

TARTU ÜLIKOOL
EESTI MEREINSTITUUT JA
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
LOODUSRESSURSSIDE ÕPPETOOL

Katri Kalda

**Formaliini ja etanooliga fikseerimise mõju kalade
kehamõõtmetele**

Magistritöö

Juhendaja: Imre Taal

TARTU 2015

Sisukord

1. Sissejuhatus.....	3
2. Kirjanduse ülevaade	6
2.1 Kalade säilitamine.....	6
2.2.1 Formaliin	9
2.2.2 Etanool	12
2.2.3 Külmutamine.....	13
3. Materjal ja metoodika.....	15
3.1 Uurimisala.....	15
3.2 Püügimetoodika ja analüüs	15
3.3 Andmeanalüüs	16
4. Tulemused	18
4.1 Massi muutus	18
4.2 Täispikkuse muutus	21
5. Arutelu	24
Kokkuvõte	29
Tänuavaldused	31
Kasutatud kirjandus	32
Lisad	40

1. Sissejuhatus

Teaduslikel uuringutel on logistilistel põhjustel sageli vajalik kogutud proovide hoiustamine hilisemaks analüüsiks, mistõttu on laialdaselt levinud proovide fikseerimine erinevate säilitusvahenditega (Culling, 1974). Fikseerimine on keemiline protsess, millega kindlustatakse kudedes toimuvate muutuste ärahoidmine, võimaldamaks organismi või selle osade surmajärgset analüüsi peale pikaajalist proovide säilitamist (Srinivasan *et al.*, 2002). Vastavalt uuringu eesmärgile valitakse sobiv fikseerimisviis. Kõige sagedamini on kasutatud organismi või selle osa fikseerimiseks ning pikaajaliseks säilitamiseks formaliini ja etanooli (Grønkjær & Wieland, 1997; Moku *et al.*, 2004; Mäkinen *et al.*, 2006; Höök *et al.*, 2008; Larmuseau *et al.*, 2010; Arula *et al.*, 2014; Vajargah & Hedayati, 2014 jpt).

Vee-elustiku uurimisel on kogutud proovide hoiustamine erinevates fiksaatorites üldteada meetoodika (Pampoulie *et al.*, 2000; Hahlbeck *et al.*, 2004; Cano *et al.*, 2008; Olsson *et al.*, 2013 jpt). Näiteks ihtüoloogilistel välitöödel puudub sageli võimalus vahetuks püügijärgseks analüüsiks (kogutud materjali läbitöötamine on liialt töömahukas), mistõttu on vajalik kalade fikseerimine hilisemaks laborianalüüsiks (Moku *et al.*, 2004). Peale laboris teostatavaid fikseeritud proovide mõõtmisanalüüse on võimalik teha tagasiarvutused eluskala algsele pikkusele ja massile (Cunningham *et al.*, 2000).

Kalade täispikkused ja massid koos struktuuridega, mille abil saab määrata kalade vanust (nt. soomused, lõpusekaaned, sahkluud, otoliidid) võimaldavad hinnata nende kasvukiirust erinevates vanuserühmades. Kalade kasvukiiruse määramine on oluline kalavarude säästlikul majandamisel ning lisaks saab selle põhjal otsustada kui head on kala toitumistingimused antud veekogus (Enneveer, 1985).

Erinevad kalade fikseerimismetoodikad põhjustavad paljudel kalaliikidel muutusi pikkuses, massis ning proovi kvaliteedis. Erinevates töodes on kalade säilitamiseks kasutatud formaliini (Fisher *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 2000; Vajargah & Hedayati, 2014), etanooli (Moku *et al.*, 2004; Brinkley *et al.*, 2008; König & Borcharding, 2012) ja külmutamist (Treasurer, 1990; Ajah & Nunoo, 2003; Paradis *et al.*, 2007). Sageli on uuritud ainult kala täispikkuse muutuseid (nt: Hay, 1982; Takizawa *et al.*, 1994; Cunningham *et al.*, 2000; Buchheister & Wilson, 2005; Niazie *et al.*, 2013; Vajargah & Hedayati, 2014 jpt) ja vähem tähelepanu pööratud massi muutustele (nt Treasurer, 1990;

Paradis *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012). Massi muutust on enamasti uuritud külmutamisel ning vähem tähelepanu pööratud etanoolis ja formaliinis fikseerimisele.

Kalade fikseerimisel etanooli ja formaliiniga on täheldatud nii liigispetsiifilisi (Al-Hassan *et al.*, 2000; Buchheister & Wilson, 2005), kui ka kasutatavast fiksaatorist sõltuvaid muutusi fikseeritud materjali kehamõõtmetes (Theilacker, 1980; Cunningham *et al.*, 2000; Jawad, 2003). Käesolevaks hetkeks on tehtud mitmeid erinevaid uuringuid fiksaatori mõju kohta, kuid vähem on uuritud, milline on kahe erineva fiksaatori mõju erinevatel kala liikidel.

Enamikes seni avaldatud erinevate fiksaatorite mõju käsitlevates teadustöodes on uurimisobjektidena eelkõige kasutatud majanduslikult olulisi kalaliike (nt: Fox, 1996; Armstrong & Stewart, 1997; Lee *et al.*, 2012; Morison *et al.*, 2003). Majanduslikult ebaolulistele, kuid ökoloogiliselt siiski tähtsatele liikidele on pööratud vähem tähelepanu, mistõttu on ka avaldatud teadustööde hulk vähene (nt: Ajah & Nunoo, 2003; Vajargah & Hedayati, 2014).

Majanduslikult väheväärtuslikud kalad on oluliseks komponendiks kogu piirkonna kalastiku liigirikkusest (Maes *et al.*, 2003). Sageli on vee ökosüsteemides majanduslikult oluliste kalaliikide osakaal, võrrelduna majanduslikult ebaoluliste kalaliikidega, tunduvalt väiksem. Näiteks Kalifornia ranniku umbes 550 kalaliigist on majanduslikult olulised ainult 3% (Horn, 1980). Musta mere muutuvast kalastiku koosseisus arvatakse olevat pidevalt *ca* 200 liiki, kuid majanduslikult oluliseks loetakse neist peamiselt nelja liiki, mis moodustavad *ca* 90% kogu väljapüütavast kalahulgast (Eremeev & Zuyev, 2007). Antud piirkonnas puudub ühtne kalavarude regulatsioon, mistõttu erinevates riikides on majanduslikult oluliste liikide tähtsus erinev (Artüz, 1999; Caddy, 2008; GFCM, 2012). Läänemeres arvatakse püsivalt elavat *ca* 100 kalaliiki, samas kui töönduspüügi saakidest moodustavad ligikaudu 90% ainult kilu (*Sprattus sprattus balticus*), räim (*Clupea harengus membras*), tursk (*Gadus morhua callarias*) ja lest (*Platichthys flesus*) (HELCOM 2012).

Läänemeremadalaid rannikulähedasi merealasiid asustavad majanduslikult pigem väärtusetud, väikesemõõtmelised kalaliigid ja mitmete lokaalselt oluliste töönduskalade noorjärgud (Thorman, 1986; Rajasilta, *et al.* 1999; Ustups, *et al.* 2007). Seega on kaldavöönd (litoraal) oluline elupaik paljudele kalaliikidele, pakkudes soodsaid tingimusi paljunemiseks, kasvamiseks ja toitumiseks. Samas on need kalad osa mereökosüsteemist,

kellel on oluline roll Läänemere toiduahelates (Baran, 2002; Maes *et al.*, 2003), kus nad on ise nii kiskjad, saakloomad kui ka konkurendid. Näiteks lesta toiduobjektide hulka võib erinevatel arenguetappidel kuuluda nii ogalik, luukarits kui ka mudillased (Ojaveer & Dreves, 2003; Jürgens, 2009). Samal ajal on lesta toiduks teistele röövtoidulistele loomadele (Boström *et al.* 2012). Juhul kui toiduahelast kaob üks n.ö. väike lüli, võib see kõrgemal tasemel kaasa tuua muutuseid (Fretwell, 1987; Post, 2002). Paraku on litoraali kalakooslused Läänemeres, tõenäoliselt seoses aeganõudva püügi- ja analüüsimetoodikaga, suhteliselt vähe uuritud (vt. nt. Sundell, 1994).

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on selgitada, kui palju formaliini ja etanooliga fikseerimine mõjutab uuritavate kalade täispikkust ja massi ning kas antud liikidel on kehamõõtmete muutused sarnased. Käsitletakse kaheksat Läänemere litoraali asustavat liiki: ogalik (*Gasterosteus aculeatus*), luukarits (*Pungitius pungitius*), raudkiisk (*Spinachia spinachia*), madunõel (*Nerophis ophidion*), väike mudilake (*Pomatoschistus minutus*), pisimudilake (*P. microps*), kirjumudil (*Gobiusculus flavescens*) ja lesta (*Platichthys flesus trachurus*).

Antud liigid said valitud käesolevasse töösse, kuna tegemist on Läänemeres üsna arvukate liikidega ning puuduvad andmed, kuidas fikseerimine mõjutab antud kalaliike. Kõnealuste liikide uuringud on olulised, sest nad on ökoloogiliselt tähtsad, kuigi neid peetakse tõenduslikult väärtusetuteks. Kalade üldise seisundi hindamiseks kasutatakse pikkust ja massi. Käesoleva töö tulemused võimaldavad edaspidi mitmete Läänemere litoraaliaala asustavate kalaliikide puhul teha tagasiarvutused eluskala algele pikkusele ja massile, nii formaliinis kui ka etanoolis fikseerimise korral.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1 Kalade säilitamine

Teaduslikes uuringutes on sageli vajalik proovide säilitamine hilisemaks laboratoorseks analüüsiks. Tänapäeval on hilisema analüüsi tarbeks laialdaselt kasutusel ihtüoloogilise materjali säilitamine erinevates fiksaatorites (tabel 1). Fiksaatorites säilitamise tagajärjel muutuvad kalade kehamõõtmed (pikkus, mass). Teades erinevate säilitamisviiside mõju proovide parameetritele, on hiljem lihtne teha tagasiarvutusi leidmaks elusa kala tegelikku pikkust ja massi (Fisher *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 2000; Moku *et al.*, 2004; Korwin-Kossakowski, 2014).

Tabel 1. Kirjandusel põhinev tabel, kirjeldamaks uuritud liikide fikseerimisega kaasnevaid morfoloogilisi muutuseid protsentides. Tähistus: TL - täispikkus, SL - standardpikkus, FL - Smitti pikkus, ¹ - lahus on tehtud mereveega, ² - lahus on tehtud destilleeritud veega, negatiivne muutuse väärtus (nii pikkusel kui massil) näitab kahanemist ja positiivne suurenemist.

Liik	Säilitamismeetod	Pikkus (mm)	Pikkuse muutus	Massi muutus	Allikas
<i>Engraulis mordax</i>	formaliin 5%	3,9–21,6 _{SL}	-8	-	Theilacker, 1980
	etanol 80%	3,7–19,0 _{SL}	0	-	
<i>Merluccius bilinearis</i>	formaliin 4% ¹	3,7–14,4 _{TL}	-4,3	-	Fowler & Smith, 1983
	etanol 95%	3,2–16,8 _{TL}	-7,0	-	
	külmutamine -15C	4,6–41,0 _{TL}	+1,4	-	
<i>Mallotus villosus</i>	formaliin 5%	4,5–22,9 _{TL}	-5,2	-	Kruse & Dalley, 1990
	etanol 100%	4,6–19,6 _{TL}	-14,4	-	
<i>Esox lucius</i>	külmutamine -25C	19–83 _{FL}	-5,4	-2,6	Treasurer, 1990
<i>Perca fluviatilis</i>	külmutamine -25C	11–34 _{FL}	-1,7	-2,7	Treasurer, 1990
<i>Phoxinus phoxinus</i>	formaliin 5%	48–86 _{TL}	-1,30	4,65	Puigcerver, 1999
<i>Mullus barbatus</i>	formaliin 5% ²		+0,27	-	Al-Hassan <i>et al.</i> , 2000
	formaliin 5%		0	-	
	formaliin 10%		+0,59	-	
	etanol 70% ²		-2,33	-	
	etanol 70% külmutamine		-2,0 -2,36	- -	
<i>M. surmuletus</i>	formaliin 5% ²		+0,92	-	Al-Hassan <i>et al.</i> , 2000
	formaliin 5%		+1,41	-	
	formaliin 10%		+0,60	-	
	etanol 70% ²		-4,44	-	
	etanol 70% külmutamine		-3,07 -4,01	- -	
<i>Menidia beryllina</i>	formaliin 5%	7,8–27,9 _{TL}	-2,2	-	Cunningham <i>et al.</i> , 2000
	formaliin 10%	8,6–27,0 _{TL}	-3,2	-	
	etanol 80%	6,3–26,7 _{TL}	-3,9	-	
	etanol 100%	8,4–29,7 _{TL}	-4,1	-	

Liik	Säilitamismeetod	Pikkus (mm)	Pikkuse muutus	Massi muutus	Allikas
<i>Theragra chalcogramma</i>	formaliin 5% ¹	5,61–9,43 _{SL}	-10	-	Porter <i>et al.</i> , 2001
	etanool 95%	5,41–9,25 _{SL}	-6	-	
<i>Osmerus eperlanus</i>	etanool 96% ¹	18,6 _{SL}	-6,9	-	Fey, 2002
<i>Sardinella aurita</i>	formaliin 10%	9,5 _{FL}	-7,1	-13,3	Ajah & Nunoo, 2003
	külmutamine -40C	9,7 _{FL}	-3,0	-14,2	
<i>Alepes djeddaba</i>	formaliin 5%	160–170 _{SL}	-6,27	-	Jawad, 2003
	formaliin 5% ²	160–170 _{SL}	0	-	
	formaliin 10%	160–170 _{SL}	0	-	
	formaliin 10% ²	160–170 _{SL}	-5,41	-	
	etanool 70%	160–170 _{SL}	-0,88	-	
	etanool 70% ²	160–170 _{SL}	-2,20	-	
	külmutamine	160–170 _{SL}	+12,43	-	
<i>Diaphus spp.</i>	formaliin 5% ¹	5,2–10,2 _{TL}	-1,6	-	Moku <i>et al.</i> , 2004
	formaliin 10% ¹	5,1–6,7 _{TL}	-1,1	-	
	etanool 70%	5,7–9,2 _{TL}	-2,4	-	
	etanool 90%	5,1–8,8 _{TL}	-4,7	-	
<i>T. chalcogramma</i>	formaliin 5% ¹	21–60 _{SL}	-(1,6–1,8)	-	Buchheister & Wilson, 2005
	formaliin 10% ¹	40–98 _{SL}	-(4,1–3,9)	-(13,4–8,4)	
	etanool 95%	18–55 _{SL}	-(5,7–1,9)	-	
	külmutamine -80C, siis 20C	37–217 _{SL}	-(4,1–1,7)	-(8,4–5,1)	
<i>Mallotus villosus</i>	külmutamine -80C, siis -20C	67–114 _{SL}	-(5,6–3,9)	-(1,7–3,5)	Buchheister & Wilson 2005
<i>Thaileichthys pacificus</i>	külmutamine 80C, siis -20C	62–216 _{SL}	-(2,7–1,4)	-(3,5–1,1)	Buchheister & Wilson 2005
<i>Brevoortia tyrannus</i>	etanool 95%	19,1–31,4 _{SL}	-3,9	-	Fey & Hare 2005
<i>Perca flavescens</i>	etanool 75%	12,1–18,1 _{TL}	-11,7	-66	Paradis <i>et al.</i> , 2007
		37–58,7 _{TL}	-1,2	-26	
	formaliin 10%	10,8–18,8 _{TL}	-10,1	-23,2	
		39,0–56,5 _{TL}	-1,2	-3,9	
	külmutamine -80C	10,9–14,0 _{TL}	-7,2	52,8	
		36–57 _{TL}	-3,9	-8,4	
<i>P. fluviatilis</i>	etanool 70%	66,5 _{TL}	-3,5	-17	König & Borchering, 2012
<i>Pseudopleuronectes yokohamae</i>	etanool 70%	22,8–53,0 _{SL}	-5,6	-27,8	Lee <i>et al.</i> , 2012
<i>Carassius auratus</i>	formaliin 10%	70–100 _{TL}	-6,9	-	Niazie <i>et al.</i> , 2013
<i>Anguilla anguilla</i>	külmutamine -20C	81–989 _{TL}	1,3–4,8	6,0–19,6	Simon, 2013
<i>Alburnoides eichwaldii</i>	formaliin 10%	77,9 _{TL}	-2,8	-	Vajargah & Hedayati, 2014

Ihtüoloogiliste proovide säilitamisel on kõige sagedamini kasutatavad fiksaatorid 10% formaliin (HCHO) ehk formaldehüüdi vesilahus ja 70% etanooli (C₂H₅OH) vesilahus (Pampoulie *et al.*, 2000; Hahlbeck *et al.*, 2004; Moku *et al.*, 2004; Cano *et al.*, 2008; Vajargah & Hedayati, 2014). Kirjanduse andmetel on kalade fikseerimiseks kasutatud ka näiteks 100% etanooli (Fisher *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 2000) või 5% formaliini

(Cunningham *et al.*, 2000; Jawad, 2003; Moku *et al.*, 2004). Universaalse fikseerimismeetodi puudumisel on omavahel kombineeritud erinevaid meetodeid. Neave *et al.* (2006) analüüsisid sõõrsuude morfoloogilisi muutusi fiksaatorites kahel silmu liigil: põhja-ameerikasilmul (*Ichthyomyzon fossor*) ja hõbejal ameerikasilmul (*I. unicuspis*). Esmalt fikseeriti silmud 10% formaliinis 48 tunniks ning seejärel säilitati neid 95% etanoolis. Sarnaselt on kasutatud ka etanooliga fikseerimist, kus stabiilse temperatuuri tagamiseks on külmutatud proovimaterjal koos etanoolilahusega (Gagliano *et al.*, 2006).

Erinevate säilitamisviiside mõju kalade keha mõõtmetele on liigispetsiifiline. Kirjanduse andmetel sõltuvad kõnealused muutused erinevatest välistest faktoritest: fiksaatori kontsentratsioonist (Cunningham *et al.*, 2000; Jawad, 2003; Moku *et al.*, 2004), kala vanusest ja suurusest (Fey, 2002; Paradis *et al.*, 2007) ning ajast, mis jääb surma ja fikseerimise vahele (Gagliano *et al.*, 2006). Tõestust on leidnud, et kaladel toimub oluline surmajärgne täispikkuse muutus ka ilma fiksaatorita (Morison *et al.*, 2003; Morison, 2004). Sellest tulenevalt on väga oluline kalade võimalikult kiire fikseerimine pärast nende püüdmist. Muutused kehamõõtmetes on mõjutatud ka sellest, kuidas kala keha füüsiliselt asetseb fiksaatoris. Armstrong & Stewart (1997) on leidnud, et mida sirgemalt on võimalik proovi fiksaatoris säilitada, seda vähem avaldab fiksaator mõju kalade pikkuse ja massi muutusele. Kehamõõtmete muutused on seotud kala väliste tunnustega. Kalade välistest erinevusest (lame, peenike, pikk jne) tulenevaid kehamõõtmete muutuseid on uuritud 5% ja 10% formaliinis ning 70% ja 95% etanoolis punase pisikarbiku (*Cyprinella lutrensis*), karestiku-vöötnina (*Rhinichthys cataractae*) ja roheline päikeseahvena (*Lepomis cyanellus*) näitel (Brinkley *et al.*, 2008). Leiti, et suurema kehapinnaga kaladel esinevad fikseerimise tagajärjel suuremad muutused kehapikkuses. Fikseeritud kaladega toimuvad muutused on seotud ka nende keha veesisaldusega (Jawad, 2003; Lee *et al.*, 2012). Antud töödes leiti, et suurema veesisaldusega organismid on vastuvõtlikumad fiksaatori mõjule.

Kehamõõtmete muutuse suurus sõltub proovi fiksaatoris seismise ajast. Kasutatud meetodikast ja uuritavast liigist olenemata toimuvad suurimad muutused fikseeritud kalade mõõtmetes esimese nädala jooksul, seejärel toimub stabiliseerumine (Fisher *et al.*, 1998; Moku *et al.*, 2004). Nimetatud stabiliseerumine toimub nii fikseeritud kalade kehamõõtmete suurenemise (positiivne muutus) kui ka vähenemise (negatiivne muutus) puhul (Fowler & Smith, 1983; Fox, 1996; Xiong *et al.*, 2007).

Takizawa *et al.* (1994) on leidnud, et fikseerimisega kaasnevad keha mõõtmete muutused erinevad liigisiselt, mistõttu tuleb vastavalt uuritavate kalade arengustaadiumile arvestada nende anatoomilisi erisusi. Seega üht liiki uurides tuleb proovid jaotada valimiteks, kus analüüsitavad isendid oleksid võimalikult väikese pikkuse vahega ning samast vanuseklassist (Jawad, 2003). Sel viisil vähendatakse kalade kehamõõtmete erinevusest tingitud tulemuste suurt varieeruvust fikseerimisel (Brinkley *et al.*, 2008). Paljudes töodes puudub pikkusklassidesse jaotamine ja andmeanalüüsi on kaasatud mõõtmelilt suure varieeruvusega isendeid (Treasurer, 1990; Buchheister & Wilson, 2005; Lee *et al.*, 2012; Simon, 2013). Mitmed autorid on oma tööde materjali ja metoodika peatükis andnud vaid uuritavate kalade mõõdetud pikkuste vahemiku (Fowler & Smith, 1983; Cunningham *et al.*, 2000; Buchheister & Wilson, 2005; Lee *et al.*, 2012) või määratlenud ainult keskmise pikkuse (Fisher *et al.*, 1998; Fey, 2002; Ajah & Nunoo, 2003; König & Borcharding, 2012; Vajargah & Hedayati, 2014). Eraldi võib välja tuua Al-Hassan *et al.* (2000) töö, kus on jäänud mainimata, milliste algpikkustega kalu autorid oma katses on kasutanud.

Kalade kehamõõtmete muutusi erinevates fiksaatorites on logistilistel põhjustel eelkõige uuritud väikese mõõtmelisel kaladel. Seetõttu on uuritavate objektide hulka kuulunud kalamari (Korwin-Kossakowski, 2014), vastsed (Hay, 1982; Fowler & Smith, 1983; Fisher *et al.*, 1998; Porter *et al.*, 2001; Ajah & Nunoo, 2003; Moku *et al.*, 2004; Fey & Hare, 2005; Gagliano *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2007; Korwin-Kossakowski, 2014), maimud (Puigcerver, 1999; Fey & Hare, 2005; König & Borcharding, 2012; Lee *et al.*, 2012; Niazie *et al.*, 2013; Simon, 2013; Korwin-Kossakowski, 2014) ja väikesekasvulised kalaliigid (Brinkley *et al.*, 2008).

2.2.1 Formaliin

Vaatamata sellele, et formaliin on tugev kantserogeen, kasutatakse seda endiselt laialdaselt fiksaatorina. Nii on formaliin (formaldehüüdi, CH₂O vesilahus) kui fiksaator ulatuslikult kasutusel ka veekeskonna elustikku käsitlevates teadustöodes (Haney & Hall, 1973; Black & Dodson, 2003; Wetzel *et al.*, 2005). Tänapäeval on formaliiniga fikseerimine muutunud teatavaks standardiks, sest see tungib kiiresti kudesse ja võimaldab seetõttu säilitada suuremõõtmelisi proove väga pikaajaliselt (Su *et al.*, 2004, Shahjalal *et al.*, 2008).

Lisaks muutub fikseeritud preparaat plastiliseks ning selle korduval uurimisel on väiksem võimalus seda kahjustada. Formaliiniga fikseerimine võimaldab säilitada elusorganismile omased välised tunnused ning seetõttu kasutatakse nimetatud fiksaatorit näiteks organismide või nende üksikute struktuuride pikaajalisel säilitamisel muuseumieksponaatidena (Culling, 1974).

Fiksaatorina ei sobi formaliin seevastu geneetilisteks uuringuteks, kuna muudab pöördumatult DNA struktuuri (Srinivasan *et al.*, 2002). Formaliin moodustab ristsidemeid rakus olevate molekulide (eriti valkude) vahel, moodustades mittelagundatava üksuse (Culling 1974; Su *et al.*, 2004), mistõttu pikemaajalisemal säilitamisel hilisem DNA ja RNA eraldamine ei ole võimalik. Vältimaks formaliooni mõju DNA struktuurile, on proovimaterjal esmalt fikseeritud etanoolis ning alles peale geneetiliste uuringute tegemist säilitatud formaliiinis. Näiteks Cano *et al.* (2008) uurisid ogaliku (*Gasterosteus aculeatus*) populatsioonide vahelisi geneetilisi erinevusi erinevates Euroopa piirkondades. Geneetiliste uuringute tarbeks fikseeriti ogalikud esmalt kaheks kuuks 96% etanooliga, misjärel kaladelt eemaldati DNA proovide tarbeks parem kõhuuim. Peale DNA proovide võtmist säilitati ogalikke 10% formaliiinis kuni morfoloogiliste mõõtmiste teostamiseni. On täheldatud, et formaliooni kahjustav mõju fikseeritava materjali struktuurile suureneb ajas (Dotti *et al.*, 2010), ehk mida pikem fikseerimise aeg, seda väiksem on eraldatava DNA või RNA hulk. Samuti ei sobi formaliin otoliidi mikrokeemia uuringuteks, sest omab degradeerivat mõju lubjastunud struktuuridele. Formaliiinis hoitud otoliitidelt pole võimalik määrata kalade vanust (Butler, 1992; Cunningham *et al.*, 2000).

Formaliini mõju kalade kehamõõtmetele erinevatel lahusekontsentratsioonidel on uuritud enamasti vastsete näitel (Fisher *et al.*, 1998; Moku *et al.*, 2004). Nimetatud töödes puudus oluline erinevus, millise kontsentratsiooniga formaliooni lahuses uuritavad objektid fikseeriti. Oluline oli seevastu uuritavate kalade kehamõõtmete muutus ajas. Moku *et al.* (2004) leidsid, et suuremad muutused kalade kehamõõtmetes toimusid 14 päeva jooksul peale fikseerimist. Seevastu Fisher *et al.* (1998) väitsid, et suuremad muutused uuritavate objektide kehamõõtmetes toimusid juba esimese seitsme päeva jooksul peale fikseerimist.

Formaliiniga fikseerimise mõju võib sõltuvalt välistest teguritest erineda ka ühe liigi piires. Theilacker (1980) uuris kunstlikult ja looduslikult kasvanud Kalifornia anšoovise (*Engraulis mordax*) vastsete kehamõõtmete erinevust formaliiiniga fikseerimisel. Tulenevalt kahest erinevast kasvukeskkonnast, erinesid ka fiksaatorist tulenevad muutused.

Looduslikult kasvanud Kalifornia anšoovise vastsetel esines, võrrelduna kunstlikult kasvanud vastsetega, formaliiniga fikseerimisel suurem täispikkuse muutus. Põhjustena toodi välja kalade erinev suurus, elukeskkond ja käitlemine enne fikseerimist. Looduslikult kasvanud vastsed võisid enne formaliiniga fikseerimist saada rohkem füüsilisi kahjustusi, kuna vastupidiselt kasvanduses kasvatatud vastsetele, püüti nad vabast loodusest võrguga.

Kalade säilitamisel formaliiniga on oluline tagada stabiilne väliskeskkonna temperatuur. On täheldatud, et temperatuuri suurenedes kasvab difusioonikiirus fikseeritava proovi koes ning kiirenevad keemilised reaktsioonid fiksaatori ja fikseeritava proovi vahel (Grizzle *et al.*, 2008). Seega formaliin tungib kõrgematel temperatuuridel kiiremini fikseeritud proovide kudedesse, mistõttu võivad tekkida koe kahjustused (Fox *et al.*, 1985). Hay (1982) uuris heeringa (*Clupea harengus pallasi*) näitel temperatuuri mõju heeringa täispikkusele formaliiniga fikseerimisel. Selgus, et heeringa säilitamisel formaliiniga temperatuuril kuni 20°C puudus oluline mõju täispikkuse muutusele.

Erinevatel kalaliikidel on kehamõõtmete muutused sõltuvad nii fiksaatorist, kui ka teistest välistest teguritest. Formaliinis fikseeritud kalad kaotavad võrrelduna etanoolis fikseeritud kaladega aja jooksul vähem oma täispikkusest (nt. Fisher *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 2000; Moku *et al.*, 2004; Brinkley *et al.*, 2008). Kõnealusele tendentsile leidub ka vastupidiste tulemustega uuringuid (Porter *et al.*, 2001). Nimetatud töös uuriti võrgu püügiga kaasnevate kahjustuste mõju avaldumist kalade fikseerimisel Vaikse ookeani mintai (*Theragra chalcogramma*) vastsete standardpikkuse muutuse näitel. Vastsed kasvatati laboris ja osa kalu töödeldi (hoiti) võrgul ning teisi mitte. Kalad, kellel jäljendati võrgupüüki võisid saada füüsilisi kahjustusi ning kaotasid 5% formaliinis rohkem standardpikkuses kui 95% etanoolis.

Mitmetes Läänemere regioonis teostatavates teadustöodes kasutatakse formaliini kalade või nende kehaosade fikseerimisel. Näiteks on formaliini kasutatud kalade populatsiooni arvukuse dünaamika (Arula *et al.*, 2014; Laur *et al.*, 2014), toitumisanalüüsi (Arula *et al.*, 2011) ja viljakuse alastel (Nissling *et al.*, 2015) uuringutel.

2.2.2 Etanool

Teiseks enimkasutatud fiksaatoriks on etanool (C_2H_5OH) ja selle vesilahused. Etanoolis fikseeritud preparaati saab kasutada geneetilisteks uuringuteks (Thakuria *et al.*, 2009), see tähendab, et etanoolis ei toimu ristsidemete teket valkudes. Vastupidiselt formaliinile kaotab etanoolis säilitatud preparaat oma iseloomuliku värvuse ja muutub pehmeks, mistõttu proovi analüüsides võib sellel tekkida soovimatuid füüsilisi muutusi (Gagliano *et al.*, 2006). Tulenevalt etanooli ebastabiilsusest (aurustumisest) võib esineda probleeme proovide säilitamisel kindlal lahusekontsentratsioonil, mistõttu tuleb proovide pikaajalisel säilitamisel lahust kindlasti uuendada (Black & Dodson, 2003).

Käesolevaks hetkeks on katsetes kasutatud erinevaid etanooli lahuse mahukontsentratsioone (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% ja 100%). Fisher *et al.* (1998) on uurinud kollase ahvena (*Perca flavescens*) vastsete täispikkuse muutust 100% ja 50% etanooli lahuses. Antud töös selgus, et ajas toimusid kõige suuremad muutused esimese 24 tunni möödudes, kus täispikkuse kahanemine oli mõlemal juhul 12,3%. Sarnasele tulemusele, kus puudus märgatav täispikkuse muutuse erinevus kahe erineva etanooli lahuse vahel, jõudsid ka Cunningham *et al.* (2000).

Kirjanduse andmetel (Paradis *et al.*, 2007) sõltub etanoolis fikseeritud kalade massi muutus oluliselt nende algsest täispikkusest. Lisaks erinevad massi muutused ka erinevates fiksaatorites, kuigi muutused pikkuses olid sarnased samadel täispikkustel. Näiteks kaotas kollane ahven 75% etanooli lahuses (TL 12,1–18,1mm) 66%, 10% formaliinis (TL 10,8–18,8 mm) 23,2% ning külmutamisel (TL 10,9–14,0 mm) suurenes 52,8% algsest massist. Suuremad ahvenad kaotasid samadel fiksaatori kontsentratsioonidel etanoolis (TL 37–58,7 mm) 26%, formaliinis (TL 39–56,5 mm) 3,9% ning külmutamisel (TL 36–57 mm) 8,4%.

Kirjanduse andmetel muutub etanoolis fikseeritud kalade pikkus võrreldes formaliinis fikseeritud kaladega aja jooksul rohkem (Fisher *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 2000; Moku *et al.*, 2004; Brinkley *et al.*, 2008). Etanoolis toimuvad ka suuremad massi muutused (Paradis *et al.*, 2007). Kalade pikkuse ja massi muutus on etanoolis säilitamise puhul seotud kala kehas sisalduva vee hulgaga (Jawad, 2003; Lee *et al.*, 2012). Fikseeritud kala kehamõõtmed vähenevad, kuna etanool seob organismis oleva vee, vähendades sellega kala kehamõõtmeid.

Kala kehamõõtmete muutused etanoolis on liigspetsiifilised (Takizawa *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 1998), seega ei ole võimalik ühe liigi põhjal teha üldistavaid järeldusi kõikide kalaliikide kohta. Sarnaselt formaliinile on kalade fikseerimise katseid etanoolis läbi viidud eelkõige noorjärkudega (Fox, 1996; Cunningham *et al.*, 2000; Fey & Hare, 2005; Wetzel *et al.*, 2005). Seetõttu puuduvad enamiku liikide täiskasvanud isendite etanoolis säilitamisel vastavad andmed kehapikkuse ja massi muutustest.

Senini teadaolevalt ei ole etanooliga fikseerimise mõju kalade kehamõõtmetele Läänemere regioonis elavatel liikidel teostatud. Etanooli on kasutatud DNA-proovide säilitamiseks geneetiliste uuringute tarbeks (Mäkinen *et al.*, 2006; Cano *et al.*, 2008; Höök *et al.*, 2008; Larmuseau *et al.*, 2010). Nimetatud töodes ei ole fiksaatorites säilitatud kogu kala vaid ainult DNA eraldamiseks vajaminev koeproov.

2.2.3 Külmutamine

Külmutamise kasutamisel proovide säilitamisel on oluline ühtlase temperatuuri tagamine (Armstrong & Stewart, 1997; Ogle, 2009). Oluline on ka kalade asend fikseeritud proovides (Armstrong & Stewart, 1997). Nimetatud uuringus külmutati lõhi (*Salmo salar*) kahel erineval viisil: sirgelt ja kõveraks painutatult. Tulenevalt füüsilistest kahjustustest olid täispikkuse muutused suuremad kõverdatud kaladel. Lisaks tuleks külmutamisel vältida proovi kokkupuudet õhuga, sest see põhjustab uuritava objekti kuivamist. Kuivamise tagajärjel fikseeritud objekt tõmbub kokku ning kaotab massi (Radke & Waiwood, 1980).

Lisaks teaduslikele uuringutele kasutatakse külmutamist kalade ja teiste meresaaduste säilitamiseks kaubanduslikul eesmärgil (Shatival *et al.*, 2008; El-Hanafy *et al.*, 2011; Sundararajan *et al.*, 2011; Coban, 2013). Antud eesmärgil külmutatud kalade puhul kasutatakse tänapäeval ka glasuurimist, kus kalad esmalt külmutatakse, seejärel kastetakse külma vette ning külmutatakse uuesti (Coban, 2013). Sel viisil püütakse takistada külmutatava objektiga toimuvaid keemilisi reaktsioone (nt. lipiidide oksüdatsiooni), et võimalikult hästi säilitada värske kala omadused (Shatival *et al.*, 2008). Töö autorile teadaolevalt ei ole kõnealust meetodit seniajani kalade kehamõõtmete uurimisel fiksaatorina kasutatud.

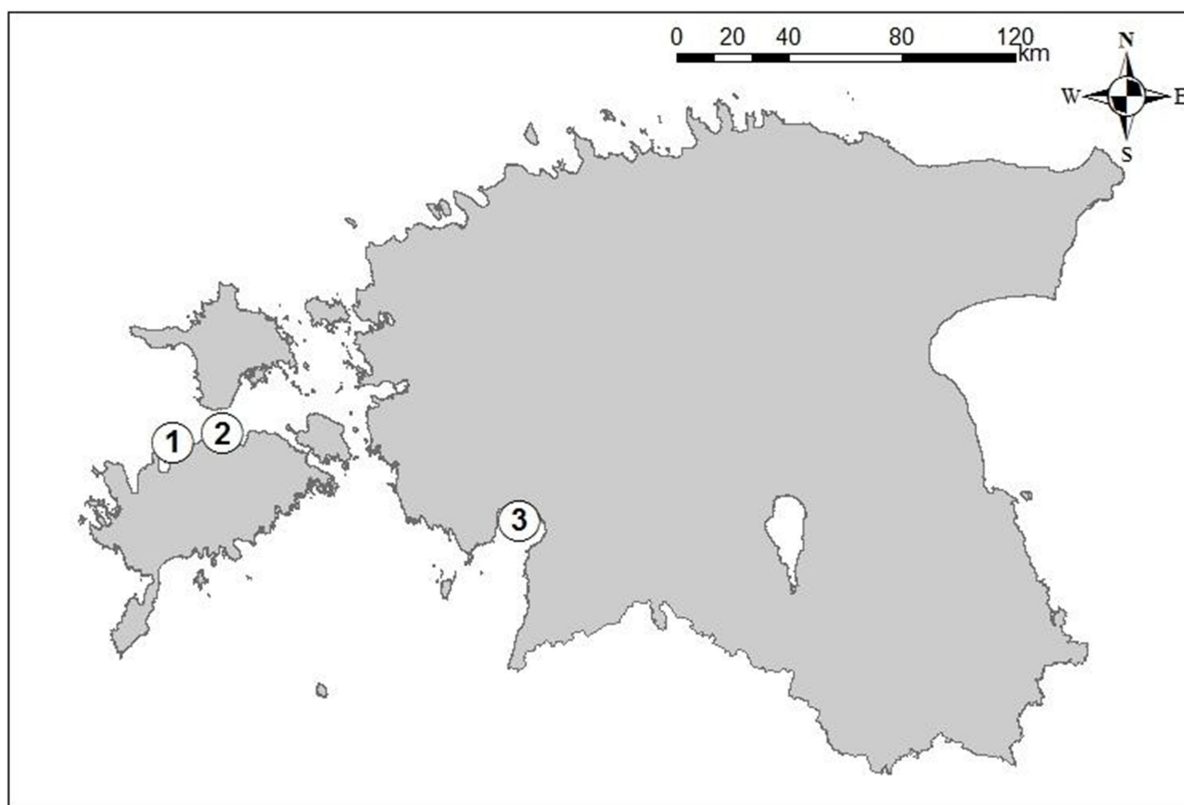
Erinevates töödes on leitud, et külmutamine avaldab kalade pikkuse muutusele suuremat mõju kui formaliin (Ramon & Bartoo, 1997) või etanool (Paradis *et al.*, 2007). Jawad (2003) leidis kuldsaba-munamakrelli (*Alepes djeddaba*) näitel, et korra külmutatud kala pikkus suurenes võrreldes eluskalaga 12,4%. Vastupidisele tulemuse jõudis Ogle (2009) kiisa (*Gymnocephalus cernuus*) külmutamisel, kus kala mass ja pikkus vähenesid võrreldes eluskala kehamõõtmega.

Kalade fikseerimisel peetakse külmutamist pigem ebasobivaks meetodiks, kuna jäätumine muudab ettearvamatult proovide struktuuri (Fowler & Smith 1983). Külmutamise tagajärjel võib kala saada väliseid vigastusi, (näiteks uimekiirte või mõne muu kehaosa purunemine) mis segab hilisemaid morfoloogiaga seotud uuringuid. Külmutamisega kaasnevate kahjustuste vältimiseks soovitatakse kõnealuse metoodikaga säilitatud kalu sulatada vees ja mõõta koheselt, sest siis on ka väiksem massi kadu (Treasurer, 1990). Teaduslikes uuringutes on külmutamise kasutamine eelkõige levinud kalade toitumisanalüüsil (Buchheister & Wilson, 2005; Taal *et al.* 2014).

3. Materjal ja meetoodika

3.1 Uurimisala

Käesoleva töö andmestik koguti Tartu Ülikooli Eesti Mereinstituudi välitööde raames 2010 aastal Panga, Parasmetsa ja Pärnu lahest (joonis 1). Panga ja Parasmetsa laht asuvad Saaremaa põhjaosas. Parasmetsa ehk Upsu laht ja Panga laht on madalad ja avatud vastavalt Väinamerele ning Läänemere avaosale. Pärnu laht on madal poolsuletud veekogu Läänemere kirdeosas. Uurimisala merevee soolsus jääb vahemikku 5–7‰.



Joonis 1. Uurimisala paiknemine Eestis. 1- Panga laht; 2- Parasmetsa laht; 3- Pärnu laht.

3.2 Püügimeetoodika ja analüüs

Käesolevas töös kasutatud proovid koguti 27.–31. oktoobril 2010 aastal Parasmetsa ja Panga lahest ning 1.–2. novembril Pärnu lahest. Nimetatud periood oli proovide kogumiseks sobiv, kuna suhteliselt madalad õhu- ja veetemperatuur võimaldasid säilitada eluskalu nende looduslikus elukeskkonnas kuni fikseerimishetkeni.

Parasmetsa ja Panga lahes kasutati kalade püüdmisel maimunoota. Nooda tiibade pikkus oli 15 m ja kõrgus 1,3 m. Tiiva välimises osas, 8 m ulatuses, oli mõrralina silma suurus sõlmest sõlmeni 10 mm. Tiiva pärapoolses otsas, 7 m ulatuses, oli silma suurus sõlmest sõlmeni 5 mm. Noodakoti suudme ava laius oli 1,2 m, kõrgus 1,3 m, koti pikkus oli 2,2 m ja noodalina silma suurus sõlmest sõlmeni 2 mm. Maimunoodaga tehti 10–30 m pikkuseid tõmbeid avavee poolt kalda suunas, seejärel veeti noodakott kaldale. Töös kasutatud madunõela isendid saadi Tartu Ülikooli Eesti Mereinstituudi iga aastaste Pärnu lahe seirepüükide käigus. Kalad koguti võrkudesse jäänud vetikate seest.

Peale püüki hoiti kalu nende loomulikus elukeskkonnas kuni mõõtmiseni. Kalad võeti veest välja ning mõõdeti koheselt täispikkus (TL) ja mass (TW), seejärel fikseeriti kalad koheselt. Fiksaatoritena kasutati 70% etanooli ja 10% formaliini, mille lahused tehti kraaniveega. Antud töös ei kasutatud külmutamist, sest puudus logistiline võimekus säilitada kalu ühtlasel temperatuuril.

Töö autor mõõtis kaheksa kalaliigi täispikkuse ja massi muutused kahes fiksaatoris. Mõlemas lahuses vaadeldi 30 isendit igast liigist, välja arvatud raudkiisk, kelle valimi suuruseks oli 17 isendit nii formaliinis kui etanoolis. Täispikkus mõõdeti ninamikust sabauime lõpuni 1 mm täpsusega ja mass 0,01g täpsusega. Mõõtmised teostati enne kala fikseerimist ehk elusal kalal ning seejärel perioodil 7, 14, 21, 28, 35 ja 42 päeval. Proove hoiti pimedas temperatuuril <17 C.

3.3 Andmeanalüüs

Selgitamaks, kas kalade kehamõõtmed muutuvad aja jooksul formaliinis ja etanoolis säilitamisel erinevalt, kasutati kordusmõõtmistega dispersioonanalüüsi (ANOVA). Tagamaks andmestiku vastavuse testi eeldustega kasutati statistilisel analüüsil naturaalloogaritme. Juhul kui sfäärilisuse eeldus ei olnud täidetud [Mauchley sfäärilisuse test: ogalik TL ($\chi^2=228,33$; $p<0,01$); madunõel TL ($\chi^2=293,50$; $p<0,01$); ogalik TW ($\chi^2=235,40$; $p<0,01$); luukarits TW ($\chi^2=97,31$; $p<0,01$); raudkiisk TW ($\chi^2=136,13$; $p<0,01$); madunõel TW ($\chi^2=62,05$; $p<0,01$); väike mudilake TW ($\chi^2=63,07$; $p<0,01$); pisimudilake TW ($\chi^2=54,75$; $p<0,01$); kirjumudil TW ($\chi^2=72,74$; $p<0,01$); lest TW ($\chi^2=98,18$; $p<0,01$)] kasutati testi tulemuste juures Greenhouse-Geisseri parandust.

Massi ja täispikkuse mõõtmiste täpsuse kontrollimiseks tehti kordusmõõtmised nii etanoolis kui ka formaliinis fikseeritud luukaritsal, kirjumudilal ja lestal. Mõõtmistäpsuse kontrollimiseks arvutati kolme mõõtmise korduvus (Lessells ja Boag, 1987), mis oli antud liikidel väga kõrge 0,993–1 (lisa 1, lisa 2).

4. Tulemused

4.1 Massi muutus

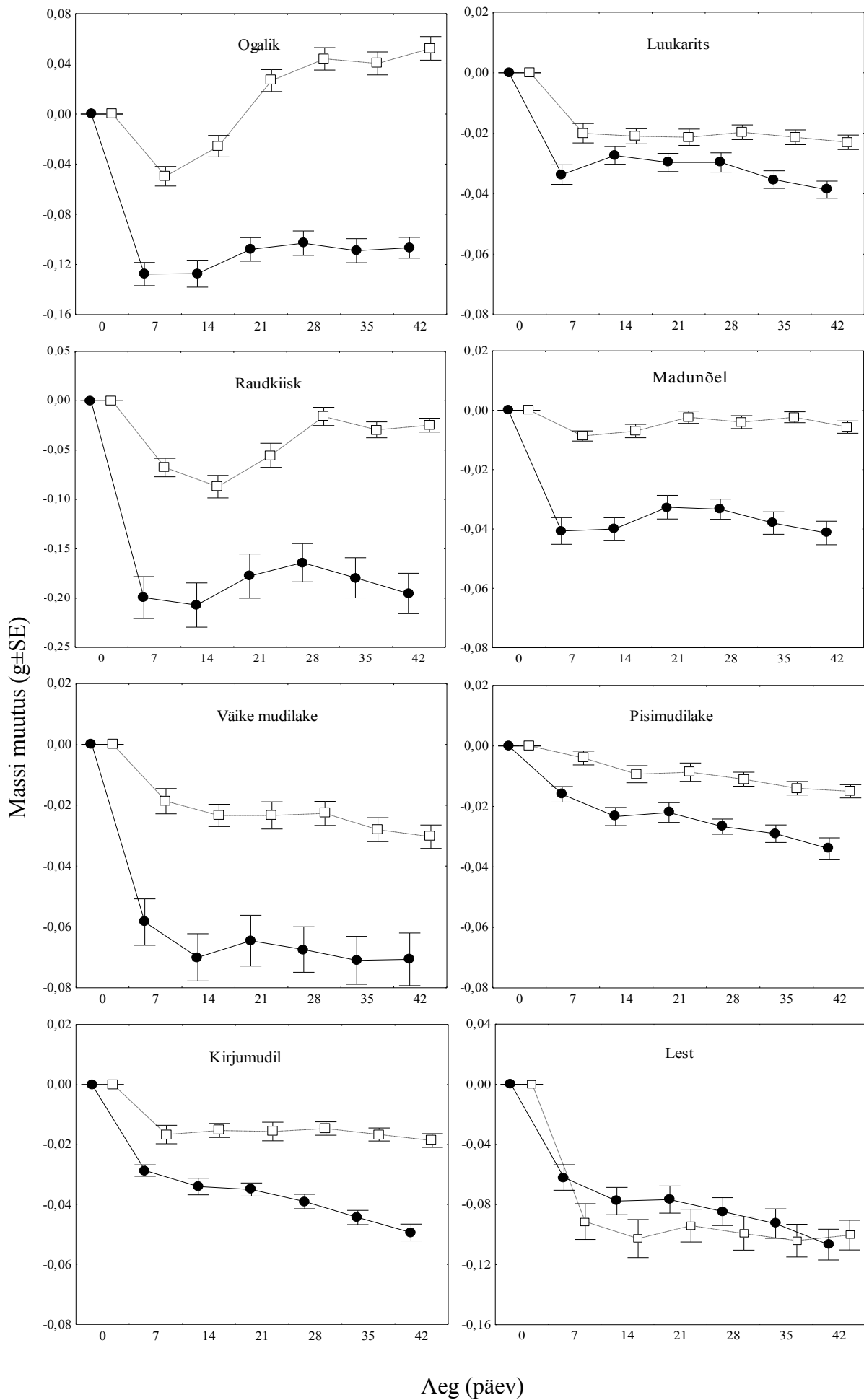
Mõõdetud kalade masside vahemik ($TW_{\min}-TW_{\max}$) ja keskmised massid ($TW\pm SE$) enne fikseerimist on toodud tabelis 2. Fiksaatorite erinevale mõjule viitab menetluse koosmõju ajafaktoriga (tabel 3). Kõigi liikide puhul vähenes kalade keskmine mass juba esimesel kordusmõõtmisel, seitsmendal päeval, nii formaliinis kui etanoolis (tabel 3, joonis 2, lisa 3, lisa 5, lisa 6). Kõikide liikide puhul leiti, et fikseerimise käigus muutus kalade pikkus ja mass (kordusmõõtmistega dispersioonanalüüsil saadud statistiliselt usaldusväärne aja mõju; tabel 3, joonis 2).

Tabel 2. Etanoolis ja formaliinis fikseeritud kalade masside vahemik ($TW_{\min}-TW_{\max}$) ja nende keskmine mass ($TW\pm SE$) enne fikseerimist grammides. Kõigil liikidel on valimi suurus $n=30$, v.a. raudkiisk $n=17$.

Liik	Etanool		Formaliin	
	$TW_{\min}-TW_{\max}$	$TW\pm SE$	$TW_{\min}-TW_{\max}$	$TW\pm SE$
Ogalik	1,24–3,24	2,30±0,09	1,41–3,31	2,17±0,08
Luukarits	0,19–0,85	0,47±0,03	0,26–0,69	0,42±0,02
Raudkiisk	1,15–4,27	2,39±0,22	0,99–5,43	2,50±0,27
Madunõel	0,11–0,98	0,25±0,03	0,11–0,49	0,22±0,01
Väike mudilake	0,13–1,15	0,40±0,05	0,09–0,88	0,35±0,04
Pisimudilake	0,10–0,50	0,26±0,02	0,09–0,47	0,27±0,02
Kirjumudil	0,17–0,45	0,29±0,01	0,14–0,43	0,29±0,01
Lest	0,14–2,20	0,68±0,08	0,22–3,21	0,94±0,13

Tabel 3. Menetluse ja aja mõju dispersioonanalüüsi tulemused massile. Valimi suurus on kõigil uuritavatel liikidel n= 30, v.a. raudkiisk n=17.

Liik	Muutuja	F	p
Ogalik	menetlus	0,17	0,683
	aeg	72,77	<0,00001
	aeg*menetlus	63,14	<0,00001
Luukarits	menetlus	0,62	0,434
	aeg	88,13	<0,00001
	aeg*menetlus	4,72	0,0001
Raudkiisk	menetlus	0,33	0,568
	aeg	76,80	<0,00001
	aeg*menetlus	37,37	<0,00001
Madunõel	menetlus	1,23	0,273
	aeg	70,30	<0,00001
	aeg*menetlus	38,41	<0,00001
Väike mudilake	menetlus	0,01	0,94
	aeg	140,38	<0,00001
	aeg*menetlus	21,10	<0,00001
Pisimudilake	menetlus	0,79	0,378
	aeg	62,40	<0,00001
	aeg*menetlus	9,43	<0,00001
Kirjumudil	menetlus	0,61	0,438
	aeg	107,49	<0,00001
	aeg*menetlus	24,13	<0,00001
Lest	menetlus	3,65	0,061
	aeg	357,02	<0,00001
	aeg*menetlus	14,85	<0,00001



Joonis 2. Uuritud liikide massi (g±SE) muutus ajas (päevades). Tähistus: ● - etanool, □ - formaliin.

4.2 Täispikkuse muutus

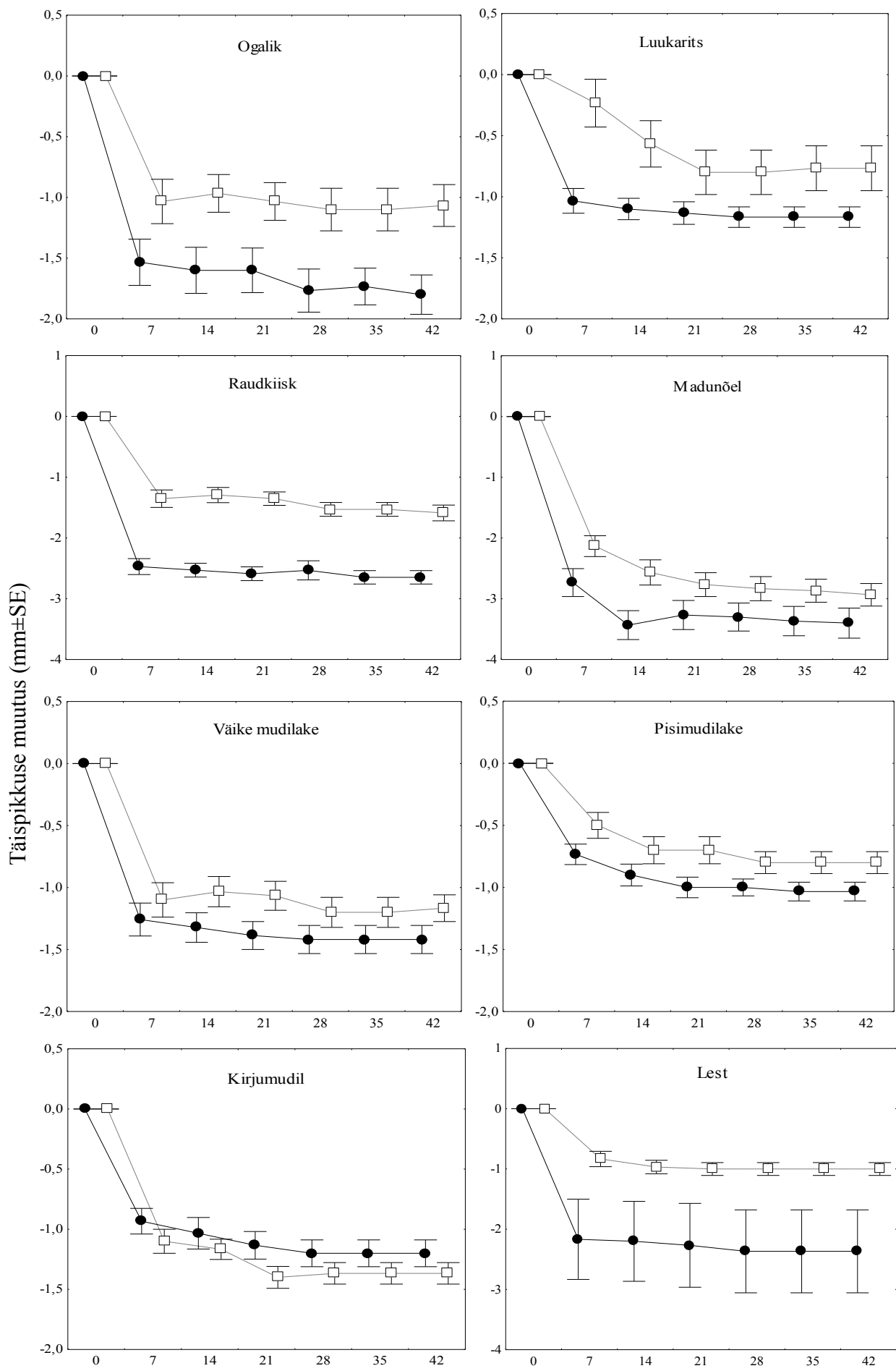
Mõõdetud kalade täispikkuste vahemik ($TL_{min}-TL_{max}$) ja keskmised massid ($TL\pm SE$) enne fikseerimist on toodud tabelis 2. Kõigi liikide keskmised täispikkused vähenesid mõlema fiksaatori puhul koheselt esimesel kordusmõõtmisel, seitsmendal päeval (tabel 5, joonis 3, lisa 4, lisa 7, lisa 8). Enamike liikide (v.a. kirjumudil, pisimudilake ja väike mudilake) puhul kulges täispikkuse muutus erinevates fiksaatorites erinevalt (joonis 3), sellele viitas statistiliselt usaldusväärne menetluse ja ajafaktori koosmõju (tabel 5, joonis 3).

Tabel 4. Etanoolis ja formaliinis fikseeritud kalade keskmine täispikkuste vahemik ($TL_{min}-TL_{max}$) ja nende keskmine mass ($TL\pm SE$) enne fikseerimist millimeetrites. Kõigil liikidel on valimi suurus $n=30$, v.a. raudkiisk $n=17$.

Liik	Etanool		Formaliin	
	$TL_{min}-TL_{max}$	$TL\pm SE$	$TL_{min}-TL_{max}$	$TL\pm SE$
Ogalik	56–72	63,53±0,82	55–72	62,23±0,78
Luukarits	32–50	42,37±0,90	34–49	40,77±0,65
Raudkiisk	75–112	94,53±2,74	70–125	96,12±3,33
Madunõel	102–220	130,07±4,08	102–162	130,13±2,18
Väike mudilake	26–55	38,32±1,47	25–51	37,07±1,18
Pisimudilake	24–37	30,70±0,57	22–37	31,03±0,62
Kirjumudil	31–38	34,20±0,30	28–39	33,83±0,40
Lest	26–60	39,07±1,47	29–65	42,73±1,63

Tabel 5. Menetluse ja aja mõju dispersioonanalüüsi tulemused kalade täispikkusele. Valimi suurus on kõigil liikidel n= 30, v.a. raudkiisk n=17.

Liik	Muutuja	F	P
Kirjumudil	menetlus	1,30	0,266
	aeg	147,60	< 0,00001
	aeg*menetlus	1,10	0,357
Väike mudilake	menetlus	0,19	0,665
	aeg	124,16	< 0,00001
	aeg*menetlus	1,22	0,295
Pisimudilake	menetlus	0,31	0,580
	aeg	80,37	< 0,00001
	aeg*menetlus	1,48	0,185
Luukarits	menetlus	0,91	0,343
	aeg	58,07	< 0,00001
	aeg*menetlus	5,56	0,00002
Ogalik	menetlus	0,50	0,498
	aeg	79,70	< 0,00001
	aeg*menetlus	4,90	0,00009
Raudkiisk	menetlus	0,28	0,602
	aeg	145,49	< 0,00001
	aeg*menetlus	13,09	< 0,00001
Madunõel	menetlus	0,15	0,704
	aeg	283,30	< 0,00001
	aeg*menetlus	3,46	0,002
Lest	menetlus	5,82	0,019
	aeg	28,66	< 0,00001
	aeg*menetlus	4,85	0,00009



Aeg (päev)

Joonis 3. Uuritud liikide täispikkuse muutus (mm ± SE) ajas (päev). Tähistus: ● - etanol, □ - formaliin.

5. Arutelu

Käesoleva magistritöö tulemused näitasid, et formaliinil ja etanoolil on fiksaatori- ja liigispetsiifiline mõju kalade massile (tabel 3, joonis 2). Selgus, et kõigil käsitletud liikidel toimusid suuremad massi muutused etanoolis (joonis 2, lisa 5, lisa 6). Näiteks kaotas madunõel formaliinis 2% ja etanoolis 16,7% algsest keha massist. Antud juhul võis seesuguse suure, fiksaatorist tuleneva erisuse põhjustada konkreetse kalaliigi pikk ja peenike kehakuju. Madunõela morfoloogilisest eripärast tulenevalt saab fiksaator tungida kiiresti kudesse. Nimetatud seaduspärasuse (st etanoolil oli suurem mõju massi muutusele) peamiseks mõjutajaks võis olla ka organismis sisalduva vee hulk, mille etanool viib kehast välja (Jawad, 2003; Lee *et al.*, 2012), vähendades seeläbi keha massi. Sarnasele tulemusele on jõudnud Paradis *et al.* (2007), kus kollane ahven kaotas fikseerimisel 70% etanooliga rohkem keha massi kui 10% formaliiniga.

Kõigil uuritud liikidel toimus mõlemas fiksaatoris suurim massi vähenemine esimesel kordusmõõtmisel peale fikseerimist (joonis 2, lisa 5, lisa 6). Kõnealune tulemus oli prognoositav, kuna ka eelnevates töödes (König ja Borcharding, 2012; Lee *et al.*, 2012) on näidatud, et suurim kalade massi vähenemine toimub fikseerimise ja esimese kordusmõõtmise vahel. Mõõdetud perioodil toimus ka massi varieerumine ajas, kuid need muutused jäid enamustel liikidel (va raudkiisk) mõõtmistäpsuse piiridesse (lisa 1), ehk ei ületa 0,01g.

Antud töös toimus formaliinis fikseeritud ogalikkude positiivne massi muutus (joonis 2, lisa 6). See tähendab, et esimesel mõõtmiskorral oli toimunud massi vähenemine ja peale antud mõõtmiskorda hakkas keha mass suurenema. Antud muutuse võis põhjustada ogaliku kehaehitus, kuna erinevalt paljudest teistest kalaliikidest ei kata ogaliku keha soomused, vaid luuplaadikesed ning kehast ulatuvad välja pikad ogad (Mikelsaar, 1984). Kala massi positiivset muutust formaliiniga fikseerimisel on eelnevalt tähendanud ka Puigcerver (1999), mil lepamaimu (*Phoxinus phoxinus*) mass suurenes 4,6% nelja kuu jooksul peale fikseerimist. Formaliinis fikseeritud kalade massi suurenemise põhjuseid pole seni autorile teadaolevalt varasemas kirjanduses käsitletud.

Lestal toimusid võrreldes algse massiga 42 päeva jooksul negatiivsed muutused nii formaliinis kui ka etanoolis, vastavalt 10,6% ja 15,7% (tabel 3, lisa 5, lisa 6). Lisaks

eespool nimetatule toimusid lestal ka mõnevõrra suuremad massi muutused võrreldes teiste käesolevas töös käsitletud liikidega (joonis 2). Antud tulemust võib võrrelduna teiste uuritud liikidega, seostada lesta suhteliselt suure kehapinnaga, mis võimaldab fiksaatoril kiiremini tungida kudesse. Käesoleva töö tulemustest erinevale järeltulele jõudsid Lee *et al.* (2012) taksonoomiliselt sarnase liigi marmor-ebalesta (*Pseudopleuronectes yokohamae*) fikseerimisel 70% etanooliga. Vaatamata sellele, et kalade algmõõtmed (SL 22,8–53,0 mm, TW 0,17–2,96 g) olid käesoleva tööga väga sarnased (tabel 2, tabel 4), kaotasid marmor-ebalestad etanoolis 29,3% algmassist juba 24 tunni möödudes. Antud mõõtmishetke loeti ka stabiliseerumise punktiks, sest edaspidi ei toimunud statistiliselt olulisi muutuseid. Selline tulemuste erinevus võib olla põhjustatud lisaks liigispetsiifilisusele ka kalade erinevast kasvukeskkonnast, näiteks erinevast vee soolsusest. Tokyo lahes on vee soolsus üle 30‰ (Kim *et al.*, 2004), samas kui Läänemere uuritud piirkonnas ca 6 ‰. Hay (1982) näitas oma töös seost, et suurema soolsusega keskkonnast püütud kalade puhul esinevad ka suuremad kehamõõtmete muutused fikseerimisel. Seega võib sarnaste liikide muutuse erinevuse põhjuseks olla mage- ja merevee kalade erinev osmoregulatsioon (Manzon, 2002; Evans *et al.*, 2005). Antud seos võib olla põhjuseks marmor-ebalesta ja lesta massi erinevas muutuses, kuid erinevusi võib põhjustada ka töödes kasutatud erinev fikseerimismetoodika. Lee *et al.*, (2012) töös transporditi marmor-ebalestad jääs ning kuivatati enne mõõtmist.

Käesolevas töös toimusid suuremad täispikkuse muutused, olenemata fiksaatorist, esimese nädalaga (tabel 5, joonis 3, lisa 7, lisa 8). Sarnaseid tulemusi on näidanud erinevad autorid ka varasemates töödes (Hay, 1982; Fisher *et al.*, 1998; König & Borcharding, 2012; Lee *et al.*, 2012). Seega toimuvad uuritavast kalaliigist olenemata suuremad muutused täispikkuses koheselt peale fikseerimist. Umbes kuu aja jooksul peale fikseerimist võib veel täheldada väiksemaid muutuseid, misjärel uuritava kala kehapikkus stabiliseerub. Antud töös toimus täispikkuse stabiliseerumine kirjumudilal, väike mudilakesel, pisimudilakesel, luukaritsal ja lestal 28 päeva pärast fikseerimist. Käesoleva töö tulemus on kooskõlas varasemate andmetega (Moku *et al.*, 2004; Brinkley *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2010; König & Borcharding 2012). Näiteks Moku *et al.* (2004) uuringus tõrviksilmudega (*Diaphus* spp.), stabiliseerus silmude pikkus esimese kuu jooksul. Käesolevas töös toimusid ogalikul, raudkiisal ja madunõelal peale ühte kuud fiksaatoris veel väikesed nihked pikkuses, kuid need jäid mõõtmisvea piiridesse (lisa 2). Kalade kehamõõtmete

stabiliseerumine mingil ajahetkel võib tuleneda sellest, et fiksaatori kontsentratsioon nii lahuses kui organismis on ühtlustunud.

Uuritud kalade täispikkuse vähenemine oli etanoolis suurem kui formaliinis (joonis 3, lisa 7, lisa 8). Sarnasele tulemusele on eelnevalt jõudnud ka teised autorid (Cunningham *et al.*, 2000; Moku *et al.*, 2004; Buchheister & Wilson, 2005; Paradis *et al.*, 2007), kuid leidub ka vastupidiseid tulemusi (Porter *et al.*, 2001), kus suurem kehapikkuse muutus toimus 5% formaliinis võrrelduna 95% etanooliga. Sarnaselt massi vähenemisele, mõjutab kalade pikkuse vähenemist etanoolis eelkõige organismis sisalduv vee hulk (Jawad, 2003; Lee *et al.*, 2012). Cunningham *et al.* (2000) ja Moku *et al.* (2004) näitasid, et erinevate lahuste kontsentratsioonidel olid kalade täispikkuse muutused erinevad, ehk suurematel kontsentratsioonidel olid nii etanoolil kui ka formaliinil proovile suurem mõju. Seevastu Fisher *et al.* (1998) töös selgus, et täispikkuse muutuste suurus ei sõltu etanooli lahuse kontsentratsioonist.

Kuigi enamjaolt oli käesolevas töös etanoolis fikseeritud kalade täispikkuse muutus suurem formaliinis säilitatutest, sõltus erinevuste suurus ka liigist (joonis 3, lisa 7, lisa 8). Tulenevalt iga liigi eripärast (erinev kasvukeskkond, kehaehitus jne) on fikseerimisega kaasnevad muutused erinevad. Näiteks kirjumudilal, väike mudilakesel ja pisimudilakesel ei leitud täispikkuse muutusel statistiliselt olulist erinevust ajas etanooli ja formaliiniga fikseerimisel (tabel 5). Lisaks olid kirjumudilal ja väike mudilakesel sarnased muutused täispikkustes, mille põhjuseks võib olla väga sarnane kehaehitus ja üldine anatoomiline areng (Ojaveer, 2003b; 2003c). Formaliiniga fikseerimise väiksemat mõju kalade pikkusele on tõestatud ka varasemates uuringutes (tabel 1), mistõttu see on eelistatud fiksaatoriks kehamõõtmega seotud uuringutes (nt Cano *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2010; Vajargah & Hedayati, 2014).

Kuna käesolevas töös käsitletud kirjumudila ja väike mudilakese täispikkuse muutused olid väga sarnased, siis võib tekkida soov antud tulemusi ekstrapoleerida ka Läänemeres elavale mustale mudilale (*Gobius niger*). Siinkohal tasub olla siiski ettevaatlik, kuna kõnealustel liikidel on erinev kasvukiirus, areng ning morfoloogia (Ojaveer, 2003a; 2003b; 2003c). Näiteks antud töös ei olnud pisimudilakese kehamõõtmete muutus fiksaatorites sarnane kahe teise mudilase liigi vastavate kehamõõtmete muutusega. Samuti on antud töös uuritud ogalik ja luukarits taksonoomiliselt lähedased liigid, kuid nende kehamõõtmete muutused olid kahes erinevas fiksaatoris erinevad. Ogaliku ja luukaritsa

puhul võisid erinevused kehamõõtmete muutumisel olla tingitud algsest täispikkuse erinevusest (täiskasvanud ogalik on täiskasvanud luukaritsast mõnevõrra suurem). Samas ei saa kogu erinevust seletada ka fikseeritud kalade suurusega, sest vaatamata taksonoomilisele lähedusele, on kõnealused kalad morfoloogiliselt siiski üsna erinevad. Näiteks on neil erinev kehapinna kattuvus luuplaadikestega ja kehast välja ulatuvate ogade asetus. Eespool nimetatust tulenevalt on siiski kindlam teha fikseerimisel kontrollmõõtmised uuritava liigi kohta, kui oletuslikult arvata, et erinevad liigid võiksid omada sarnast muutust fiksaatoris.

Fikseerimise mõju on liigispetsiifiline. Antud tulemust kinnitavad ka paljud eelnevalt tehtud tööd erinevate liikidega, kus sarnastel pikkustel ja fiksaatori kontsentratsioonidel on muutused erinevad (vt tabel 1). Lisaks võivad muutused erineda ka liigisiselt. Isendi kasv on mõjutatud erinevate tegurite poolt, nagu näiteks toidu kättesaadavus ja elukoha valik. Fikseerimisel toimuvad muutused on seotud konkreetse isendi eripäraga ja võivad seetõttu erineda ka individuaalselt (Fisher *et al.*, 1998).

Antud töös uuritud liigid on saavutanud täiskasvanud isendite anatoomilised tunnused. See tähendab, et kalade luustik ja soomuskate olid fikseerimise hetkeks välja arenenud, mistõttu antud muutuste suurust ei saa üle viia maimude või vastsete kehamõõtmete muutustele. Kala täispikkuse muutuse suurus väheneb võrdeliselt kala täispikkuse suurenemisega (Radke & Waiwood, 1980; Paradis *et al.*, 2007), ehk mida suuremaks läheb kala oma kasvult seda väiksem mõju on fikseerimisel. Paradis *et al.* (2007) näitasid kollase ahvena puhul selgelt, kuidas erinevatel täispikkustel muutused erinesid. Näiteks 75% etanooliga fikseerimisel täispikkusel 12,1–18,1 mm kahanes 11,7% ja 37,0–58,7 mm 1,2%. Selle peamiseks põhjuseks võib olla kalade morfoloogiliselt erinev arengujärk.

Väga oluline on kalade fikseerimine koheselt peale püüki, sest on täheldatud kalade erinevast käsitlemisest tulenevat mõju fikseeritavale proovile (Theilacker, 1980). Enamjaolt on jäetud selgitamata, kas kalad on enne fikseerimist elus või surnud (Fowler & Smith, 1983; Al-Hassan *et al.*, 2000; Fey & Hare, 2005; Lee *et al.*, 2012). Morison *et al.* (2003) täheldasid lõuna-ogapagruse (*Acanthopagrus butcheri*), Austraalia tähnliivaahvena (*Sillaginodes punctata*), sininina-liivaahvena (*Sillago ciliata*) ja laigulise seanina (*Lethrinus miniatus*) olulist surmajärgset kahanemist ilma keemilise fiksaatorita. Sellest tulenevalt võib olla kaheldav, kas kehamõõtmete muutus tuleneb fiksaatori mõjust või mitte. Kalade kehamõõtmete muutus võib olla seotud kalade esmase käsitlemisega enne

fikseerimist. Seetõttu on oluline arvestada kalade surma järgset kehamõõtmete muutust. Sõltuvalt uuritava liigi arengustaadiumist võib surnud kalade kehamõõtmete põhjal järeltõlgete tegemine põhjustada teatava nihke kalade seisundi hindamisel. Antud töös välistati surmajärgsest kahanemisest tingitud mõju proovidele, hoides püütud kalu kuni esmase mõõtmise ja fikseerimiseni merevees (see tähendab, et kalad võeti veest, mõõdeti ja fikseeriti koheselt).

Töös käsitletud liikide kehamõõtmete muutusi erinevates fiksaatorites pole autorile teadaolevalt eelnevalt uuritud. Varasemas kirjanduses on välja toodud koefitsente ja võrrandeid, mis võimaldavad peale fikseerimist leida tagasiarvutamise teel eluskala pikkuse (Treasurer, 1990; Moku *et al.*, 2004; Paradis *et al.*, 2007). Käesoleva töö tulemusteks on ogaliku, luukaritsa, raudkiisa, madunõela, väike mudilakese, pisimudilakese, kirjumudila ja lesta keskmiste masside ja täispikkuste muutused sõltuvalt fikseerimise aja pikkusest (lisa 3, lisa 4). Nende tulemustele tuginedes saab teha tagasiarvutused oletatavale elusa kala kehamõõtmetele. Fikseerimise tulemusi on soovitatav kasutada antud liikide vastavatel pikkustel ning massidel 10% formaliinis ja 70% etanoolis. Soovituslikult võiks fikseeritud kalu hakata mõõtma üks kuu peale fikseerimist, mil kalade kehamuutused on stabiliseerunud (Fowler & Smith, 1983), sest sellele eelneval perioodil võivad individuaalsed kehamõõtmed veel muutuda.

Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö peamiseks eesmärgiks on uurida, kui palju 10% formaliini ja 70% etanooliga fikseerimine mõjutab uuritavate kalade täispikkust ja massi ning kas antud liikidel (st. nii liigisiselt kui liikide vahel) on kehamõõtmete muutused sõltuvad fiksaatorist.

Fikseerimine võimaldab säilitada elusorganismile omased tunnused. Kirjanduse andmetel omavad formaliin ja etanool fikseerimisel nii liigispetsiifilist, kui ka liigisisest mõju kalade kehamõõtmetele. Fikseerimisega kaasnevate kehamõõtmete muutuste suurus kaladel sõltub valitud fikseerimismetoodikast (s.h. fiksaatorist, fiksaatori kontsentratsioonist, kala asetusest fiksaatoris), kala morfoloogilistest tunnustest ja arengustaadiumist ning ajast (st surmast fikseerimiseni ja hoiustamisajast).

Antud töös käsitletakse 8 kalaliiki: ogalik (*Gasterosteus aculeatus*), luukarits (*Pungitius pungitius*), raudkiisk (*Spinachia spinachia*), madunõel (*Nerophis ophidion*), väike mudilake (*Pomatoschistus minutus*), pisimudilake (*P. microps*), kirjumudil (*Gobiusculus flavescens*) ja lest (*Platichthys flesus trachurus*). Uuritavad liigid on oluliseks osaks Läänemere rannikulähedaste madalate merealade kalakooslustest. Nimetatud piirkonna kalakoosluseid on vähe uuritud ning seetõttu teaduskirjanduses vähe kajastamist leidnud.

Töö tulemusena leiti, et 70 % etanoolil ja 10% formaliinil oli erinev mõju uuritud liikide massile ja täispikkusele ning need erinesid liigiti (v.a. kirjumudila ja väike mudilakese täispikkuse puhul). Selgus et formaliin omab kalade täispikkusele ja massile enamasti väiksemat mõju kui etanool. Suurimad täispikkuse ja massi muutused toimusid kaladel seitsme päeva jooksul peale fikseerimist. Seejärel toimus kehamõõtmete muutuse stabiliseerumine. Erinevatel liikidel kulges kehamõõtmete muutumine fiksaatoris erinevalt. Antud töös esines ogalikul positiivne massi muutus formaliiniga fikseerimisel.

Käesoleva töö tulemused on edaspidiste teadustööde või kalastiku seire logistika (välitööde) seisukohalt vajalikud, kuna näitavad, kuidas formaliin ja etanool fiksaatorina mõjutavad erinevate kalade kehamõõtmeid. Teades erinevate säilitamisviiside mõju proovide kehaparameetritele on hiljem lihtne teha tagasiarvutusi, leidmaks elusa kala algseid kehamõõtmeid.

Summary

Changes in body sizes of fishes after preservation in ethanol and formalin

The aim of current study was to describe the fixation impact of 10% formalin and 70% ethanol on the total length and mass of different fish species. The study species were three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), nine-spined stickleback (*Pungitius pungitius*), boltnose (*Spinachia spinachia*), straight-nosed pipefish (*Nerophis ophidion*), sand goby (*Pomatoschistus minutus*), common goby (*P. microps*), two-spotted goby (*Gobiusculus flavescens*) and flounder (*Platichthys flesus trachurus*). These model species are an important part of the fish communities of the Baltic Sea coastal areas, which have received surprisingly little scientific attention.

While the fixation retains characteristics of a living organism, it is known from previous studies that formalin and ethanol have species-specific effects on the fish morphology. The change in body morphology that accompanies fixation depends on several factors, including e.g. fixator (fixator concentration), the fish morphology, fish life stage and time (death to fixation and storage time).

As a result of this study it was described how 70% ethanol and 10% formalin have different effects on the body morphology changes in studied model species (e.g. sand goby, two-spotted goby total length). Generally formalin had a smaller effect on body morphology than ethanol. The biggest changes in body morphology in fish occurred before seventh day after fixation. Thereafter the changes stabilized. The rate of fixator induced changes over time was species specific. Also a positive change in body mass was recorded – in case of three-spined stickleback.

The results of this study are important to aid future research or fieldwork, because they indicate how formalin and ethanol, as fixators, influence the body morphology of different fish. Knowing the effects of different fixators on the body morphology of fish allows to estimate the „live size“ of fixed fish in different investigations where fixation is necessary or archived samples are used, thus enabling increase of scientific precision in such studies.

Tänuavaldused

Käesoleva töö autorina soovin tänada oma juhendajat Imre Taali igakülgse abi, nõuannete ja mõistmise eest.

Soovin tänada Lauri Saksa statistiliste soovitude ja töö valmimisel osutatud nõuannete eest. Lisaks soovin tänada Kristiina Jürgensit, Roland Svirgsdeni ja Aare Verliini, kes aitasid välitöödel.

Kasutatud kirjandus

- Ajah, P. O., Nunoo, F. K. E. (2003). The effects of four preservation methods on length, weight and condition factor of the clupeid *Sardinella aurita* Val. 1847. *Journal of Applied Ichthyology* 19: 391–393.
- Al-Hassan, L. A. J., Bujawari, J. A., El-Silini, O. A. (2000). The effect of some preservatives and freezing on certain body dimensions of two species of the family *Mullidae* collected from Benghazi waters, Libya. *Acta Ichthyologica Et Piscatoria* 30: 127–135.
- Armstrong, J., Stewart, D. (1997). The effects of initial length and body curvature on shrinkage of juvenile Atlantic salmon during freezing. *Journal of Fish Biology* 50: 903–905.
- Artüz, M. L. (1999). Inventory of existing species and their habitats in the Bosphorus area. *Oceonata* 1: 552–564.
- Arula, T., Kotta, J., Lankov, A., Simm, M., Pölme, S. (2011). Diet composition and feeding activity of larval spring-spawning herring: Importance of environmental variability. *Journal of Sea Research* 68: 33–40.
- Arula, T., Gröger, J., Ojaveer, H., Simm, M. (2014). Shifts in the spring herring (*Clupea harengus membras*) larvae and related environment in the eastern Baltic Sea over the past 50 years. *PlosOne* 9: e91304.
- Baran, E. (2002). Chapter 5.5.2.11 - The importance of non-commercial fish. In: *Fisheries and aquaculture: towards sustainable aquatic living resources management*. Edited by Safran, P., UNESCO Encyclopaedia of Life Support Systems. EOLSS Publishers, Oxford, UK.
- Black, A. R., Dodson, S. I. (2003). Ethanol: a better preservation technique for *Daphnia*. *Limnology and Oceanography: Methods* 1: 45–50.
- Brinkley, P. D., Fischer, J. R., Paukert, C. P. (2008). The effect of fixative on total length of small-bodied stream fishes. *Journal of Freshwater Ecology* 23:471–473.
- Buchheister, A., Wilson, M. T. (2005). Shrinkage correction and length conversion equations for *Theragra chalcogramma*, *Mallotus villosus* and *Thaleichthys pacificus*. *Journal of Fish Biology* 67: 541–548.
- Butler, J. L. (1992). Charpet 2: Collection and preservation of material for otolith. In: *Otolith microstructure examination and analysis*. Edited by Stevenson, D. K.,

- Campana, S. E. pp 13–17. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences.
- Boström, M. K., Östman, Ö., Bergenius, M. A., Lunneryd, S-G. (2012). Cormorant diet in relation to temporal changes in fish communities. *ICES Journal of Marine Science* 69: 175–183.
- Caddy, J. (2008). Recent experience and future options for fisheries assessment and management in the Black Sea: A GFCM perspective. *General Fisheries Commission for the Mediterranean GFCM internal report* 23 pp.
- Cano, J. M., Mäkinen, H. S., Leinonen, T., Freyhof, J., Merilä, J. (2008). Extreme neutral genetic and morphological divergence supports classification of Adriatic three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) populations as distinct conservation units. *Biological Conservation* 141: 1055–1066.
- Coban, Ö. E. (2013). Evaluation of essential oils as a glazing material for frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet. *Journal of Food Processing and Preservation*. 37: 759–765.
- Culling, C. F. A. (1974). Chapter 3 - Fixation. In: *Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques*. Edited by Culling, C. F. A. pp 29–61. Butterworth-Heinemann.
- Cunningham, M. K., Granberry W. F, Jr., Pope, K. L. (2000). Shrinkage of inland silverside larvae preserved in ethanol and formalin. *North American Journal of Fisheries Management* 20: 816–818.
- Dotti, I., Bonin, S., Basili, G., Nardon, E., Balani, A., Siracusano, S., Stanta, G. (2010). Effects of formalin, methacarn, and fineFIX fixatives on RNA preservation. *Diagnostic Molecular Pathology* 19: 112–122.
- El-Hanafy, A. E. A., Shawky, H. A., Ramadan, M. F. (2011). Preservation of *Oreochromis niloticus* fish using frozen green tea extract: impact on biochemical, microbiological and sensory characteristics. *Journal of Food Processing and Preservation* 35: 639–646.
- Enneveer, M. (1985). *Kalakasvatus*. Valgus. 238 lk.
- Eremeev, V. N., Zuyev, G.V. (2007). Commercial fishery impact on the modern Black Sea ecosystem: a review. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 7: 75–82.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews* 85: 97–177.

- Fey, D. P. (2002). Length correction of larval and early-juvenile herring (*Clupea harengus* L.) and smelt (*Osmerus eperlanus* L.) after preservation in formalin and alcohol. *Bulletin of the Sea Fisheries Institute* 1: 47–51.
- Fey, D. P., Hare, J. A. (2005). Length correction for larval and early-juvenile Atlantic menhaden (*Brevoortia tyrannus*) after preservation in alcohol. *Fishery Bulletin* 103: 725–727.
- Fisher, S. J., Anderson, M. R., Willis, D. W. (1998). Total length reduction in preserved yellow perch larvae. *North American Journal of Fisheries Management* 18: 739–742.
- Fowler, G., Smith, S. (1983). Length changes in silver hake (*Merluccius bilinearis*) larvae: effects of formalin, ethanol, and freezing. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 40: 866–870.
- Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J., Roller, P. P. (1985). Formaldehyde fixation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 33: 845–853.
- Fox, C. J. (1996). Length changes in herring (*Clupea harengus*) larvae: effects of capture and storage in formaldehyde and alcohol. *Journal of Plankton Research* 18: 483–493.
- Fretwell, S. D. (1987). Food chain dynamics: the central theory of ecology? *Oikos* 50: 291–301.
- Gagliano, M., Kowalewsky, S., McCormick, M. I. (2006). An alternative method for the preservation of tropical fish larvae. *Journal of Fish Biology* 68: 634–639.
- GFCM (General Fisheries Commission for the Mediterranean) (2012). Background document on the Black Sea fisheries. *General Fisheries Commission for the Mediterranean Secretariat*. 130 pp.
- Grizzle, W. E., Fredenburgh, J. L., Myers, R. B. (2008). Fixation of tissues. *Theory and practice of histological techniques* 6: 53–74.
- Grønkvær, P., Wieland, K. (1997). Ontogenetic and environmental effects on vertical distribution of cod larvae in the Bornholm Basin, Baltic Sea. *Marine Ecology Progress Series* 154: 91–105.
- Hahlbeck, E., Griffiths, R., Bengtsson, B-E. (2004). The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption: I. Sexual differentiation. *Aquatic Toxicology* 70: 287–310.
- Haney, J. F., Hall, D. J. (1973). Sugar-coated *Daphnia*: A preservation technique for *Cladocera*. *Limnology and Oceanography* 18: 331–333.

- Hay, D. E. (1982). Fixation shrinkage of herring larvae: effects of salinity, formalin concentration, and other factors. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39: 1138–1143.
- HELCOM (2012). Indicator based assessment of coastal fish community status in the Baltic Sea 2005-2009. Baltic Sea Environment Proceedings No. 131.
- Horn, M. H. (1980). Diversity and ecological roles of noncommercial fishes in California marine habitats. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations* 21: 37–47.
- Höök, T. O., Gorokhova, E., Hansson, S. (2008) RNA:DNA ratios of Baltic Sea herring larvae and copepods in embayment and open sea habitats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76: 29–35.
- Jawad, L. A. (2003). The effect of formalin, alcohol and freezing on some body proportions of *Alepes djeddaba* (Pisces: *Carangidae*) collected from the Red Sea coast of Yemen . *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 38: 77–80.
- Jürgens, K. (2009). Lesta toitumine ning arvukus ja kasvuparameetrid seoses söödava rannakarbi arvukuse muutusega Küdema lahes. Magistriväitekirj, Tartu Ülikool, 44 lk.
- Kim, D. M., Nakada, N., Horiguchi, T., Takada, H., Shiraishi, H., Nakasugi, O. (2004). Numerical simulation of organic chemicals in a marine environment using a coupled 3D hydrodynamic and ecotoxicological model. *Marine Pollution Bulletin* 48: 671–678.
- Korwin-Kossakowski, M. (2014). Physical changes in specimens of five species of *Cyprinidae* preserved in ethanol and frozen. *Journal of Fish Biology* 85: 736–751.
- Kruse, G. H., Dalley, E. L. (1990). Length changes in capelin, *Mallotus villosus* (Müller), larvae due to preservation in formalin and anhydrous alcohol. *Journal of Fish Biology* 36: 619–621.
- König, U., Borcherdig, J. (2012). Preserving young-of-the-year *Perca fluviatilis* in ethanol, formalin, or in a frozen state and the consequences for measuring morphometrics. *Journal of Applied Ichthyology* 28: 740–744.
- Larmuseau, M. H. D., Vancampenhout, K., Raeymaekers, J. A. M., Van Houdt, J.K. J., Volckaert, F. A. M. (2010). Differential modes of selection on the rhodopsin gene in coastal Baltic and North Sea populations of the sand goby, *Pomatoschistus minutus*. *Molecular Ecology* 19: 2256–2268.
- Laur, K., Ojaveer, H., Simm, M., Klais, R. (2014). Multidecadal dynamics of larval gobies *Pomatoschistus* spp. in response to environmental variability in a shallow temperate bay. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 136: 112–118.

- Lee, J-H., Kodama, K., Horiguchi, T. (2012). Change in body size of juvenile marbled sole *Pseudopleuronectes yokohamae* after preservation in ethanol. *Ichthyological research* 59: 49–52.
- Lessells, C. M., Boag, P. T. (1987). Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *Auk* 104: 116–121.
- Maes, J., de Brabandere, L., Ollevier, F., Mees, J. (2003). The diet and consumption of dominant fish species in the upper Scheldt estuary, Belgium. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 83: 603–612.
- Manzon, L. A. (2002). The role of prolactin in fish osmoregulation: A Review. *General and Comparative Endocrinology* 125: 291–310.
- Melo, M.T., Saturnino, C., Santos, J. N. S., Vasconcellos, R. M., Cruz-Filho, A. G., Araújo, F. G. (2010). Correction of the weight and length for juveniles *Atherinella brasiliensis* (Actinopterygii: Atherinopsidae) after fixation in formalin and preservation in ethanol. *Zoologia* 27: 892-896.
- Mikelsaar, N. 1984. Eesti NSV kalad. Valgus, Tallinn. 432 lk.
- Moku, M., Mori, K., Watanabe, Y. (2004). Shrinkage in the body length of myctophid fish (*Diaphus Slender-Type* spp.) larvae with various preservatives. *Copeia* 3: 647–651.
- Morison, A. K. (2004). Is rigor mortis the cause of post-mortem shrinkage in juvenile *Pagrus auratus*? *Journal of Fish Biology* 65: 883–888.
- Morison, A. K., Brown, I. W., Jones, G. K. (2003). Post mortem shrinkage of four species of temperate and tropical marine fishes, without freezing or preservation. *Journal of Fish Biology* 62: 1435–1449.
- Mäkinen, H. S., Cano, J. M., Merilä, J. (2006). Genetic relationships among marine and freshwater populations of the European three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) revealed by microsatellites. *Molecular Ecology* 15: 1519–1534.
- Neave, F. B., Mandrak, N. E., Docker, M. F., Noakes, D. L. (2006). Effects of preservation on pigmentation and length measurements in larval lampreys. *Journal of Fish Biology* 68: 991–1001.
- Niazie, E. H. N., Vajargah, M. F., Reza Tarkhani, R., Vesaghi, M. J., Sabet, A. F., Abbasi, F., Hedayati, A. (2013). Surveying effects of fixation in formalin on the morphological characteristics of goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Environmental Treatment Techniques* 2: 28–30.
- Nissling, A., Thorsen, A., Filipa F.G. da Silva, F. F. G. (2015). Fecundity regulation in relation to habitat utilisation of two sympatric flounder (*Platichthys flesus*) populations in the brackish water Baltic Sea. *Journal of Sea Research* 95: 188–195.

- Ogle, D. (2009). The effect of freezing on the length and weight measurements of ruffe (*Gymnocephalus cernuus*). *Fisheries Research* 99: 244–247.
- Ojaveer, H. (2003a). Black goby, *Gobius niger* L. In: *Fishes of Estonia*. Edited by Ojaveer, E., Pihu E. and Saat, T. 327–328 pp. Estonian Academy Publishers, Tallinn.
- Ojaveer, H. (2003b). Sand goby, *Pomatoschistus minutus* (Pallas). In: *Fishes of Estonia*. Edited by Ojaveer, E., Pihu E. and Saat, T. 329–333 pp. Estonian Academy Publishers, Tallinn.
- Ojaveer, H. (2003c). Two-spotted goby, *Coryphopterus flavescens* (Fabricius). In: *Fishes of Estonia*. Edited by Ojaveer, E., Pihu E. and Saat, T. 335–336 pp. Estonian Academy Publishers, Tallinn.
- Ojaveer, E. & Drevs, T. (2003). Flounder, *Platichthys flesus trachurus* (Duncker). In: *Fishes of Estonia*. Edited by Ojaveer, E., Pihu, E. and Saat, T. 362–370 pp. Estonian Academy Publishers, Tallinn.
- Olsson, J., Bergström, L., Gårdmark, A. (2013). Top-down regulation, climate and multi-decadal changes in coastal zoobenthos communities in two Baltic Sea areas *PLoS One* 8: e64767.
- Pampoulie, C., Bouchereau, J. L., Rosecchi, E., Poizat, G., Crivelli, A. J. (2000). Annual variations in the reproductive traits of *Pomatoschistus microps* in a Mediterranean lagoon undergoing environmental changes: evidence of phenotypic plasticity. *Journal of Fish Biology* 57: 1441–1452.
- Paradis, Y., Brodeur, P., Mingelbier, P., Magnan, P. (2007). Length and weight reduction in larval and juvenile yellow perch preserved with dry ice, formalin, and ethanol. *North American Journal of Fisheries Management* 27: 1004–1009.
- Porter, S.M., Brown, A.L., Bailey, K.M. (2001). Estimating live standard length of net-caught walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) larvae using measurements in addition to standard length. *Fishery Bulletin* 99: 691–696.
- Post, D. M. (2002). The long and short of food-chain length. *Trends in Ecology & Evolution* 17: 269–277.
- Puigcerver, M. (1999). Variations in length, weight and length-weight relationships in the European minnow *Phoxinus phoxinus* (L.) due to fixation and preservation processes. *Miscel·lània Zoològica* 22: 21–6.
- Radke, R. L., Waiwood, A. K. G. (1980). Otolith formation and body shrinkage due to fixation in larval cod (*Gadus morhua*). *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* 929: 16.

- Rajasilta, M., Mankki, J., Ranta-Aho, K., Vuorinen, I. (1999). Littoral fish communities in the Archipelago Sea, SW Finland: a preliminary study of changes over 20 years. *Hydrobiologia* 393: 253–260.
- Ramon, D., Bartoo, N. (1997). The effects of formalin and freezing on ovaries of albacore, *Thunnus alalunga*. *Fishery Bulletin* 95: 869–872.
- Shahjalal, H., Hossain, M. S., Rahman, M. A. (2008). Formaldehyde content in the Rui fish (*Labeo rohita*) in Bangladesh and effect of formaldehyde on lipid peroxidation in rat liver and intestinal tissues. *Journal of Medical Sciences* 8: 405–409.
- Shativel, S., Huang, J., Bechtel, P.J. (2008). Properties of pollock (*Theragra chalcogramma*) skin hydrolysates and effects on lipid oxidation of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during 4 months of frozen storage. *Journal of Food Biochemistry* 32: 247–63.
- Simon, J. (2013). A correction factor for the shrinkage of total length and weight of European eels during freezing. *Journal of Applied Ichthyology* 29: 909–911.
- Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell, S. (2002). Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *The American journal of pathology* 161: 1961–1971.
- Su, J. M. F., Perlaky, L., Li, X. N., Leung, H. C. E., Antalffy, B., Armstrong, D., Lau, C. C. (2004). Comparison of ethanol versus formalin fixation on preservation of histology and RNA in laser capture microdissected brain tissues. *Brain pathology* 14: 175–182.
- Sundararajan, S., Prudente, A., Bankston, D. J., King, J. M., Wilson, P., Sathivel, S. (2011). Evaluation of green tea extract as a glazing material for shrimp frozen by cryogenic freezing. *Journal of Food Science* 76: E511–E518.
- Sundell, J. (1994) Dynamics and composition of littoral fish fauna along the coast of SW-Finland. *Aqua Fennica* 24: 37–49.
- Taal, I., Saks, L., Nedolgorova, S., Verliin, A., Kesler, M., Jürgens, K., Svirgsden, R., Vetemaa, M., Saat, T. (2014). Diet composition of smelt *Osmerus eperlanus* (Linnaeus) in brackish near-shore ecosystem (Eru Bay, Baltic Sea). *Ecology of Freshwater Fish* 23: 121–128.
- Takizawa, K., Fujita, Y., Ogushi, Y., Matsuno, S. (1994). Relative change in body length and weight in several fish larvae due to formalin fixation and preservation. *Fisheries science* 60: 355–359.
- Thakuria, D., Schmidt, O., Liliensiek, A-K., Egan, D., Doohan, F. M. (2009). Field preservation and DNA extraction methods for intestinal microbial diversity analysis in earthworms. *Journal of Microbiological Methods* 76: 226–233.

- Theilacker, G. H. (1980). Changes in body measurements of larval northern anchovy, *Engraulis mordax*, and other fishes due to handling and preservation. *Fishery Bulletin* 78: 685–692.
- Thorman, S. (1986). Physical factors affecting the abundance and species richness of fishes in the shallow waters of the southern Bothnian Sea, Sweden. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 22: 357–369.
- Treasurer, J. (1990). Length and weight changes in perch, *Perca fluviatilis* L., and pike, *Esox lucius* L., following freezing. *Journal of Fish Biology* 37: 499–500.
- Ustups, D., Uzars, D., Müller-Karulis, B. (2007). Structure and feeding ecology of the fish community in the surf zone of the Eastern Baltic Latvian coast. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences* 61: 20–30.
- Vajargah, M. F., Hedayati, A. (2014). The effect of preservation in formalin on the morphological characters of spiralin (*Alburnoides Eichwaldii*). *Journal of Environmental Treatment Techniques* 2: 106–108.
- Wetzel, M. A., Leuchs, H., Koop, J. H. E. (2005). Preservation effects on wet weight, dry weight, and ash-free dry weight biomass estimates of four common estuarine macro-invertebrates: no difference between ethanol and formalin. *Helgoland Marine Research* 59: 206–213.
- Xiong, M., Rosenthal, H., Que, Y., Qiao, Y., Chang, J. (2007). Shrinkage of *Gobiocypris rarus*, *Procypris rabaudi*, and *Sinilabeo rendahli* preserved in formalin. *Journal of Applied Ichthyology* 23: 173–176.

Lisad

Lisa 1. Massi mõõtmisvea hindamine.

Fiksaator	Liik	r	F	p	n
Etanool	Luukarits	0,998	1765,51	<0,0001	20
	Kirjumudil	0,993	402,83	<0,0001	19
	Lest	1	9728,26	<0,0001	20
Formaliin	Luukarits	0,999	2841,64	<0,0001	20
	Kirjumudil	0,994	541,96	<0,0001	20
	Lest	1	42396,80	<0,0001	20

Lisa 2. Täispikkuse mõõtmisvea hindamine.

Fiksaator	Liik	r	F	p	n
Etanool	Luukarits	0,999	3344,42	<0,0001	20
	Kirjumudil	0,999	311,78	<0,0001	19
	Lest	0,999	3566,61	<0,0001	20
Formaliin	Luukarits	0,999	3224,42	<0,0001	20
	Kirjumudil	1*			20
	Lest	1*			20

*Vastavate liikide puhul ei olnud mõõtmistäpsust võimalik kontrollida, sest kattuvus oli 100%.

Lisa 3. Kalade masside keskmised muutused (g) formaliinis ja etanoolis.

Liik	Mõõtmise (päev)	Etanool		Formaliin	
		Keskmine muut	SD	Keskmine muut	SD
Ogalik	7	-0,13	0,05	-0,05	0,04
Ogalik	14	-0,13	0,06	-0,03	0,05
Ogalik	21	-0,11	0,05	0,03	0,05
Ogalik	28	-0,10	0,05	0,04	0,05
Ogalik	35	-0,11	0,05	0,04	0,05
Ogalik	42	-0,11	0,05	0,05	0,05
Luukarits	7	-0,03	0,02	-0,02	0,02
Luukarits	14	-0,03	0,02	-0,02	0,01
Luukarits	21	-0,03	0,02	-0,02	0,01
Luukarits	28	-0,03	0,02	-0,02	0,01
Luukarits	35	-0,04	0,02	-0,02	0,01
Luukarits	42	-0,04	0,02	-0,02	0,01
Raudkiisk	7	-0,20	0,12	-0,07	0,05
Raudkiisk	14	-0,21	0,12	-0,09	0,06
Raudkiisk	21	-0,18	0,12	-0,06	0,07
Raudkiisk	28	-0,16	0,11	-0,02	0,05

Liik	Mõõtmise (päev)	Etanool		Formaliin	
		Keskmine muut	SD	Keskmine muut	SD
Raudkiisk	35	-0,18	0,11	-0,03	0,04
Raudkiisk	42	-0,20	0,11	-0,02	0,04
Madunõel	7	-0,04	0,02	-0,01	0,01
Madunõel	14	-0,04	0,02	-0,01	0,01
Madunõel	21	-0,03	0,02	0	0,01
Madunõel	28	-0,03	0,02	0	0,01
Madunõel	35	-0,04	0,02	0	0,01
Madunõel	42	-0,04	0,02	-0,01	0,01
Väikemudilake	7	-0,06	0,04	-0,02	0,02
Väikemudilake	14	-0,07	0,04	-0,02	0,02
Väikemudilake	21	-0,06	0,05	-0,02	0,02
Väikemudilake	28	-0,07	0,04	-0,02	0,02
Väikemudilake	35	-0,07	0,04	-0,03	0,02
Väikemudilake	42	-0,07	0,05	-0,03	0,02
Pisimudilake	7	-0,02	0,01	0	0,01
Pisimudilake	14	-0,02	0,02	-0,01	0,02
Pisimudilake	21	-0,02	0,02	-0,01	0,02
Pisimudilake	28	-0,03	0,01	-0,01	0,01
Pisimudilake	35	-0,03	0,02	-0,01	0,01
Pisimudilake	42	-0,03	0,02	-0,02	0,01
Kirjumudilake	7	-0,03	0,01	-0,02	0,02
Kirjumudilake	14	-0,03	0,02	-0,02	0,01
Kirjumudilake	21	-0,04	0,01	-0,02	0,02
Kirjumudilake	28	-0,04	0,01	-0,01	0,01
Kirjumudilake	35	-0,04	0,01	-0,02	0,01
Kirjumudilake	42	-0,05	0,02	-0,02	0,01
Lest	7	-0,06	0,05	-0,09	0,07
Lest	14	-0,08	0,05	-0,10	0,07
Lest	21	-0,08	0,05	-0,09	0,06
Lest	28	-0,08	0,05	-0,10	0,06
Lest	35	-0,09	0,05	-0,10	0,06
Lest	42	-0,11	0,06	-0,10	0,05

Lisa 4. Kalade täispikkuste keskmised muutused (mm) formaliinis ja etanoolis.

Liik	Mõõtmise (päev)	Etanool		Formaliin	
		Keskmine muut	SD	Keskmine muut	SD
Ogalik	7	-1,53	1,04	-1,03	1,00
Ogalik	14	-1,60	1,04	-0,97	0,85
Ogalik	21	-1,60	1,01	-1,03	0,85
Ogalik	28	-1,77	0,97	-1,10	0,96
Ogalik	35	-1,73	0,83	-1,10	0,96
Ogalik	42	-1,80	0,89	-1,07	0,94
Luukarits	7	-1,03	0,56	-0,23	1,07
Luukarits	14	-1,10	0,48	-0,57	1,04
Luukarits	21	-1,13	0,51	-0,80	1,00
Luukarits	28	-1,17	0,46	-0,80	1,00
Luukarits	35	-1,17	0,46	-0,77	1,01
Luukarits	42	-1,17	0,46	-0,77	1,01
Raudkiisk	7	-2,47	0,72	-1,35	0,79
Raudkiisk	14	-2,53	0,62	-1,29	0,69
Raudkiisk	21	-2,59	0,62	-1,35	0,61
Raudkiisk	28	-2,53	0,86	-1,53	0,62
Raudkiisk	35	-2,65	0,61	-1,53	0,62
Raudkiisk	42	-2,65	0,61	-1,59	0,71
Madunõel	7	-2,73	1,26	-2,13	0,94
Madunõel	14	-3,43	1,3	-2,57	1,14
Madunõel	21	-3,27	1,31	-2,77	1,07
Madunõel	28	-3,30	1,26	-2,83	1,09
Madunõel	35	-3,37	1,33	-2,87	1,04
Madunõel	42	-3,4	1,35	-2,93	1,01
Väikemudilake	7	-1,26	0,73	-1,10	0,76
Väikemudilake	14	-1,32	0,65	-1,03	0,67
Väikemudilake	21	-1,39	0,62	-1,07	0,64
Väikemudilake	28	-1,42	0,62	-1,20	0,66
Väikemudilake	35	-1,42	0,62	-1,20	0,66
Väikemudilake	42	-1,42	0,62	-1,17	0,59
Pisimudilake	7	-0,73	0,45	-0,50	0,57
Pisimudilake	14	-0,90	0,48	-0,70	0,6
Pisimudilake	21	-1,00	0,45	-0,70	0,6
Pisimudilake	28	-1,00	0,37	-0,80	0,48
Pisimudilake	35	-1,03	0,41	-0,80	0,48
Pisimudilake	42	-1,03	0,41	-0,80	0,48
Kirjumudilake	7	-0,93	0,58	-1,10	0,55
Kirjumudilake	14	-1,03	0,72	-1,17	0,46
Kirjumudilake	21	-1,13	0,63	-1,40	0,50
Kirjumudilake	28	-1,20	0,61	-1,37	0,49

Liik	Mõõtmise (päev)	Etanool		Formaliin	
		Keskmine muut	SD	Keskmine muut	SD
Kirjumudilake	35	-1,20	0,61	-1,37	0,49
Kirjumudilake	42	-1,20	0,61	-1,37	0,49
Lest	7	-2,17	3,65	-0,83	0,70
Lest	14	-2,20	3,63	-0,97	0,61
Lest	21	-2,27	3,81	-1,00	0,59
Lest	28	-2,37	3,77	-1,00	0,59
Lest	35	-2,37	3,77	-1,00	0,59
Lest	42	-2,37	3,77	-1,00	0,59

Lisa 5. Kalade keskmine massi muutus (%) etanoolis.

Liik	Mõõtmise (päev)					
	7	14	21	28	35	42
Ogalik	-5,5	-5,5	-4,7	-4,5	-4,7	-4,6
Luukarits	-7,2	-5,9	-6,4	-6,4	-7,6	-8,3
Raudkiisk	-8,3	-8,6	-7,4	-6,9	-7,5	-8,2
Madunõel	-16,4	-16,2	-13,2	-13,5	-15,3	-16,7
Väike mudilake	-14,5	-17,3	-16,0	-16,7	-17,6	-17,5
Pisimudilake	-6,1	-8,9	-8,4	-10,2	-11,1	-13,0
Kirjumudil	-9,9	-11,7	-12,0	-13,4	-15,2	-17,0
Lest	-9,1	-11,5	-11,3	-12,5	-13,7	-15,7

Lisa 6. Kalade keskmise massi muutus (%) formaliinis.

Liik	Mõõtmise (päev)					
	7	14	21	28	35	42
Ogalik	-2,3	-1,2	1,2	2,0	1,9	2,4
Luukarits	-4,7	-5,0	-5,1	-4,7	-5,1	-5,4
Raudkiisk	-2,7	-3,5	-2,2	-0,6	-1,2	-1,0
Madunõel	-3,9	-3,1	-1,0	-1,8	-1,0	-2,5
Väike mudilake	-5,4	-6,7	-6,7	-6,6	-8,1	-8,8
Pisimudilake	-1,5	-3,4	-3,2	-4,0	-5,1	-5,5
Kirjumudil	-5,8	-5,4	-5,5	-5,1	-5,8	-6,5
Lest	-9,8	-11,0	-10,1	-10,6	-11,1	-10,7

Lisa 7. Kalade keskmiste täispikkuste muutus (%) etanoolis.

Liik	Mõõtmise (päev)					
	7	14	21	28	35	42
Ogalik	-2,4	-2,5	-2,5	-2,8	-2,7	-2,8
Luukarits	-2,4	-2,6	-2,7	-2,8	-2,8	-2,8
Raudkiisk	-2,6	-2,7	-2,7	-2,7	-2,8	-2,8
Madunõel	-2,1	-2,6	-2,5	-2,5	-2,6	-2,6
Väike mudilake	-3,3	-3,5	-3,6	-3,7	-3,7	-3,7
Pisimudilake	-2,4	-2,9	-3,3	-3,3	-3,4	-3,4
Kirjumudil	-2,7	-3,0	-3,3	-3,5	-3,5	-3,5
Lest	-5,5	-5,6	-5,8	-6,1	-6,1	-6,1

Lisa 8. Kalade keskmiste täispikkuste muutus (%) formaliinis.

Liik	Mõõtmise (päev)					
	7	14	21	28	35	42
Ogalik	-1,7	-1,6	-1,7	-1,8	-1,8	-1,7
Luukarits	-0,6	-1,4	-2,0	-2,0	-1,9	-1,9
Raudkiisk	-1,4	-1,3	-1,4	-1,6	-1,6	-1,7
Madunõel	-1,6	-2,0	-2,1	-2,2	-2,2	-2,3
Väike mudilake	-3,0	-2,8	-2,9	-3,2	-3,2	-3,1
Pisimudilake	-1,6	-2,3	-2,3	-2,6	-2,6	-2,6
Kirjumudil	-3,3	-3,4	-4,1	-4,0	-4,0	-4,0
Lest	-2,0	-2,3	-2,3	-2,3	-2,3	-2,3

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Katri Kalda,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Formaliini ja etanooliga fikseerimise mõju kalade kehamõõtmetele“, mille juhendaja on Imre Taal,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015