Finns	Är under utveckling

Man kan ställa sig frågan varför de olika metoderna ger så olika resultat i denna studie. En anledning som redan nämnts är att en större provvolym analyserades med metabarcoding-teknik jämfört med Utermöhl-metoden. En viktigare anledning är sannolikt att man med Utermöhl-metoden inte alltid klarar av att identifiera organismer mindre än ca 5-10 µm till art eller till släkte. Dessa organismer räknas oftast som oidentifierade celler med flagell (flagellates) eller som encelliga organismer utan flagell (unicells). En tredje anledning är att man med Utermöhl-metoden helt förbiser de organismer som är mindre än 2µm. Bland dessa finns de talrikaste växtplanktonen i havet, fototrofa pikoplankton. I den gruppen ingår både cyanobakterier av *Synechococcus*-typ och små eukaryota plankton. De kan räknas på ett kvantitativt sätt med fluorescensmikroskop eller med en flödescytometer. Metabarcoding-data ger ny insikt om biodiversiteten bland pikoplankton. I den här studien noterades flera olika OTU för *Synechococcus* och de har även olika utbredning. Uppenbarligen så finns det olika *Synechococcus* i olika havsområden i haven runt Sverige. Bland eukaryota picoplankton är det värt att notera det stora antalet olika OTU inom Chlorophyta. Släkten som inte observeras med Utermöhl-metoden är bl.a. *Ostreococcus*, *Bathycoccus* och *Nannochloropsis*. Det är också värt att notera att två arter av coccolithophorider (~kalkflagellater) noterades med rDNA teknik men inte med ljusmikroskopi.

När det gäller större växtplankton som borde kunna observeras med båda metoderna finns det flera exempel på god överensstämmelse mellan resultat. Man får dock beakta att Utermöhl-metoden ger resultat i form av absoluta cellantal eller biomassa (biovolym eller kol) medan metabarcoding-data idag endast ger relativ abundans av antalet OTU. Exempel på god överensstämmelse mellan de två metoderna är cyanobakterierna *Aphanizomenon* och *Nodularia*, grönalger *Planctonema*, kiselalgerna *Leptocylindrus* och *Guinardia*, dictyochophycéerna *Dictyocha* och *Pseudochattonella* samt dinoflagellatsläktet *Ceratium* (syn. *Triplos*). Det finns även exempel på arter eller släkten som endast observerats med ljusmikroskopi (Utermöhl-metoden), bl.a. kiselalgerna *Actinocyclus* och *Cylindrotheca*. Det är dock mycket vanligare att metabarcoding har resulterat i observationer av organismer som inte noterats med Utermöhl-metoden. En anledning till att arter/släkten inte noterats med rDNA-metodiken kan vara att sekvenser för arten/släktet saknas i referensdatabaser, organismen har helt enkelt aldrig sekvenserats. En annan anledning kan vara att det inte finns specifika sekvenser på art eller släktesnivå. I dessa fall kan det vara lämpligt att använda en större del av rDNA genomet, t.ex. att ta med 28S.

Skadliga alger har noterats med både mikroskopi och metabarcoding-teknik men den senare visade på större utbredning och mycket större biodiversitet. Båda metoderna gav likartade resultat för cyanobakterien *Nodularia*. Häftalgerna *Chrysochromulina* och *Prymnesium* kan bl.a. orsaka fiskdöd. *Prymnesium polylepis* (syn. *Chrysochromulina polylepis*) skadade en stor del av det marina ekosystemet i Kattegat-Skagerrak år 1988. Metabarcoding-data visar på förekomst av denna art både i Kattegat och i Egentliga Östersjön. Med Utermöhl-metoden noterades *Chrysochromulina* endast som släkte. *Aureococcus anophagefferens* är tidigare inte känd från Svenska vatten men

noterades i Kattegat med metabarcoding-tekniken. Arten orsakar så kallade ”brown tides” bl.a. vid Long Island i USA. Vid dessa blomningar slutar musslor äta och svälter. *Pseudochattonella* (Dictyochophyceae) har orsakat fiskdöd i bl.a. Danmark, Sverige och Norge. Släktet noterades med rDNA-teknik men missades med mikroskopi-metoden.

Bland dinoflagellater finns det både arter som skadar fisk och arter som producerar biotoxiner som ansamlas i t.ex. musslor. Med Utermöhl-metoden noterades bl.a. flera arter av dinoflagellatsläktet *Dinophysis* som producerar biotoxiner som kan ansamlas i t.ex. musslor. *Dinophysis* kunde inte bestämmas till släktes- eller artnivå med 18S rDNA. Variabiliteten mellan arter inom släktet är för liten. Däremot identifierades familjen Dinophysaceae-/Oxyphysaceae i vilken släktet *Dinophysis* ingår. *Alexandrium* är ett annat dinoflagellatsläkte som producerar biotoxiner som kan ansamlas i filtrerande organismer och föras vidare i näringsväven. Med Utermöhl-metoden noterades *Alexandrium* på en provtagningspunkt medan rDNA visar på förekomst flera arter och förekomst på flera stationer. *Protoceratium*, som producerar yessotoxin, observerades endast med rDNA-teknik. Det är förvånande att *Protoceratium* inte observerats med ljusmikroskopi eftersom den är relativt lätt att identifiera. I det här fallet kan man misstänka att den OTU som är knuten till *Protoceratium* även kan vara knuten till en annan organism.

Rekommendationer

I detta stycke ger författarna sin syn på hur barcoding-teknik och qPCR kan och bör införas i svensk nationell och regional miljöövervakning av plankton i haven runt Sverige. Förslagen är till stor del relevanta även för övervakning av plankton i sötvatten.

Metabarcoding av 16S och 18S rDNA av plankton är idag en teknik som är mogen att införas i miljöövervakningsprogram. En anledning är att den ger mer information om biodiversitet än metodik baserad på mikroskopi. En annan anledning är att tekniken är etablerad och relativt billig. Metabarcoding är inte beroende av den individuella skickligheten hos en växtplanktonexpert som analyserar växtplankton med mikroskop. Tekniken kan dock inte ersätta mikroskop-baserad teknik eftersom barcoding-resultat inte ger samma information om antal celler per liter eller information om biomassa baserad på cellvolym och cellantal. Metabarcoding skall ses som ett komplement till mikroskopi och andra optiska metoder (t.ex. Imaging Flow Cytometry).

qPCR metodik för att kvantitativt analysera förekomst av skadliga alger har utvecklats i bl.a. Norge (Engesmo et al. 2016 och Engesmo et al. manuskript). qPCR bör användas även i Sverige för kvantitativ analys av utvalda arter. Det gäller framförallt skadliga arter som är svåra att identifiera och kvantifiera på annat sätt, t.ex. *Alexandrium* spp., *Karlodinium* spp., *Pseudochattonella* spp. och *Heterosigma* spp. Ett alternativ är att man kvantifierar hela mängden 18S rDNA med qPCR. Kombinerat med metabarcoding kan absoluta mängder av olika OTUs då räknas fram

Förslag

Referensmaterial

Idag saknas rDNA-sekvenser för ett stort antal encelliga plankton som förekommer i haven runt Sverige. Några sekvenser i referensdatabaser är sannolikt knutna till fel organismer p.g.a. misstag eller okunskap. Det behövs därför en insats för att sekvensera fler organismer. Det är möjligt att sekvensera rDNA från enstaka celler som identifierats utifrån morfologiska karaktärer med mikroskopi. Det finns behov av ett projekt för sekvensering av utvalda planktonarter.

Utökad pilotstudie

Resultaten som rapporteras i den här rapporten utgår från ett relativt litet antal prover som samlades in i juli 2013. Ett större datamaterial som innefattar alla årstider inklusive vårblooming och höstblooming skulle ge ett bättre beslutsunderlag för att överväga införande av rDNA metabarcoding i det långsiktiga miljöövervakningsprogrammet. SMHI och KTH/Science for Life Laboratory håller på att samla in prover lämpliga för analys. Under varje svensk miljöövervakningsexpedition med R/V Aranda tas ett delprov från växtplanktonprovet som samlas in med slang från 0-10 m djup. Provet filtreras och fryses för framtida sekvensering av rDNA. För närvarande saknas finansiering för att sekvensera proverna. Det finns behov av ett projekt för att analysera rDNA med "high throughput sequencing" och bearbeta data både från Utermöhl-proverna och rDNA.

Provtagning inom nationell miljöövervakning

Under något av de närmaste åren, t.ex. från 1 januari 2018, bör provtagning för barcoding-analys av plankton införas i den svenska nationella miljöövervakningen. För närvarande finns tre olika utförare av nationell planktonprovtagning i haven runt Sverige: SMHI, Stockholms universitet och Umeå universitet. Innan start av provtagning bör provtagare utbildas så att filtrering och förvaring av prover sker på ett korrekt och konsekvent sätt. En lathund för provtagning tas fram.

•

Sekvensering och upparbetning av rDNA data

En standardiserad metodik för sekvensering bör beskrivas i ett versionshanterat dokument. Metodiken för bearbetning av DNA-sekvenser och jämförelser med referensdatabaser för identifiering av organismer bör också beskrivas. Förslagsvis utför KTH/Science for Life Laboratory rDNA sekvensering av planktonprover inledningsvis. Så småningom kan eventuellt andra aktörer utföra analyserna.

Ackrediterade laboratorier

Utförare av provtagning och analyser bör vara ackrediterade av SWEDAC enligt ISO-standard. Idag saknas laboratorier som är ISO-certifierade för

metabarcoding-analys av plankton. En process för ackreditering bör med andra ord startas.

Dataflöde och databaser

I Fig 36 beskrivs dataflödet från provtagare till användare av biodiversitetsdata baserad på rDNA barcoding av 16S och 18S rDNA. För prokaryoter, d.v.s. arkéer och bakterier inklusive cyanobakterier bör databasen SILVA användas som referensdatabas. För encelliga eukaryoter bör databasen PR2 användas. En ny global databas kallad UniEuk för eukaryoter är under uppbyggnad med stöd av EU. Den kommer sannolikt att utgöra en ny standard inom några år. En databas för flercelliga eukaryoter, t.ex. fiskar och ryggradslösa djur, bör också användas. Det är viktigt att antalet referensdatabaser begränsas. Man bör helst verka för globala databaser men europeiska, nordiska eller svenska databaser är också möjliga.

Det är nödvändigt att upprätta en databas för sekvenserna från planktonproverna. Den kan antingen placeras som en del av det nationella datavärdskapet för marinbiologi och oceanografi vid SMHI eller placeras någon annanstans, t.ex. vid SNIC, Vetenskapsrådets system för hantering av stora datamängder. Sekvens-data bör också deponeras i publika sekvens-databaser som ENA (EBI's databas).

Slutresultatet av metabarcoding-data, d.v.s. listor över operational taxonomic units (~artlistor) från enskilda prover, bör förvaltas och tillgängliggöras av nationell datavärd för marinbiologi och oceanografi, för närvarande SMHI. Den nationella datavärden gör sedan data tillgängliga för nationella och internationella användare.

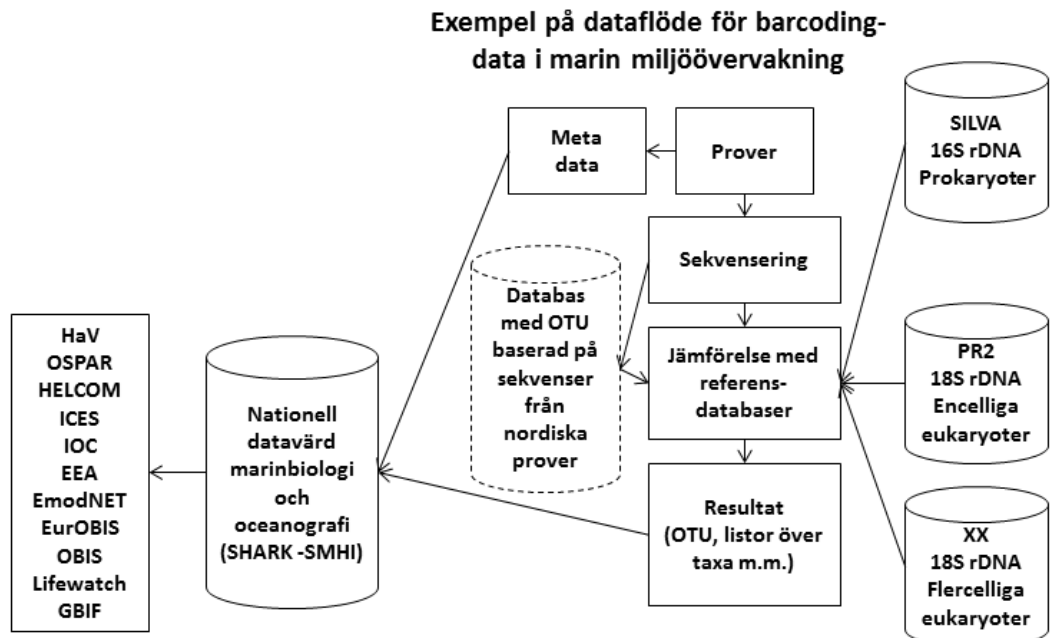


Fig. 36 Ett exempel på dataflöde från prover till användare av biodiversitetsdata baserad på barcoding av rDNA. Sekvenser från prover kan antingen lagras hos nationell datavärd eller i en databas som skapas speciellt för detta ändamål.

Övrigt internationellt samarbete

UNESCO-IOC (Intergovernmental Oceanographic Committee) och SCOR (Scientific Committee on Oceanic Research) har startat ett flerårigt forskningsprogram kallat GlobalHAB. Inom ramen för GlobalHAB används och utvecklas molekylärbiologisk teknik för studier av skadliga algblomningar. GlobalHAB planerar att anordna en eller flera workshops/open science meetings inom detta område.

ICES har arbetsgrupper inom vilket det sker samarbete vad gäller molekylärbiologisk teknik för planktonforskning och invasiva arter. Vid arbetsgruppernas möten presenteras nya resultat och speciella workshops kommer att arrangeras. Den relativt nyetablerade arbetsgruppen ICES Working Group on Integrated Morphological and Molecular Taxonomy (WGIMT) är högst relevant. Det är viktigt att fortsätta arbetet gällande plankton i WGPME (Working Group on Phytoplankton and Microbial Ecology), WGHABD (Working Group on Harmful Algal Bloom Dynamics) och WGZE (Working Group on Zooplankton Ecology). När det gäller invasiva arter är det arbetsgrupperna WGITMO (Working Group on Introduction and Transfers of Marine Organisms) och WGBOSV (Working Group on Ballast and Other Ship Vectors) som är relevanta.

Det pågår även EU-projekt som arbetar med dessa frågor, bl.a. JERICO-NEXT, som SMHI deltar i. Inom BONUS-programmet för Östersjön pågår BLUEPRINT som är inriktat på bakterier och AFISMON som är inriktat på att ta fram automatiserad provtagningsutrustning. KTH deltar i båda dessa.

Erkännanden

TransAtlantic AB, besättning och kapten på lastfartyget TransPaper, har gjort det möjligt att installera och driva ett FerryBox-system på fartyget. Detta har gjort vår vattenprovtagning möjlig. Stort tack för detta. EU-projektet JERICO (Framework Program 7) har bidragit till att provtagning och analyser kunnat genomföras. Lars Edler utförde mikroskop-analyserna av planktonproverna. DNA sekvenseringen utfördes av National Genomics Infrastructure (NGI) på Science for Life Laboratory i Stockholm. HPLC-analys av klorofyll a utfördes av Inst. för biologi och miljövetenskap, vid Göteborgs universitet. Marie Johansen, SMHI, har läst manuskriptet och kommit med kloka förbättringsförslag.

Förkortningar och ordförklaring

BLAST Basic Logical Alignment Search Tool <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

PR2 Protist Ribosomal Reference Database <http://ssu-rrna.org>

SILVA SILVA ribosomal RNA database project <http://arb.silva.de>

UniEuk A Universal taxonomic framework and integrated reference gene database for Eukaryotic biology, ecology and evolution

Referenser

OBS! Inte alla referenser i listan omnämns i texten. Övriga referenser har tagits med som ytterligare information.

Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M., 2012. Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 4, 143-176.

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

Bott, N.J., Ophel-Kellener, K.M., Sierp, M.T., Rowling, K.P., McKay, A.C., Loo, M.G.K., Tanner, J.E., Deveney, M.R., 2010. Toward routine, DNA-based detection methods for marine pests. *Biotechnol. Adv.* 28, 706-714.

Campbell, L. 2001. Flow cytometric analysis of autotrophic picoplankton. *Methods in Microbiology: Marine Microbiology* (pp. 317–341). J. H. Paul (Ed.) Academic Press, San Diego.

Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., et al. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 42, D633–42.

De Vargas C., Audic S., Henry N., Decelle J., Mahe F., Logares R., Lara E., Berney C., Le Bescot N., Probert I., Carmichael M., Poulain J., Romac S., Colin S., Aury J-M., Bittner L., Chaffron S., Dunthorn M., Engelen S., Flegontova O., Guidi L., Horak A., Jaillon O., Lima-Mendez G., Lukes J., Malviya S., Morard R., Mulot M., Scalco E., Siano R., Vincent F., Zingone A., Dimier C., Picheral M., Searson S., Kandels-Lewis, S., Acinas S.G., Bork P., Bowler C., Gorsky G., Grimsley N., Hingamp P., Iudicone D., Not F., Ogata H., Pesant S., Raes J., Sieracki M.E., Speich S., Stemmann L., Sunagawa, S., Weissenbach J., Wincker P., Karsenti E. & Tara Oceans Coordinators 2015. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science* 348: 1-11. Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461.

Ebenezer V., Medlin L.K. & Ki J-S. 2012. Molecular Detection, Quantification, and Diversity Evaluation of Microalgae. *Marine Biotechnology* 14: 129-142.

Edler, L., Elbrächter, M. 2010. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. in: *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*, Eds. Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. Intergovernmental Oceanographic Commission Manual and guides, pp 55: 13-20.

Egge, E.S., Eikrem, W. & Edvardsen, B. 2015. Deep-branching Novel Lineages and High Diversity of Haptophytes in the Skagerrak (Norway) Uncovered by 454 Pyrosequencing. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62, 121–140.

Egge, E.S., Johannessen, T.V., Andersen, T., Eikrem, W., Bittner, L., Larsen, A., Edvardsen, B. 2015. Seasonal diversity and dynamics of haptophytes in the Skagerrak, Norway, explored by high-throughput sequencing. *Molecular Ecology* 24, 3026–3042.

Eiler, A., Drakare, S., Bertilsson, S., Pernthaler, J., Peura, S., Rofner, C., et al. (2013). Unveiling distribution patterns of freshwater phytoplankton by a next generation sequencing based approach. *PLoS One* 8, e53516.

Engesmo, A. 2016. Identification and quantification of ichthyotoxic flagellates. PhD thesis, University of Oslo. 37 pp.

- Engesmo, A., Strand, D., Gran, S., Edvardsen, B., Medlin, L.K., Eikrem, W. Manuscript. Development of a qPCR assay to detect and quantify ichthyotoxic flagellates along the Norwegian coast, with the first Norwegian record for *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae)
- EU 2000. Directive 2000/60/EC of the European parliament and of the council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy
- EU 2008. Directive 2008/56/EC Of the European parliament and of the council of 17 June 2008 establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive). Official Journal of the European Union. 64:19-40.
- EU 2010. Commission decision 2010/477/EU of 1 September 2010 on criteria and methodological standards on good environmental status of marine waters. Official Journal of the European Union. 232/14-24.
- Godhe, A. Caroline Cusack, John Pedersen, Per Andersen, Donald M. Anderson, Eileen Bresnan, Allan Cembella, Einar Dahl, Sonja Diercks, Malte Elbrächter, Lars Edler, Luca Galluzzi, Christine Gescher, Melissa Gladstone, Bengt Karlson, David Kulis, Murielle LeGresley, Odd Lindahl, Roman Marin, Georgina McDermott, Linda K. Medlin, Lars-Johan Naustvoll, Antonella Penna, Kerstin Töbe. (2007) Intercalibration of classical and molecular techniques for identification of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) and estimation of cell densities. *Harmful Algae*;56-72
- Godhe, A., Asplund, M. E., Härnström, K., Saravanan, V., Tyagi, A., and Karunasagar, I. (2008). Quantification of Diatom and Dinoflagellate Biomasses in Coastal Marine Seawater Samples by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7174–7182.
- Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., et al. (2013). The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 41, D597–604.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J. & Williams P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.
- HELCOM 2015 Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM. 413 pp. World-wide electronic publication, Helsinki Commission, <http://helcom.fi/action-areas/monitoring-and-assessment/manuals-and-guidelines/combine-manual> downloaded on 24 June 2015.
- Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., and Andersson, A. F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 5, 1571–1579.
- Hu, Y.O.O., Karlson, B., Charvet, S., Andersson, A.F. 2016. Diversity of pico- to mesoplankton along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *Front. Microbiol.* 7:679.
- Hugerth, L. W., Muller, E. E. L., Hu, Y. O. O., Lebrun, L. A. M., Roume, H., Lundin, D., et al. (2014a). Systematic design of 18S rRNA gene primers for determining eukaryotic diversity in microbial consortia. *PLoS One* 9, e95567.
- Hällfors, G. (2004). Checklist of Baltic Sea Phytoplankton Species. Helsinki Commission; Baltic Marine Environment protection Commission Available at: <http://helcom.fi/Lists/Publications/BSEP95.pdf>.

- Karlson, B. 2014. Monitoring Methods of Phytoplankton in the Baltic Sea and Kattegat-Skagerrak. Swedish Agency for Marine and Water Management, report 2014:26, 38 pp.
- Karlson, B., Andersson, L. Kaitala, S., Kronsell, J., Mohlin, M., Seppälä, Willstrand-Wranne, A. In Press. Oceanographic variability in near surface waters of the Baltic Sea and the Kattegat – a comparison of Ferrybox data vs. monitoring data from research vessels.
- Karlson, B., Andreasson, A., Johansen, M., Mohlin, M., Skjevik, A-T., Strömberg, P. (2015). Plankton Toolbox – open source software making it easier to work with plankton data, Proceedings of the 16th International Conference on Harmful Algal Blooms, 27 Oct. to 1 November, 2014, Wellington, New Zealand.
- Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). 2010. Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, no. 55.) (IOC/2010/MG/55) 110 pages.
- Kremp, A., Lindholm, T., Dreßler, N., Erler, K., Gerdts, G., Eirtovaara, S., et al. (2009). Bloom forming *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in shallow waters of the Åland Archipelago, Northern Baltic Sea. Harmful Algae 8, 318–328.
- MacIsaac, E. A., and Stockner, J. G. 1993. Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy. In Handbook of methods in aquatic microbial ecology. P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr, and J. J. Cole (eds.) Lewis, Boca Raton. pp. 187–197.
- Medlin, L.K. 2013. Molecular tools for monitoring harmful algal blooms. Environmental Science and Pollution Research 20: 6683–6685.
- Menden-Deuer S & EJ Lessard. 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. Limnology & Oceanography 45: 569-579
- Not, F., del Campo, J., Balagué, V., de Vargas, C., and Massana, R. (2009). New insights into the diversity of marine picoeukaryotes. PLoS One 4, e7143.
- Not, F., Valentin, K., Romari, K., Lovejoy, C., Massana, R., Töbe, K., et al. (2007). Picobiliphytes: a marine picoplanktonic algal group with unknown affinities to other eukaryotes. Science 315, 253–255.
- Ojaveer, H., Jaanus, A., Mackenzie, B.R., Martin, G., Olenin, S., Radziejewska, T., et al. (2010). Status of biodiversity in the Baltic Sea. PLoS ONE 5: e12467.
- Olenina, I., Hajdu, S., Edler, L., Andersson, A., Wasmund, N., Busch, S., Göbel, J., Gromisz, S., Huseby, S., Huttunen, M., Jaanus, A., Kokkonen, P., Ledaine, I. and Niemkiewicz, E. 2006 Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea HELCOM Balt. Sea Environ. Proc. No. 106, 144pp
<http://helcom.fi/Lists/Publications/BSEP106.pdf> (7 October 2015).
- Olson, R.J and H. M. Sosik. 2007. A submersible imaging-in-flow instrument to analyze nano- and microplankton: Imaging FlowCytobot. Limnol. Oceanogr. Methods
- Prokopowich, C. D., Gregory, T. R., and Crease, T. J. (2003). The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. Genome 46, 48–50.
- Rhodes L., Smith K. & Moisan C. 2013. Shifts and stasis in marine HAB monitoring in New Zealand. Environmental Science and Pollution Research 20: 6872-6877.

- Sosik, H. M., and R. J. Olson. 2007. Automated taxonomic classification of phytoplankton sampled with imaging flow cytometry. *Limnol. Oceanogr. Methods*.
- Spencer, S. J., Tamminen, M. V., Preheim, S. P., Guo, M. T., Briggs, A. W., Brito, I. L., et al. (2015). Massively parallel sequencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers. *ISME J.* doi:10.1038/ismej.2015.124.
- Thomsen, H. A., and Oates, K. (1978). *Balaniger balticus* gen. et sp. nov. (Prymnesiophyceae) from Danish coastal waters. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 58, 773–779.
- Tyrrell, T., Schneider, B., Charalampopoulou, A., and Riebesell, U. (2008). Coccolithophores and calcite saturation state in the Baltic and Black Seas. *Biogeosciences* 5, 485–494.
- Utermöhl H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt int Verein theor angew Limnol* 9: 1-38.
- Wright, S.W., Jeffrey, S.W., 1997. High-resolution HPLC system for chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton. In: Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W. (Eds.), *Phytoplankton Pigments in Oceanography*. UNESCO Publishing, Paris, pp. 327–342.
- Zamor R.M., Glenn K.L. & Hambright K.D. 2012. Incorporating molecular tools into routine HAB monitoring programs: Using qPCR to track invasive *Prymnesium*. *Harmful Algae* 15: 1-7.

Rapporten har producerats av SMHI och KTH-Science for Life Laboratory på uppdrag av Havs- och vattenmyndigheten.



www.smhi.se



www.kth.se



www.scilifelab.se