



Atskaite par projekta zinātniskām aktivitātēm novembris 2014 - janvāris 2015

1. Jaunas zinātniskās grupas izveide

Jaunā starpdisciplinārā zinātniskā grupa turpina pētījumus sekojošā sastāvā:

- Zinātniskais vadītājs Artūrs Škute
- Vadošais pētnieks Indriķis Krams
- Vadošā pētniece Maija Balode
- Pētniece Tatjana Krama
- Pētniece Jolanta Vrubļevska
- Pētniece Aija Pupiņa
- Pētnieks Mihails Pupiņš
- Pētnieks Lauri Saks
- Pētnieks Valērijs Vahruševs
- Laborants Artūrs Kārkliņš
- Laborante Irina Pestinis
- Laborante Liene Muzikante
- Laborants Aleksandrs Mednis

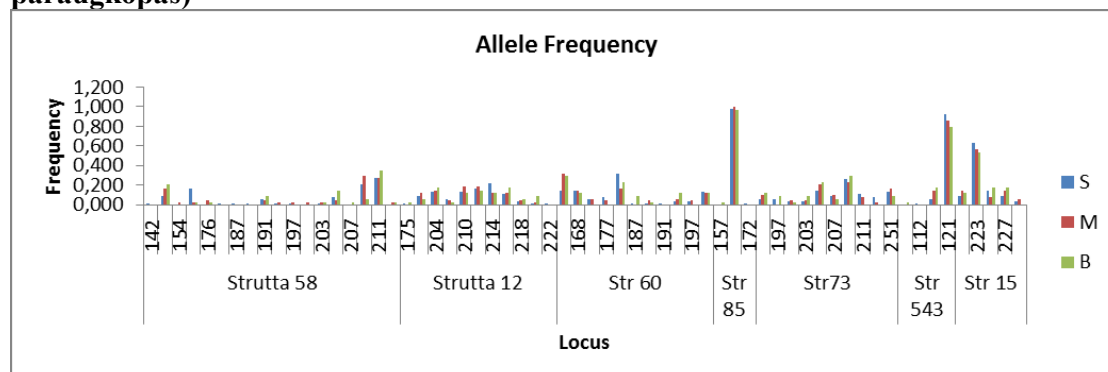
2. Pētniecība

2.1. Populāciju ģenētika

Dotajā periodā turpinās iepriekš iegūto datu analīze ar GenAEx 6.501 datorprogrammas palīdzību. No iegūtajiem un apstrādātajiem datiem tika izveidota matrica Excel formātā un apstrādāta ar GenAEx 6.501 datorprogrammu. Tika iegūti sekojoši dati.

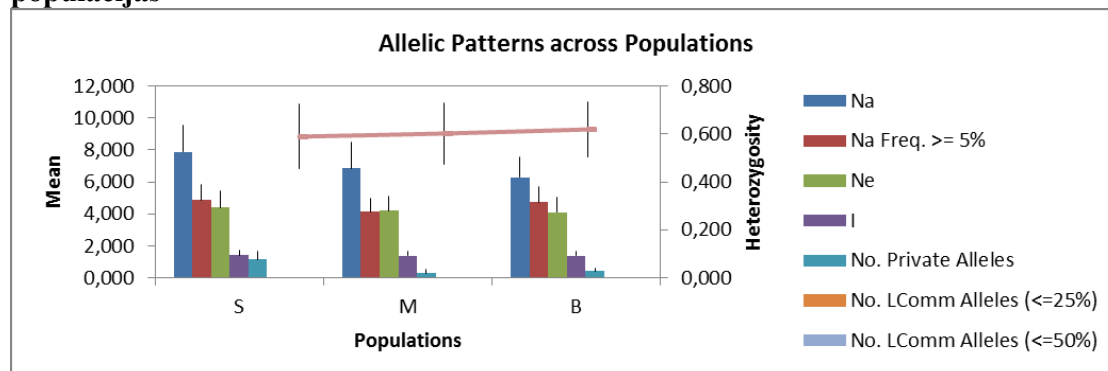
Salīdzinot dabiskās populācijas Salacas upes trīs dažādās paraugkopu iegūšanas vietās (S, M un B paraugkopas) savā starpā, ar 7 atsevišķu lokusu palīdzību kopā tika novērotas 61 alēles. No tām 37 alēles bija kopīgas alēles, kuras bija sastopamas starp visām Salacas upes S, M un B paraugkopām. Tika novērotas 16 privātās alēles kādā no atsevišķām paraugkopām. Novērojama raksturīga iezīme, ka tajā grupā, kura atrodas upē vistālāk no jūras (S-paraugkopa) privātās alēles ir uz pusi vairāk, kā B-grupai, kura ir tuvāk jūrai. Ar mikrosatelītu lokusu str85, Str543 un Str 15 palīdzību tika novērotas izteiktas dominantās alēles. Mikrosatelītu lokuss Strutta58 no 18 kopējām alēlēm varēja novērot vairāk kā pusi, precīzāk 11 privātās alēles, bet ar mikrosatelītu lokusiem Strutta12 un Str60, varēja novērot alēles ar savstarpēji līdzīgām frekvencēm.

Alēļu sastopamība pa mikrosatelītu lokusiem Salacas upes populācijā (S, M un B paraugkopās)



Pēc heterozigotātes vidējiem rādītājiem var novērot, ka paraugkopām, kuras iegūtas no Salacas dabiskajās populācijas, ir novērojams heterozigotātes līmeņa pieaugums atkarībā no tā cik tālu iegūšanas vieta atrodas no jūras - jo tuvāk jūrai, jo lielāks heterozigotātes līmenis. To var izskaidrot ar faktu, ka uz upes augšteci aizceļo mazāks skaits īpatņu, līdz ar to veidojas lielāka inbrīdīga iespējamība samazinot heterozigotāti, taču apstākļi upes augštecē prasa augstāku piemērošanos videi, līdz ar to ģenētiskās atlasē rezultātā, izdzīvo vairāk individuālu alēļu, kuras ļauj pielāgoties konkrētajai videi.

Vidējais ģenētiskais raksturojums S, M un B paraugkopām no Salacas dabiskās populācijas



Salīdzinot savstarpēji S, M un B paraugkopas no Salacas ūdenstilpnes skatīt nav novērojamas būtiskas distancētās atšķirības, un ģenētiskās atšķirības starp indivīdiem savstarpēji ir līdzīgas. Minimāli gan var novērot tendenci B un S paraugkopai distancēties vienā virzienā, tomēr pēc iegūtajiem datiem un izmantojot tikai koordinātu analīzes to nebūs iespējams noteikt korekti. Var arī novērot, ka B paraugkopa, kuras iegūšanas vieta atrodas tuvāk jūrai ģenētiskās atšķirības starp indivīdiem ir mazākas kā S paraugkopai. Lai būtu iespējams pārbaudīt vai eksistē tendence atsevišķām paraugkopām ģenētiski distancēties vienas populācijas ietvaros, veidojot mazākas subpopulācijas, būtu jāpalielina paraugu iegūšanas vietu skaits, jāpalielina distance starp iegūšanas vietām un darbs būtu jāveic ilgtermiņā.



2.2. Eko-imunoloģija

Aktivitātes „Eko-imunoloģija” atskaite par 2014. gada novembri, decembri un 2015. gada janvāri balstīta uz vadošā pētnieka I.Krama, pētnieces T.Kramas, pētnieka L.Saks un pētnieces J.Vrubļevskas-Ludiņas ikmēneša darba laika uzskaites atskaitēm.

Pārskata perioda laikā tika veikta zinātniskās literatūras izpēte par tēmu „kopējā glutaciona aktivitātes noteikšanas metodes eko-imunoloģijas pētījumos”, pamatojoties uz vairākiem zinātniskās literatūras avotiem, galvenokārt no šādiem zinātniskiem izdevumiem: FOOD ANALYTICAL METHODS, COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY A-MOLECULAR & INTEGRATIVE PHYSIOLOGY, ECOTOXICOLOGY, AQUATIC TOXICOLOGY, COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY A-MOLECULAR & INTEGRATIVE PHYSIOLOGY, MAGNESIUM RESEARCH, COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY C-TOXICOLOGY & PHARMACOLOGY, ARCHIVES OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY, BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY un citiem.

Glutations (γ -l-Glutamīls-l-cisteinīlglicīns) ir viens no svarīgākajiem iekššūnu tripeptīdiem, kas pilda antioksidatīvu funkciju organisma šūnu līmenī. Reducētā glutaciona daudzuma samazināšanās un oksidētā glutaciona daudzuma palielināšanās ir tieši saistīta ar novecošanās procesu, jo glutaciona redoks līdzsvaram ir tendence līdz ar organisma novecošanos oksidēties. Glutaciona oksidēšanās korelē ar mitohondriālo DNS bojājumiem. Glutaciona līmeņa pazemināšanās ir saistīta ar apoptozi, un glutaciona daudzuma palielināšanās pazemina vai palēnina šūnu bojāeju. No visa iepriekš minētā izriet, ka, šī šūnu antioksidants vai tā prekursori, novērš ar novecošanās un šūnu bojāejas procesiem saistītu šūnu darbības traucējumus. Tas aizsargā sarkanos asins ķermeņiņus, gremošanas traktu, samazina embolijas izraisītus dzīvo organismu smadzeņu darbības traucējumus, kā arī sirds darbības traucējumus, nodrošina aknu, šūnu un limfātiskās sistēmas detoksikāciju, uzrāda antiproliferatīvu iedarbību audzēju augšanas procesā. Tas atrodams dažādos audos, kur sasniedz koncentrāciju no 1 līdz 10 mM. Daži autori uzskata, ka glutaciona redoks veido 1% no kopēja glutaciona audos, bet mitohondriālā DNS – līdz 25%. Kopēja glutaciona

daudzums ir atkarīgs no šūnu struktūras un funkcijas, to oksidatīvās kapacitātes, ārējiem vides apstākļiem, citu blakus esošo audu ietekmes un citiem faktoriem. Augstākā glutaciona koncentrācija ir atrasta acs tīklenē - 10 mM, zemākā – asins plazmā - 0.05 mM.

Ūdens organismiem glutaciona sintēze norīt hepatopankrijā – viduszarnas gremošanas dziedzerī un žaunās. To stimulē labāki apgaismošanas apstākļi. Glutaciona daudzumu ir iespējams noteikt ar spektrofotometrijas, fluorometrijas, elektrofotometrijas un augstās izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfijas metodēm.

Balstoties uz zinātniskās literatūras analīzes rezultātiem, kopēja glutaciona noteikšanai ūdens organismu audos tika izvēlēta masspektrofotometrijas- hromatogrāfijas metode, kā metode ar paaugstināto jutību attiecībā uz mazām glutaciona koncentrācijām bioloģiskajos paraugos.

Komandējuma uz Tartu Universitāti Zinātņu un tehnoloģiju fakultātes Igaunijas Jūras institūtu laikā turpinājās pētījumā ar zivīm iegūtā bioloģiskā materiāla apstrāde. Tika apgūti kopējā glutaciona koncentrācijas noteikšanas metodei nepieciešamo buferu pagatavošanas, paraugu sagatavošanas un apstrādāšanas pamatprincipi, kopējā glutaciona (šūnu antioksidanta) koncentrācijas noteikšanas metode bioloģiskajos paraugos.

Tika veikta glutaciona koncentrācijas noteikšanas metode paraugos, kas tika iegūti zivju ekoimunoloģijas eksperimentālā pētījuma gaitā. Kopējā glutaciona koncentrācija aknas audu paraugos svārstījās no 2.85 $\mu\text{mol g}^{-1}$ līdz 1.86 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Iegūto datu statistiskā apstrāde un kvantitatīvi korelatīvā analīze tiks veikta nākamā pārskata perioda gaitā.

Pārskata perioda sākumā tika paveikta pilotpētījumā ar mugurkaulnieku perifērās asins parametru portatīvo ekspress-analizatoru HemoCue® WBC DIFF iegūto rezultātu salīdzināšana ar references radītājiem un citiem pētījumā iegūtajiem rezultātiem. Iegūtie radītāji atšķirās no references radītājiem diapazonā no 51.00 līdz 34.9 ml/kg sarkano asins ķermenīšu proporcionālā masā. Notika arī pilotpētījumā ar mugurkaulnieku perifērās asins parametru portatīvo ekspress-analizatoru HemoCue® WBC DIFF iegūto rezultātu primārā apstrāde un interpretācija. Iegūto rezultātu nesakritība ar references datiem sastādīja 0.5, kas ir uz statistiskā būtiskuma robežas.



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

Tas, iespējams, neļāva iegūt ticamas korelācijas ar citiem zivju eko-imunoloģijas pētījumā iegūtajiem rezultātiem. Turpmākajos pārskata periodos iepriekš minētie dati tiks salīdzināti ar jauniem datiem un to apstrāde turpināsies.

Eko-imunoloģijas aktivitātes darba grupas locekļi I.Krams un T.Krama sadarbībā ar līdzautoriem pārskata perioda gaitā, pamatojoties uz paveiktos pētījumos iegūtajiem rezultātiem, uzrakstīja, sagatavoja iesniegšanai, un iesniedza zinātnisko rakstu – manuskriptu „Reproduction is costly in an infected aquatic insect” starptautiskās zinātniskās elektroniskās datu bāzēs iekļautajā anonīmi recenzējamā zinātniskā preses izdevumā „Behavioral Ecology and Sociobiology”, zinātniskā izdevniecība - Springer Verlag. 2013. gada izdevuma impakt-faktors sastādīja 3.049. Manuskripts ir veltīts akva-ekosistēmu trofisko ķēžu pamatposmus veidojošo organismu reprodukcijas ekoloģiskām un eko-imunoloģiskām izmaksām. Manuskriptā tika iekļautas kopsavilkuma, ievada, materiālu un metožu, rezultātu un diskusijas daļas, kā arī referenču daļa. Referencēs tika apstrādāti un iekļauti 77 literatūras avoti no starptautiskās zinātniskās elektroniskās datu bāzēs iekļautajiem anonīmi recenzējamajiem zinātniskiem preses izdevumiem. Manuskripta teksts tika sagatavots iesniegšanai atbilstoši Springer Verlag izdevniecības prasībām. Rezultātā manuskripta teksts ieņēma 11 lapaspuses. Turpmākajos pārskata periodos notiks sazināšanās ar zinātniskā izdevuma „Behavioral Ecology and Sociobiology” redakcijas pārstāvjiem, par recenzentu noteikšanu un manuskripta nosūtīšanu recenzentiem, kā arī labojumiem pozitīvo recenziju rezultātā. Negatīvo recenziju rezultātā manuskripts tiks sagatavots un iesniegts citā starptautiskās zinātniskās elektroniskās datu bāzēs iekļautajā anonīmi recenzējamā zinātniskā preses izdevumā ar impakt-faktoru ne zemāk par projekta pieteikumā pieteikto.

Projekta pārskata periodā Eko-imunoloģijas aktivitātes darba grupas loceklis L.Saks uzsāka zivju eko-imunoloģijas eksperimentālā pētījumā iegūto zivju audu paraugu parazitoloģisko izmeklēšanu. Parazitoloģiskā izmeklēšana tika veikta ar gaismas mikroskopijas metodes palīdzību uz saplaiksnītiem zivju audu paraugiem. Pozitīvo paraugu fotoattēli tika uzņemti un saglabāti digitālā formā. Fotoattēli tika pakļauti digitālai apstrādei ar mērķi turpmākā darbā gaitā kvantificēt noteikto parazitū parametrus. Šī mērķa sasniegšanai fotoattēlos tika iestrādātā digitālā skala, ar kuras



palīdzību turpmāk tiks noteikti izmeklēšanas gaitā atrasto parazitāru oocīsu izmēri un iecīstēšanas pakāpe. Tas sniegs vērtīgu informāciju par pētījuma eksperimentālās un kontroles grupu zivju imūnsistēmas stāvokli un reakcijas specifiskumu. Iegūto datu kvantificēšana un statistiskā apstrāde tiks veikti turpmākajos projekta pārskata periodos. Šie dati noteikti tiks pakļauti korelatīvai analīzei ar citiem zivju ekoloģijas pētījuma iegūtajiem datiem par zivju imunoloģiskiem radītājiem.

2.3. Etoloģija

Aktivitātes „Etoloģija” atskaite par 2014. gada novembri, decembri un 2015. gada janvāri balstīta uz pētnieka M.Pupiņa, pētnieces A.Pupiņas, pētnieka V.Vahruševa ikmēneša darba laika uzskaites atskaitēm.

Aktivitāte „Etoloģija” turpināja sekmīgi realizēties šajā Projekta posmā. Visā posmā katrā mēneša sākumā „Etoloģija” grupas pētnieki piedalījās Projekta zinātniskās grupas kopsapulcē par darba kārtību un plāniem pašreizējā mēnesī. Grupas pētnieki sastādīja mēneša darba plānu un apsprieda to ar Kopsapulces vadītāju Prof. A.Škute, kas arī analizēja grupas darbu iepriekšējā mēnesī.

Šī posma galvenie uzdevumi bija turpināt pētīt un analizēt modernus zinātniskus datus par izlaižamo zivju mazuļu bojāeju stresa un plēsēju dēļ ar mērķi konkretizēt tehnoloģiju problēmu iemeslus citās valstīs un atrast to modernizācijas risinājumus pasaulē. Tam tika veikta zinātnisko elektronisko datu bāzes *Directory of Open Access Journals* (DOI), *WEB of Science* izpēte attiecībā uz zinātniskās literatūras pieejamību par pētījuma posma problemātiku. Kopā posmā atrasti vairāk ka 3 000 zinātnisko rakstu un žurnālu. Veiktā arī zinātnisko elektronisko datu bāzes Google Scholar izpēte, kur posmā atrasti ap 5 000 zinātniski un tehniski raksti, grāmatas un žurnāli par mēneša pamata tēmām. Katrs no Etoloģijas grupas pētniekiem pētīja savu specializēto augstāk minēto zinātnisko un praktisko virzienu atbilstoši personīgajam plānam, nepieciešamības gadījumā pētījām aktuālus citu Etoloģijas aktivitātes pētnieku virzienus.

Jauni uzdevumi bija novērtēt, izvēlēties, iegādāties un apgūt zinātniskās firmas *Loligo* pētniecisko programmatūru, lai uz tas bāzes novadīt nepieciešamus eksperimentus datu ieguvei, izpētīt zivju mazuļu uzvedības aspektus, kas ir aktuāli



izlaižamo zivju mazuļu bojāeju mazināšanai, lai paaugstināt viņu izdzīvošanu pēc izlaišanas dabā.



Posmā uzdevumos bija arī Akvakultūras laboratorijas tehniskas aparatūras apgūšana, lai nodrošināt eksperimentu gaitu.

Lielāka uzmanība šajā posmā tika pievērsta zivju mazuļu savstarpējām attiecībām; mēģināts izprast iepriekšējas adaptācijas plēsējiem ietekmi uz izlaižamo zivju izdzīvotību upes ekosistēmā; izlaižamo zivju iespējām iemācīties izvairīties no plēsējiem. Kā plēsēju modeļu suga tika izmantoti arī *Percottus glehni* Dyb pieaugušie īpatni, noķerti Latvijas dabā. Pētījums laikā tie tika uzturēti un pavairoti Akvakultūras laboratorijā.



Pētītais materiāls ļauj apgalvot, ka mazuļu treniņš pirms izlaišanas dabā dod iespēju palielināt akvakultūras izmantošanas efektivitāti. Darbs ar pasaules zinātniski praktisko literatūru akvakultūrā iekļāva sevī starptautisko zinātnisko publikāciju izpēti un analīzi, lai analizēt pētījuma tēmas:

1. Mehāniski akustiskais signāls pretplēsēju treniņā.
2. Plēsēju adaptīvā aizmiršana.



3. Ķīmisko vielu ietekme *predator-pray* mijiedarbībai.
4. Izlaisto smoltu izdzīvošanas uzlabošanas stratēģijas: zivju pretplēsēju trenings baseinos.
5. Pret plēsēju treniņa kļūdas.
6. In-situ pieredzes loma.

Grupas pētnieki katru nedēļu apkopoja un apsprieda saņemto informāciju. Saņemtās informācija tika integrēta eksperimenta dizainā, lai saņemt vēlamus un praktiskus rezultātus. Eksperimentu novadīšana pieprasa nepieciešama aprīkojuma izmantošanu. Tāpēc grupas pētnieki dotajā posmā turpināja strādāt Daugavpils universitātes akvakultūras laboratorijā telpās Projekta vadītāja Prof. A.Škute vadībā attīstot akvakultūru uzturēšanas tehnoloģijas barošanā, temperatūras uzturēšanā, filtrācijā u.c.

Akvakultūrā izaudzētie izlaisti dabā mazuļi mīt, migrē un var izplatīties visā Eiropā. Citās valstīs notiek akvakultūru strauja modernizācija. Tāpēc projekta praktiskā efekta sasniegšanai ir svarīgi izplatīt grupas pētnieku idejas un pieredzi arī starp kaimiņvalstu zinātniekiem. Posma gaitā pētnieki gatavoja uzstāšanos un pieteicās piedalīties starptautiskajā konferencē **9th Symposium for European Freshwater Sciences 05.-10.07.2015.**, Šveicē; un **LU zinātniskajā konferencē, Zooloģijas un dzīvnieku ekoloģijas sekcijā 06.02.2015.** par savā darba posmā sasniegto zinātniekiem no Latvijas un citām valstīm.



Grupas dalībnieku tēzes

Restoration of population or re-writing of evolution? Study of restoration of Salmonidae populations in Latvia and perspectives of the aquaculture modernization

A.Škute, N.Škute, A.Pupiņa, M.Pupiņš

Restoration of declined hydrobionts populations using captive breeding, rearing of juveniles in aquaculture, and releasing in wild is traditional method of fish

Lapa 8 no 25

ESF projekts „Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

Vienošanās Nr. 2013/0067/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/060

Ieguldījums tavā nākotnē!



conservation. The method is widely used for Salmonidae populations restoration in Latvia. More than 5 072 000 juveniles of five Salmonidae species were released in wild in 2014 year in Latvia. Salmonidae species and their populations are result of many-years evolution and natural selection under dynamic influence of many natural factors. But process of captive breeding, rearing in aquaculture, and releasing in wild in all its stadiums in Latvia differs from the processes in natural rivers or lakes. The natural selection is replaced with artificial selection, what is the domestication. Therefore the released in Latvia Salmonidae juveniles' genotypes can differ from natural fishes, creating artificial population bottleneck effect what can effect natural Salmonidae populations and their evolution. The research was supported by project "Creation of a new scientific group for modernization of aquaculture technology" # 2013/0067/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/060. In the research the methods of captive breeding, rearing of juveniles in aquaculture, and releasing in wild in Latvia were analyzed. In a result of the study methods of modernization of the Salmonidae aquaculture in Latvia were developed.

Study of restoration of *Emys orbicularis* ponds and population using modernized aquaculture, realized for the first time in Latvia

M,Pupiņš, A.Pupiņā, A.Škute

*Water ecosystems, optimal for the hydrobionts, are the main condition for their populations' sustainability. *Emys orbicularis* is preserved freshwater turtles species in European Union. The main negative factors for *E.orbicularis* in Latvia are overgrowing of water habitats and fragmentation of populations. The ponds in Silene Nature Park were overgrowing in Soviet time because of heavy pollution by nitrogen from agriculture. Therefore measures of conservation of *E.orbicularis* in the territory Natura 2000 were restoration of degraded ponds and releasing of *E.orbicularis* reared in modernized aquaculture in the waterbodies. The research in aquaculture was supported by project "Creation of a new scientific group for modernization of aquaculture technology" # 2013/0067/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/060. Three ponds systems with 16 ponds were created. 42 young adults and semiadults *E.orbicularis* from the modernized aquaculture were released in the ponds. We have investigated the restored waterbodies in 2013-2014. Area, depth, developments of shelf water plants ecosystems, connection, overgrowing, and other parameters were monitored. In a result of the study we found that all the shelf water plants ecosystems were restored for 60 – 70% in 2014. The level of restoration of ecosystems can guarantee released turtles needs for food, sun-basking and safe shelter.*

Study of restoration of *Bombina bombina* ponds and population using modernized aquaculture, realized in two Natura 2000 territories in Demene, Latvia

A.Pupiņā, M,Pupiņš, A.Škute



*The Fire-bellied Toad *Bombina bombina* is preserved hydrobiont species in European Union. The main negative factors for *B.bombina* in Latvia are overgrowing of ponds, fish predation and fragmentation of populations. The ponds of biggest Latvian *B.bombina* population "Demene" were overgrowing, semi-dried; nearest waterbodies invaded by invasive fish *Perccottus glenii*. Therefore 27 isolated ponds were created or restored in two new Nature 2000 sites (14 in Katriniski and 13 in Strauti). Created ponds were shallow, average depth was 0.5 m, with well insolated shores. In 2013 - 2014 *B.bombina* tadpoles were reared in modernized aquaculture till their metamorphose stage. The research in aquaculture was supported by project "Creation of a new scientific group for modernization of aquaculture technology" # 2013/0067/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/060. 4 069 juveniles were released in the ponds in 2013-2014. Monitoring of habitat improvement actions was carried out in 2013 and 2014. The study in Katriniski and Strauti showed success of the actions: 1) high level of restoration of water plant ecosystems in both territories Katriniski and Strauti; 2) presence of vocalizing males and juveniles *B.bombina* in both territories; 3) absence of *Perccottus glenii* in the ponds.*

Katru mēnesi tika veikta grupas un katra pētnieka mutiska atskaite par darbu projekta zinātniskajam vadītājam A.Škute, pētījumu plāna koriģēšana atbilstoši ieteikumiem un saskaņošana ar vadītāju.

2.4. Ekotoksikoloģija

Aktivitātes „Ekotoksikoloģija” atskaite par 2014. gada novembri, decembri un 2015. gada janvāri balstīta uz vadošās pētnieces Maijās Balodes ikmēneša darba laika uzskaites atskaitēm.

Pārskata periodā veikti sekojoši darba uzdevumi:

- testobjektu kultūru kolekcijas inventarizācija, papildināšana ar jauniem streiniem un to adaptēšana laboratorijas apstākļiem
- materiāli tehniskais nodrošinājums eko-toksicitātes testu veikšanai
- eko-toksikoloģisko testu veikšana ar mērķi noskaidrot pesticīdu ietekmi uz lašveidīgo zivju asins sastāva un ģenētiskām izmaiņām
- turpinās hematoloģisko analīžu datu apkopošana
- lašveidīgo zivju asins sastāva izmaiņu pētījumi pesticīdu ietekmē - leukocitārās formulas izmaiņas
- uzsākti ģenētiskie pētījumi lašveidīgo zivju asins šūnās, lai eritrocītu šūnās noteiktu pesticīdu ietekmē izraisītās mikronukleju izmaiņas



- dažāda trofiskā līmeņa testorganismu (planktonaļģu, pelāģisko vēžveidīgo un zivju) toksikorezistences salīdzinājums, balstoties uz eko-toksikoloģiskajos testos iegūtajiem rezultātiem
- abstrakta gatavošana Eiropas SETAK konferencei (25th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry) 3 – 7. 05. 2015, Barselona, Spānija
- materiāla gatavošana projekta informācijas ievietošanai LHEI mājas lapā par projekta IV posmā veiktajiem pētījumiem
- piedalīšanās projekta dalībnieku sanāksmēs; atskaitīšanās par paveikto un turpmāko plānu apspriešana
- zivjraudzētavas apmeklējums, lai apspriestu akvakultūras jomas galvenās problēmas, pārrunātu jautājumus par dzīvās barības lomu zivju akvakultūrā (jo sevišķi zivju mazuļu audzēšanā), un iepazītos ar vienu no modernākām recirkulācijas sistēmām Latvijā
- Tikšanās ar zivju un vēžu akvakultūras speciālistiem aktuālāko problēmu apspriešanai un ESF projekta ietvaros uzsākto pētījumu turpināšanai un pielietošanai; eksperimentālo datu analīze
- Zemkoības Ministrijā tikšanās ar Zivsaimniecības Departamenta vadību, Latvijas Universitātes, Latvijas Lauksaimniecības Universitātes, BIOR, Lauku atbalsta dienesta un Zivsaimniecības atbalsta tīkla speciālistiem, lai apspriestu profesionālās izglītības programmas izstrādi un ieviešanu akvakultūras jomā, Norvēģijas un ESF projektu rezultātu lietderīgai izmantošanai
- IV posma atskaites gatavošana, apkopojot III un IV posmā iegūtos rezultātus

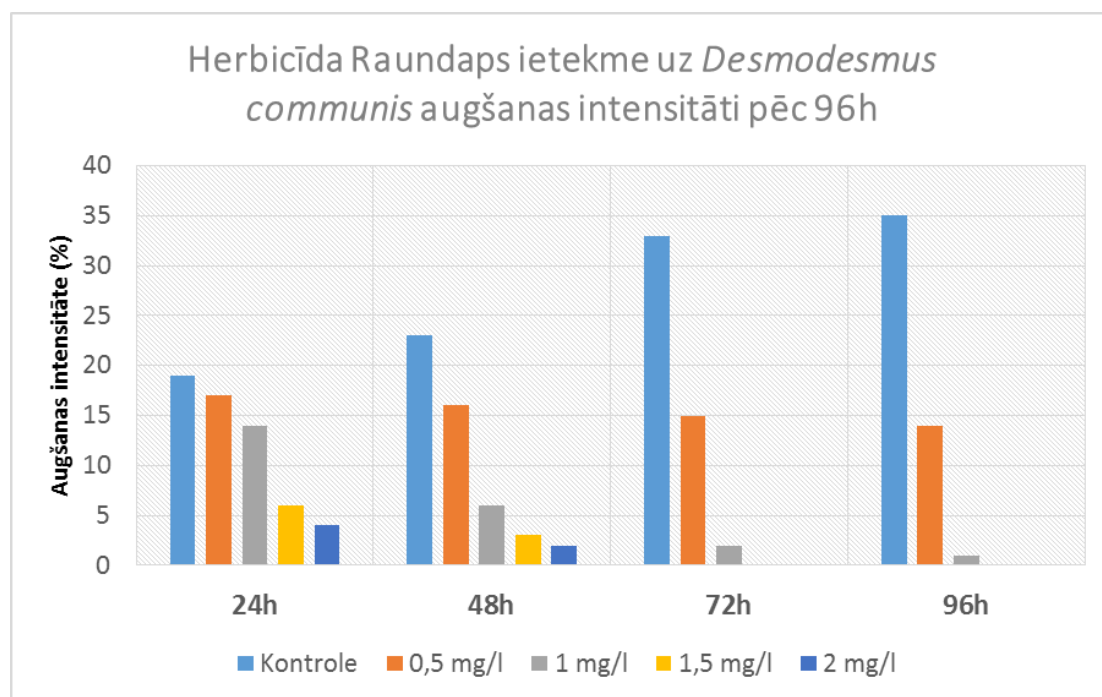
REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Akūtās toksicitātes tests ar mikroskopisko zaļajģi *Desmodesmus communis*

Līdz šim projekta ietvaros, toksicitātes testi bija veikti tikai ar zooplanktona organismiem un zivīm. Tomēr lai aptvertu visus trofiskos līmeņus un iegūtu kopainu par pesticīdu potenciāli toksisko ietekmi uz dažāda trofiskā līmeņa testorganismiem un ūdens ekosistēmu kopumā, bija nepieciešams veikt arī akūtās toksicitātes testus ar hidroekosistēmu pirmproducentiem - fitoplanktona organismiem, kā testa objektu

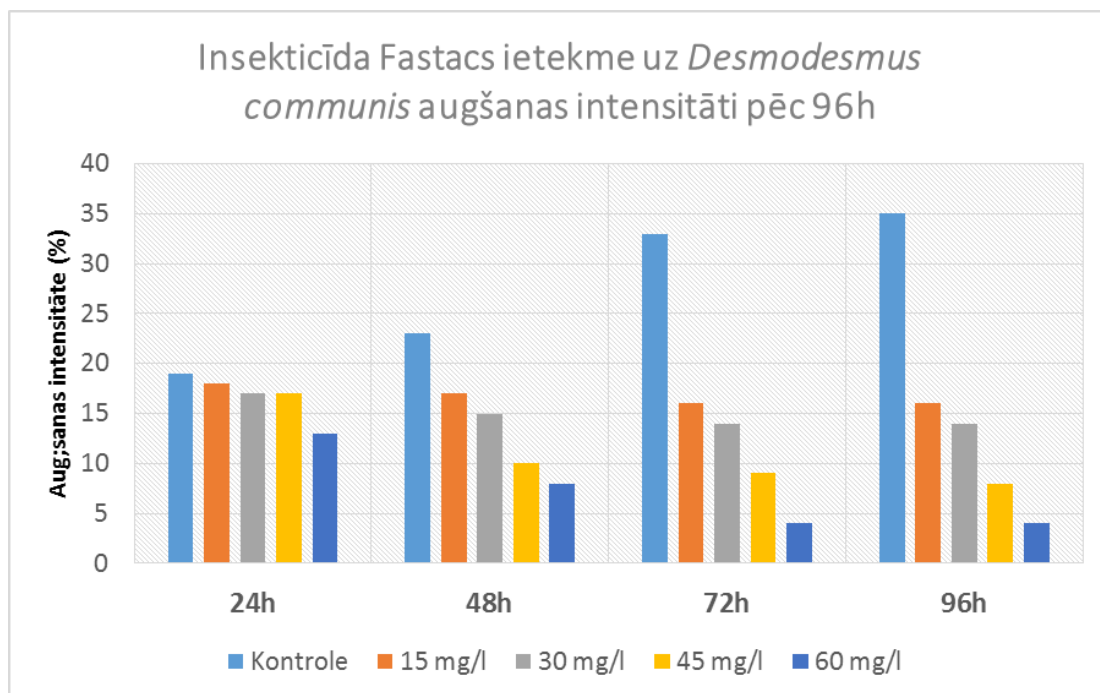
izmantojot ISO Saldūdens aļģu standarttestā norādīto zaļāļģu sugu *Desmodesmus communis*, kas tika iegūta no Latvijas Hidroekoloģijas institūta (LHEI) aļģu kultūru kolekcijas (izmantojot no Rīgas līča izdalīto lokālo streinu DCGR-3). Aļģu biomasas pieaugums kontrolē liecina par testa kultūras labo fizioloģisko stāvokli un atbilstību standarta prasībām.

Analizējot literatūru, tika apkopotas dažādu aļģu sugu EC_{50} vērtības, tomēr tās būtiski atšķīrās atkarībā no literatūras avota, tāpēc lai noteiktu abu pesticīdu EC_{50} , sliekšņa- un netoksisko koncentrāciju vērtības attiecībā uz *Desmodesmus communis* lokālo streinu bija nepieciešami vairākkārtēji eksperimentu atkārtējumi.



6 attēls. Raundap ietekme uz aļģu augšanas intensitāti

Kā redzams 6.attēlā, jau sākot no Raundapa zemākās testa koncentrācijas 0,5 mg/l ir novērojama neliela augšanas inhibīcija jau pēc 48h. Herbicīda koncentrācijai pieaugot līdz 2 mg/l jau pēc 48h ekspozīcijas vērojama gandrīz 100 %-īga šūnu bojāeja, norādot uz būtiski toksisku efektu.

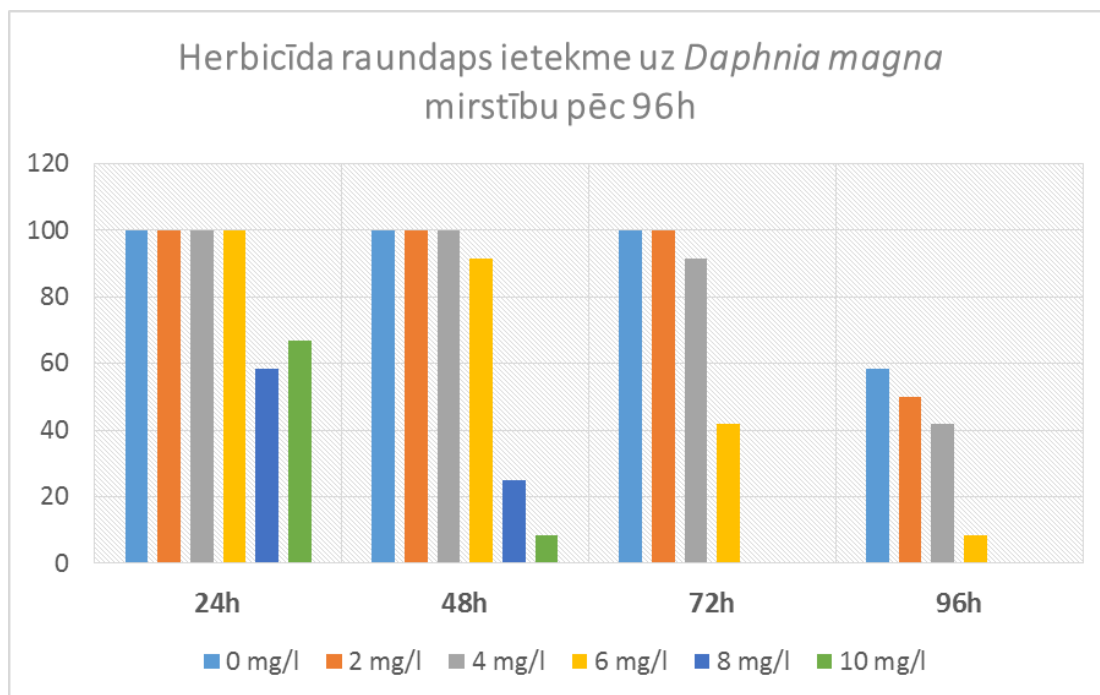


7. attēls. Fastac ietekme uz aļģu augšanas intensitāti

Testā ar insekticīdu Fastac (skat 7.att.), **šūnu augšanas ātrums pēc 24h iedarbības samazinājās tikai pie lielākās koncentrācijas - 60 mg/L**, bet pēc 48 st iedarbības **Fastac inhibējošā iedarbība strauji pieauga**, būtiski samazinot šūnu augšanas intensitāti.

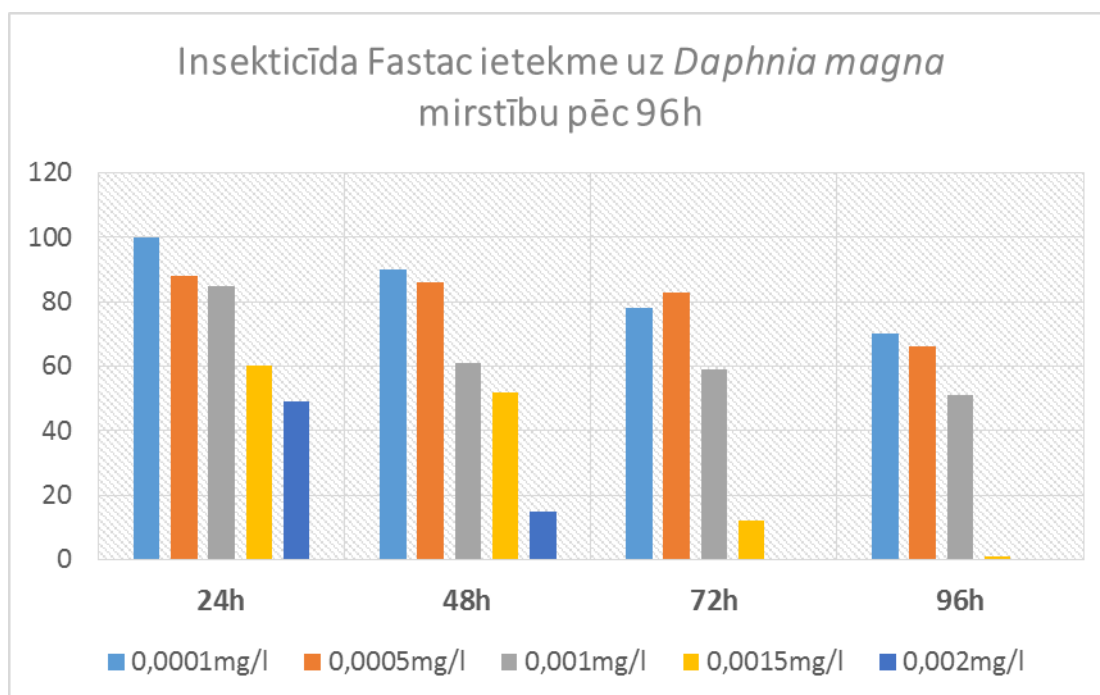
Akūtās toksicitātes testi ar zooplanktona organismiem *Daphnia magna*

Testi veikti ar vienu no pasaulē vispopulārākajiem zooplanktona testorganismiem - ar saldūdens vēžveidīgo *Daphnia magna*.



8. attēls. Raundap ietekme uz *Daphnia magna*

Herbicīda Raundap toksiskā ietekme ir atspoguļota 8. attēlā. Tā kā herbicīdu mērķorganisms ir augu valsts organismi, tad teorētiski, zooplanktonu tam vajadzētu ietekmēt minimāli, tomēr jau apkopojot literatūru un analizējot citu eksperimentu rezultātus ir redzams, ka tā toksiskā ietekme uz zooplanktona organismiem ir augsta. Lai gan pirmajās 24h četru zemāko koncentrāciju paraugi saglabā 100% izdzīvotību, tomēr testa beigās (96h), pilnīgi visos paraugos ir būtiska organismu mirstība.



9. attēls. Fastac ietekme uz *Daphnia magna* izdzīvotību

Insekticīda Fastac mērķis ir inhibējoši iedarboties uz kukaiņiem, izraisot kukaiņu nervu sistēmas bojājumus un novedot organismus līdz bojāejai.

Kā redzams 9.attēlā, Fastac EC₅₀ koncentrācijas ir būtiski zemākas kā herbicīdam, kas norāda uz tā lielāku ietekmi uz *Daphnia magna*.

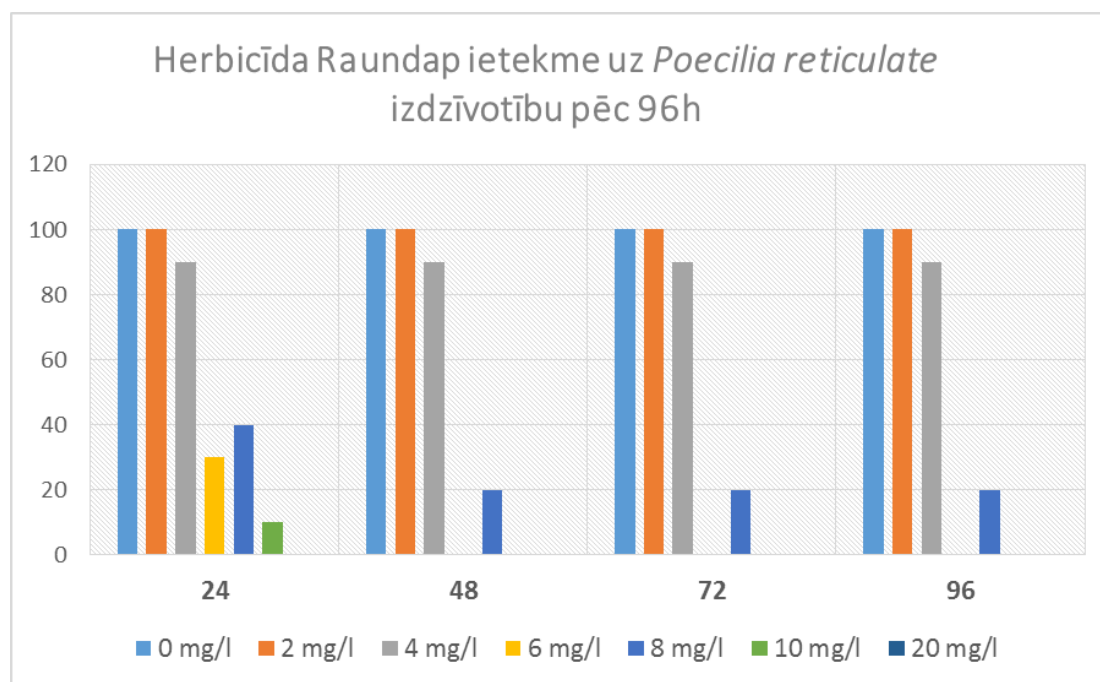
Pie zemākās Fastac koncentrācijas 0,0001 mg/l indivīdu bojāeju konstatēta jau pēc 48h iedarbības, bet koncentrācija 0,002mg/l pēc 72h ekspozīcijas jau izraisa 100% *Daphnia magna* bojāeju.

Iegūtie rezultāti norāda uz insekticīda Fastac īpašu toksiskumu attiecībā pret zooplanktona organismiem *Daphnia magna* un nokļūstot saldūdens ekosistēmās spētu būtiski ietekmēt pelāģisko organismu attīstību un ekosistēmas līdzsvarotu attīstību kopumā.

Akūtās toksicitātes testi ar zivju sugu *Poecilia reticulata*

Kā trešo testa organismu mēs izvēlējamies augstāku trofisko līmeni pārstāvošu organismu - zivju sugu *Poecilia reticulata*. Barības ķēdē tā barojas ar zooplanktona organismiem (tai sk. *Daphnia magna*), kas savukārt pārtiek no mikroskopiskajām aļģēm.

Lai gan, **salīdzinot ar zooplanktona sugu *Daphnia magna***, testos izmantotā zivju suga *Poecilia reticulata* **uzrādīja zemāko jutību** pret herbicīda Raundapa ietekmi, tā inhibējoša ietekme vērojama jau pie **zemām koncentrācijām – sākot ar 6 mg/l** (skat 10.att.).

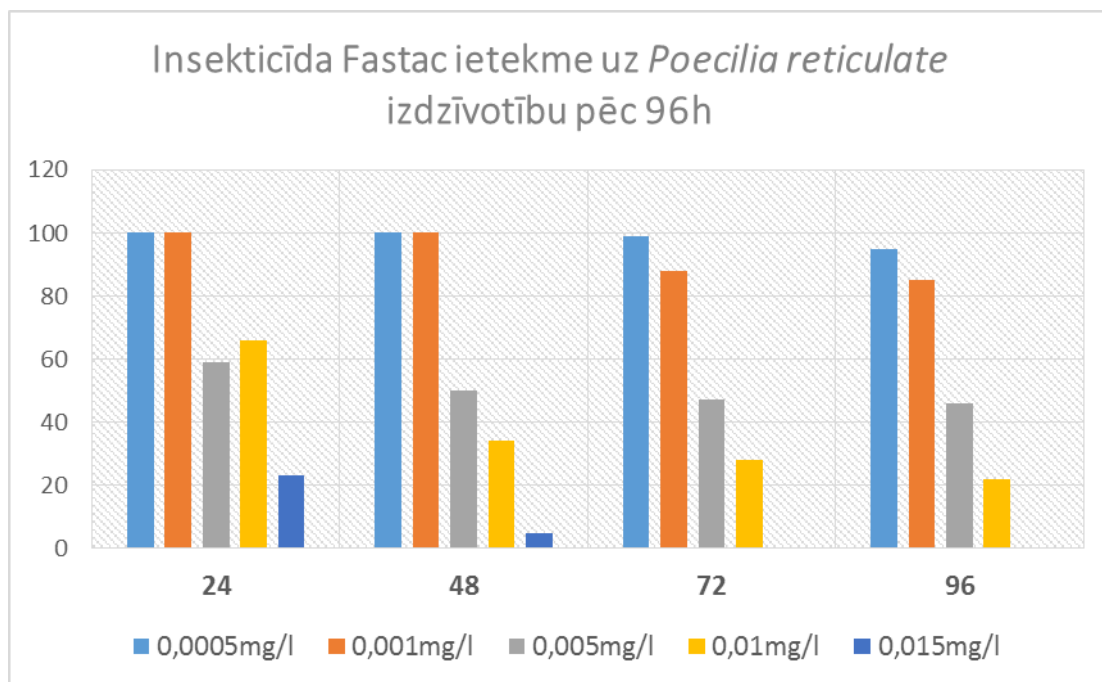


10. attēls. Raundap ietekme uz *Poecilia reticulata* izdzīvotību

Pie Raundapa koncentrācijas - 2 mg/l organismu mirstība akusperimenta laikā netika novērota. Pie otras zemākās Raundap koncentrācija - 4 mg/l jau pēc 24h stundām novērojama minimāla mirstība, kas saglabājas līdz pat testa beigām (96h), bet ir statistiski nenozīmīga.

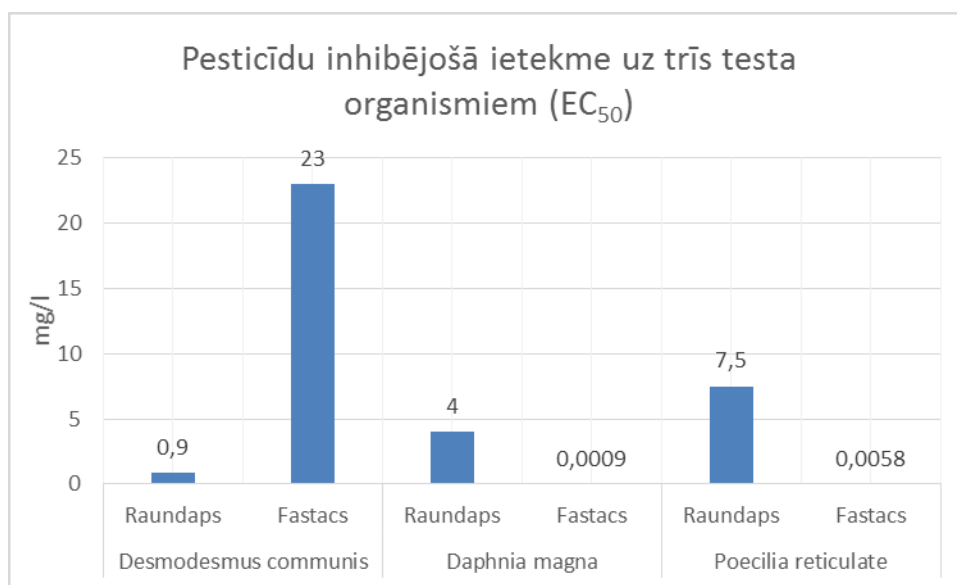


Taču pie **6 mg/l** toksiskās vielas koncentrācijas vērojama **strauja indivīdu mirstība jau pēc 24h, bet pēc 48h - 100% testa organismu bojāeja**. Pie 8 mg/l ir minimāla izdzīvotība arī pēc 96h. **Paraugos ar augstākajām koncentrācijām - 10 un 20 mg/l, 100% *Poecilia reticulata* mirstība konstatēta jau pēc 48h iedarbības.**



11. attēls. Fastac ietekme uz *Poecilia reticulata* izdzīvotību

Iepriekšējos grafiskos attēlota tendence ar kādu pesticīdi Raundaps un Fastac iedarbojas uz dažāda trofiskā līmeņa testobjektiem. Analizējot iegūtos datus ar Probita metodes palīdzību tika iegūtas **EC₅₀ vērtības**, kas attēlotas 12.attēlā.



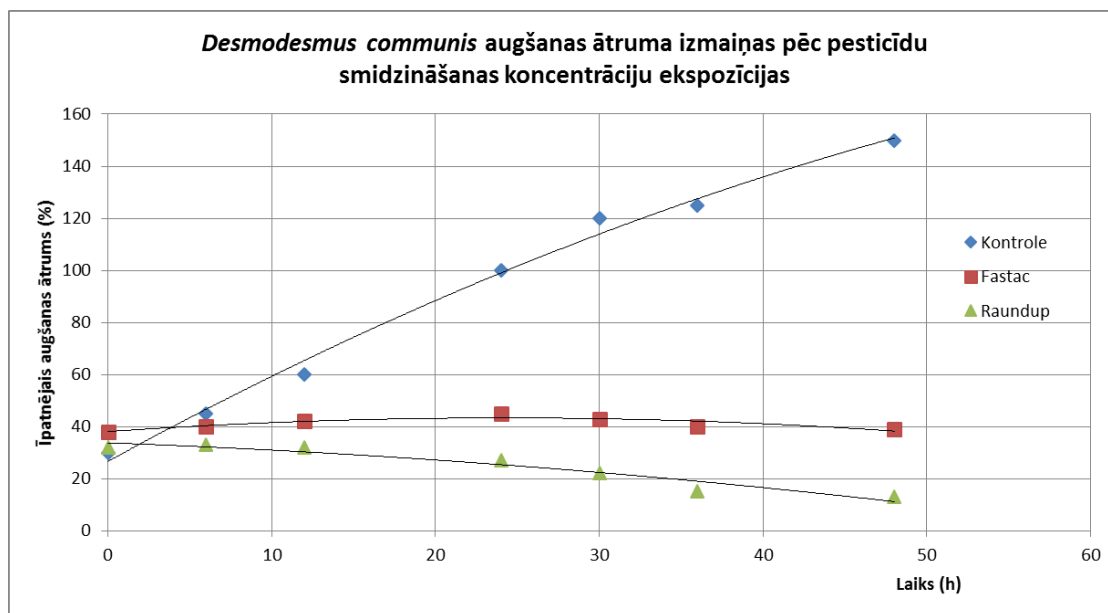
12. attēls. Testa organismu EC₅₀ pēc 96 stundu ekspozīcijas ar pesticīdiem Raundap un Fastac.

Akūtās toksicitātes testi ar pesticīdu izsmidzināšanas koncentrācijām

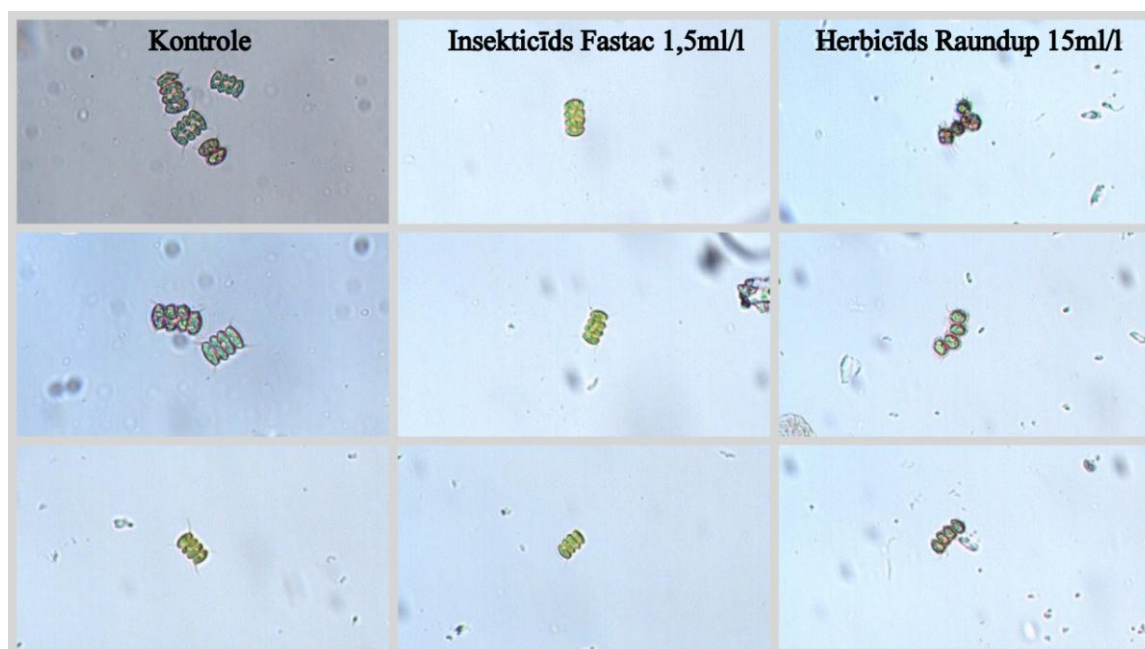
Eksperimentos tika izmantotas **ražotāju norādītās izsmidzināšanai rekomendētās pesticīdu koncentrācijas**, jo lai gan realitātē izsmidzinot nepieciešamo pesticīda devu, tas ūdenstilpē nonāk jau daļēji atšķaidītā vai biodegradētā stāvoklī, nepieciešams ņemt vērā potenciāli iespējamus riskus, kas varētu būt saistīti ar pesticīdu nokļūšanu hidroekosistēmās (piem. lauksaimniecības zemju apstrādei ar pesticīdiem notiekot tiešā ūdentilpju tuvumā, kas jo sevišķi bīstami zema ūdens līmeņa laikā; pesticīdu koncentrācijas pieaugums, ņemot vērā to iespējamo bioakumulāciju).

Lai izprastu pesticīdu iedarbības mehānismu un apjaustu tā inhibējošo ietekmi uz vidi, tika veikts eksperiments, kur abu pesticīdu - herbicīda **Raundup**® un insekticīda **Fastac**® koncentrācijas bija uz iepakojuma etiķetes norādītā **lauksaimniecībā pielietojamā pesticīdu izsmidzināšanas deva**, kas **Raundup** gadījumā atbilda **15ml/l**, bet **Fastac** gadījumā - **1,5ml/l**.

Līdzīgi kā EC₅₀ noteikšanas eksperimentos, kā testa organismi tika izmantoti dažādu trofisko līmeņu ūdensorganismi – fitoplanktons *Desmodesmus communis*, zooplanktons *Daphnia magna* un zivis *Poecilia reticulata*.



13. attēls. Augšanas intensitātes izmaiņas abu pesticīdu ietekmē pie to izsmidzināšanas koncentrācijām



14. attēls. *Desmodesmus communis* vizuālās izmaiņas pēc abu pesticīdu izsmidzināšanas koncentrāciju iedarbības (Raundup - 15ml/l, Fastac - 1,5ml)



13. attēlā redzams, ka **herbicīda Raundapa un insekticīda Fastac izsmidzināšanas koncentrāciju klātbūtnē**, salīdzinājumā ar kontroli **vērojams aļģu augšanas palēninājums**.

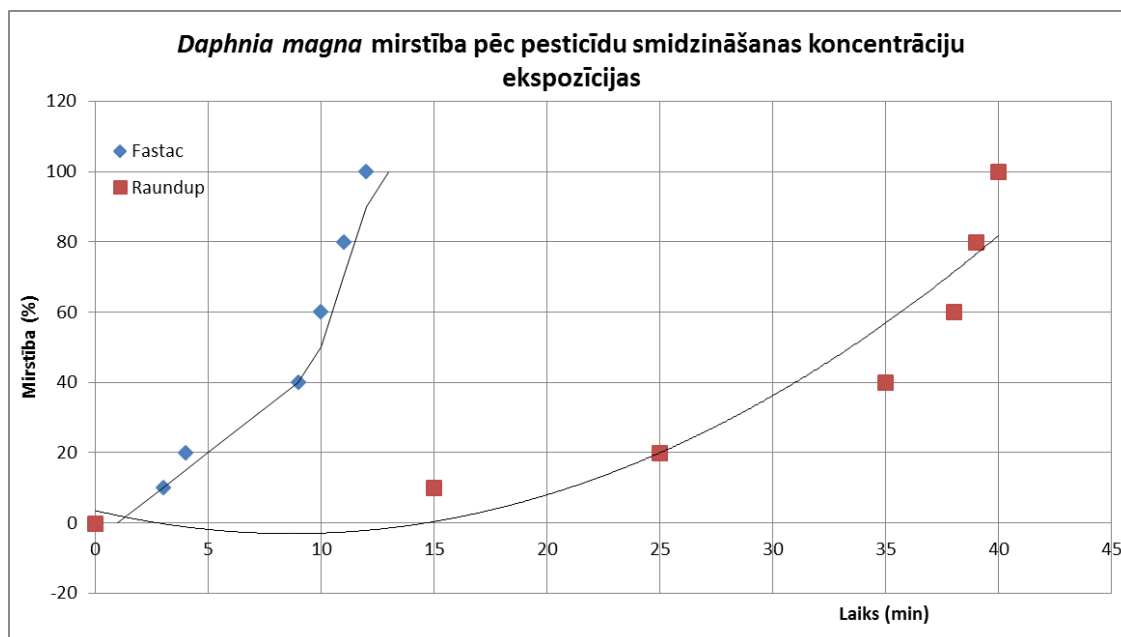
Kaut arī abi pesticīdi raksturojās ar inhibējošāku iedarbību attiecībā pret aļģēm, **būtiskāks aļģu augšanas palēninājums, kā arī morfoloģiskas izmaiņas bija vērojams Raundapa iedarbības rezultātā**, ko apstiprināja ar fotogrāfēšanas palīdzību veiktā šūnu vizuālā novērošana (14. attēls).

Fastac gadījumā, kaut arī eksperimenta laikā nav vērojams būtisks, kontrolei līdzīgs aļģu biomasas pieaugums, kas liecina par *Desmodesmus communis* reprodukcijas spēju samazināšanos, to šūnu skaits paliek nemainīgs un tām nav novērojamas nekādas morfoloģiskas patoloģijas.

Salīdzinoši ar Fastac, **lielākā inhibējoša ietekme uz planktonaļģu *Desmodesmus communis* attīstību ir herbicīdam Raundup, kas izsmidzināšanas koncentrācijā izraisa aļģu biomasas samazināšanos jau pēc 12 stundu ekspozīcijas, liecinot par augsto toksicitāti attiecībā uz fotosintezējošiem organismiem**.

Herbicīda ietekmē vērojamas arī **šūnu morfoloģiskās un fizioloģiskas izmaiņas, šūnām deformējoties un pigmentu izmaiņu rezultātā zaudējot krāsu** (14. attēls).

Raundupa inhibējošā iedarbība skaidrojama ar sekojošu iedarbības mehānismu: takā tas sastāv no virsmas aktīvām vielām un glifosāta, virsmas aktīvās vielas noārda šūnu apvalkus, kā rezultātā glifosāts var viegli iekļūt šūnā un tiešā veidā iedarboties uz aminoskābju ražošanu, kavējot šūnu attīstību un veidojot mutācijas



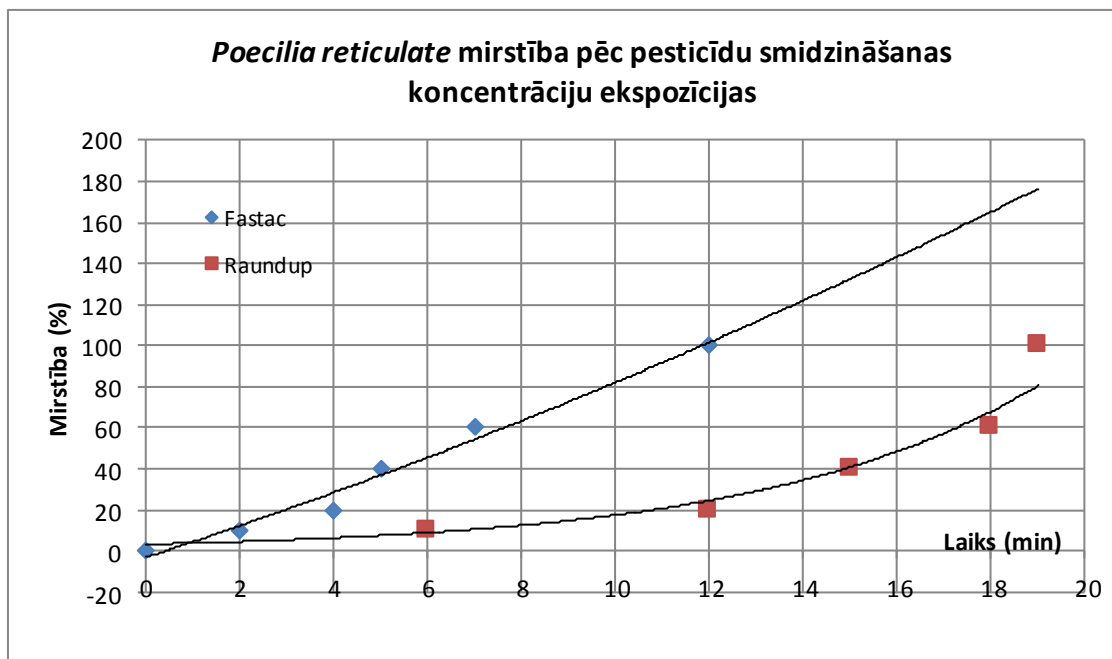
15. attēls. *Daphnia magna* mirstības tendence abu pesticīdu ietekmē pie to izsmidzināšanas koncentrācijām (Raundup - 15ml/l, Fastac - 1,5ml)

15.attēls ilustrē abu pesticīdu izsmidzināmo koncentrāciju (Raundup - 15ml/l, Fastac - 1,5ml) ietekmi uz *Daphnia magna* izdzīvotību.

Gan herbicīda, gan insekticīda gadījumā izsmidzināšanas koncentrāciju robežās vērojama strauja un 100%-īga organismu mirstība, atšķiroties tikai bojāejas laikam.

Straujāka toksiskā iedarbība vērojama Fastac gadījumā, 100%-īgu visu indivīdu bojāeju izraisot jau pēc 12-13 minūšu ekspozīcijas.

Raundap gadījumā 100%-īga organismu bojāeja pie izsmidzināšanas koncentrācijas vērojama pēc 40 min.



16. attēls. *Poecilia reticulata* mirstības tendence abu pesticīdu ietekmē pie to izsmidzināšanas koncentrācijām (Raundup - 15ml/l, Fastac - 1,5ml)

Rezultāti parāda, ka *Poecilia reticulata* ir jutīgāki pret Raundap izsmidzināšanas koncentrācijām, salīdzinājumā ar *Daphnia magna*, jo 100% visu indivīdu bojāeja konstatēta jau pēc 19 minūtēm, kas ir ievērojami ātrāk nekā zooplanktona testobjektiem (skat 16.att.). Par Raundapa toksisko ietekmi liecina arī zivju izvalbītās acis un uzpūtušies vēderi.

Paraugos ar insekticīdu Fastac redzam, ka pie izsmidzināšanas koncentrācijas zivju, kā arī dafniju bojāeja novērojama jau pēc 12 minūtēm. Kaut arī Fastac izsmidzināšanas koncentrācijas raksturojās ar augstu toksiskuma pakāpi, eksperimenta laikā netika konstatētas nekādas zivju vizuālas izmaiņas, ko iespējams izskaidrot ar īso ekspozīcijas laiku (skat 17.att.).



17.attēls. Vizuālās *Poecilia reticulata* izmaiņas pēc abu pesticīdu ietekmes pie izsmidzināšanas koncentrācijām (Raundup - 15ml/l, Fastac - 1,5ml)

Secinājumi

- 1) Neraugoties uz to, ka herbicīdi paredzēti nezāļu apkarošanai, nokļūstot ūdens vidē Raundaps būtiski ietekmē ne tikai augu valsts pārstāvjus – fitoplanktona organismus, bet arī zooplanktonu un zivis
- 2) Attiecībā uz dažāda trofiskā līmeņa ūdensorganismiem herbicīda Raundapa akūta toksiskā ietekme izpaužas sekojošā secībā: aļģes > zooplanktons > zivis, subletālai koncentrācijai svārstoties robežās no 0,9 mg/L (aļģēm) – 7,5 mg/L (zivīm), bet sliekšņa koncentrācija no < 0,5 mg/L (aļģēm) līdz > 4,0 mg/L (zivīm)
- 3) No testiem pakļautajiem testobjektiem visaugstākā jutība pret herbicīda Raundapa iedarbību ir mikroskopiskajai zaļajai *Desmodesmus communis*, bet viszemākā - zivīm *Poecilia reticulata*
- 4) No eko-toksikoloģisko testu rezultātiem izriet, ka par akūti netoksiskām varam uzskatīt tikai Raundapa koncentrācijas < 0,5 mg/L (aļģēm) līdz 2,0 mg/L (zivīm)
- 5) Ņemot vērā ka lauksaimniecībā pieļaujamās herbicīda Raundapa izsmidzināšanas koncentrācijas atbilst 15 ml/L, lai panāktu šī insekticīda netoksisku akūtu iedarbību, nokļūstot ūdentilpē būtu nepieciešams vismaz 30 kārtīgs atšķaidījums



- attiecībā pret aļģēm, un 4 līdz 8 kārtīgs atšķaidījumu attiecībā pret zooplanktonu un zivīm
- 6) Kaut arī insekticīdi paredzēti sauszemes kaitēkļu apkarošanai, nokļūstot ūdens vidē tie spēj radīt patiesus draudus, inhibējot dažādu trofisko līmeņu ūdens organismus, jo sevišķi zooplanktonu un zivis
 - 7) Insekticīda Fastac toksiskā ietekme attiecībā uz dažāda trofiskā līmeņa ūdensorganismiem izpaužas sekojošā secībā: zooplanktons > zivis > aļģes, subletālai koncentrācijai svārstoties ļoti plašā diapozonā: no 0,0009 mg/L (zooplantonam) – 23 mg/L (aļģēm), bet sliekšņa koncentrācijai no < 0,0001 mg/L (zooplantonam) līdz < 15 mg/L (aļģēm)
 - 8) Viszemākā jutība pret insekticīdu Fastac iedarbību ir planktonaļģēm *Desmodesmus communis*, bet vislielākā – vēžveidīgiem zooplanktona organismiem *Daphnia magna*
 - 9) Dafnijām un zivīm par akūti netoksiskām attiecīgi varam uzskatīt Fastac koncentrācijas < 0,0001 mg/L un 0,0005 mg/L, bet aļģēm < 15 mg/L
 - 10) Ņemot vērā ka lauksaimniecībā pieļaujamās insekticīda Fastac izsmidzināšanas koncentrācijas atbilst 1,5 ml/L, lai panāktu šī insekticīda akūti netoksisku iedarbību, nokļūstot ūdentilpē būtu nepieciešams panākt vismaz 15 000 kārtīgu atšķaidījumu attiecībā pret dafnijām un 3000 kārtīgu atšķaidījums attiecībā pret zivīm
 - 11) Attiecībā pret aļģēm, Fastac izsmidzināšanas koncentrācijas atrodas zem netoksisko, sliekšņa, kā arī subletālo koncentrāciju robežas un nevarētu izraisīt akūtu toksiskumu
 - 12) Kopumā eko-toksikoloģisko akūto testu rezultāti parāda, ka abi testēšanai pakļautie pesticīdi, gan herbicīds Raundaps, gan insekticīds Fastac, nokļūstot ūdens vidē var atstāt būtisku ietekmi uz dažādu trofisko līmeņu ūdens organismiem un var nodarīt būtisku kaitējumu hidroekosistēmas līdzsvarotai attīstībai, kā arī tās krastos atrodošai akvakultūrai
 - 13) Lai novērotu ilgtermiņa ietekmi nepieciešama akūto testu papildināšana ar hroniskiem testiem



2.5. Publikāciju sagatavošana

1) Ir sagatavoti četri ziņojumi (referāti) par pētījumu rezultātiem un tiks nodrošināta dalība sekojošās starptautiskās zinātniskās konferencēs:

- 9th Symposium for European Freshwater Sciences 2015(SEFS 9), Geneva, Switzerland, July 5-10, 2015;
- Aquaculture 2015, Cutting Edge Science in Aquaculture, 23 - 26 August 2015 Le Corum, Montpellier, France

Līdz projekta īstenošanas beigām (31.08.2015.) šie rezultāti tiks sasniegti pilnībā.

2) Turpinās darbs pie divu zinātnisko rakstu sagatavošanas, kas tiks publicēti Web of Scienc vai, SCOPUS datubāzēs iekļautos žurnālos.

Līdz projekta īstenošanas beigām (31.08.2015.) šie rezultāti tiks sasniegti pilnībā.

3) Turpinās darbs pie divu oriģinālu zinātnisko rakstu sagatavošanas, kas tiks pieņemti publicēšanai žurnālos, kuru citēšanas indekss sasniedz vismaz 50 % no *Thomson Reuters Journal Citation Report* nozares vidējā citēšanas indeksa.

- Pašlaik viens no zinātniskiem rakstiem „Reproduction is costly in an infected aquatic insect” jau ir pabeigts un tā iesniegšana publicēšanai notiks tuvākajā laikā, tiklīdz tiks atrasts piemērots izdevums kura citēšanas indekss sasniedz vismaz 50 % no *Thomson Reuters Journal Citation Report* nozares vidējā citēšanas indeksa Darbs pie otra raksta turpinās.

Līdz projekta īstenošanas beigām (31.08.2015.) šie rezultāti tiks sasniegti pilnībā.

25.02.2015.