



ESF projekts

„Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

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

Atskaite par projekta zinātniskām aktivitātēm janvāris-marts 2014

1. Jaunas zinātniskās grupas izveide

Tika izveidota jauna starpdisciplināra zinātniskā grupa sekojošā sastāvā:

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

2. Pētniecība

2.1. Populāciju ģenētika

Lai izstrādātu atražojamo lašveidīgo zivju populācijas zinātniskās sertifikācijas principus un lašveidīgo zivju vaislinieku atlasē procedūras shēmu atskaite periodā tika veikti sekojoši pētījumi:

- 1) Laika posmā no janvāra sākuma līdz marta beigām tika veikta zinātnisko elektronisko datu bāžu SCOPUS un Web of Science/Web of Knowledge (ISI) izpēte attiecībā uz zinātniskās literatūras izdevumiem akvakultūras un ģenētikas nozarē.
- 2) Zinātniskās literatūras analīzes rezultātā tika noskaidrots, ka mākslīgā atražošana var būt efektīva metode lašveidīgo zivju populāciju apsaimniekošanai, bet arī šeit pastāv riski, tāpēc svarīgi pirms tam veikt katras populācijas skrīningu, lai identificētu populācijas struktūru, stabilitāti, paaugstinātā riska zonas un to mijiedarbību ar apkārtējo vidi.
- 3) Galvenās bažas attiecībā uz atražošanu attiecas uz atražojamā materiāla ģenētisko piemērotību savvaļas populācijām un šo populāciju ģenētiskās veselības



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

ESF projekts

„Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

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

nodrošināšanu. Svarīgi ieturēt līdzsvaru starp pēc iespējas mazāku ietekmi, tajā pat laikā saglabājot populācijas ilgtspējību un tās nozīmi kā nozvejas materiālu (Arahamian *et al.*, 2003).

- 4) Ja atražošanas mērķis ir, izmantojot vietējos resursus, paplašināt populāciju un padarīt to ilgtspējīgu, tad ir svarīgi saglabāt ģenētisko un fenotipisko dažādību, tādējādi saglabājot populācijas piemērotību videi. Savukārt, ja mērķis ir optimizēt vietējo ražošanu, priekšroku dodot konkrēta genotipa un fenotipa īpatņiem, tad ir svarīgi nodrošināt, ka netiek traucēta savvaļas populācijas attīstība (Youngson and Verspoor, 1999). To var panākt, līdz minimumam samazinot iespēju savvaļas un mākslīgi atražotajām zivīm savstarpēji krustoties. Pirms veikt mākslīgo atražošanu, jāapsver, vai tas ir optimālais problēmas risinājums konkrētajā gadījumā. (Salmon and Sea trout, 2003).
- 5) Zinātniskās literatūras izpētes laikā tika noskaidrots, ka galvenais atražošanas programmas mērķis ir optimizēt vietējo ražošanu, vienlaikus nodrošinot, lai dabiskās populācijas dzīvotspēja un daudzveidība nav samazinājusies. Šādos gadījumos daļa no savvaļas zivīm tiek nogādātas audzētavā mākslīgai pavairošanai, bet pēcnācēji tiek atlaisti dabiskajā biotopā kā kāpuri, zivju mazuli, smolti vai pieauguši īpatņi, kur tie sajaucas ar savvaļas zivīm. Mērķis ir nodrošināt, ka populācijā netiek ieviesti nekādi "ārējie" gēni. Šāda veida programmas realizācijai nepieciešama piemērota platība, kurā populācijai paplašināties, kā arī zivju resursu izmantošanas regulācija (piemēra, licences). Ģenētikas ziņā svarīgi ir minimizēt mākslīgo selekciju; jo ilgāk zivis atrodas audzētavā, jo lielāks būs risks. Turklāt ir jāatrod līdzsvars starp vaislas materiāla nozvejas ietekmi uz populāciju salīdzinājumā ar pēcnācēju ielaišanu tajā – kādus riskus un iespējamus kaitējumus var prasīt skaitliskais ieguvums (Arahamian *et al.*, 2003).
- 6) Literatūras analīzes rezultātā ir noskaidrots, ka DNS polimorfisms ir atrasts mitohondriālajā un nukleārajā (kodola) DNS – precīzāk, to kodējošajās un nekodējošajās daļās, to unikālajās un atkārtotošajās secībās. Kodējošā DNS daļa, kas sastāda tikai 1% no zīdītāju genoma, ir vairāk saglabājusies, kamēr nekodējošajā daļā sastop vairāk mutāciju, jo to veidošanos mazāk ierobežo atlase (Altukhov, 2006).
- 7) Mutācijas, kas notiek nekodējošajā DNS daļā, tieši neietekmē izdzīvotspēju, līdz ar to šīs radušās atšķirības evolūcijas gaitā uzkrājas, un šo informāciju var izmantot, lai noteiktu, cik evolucionāri tuvradniecīgi ir divi organismi. Jo mazāk atšķirīgu mutāciju divu organismu starpā, jo tuvāka to radniecība caur vienu kopēju senci. Jo vairāk savstarpēju atšķirību, jo ilgāks periods pagājis kopš laika, kad tiem ir bijis viens pirmssākums (Hoech, 2008). Ievērojama daļa no atkārtotā (satelīta) kodola DNS sastāv no tā saukto kodola-vienību tandēmā atkārtotām kopijām (multikopijām), kuru garums ir no diviem līdz vairākiem tūkstošiem bāzu pāru.



ESF projekts

„Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

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

- 8) Lieku nukleotīdu iestarpināšanas, ko rada DNS daļu pārslīdēšana un pāru nesakritības replikācijas laikā, kā arī nevienlīdzīgas hromosomu daļu maiņas (crossing-over) rezultātā maina atkārtotā skaitu jeb multikopiju sekvenču garumu. To variācija, kas novērota dažādās hromosomās un indivīdos, tika nodēvēta par VNTR (*variable numbers of tandem repeats*). Dzimtās, kurām raksturīgi šādi tandēma atkārtojumi, pētnieku uzmanība tiek vērsta uz minisatelītiem, kas sastāv no atkārtotām kopijām (motīviem) katrā no tām pa 9 vai 10 līdz 100 bāzu pāru, un mikrosatelītiem, kuru kopijas parasti ir vienu līdz četru, dažkārt līdz sešu nukleotīdu garumā. Mikrosatelītus nereti apzīmē ar SSR (simple sequence repeat) vai STR (short tandem repeat).
- 9) Minisatelīta lokuss var saturēt divus līdz vairākus simtus šādu atkārtojumu; mikrosatelīta lokuss – desmit līdz simts atkārtojumu. Šo lokusu individuālās alēles viena no otras atšķiras ar tandēmā atkārtoto kopiju skaitu. Minisatelītu lokusi tiek pārbaudīti ar norobežojuma fragmentu hibridizāciju ar multi- vai viena lokusa zondi, kas ir atkārtotajai: motīva ķedei atbilstoša nukleotīdu ķēde. Individuāli mikrosatelītu lokusi tiek pētīti ar PĶR analīzēm, izmantojot unikālajām sekvencēm (domēniem) komplimentārus praimerus, papildinot katru mikrosatelīta lokusu. Tad tā allēļu 'izmērs' tiek noteikts poliakrilamīda gēla elektroforēzē, salīdzinot to ar atskaites DNS fragmentiem ar zināmu garumu ar sekvenēšanas palīdzību (Altukhov, 2006). Sekojošas īpašības padara šos lokusus par ļoti piemērotiem ģenētiskajiem marķieriem ar lielu potenciālu: abi lokusu veidi ir ļoti daudzskaitlīgi un izkaisīti pa visu genomu. Piemēram, aptuvenais skaits mikrosatelītu, kas sastāv no dinukleotīdu atkārtojumiem (GT)*n* un (CT)*n* taimiņa *Salmo trutta* genomā ir attiecīgi 109000 un 33000; šie lokusi galvenokārt atrodas nekodējošos genoma reģionos, līdz ar to tiem ir jābūt selektīvi neitrāliem; lai gan mini- un mikrosatelītu funkcijas ir neskaidras, daži pierādījumi apliecina faktu, ka tie darbojas kā kodējošie vai regulējošie elementi; dažkārt tie tikuši atrasti eksonos un asociēti ar slimībām; šos lokusus raksturo strauja evolūcija. Mini- un mikrosatelītu spontāno mutāciju ātrums ir 10⁻² līdz 10⁻⁴ katrā lokusā vienas paaudzes ietvaros. Mini- un mikrosatelītu lokusu diverģenci izraisa gan ģenētiskais dreifs, gan mutācijas. Mikrosatelīti parāda dažādus polimorfisma līmeņus kopumā lielākos daudzumos, nekā alozīmos gēnus. Mikrosatelīti un viena-lokusa minisatelīti parāda koodominantu pārmantojamību pēc Mendēļa likumiem.
- 10) Mikrosatelīti radnieciskās sugās ir identiski, kas atļauj izmantot vienus un tos pašus praimerus un līdzīgus protokolus. Mikrosatelītu analīzēm nepieciešams pavisam neliels audu vai asins parauga daudzums. Mikrosatelītu lokusi šobrīd tiek plaši izmantoti kā ģenētiskie marķieri. Augstais mutāciju līmenis, lielā alēļu dažādība un augstā heterozigotāte paver nesalīdzināmi plašas pētniecības iespējas ekoloģijas un ilgspējīgas bioloģijas nozarēs. Šī metode ļauj apiet ilgstošu kontrolētu mākslīgo reprodukciju tādām ilgi dzīvojošām sugām kā, piemēram, taimiņi.
- 11) Darba gaitā tika veikta sekojošo metožu aprobācija un optimizācija:



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

ESF projekts

„Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

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

- DNS izdalīšana. DNS izdalīšanai no muskuļu paraugiem tika izmantotas vairākas metodes, bet par pamatu izmantota DNS standarta izdalīšanas metode audiem ar, kuru sasniegti augsti kvalitātes un kvantitātes rādītāji paraugos. Tika izmantoti saldēti paraugi (50-100 mg). Paraugu homogenizē piestiņā un noskalo ar 400ml izdalīšanas bufera (0,4M Na Cl, 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 2mM ETDA (pH8.0), 20% SDS (līdz 2%)). To ievieto 2ml mēģenē un pievieno 16mkl Proteināzi K (Proteināze K 10mg, dH2O 990mkl). Paraugus inkubē no 1h vai arī ievieto uz nakti „Thermo shaker”65C. Pēc inkubācijas pievieno 300mkl 6M NaCl un labi samaisa. Paraugu centrifugē 30 min 12000 (max) apg/min +18°C . Pēc centrifugēšanas supernantu pārnes jaunā mēģenē. Supernentam pievieno ekvivalentu daudzumu izopropilspirta (1:1) vai (0.7:1) un sajauc. Paraugus novieto saldētavā (-20°C). Pēc saldētavas paraugus centrifugē 20 min 12000 (max) apgr/min pie +4°C temperatūras. Augšējo slāni nolej, nogulsnēm pievieno 70% etilspirta (96%C2H5OH 73ml, dH2O 27ml). Labi samaisa paraugus ar vortex. Centrifugē 5 min 12000apg/min, pēc tam etilspirtu uzmanīgi nolej. Paraugu tīra divas reizes un tad to žāvē istabas temperatūrā. Sausu DNS paraugu šķīdina 300-500ml TE bufersķīdumā (1M Tris-HCl (pH 8,0), 1mM ETDA, dH2O līdz 100ml). Pievieno 10mkl RNāzes šķīduma (RNS-āze 0,02g, dH2O 2ml). Paraugus novieto 37°C temperatūrā ūdens vannā uz 1 stundu.
- PQR reakcija ar mikrosatelītu praimeriem. Darbā tika izmantoti 8 iezīmēti mikrosatelītu praimerī : Strutta 58, Strutta 12 (Poteaux, 1995), Str 60, Str 73, Str 15(Estoup, 1993), Str 543, Str 79, Str 85 (Presa, 1996). Katra mikrosatelītu praimeru pāra viens no praimeriem tika iezīmēts ar fluorescējošu krāsvielu . Tika izmantotas četras fluorescējošas iezīmes FAM (zils), HEX (zaļš), TAMRA (melns), ROX (sarkans). DNS paraugiem tika pagatavoti darba šķīdumi un katrs paraugs atšķaidīts ar vidējo koncentrāciju 100ng/mkl. Darba vajadzībām tika pagatavoti 8mM darba šķīdumi (pamata šķīdums 200mM). Reakcijai tikai izmantotas apmēram 200ng DNS, 5X „Hot Fire Pol Blend Master Mix” ar 10mM MgCl₂ un 8mM mikrosatelītu praimerī. Temperatūra izvēlēta, pamatojoties uz „Hot Fire Pol Blend Master Mix” lietošanas instrukciju (Solis BioDyne – Data Sheet) 54°C ar 35 ciklu skaitu uz reakciju.
- PQR produkta vizualizācija, mikrosatelītu alēļu izmēru noteikšana.Lai notektu mikrosatelītu alēļu izmēru, tika pielietots kapilāra elektrodu sekvenators un izmantots polimērs POP-4. Sekvenatoram paraugus sagatavo, izmantojot 1,5mkl PQR produkta, tam pievienojot klāt formamīdu un standarta fluorescējošu krāsvielu, kura nesakrīt ar attiecīgā praimera fluorescējošo krāsvielu. Paraugus attiecīgi vortexē un centrifugē. Pirms likšanas uz sekvenatora paraugus denaturē 5 min 95°C temperatūrā.
- PQR optimizācijas rezultāti. Ar fluorescējošu krāsvielu iezīmētu praimeru darbība tika pārbaudīta ar PQR reakcijas apstākļiem, kuri pielietoti identiskiem praimeriem bez fluorescējošas iezīmes (Poteaux et. al., 1995). Ne



ESF projekts

„Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

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

visi praimeru strādāja vienlīdz labi. Lai uzlabotu vizualizāciju tika izmantotas arī citas reaģentu attiecības kā norādīts tabulā pirmajā un otrajā testā. Iegūtie rezultāti tika parbaudīti uz 1,5% agarozes gēla ar elektroforēzes palīdzību. Secīgi DNS mikrosatelītu vizualizācija tika veikta ar sekvenatora palīdzību, bet dati nebija skaidri nolasāmi uz sekvencēm, veidojās blakus produkti, kā arī signāls dažiem DNS mikrosatelītiem bija ļoti zems.

- DNS mikrosatelītu pārbaude uz 1,5% agarozes gēla elektroforēzē. (Izmantotie apzīmējumi: M-marķieris, 1,2,3,4,8,9,10,12-paraugu nr, Str15, Str73, Str85, str543-neiezīmētie praimeru, fl-fluorescējoša krāsviela, (skatīt 2.pielikumā)
- Sekvenatora sekvenču ar blakus produktiem un zemu signālu. Lai iegūtu labāk nolasāmas sekvenču ar labāku signālu praimeru darbība tika parbaudīta kopā ar „Hot FirePol Blend Master Mix”. Katra praimera darbība tika parbaudīta atsevišķi ar reaģentu daudzumu kas norādīts tabulā trešajā testā. Kvalitatīva, labi nolasama sekvenču redzama dotajā attēlā:
- Sekvenatora sekvenču ar labu signālu. No mikrosatelītu praimeriem tika veidoti multipleksie komplekti, ņemot vērā katra mikrosatelītu praimera fluorescējošo krāsvielu, ar kuru tas iezīmēts, lai tās neatkārtotos vienā komplektā, ņemot vērā, ka viena fluorescējošā krāsviela tiek lietota, kā standarts sekvenatorā.



ESF projekts

„Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

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

2.2. Eko-imunoloģija

Lai veiktu zivju eko-imunoloģiskā apsekošana, eksperimentāli modelējot vides faktoru nozīmi pirms rūpnieciski audzēto zivju izlaišanas dabā, izmantojot modeļsugas atskaites periodā tika veikti sekojoši pētījumi:

- 1) Tika veikta zinātnisko elektronisko datu bāžu SCOPUS un Web of Science/Web of Knowledge (ISI) izpēte attiecībā uz zinātniskās literatūras izdevumiem akvakultūras un etoloģijas nozarē. Izpētes rezultātā noskaidrojām, ka zinātniskās literatūras izdevumi mums pieejamās zinātniskās datu bāzēs ir plaši pārstāvēti un brīvi pieejami. No datu bāzēs pieejamajiem zinātniskās literatūras izdevumiem kā atbilstošākos eko-imunoloģijas aktivitātei izvēlējamies šādus žurnālus ar impakta faktoriem (impact factor, IF): Fish and Shellfish Immunology IF 2,96, Marine Environmental Research IF 2,33, Aquaculture IF 2,00, Aquatic toxicology IF 3,73, Marine and Freshwater Behaviour and Physiology IF 0,87, Environmental Biology of Fishes IF 1,30, Journal of Ethology IF 1,22 un iepazīnāmies ar šo zinātnisko izdevumu publikāciju noformēšanas un iesniegšanas prasībām akvakultūras nozarē.
- 2) Tika apgūta citātu / atsauksmju pārvaldības (uzglabāšanas, noformēšanas un ievietošanas) programmatūra EndNote X6, ko lieto rakstot zinātniskās publikācijas izmantotās zinātniskās literatūras avotu pus-automātiskai noformēšanai atbilstoši konkrētā zinātniskā izdevuma prasībām, zinātniskās literatūras bibliotēku (programmā esošai atsaucei piesaistīta zinātniskā raksta lejupielādētā elektroniskā versija) veidošanai un sistematizēšanai pēc noteiktiem kritērijiem, piem., „akvakultūras”, „eko-imunoloģija”, ērtai grupas dalībnieku izveidoto bibliotēku apmaiņai un sinhronizācijai.
- 3) Pirms eksperimentālo pētījumu uzsākšanas, lai sagatavotos pētījumos iegūto datu precīzai analīzei un interpretācijai, apgūtas divas analītiskas un statistiskās datu apstrādes programmatūras: SPSS Statistics 16.0 un STATISTICA 10.0 un to pamatfunkcijas: manipulācijas ar datiem - datu ievade, atlase, kārtošana, saglabāšana; datu eksportēšana uz Word, Excel, PowerPoint, kā arī uz PDF; aprakstošā statistiska (vidējais, moda, mediāna, dispersija, standartnovirze, biežumu tabulas u.c.); dispersiju analīze, regresija un korelāciju analīze, sadalījuma pārbaude, faktoranalīze un galveno komponentu analīze; grafiku attēlošana (stabiņveida un apļa diagrammas, izkliedes diagrammas, līnijgrafiki, boxplot, 3D grafiki u.c.), rezultātu noformēšana (tabulas, grafiki).
- 4) Tika veikta zinātnisko elektronisko datu bāžu SCOPUS un Web of Science/Web of Knowledge (ISI) izpēte attiecībā uz zinātniskās literatūras pieejamību par šādām tēmām: akvakultūra, akvakultūru eko-imunoloģija un imunoloģija, zivju eko-imunoloģija un imunoloģija, lašveidīgo zivju akvakultūra, zivju parazītu daudzveidība un to dzīves stratēģijas, imūnsistēmas darbības principi, akvakultūras organismu slimības un imūnsistēmas profilakse, akvakultūras hematoloģija, zivju hematoloģija un seroloģija, akvakultūrā izmantojamo organismu hematoloģiskie parametri un bioķīmiskie, hormonālā fona rādītāji un to



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

ESF projekts

„Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

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

ietekme uz augšanu, bioķīmiskie radītāji atbildes reakcijas laikā uz barības bāzes īpatnībām, sedimentāro piesārņojumu, toksisko vielu iedarbību un infekciju. Turpmāko zinātniskās literatūras izpēti par augšup minētajām tēmām veicām pamatojoties uz 86 zinātniskās literatūras avotiem, galvenokārt no šādiem zinātniskiem izdevumiem: Fish and Shellfish Immunology, Marine Environmental Research un Aquaculture.

- 5) Zinātniskās literatūras analīzes rezultātā esam noskaidrojuši, ka zivju imūnā sistēma ir līdzīga sauszemes mugurkaulnieku imūnajai sistēmai, tomēr pastāv arī būtiskas atšķirības. Tā kā zivis jau embrionālās stadijas laikā dzīvo ūdens vidē, tām ir attīstīti dažādi mehānismi aizsardzībai pret mikroorganismiem. Līdz ar to zivis jau embriogēnēzes laikā paļaujas galvenokārt uz iedzimtās imunitātes aizsardzības reakcijām. Komponenti, kas nodrošina iedzimtās imunitātes atbildes reakcijas, ir šūnu un humorālie faktori, kā arī plazmā un citos ķermeņa šķidrums šķīstošas humorālās un šūnu receptoru molekulas. Zivju limfātiskās sistēmas orgāni ir liesa, nieres un aizkrūts dziedzeris. Imūnglobulīni ir galvenie komponenti imūnās sistēmas atbildes reakcijās pret patogēniem organismiem. Imunomodulējošie produkti kā nukleotīdi, glikāni un probiotikas arvien biežāk tiek izmantotas akvakultūrās. Pētījumi parāda, ka šo produktu izmantošana samazina vajadzību pēc terapijas metodēm, palielina vakcinācijas efektivitāti, uzlabo akvakultūru produktivitātes rādītājus. Lai arī zinātniskajā literatūrā ir daudz informācijas par zivju antigēnu atpazīšanas molekulu receptoriem, imūnglobulīniem, T-šūnu receptoriem, ir maz kas zināms par šūnu mijiedarbību, kas rada un kontrolē zivju adaptīvās imunitātes atbildes reakcijas. Šī situācija ir radusies plaši pielietojamu reaģentu- monoklonālo antivielu trūkuma dēļ, jo tas traucē noteikt un atpazīt konkrētai zivju sugai specifiskas limfocītu subpopulācijas, un noskaidrot specifiskas imūnfunkcijas, zivju antivielu mijiedarbību ar antigēniem un ar imunitāti saistīto gēnu ekspresiju.
- 6) Pētījumos noskaidrots, ka galvenais faktors, kas samazina akvakultūru produktivitāti, ir infekciju slimību uzliesmojumi akvakultūru populācijās ar lielu blīvumu. Imunoloģiska iejaukšanās, galvenokārt vakcinācijas veidā, samazina infekcijas slimību radītos zaudējumus akvakultūrām. Zinātniskajā literatūrā norādīts, ka zivju vakcinācija pret dažādu infekciju izraisītājiem principā ir aizstājusi antibiotiku lietošanu, jo atkārtota antibiotiku lietošana rada mikroorganismu rezistenci pret dažādām antibiotikām, apspiež zivju imūnsistēmas darbību, kā arī zivīs uzkrājas cilvēkiem kaitīgi antibiotiku šķelšanās starpprodukti. Zivju vakcinācijas metodes ir strauji attīstījušās: tradicionālo injekcijas metodi zivju akvakultūrās biežāk aizstāj orālās vakcīnas, „apsmidzināšanas” metodes vai arī „vannošanas” jeb zivju iemērķšanas procedūras, kas arī ir tik pat efektīvas metodes zivju vakcinācijai pret infekciju izraisītājiem, bet rada mazāku stresu zivīm nekā klasiskā injekcijas metode. Vakcīnas ir radītas pret daudzām zivju slimībām, piemēram, virusālo hemorāģisko septicēmiju (izraisa *Vibrio salmonicida*), karpu pavasara virēmiju (izraisa *Rhabdo carpio*), foreļu furunkulozi (izraisa *Aeromonas salmonicida salmonicida*), saprolegniozi (izraisa *Saprolegnia*



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

ESF projekts

„Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

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

- spp.). Mikroorganismu ārējās membrānas rekombinantu proteīnu radīšana un izmantošana vakcīnās nodrošina plaša mēroga vakcinācijas iespējas. Eko-imunoloģijas pētījumos vakcināciju izmanto kā metodi organisma spējām veidot adaptīvās imunitātes atbildes reakcijas pret antigēnu.
- 7) Zinātniskās literatūras izpētes laikā noskaidrojām, ka akvakultūrās visbiežāk izmantojamās zivis kalpo par saimniekorganismiem virknei parazitāru, kas ir ļoti taksonomiski daudzveidīgi un tiem piemīt ārkārtīgi sarežģītas dzīves ciklu stratēģijas. Daži no šiem parazitāriem tiek tieši nodoti gala saimniekiem, savukārt citiem ir nepieciešama virkne starpsaimnieku līdz tie nokļūst gala saimniekā un sasniedz dzimumgatavību. Akvakultūrās visbiežāk sastopamie parazitāri, kas rada nopietnas lašveidīgo zivju slimības, augstu zivju mirstību un līdz ar to finansiālus zaudējumus, ir dažādi virusi (Rabdovīruss- virusālā hemorāģiskā septicēmija, infekciozā hematopoētiskā nekroze, Binavīruss- infekciozā pankreatiskā/aizkuņģa dziedzeru nekroze, Alphavirus- miega slimība), baktērijas (Aeromonas salmonicida salmonicida- foreļu furunkuloze, Yersinia ruckeri- sarkanmutes slimība, Flavobaktērija- fleksibakterioze, spuru puve), sēnes (Saprolegnia spp. saprolegnioze), ektoparazīti vienšūņi (protozoji) (Ichthyobodo necator- kostioze; Trichodina sp. - trihodinoze; Chilodonella cyprini - karpu hilodonella), daudzšūņi (Metazoa) (Gyrodactylus sp. ādas parazitārs – sūcējtārps), endoparazīti (Myxosoma cerebralis - „griešanās slimība”).
 - 8) Literatūras avotos norādīts, ka zivju slimības un to cēloņi (parazīti un saimnieka mijiedarbība) vienmēr jāapskata ciešā kopsakarībā ar saimniekorganisma (zivs), slimību ierosinātāju un apkārtējās vides (ūdens kvalitāte, diēta vide, turēšanas nosacījumi, barība/barošana, labturība, utt.) savstarpēju mijiedarbību, tas ir, jāapskata visi iespējamie ekoloģiskie faktori un mijiedarbības. Kā svarīgākie slimību profilakses priekšnosacījumi, kas minēti zinātniskajā literatūrā, ir: vispārēji higiēnas un sanitārijas pasākumi, turēšanas nosacījumu optimizēšana, labturība (ievērot apdzīvotības blīvumu) un stresa reducēšana zivīm, sabalansēta un spēcinoša barība, parazitāru apkarošana, vakcinēšana, audzētavās izmantot no slimībām brīvus, vēlamus, no veterināri sertificēta vaislas materiāla iegūtus ikrus, veselu zivju mazuļu iepirkšana.
 - 9) Literatūras analīzes rezultātā ir noskaidrots, ka zivju hematoloģisko parametru noteikšana ir informatīva tādu slimību un infekciju gadījumos, kad tiek ietekmēti asins šūnu komponenti. Atsevišķās slimības vai traucējumi var izraisīt anēmiju, leukopēniju, leukocitozi, trombocitopēniju un citas anormālas asins šūnu izmaiņas. Hematogrammas analīze var būt noderīga arī slimības vai patoloģiskās stāvokļa ritējuma izvērtēšanai, kā arī reakcijas uz terapiju izvērtēšanai. Tomēr, neskatoties uz to, hematoloģisko datu izmantošana līdzīgos pētījumos notiek vēl diezgan reti, tādēļ, ka akvakultūras organismu asins paraugu iegūšana ir apgrūtināta, asins šūnām lizējot saskarsmē ar ūdeni. Pētījumos apgrūtināta arī ticamu references materiālu trūkums, kuri, savukārt, netiek iegūti pirmās grūtības rezultātā. Tomēr literatūrā ir atrasti vairāki publicēti dati par references izmaiņām iepriekš minētos



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

ESF projekts

„Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

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

apstākļos atkarībā no organismu pazīmēm (vecuma, dzimuma) ka arī ārējiem apstākļiem (barības bāzes izmaiņām, piesārņojumu, infekcijām, toksisko vielu klātbūtni, populācijas blīvumu utt.). Vairāku autoru dati liecina par to, ka hematoloģisku parametru izmaiņas labi korelē ar citiem asins bioķīmiskiem rādītājiem. Literatūras analīzes rezultātā, kā arī zinātniskās sadarbības rezultātā ar Tartu Universitātes kolēģiem tika izvērtētas un apgūtas optimālas asins paraugu iegūšanas metodes. Tas bija sevišķi svarīgi, jo standarta asins paraugu iegūšanas un analīzes metodes, kas ir pieņemtas zooloģijas praksē ar sauszemes mugurkaulniekiem, var novest pie bioloģiskā materiāla neatgriezeniskas bojā ejas pētījumos ar akvakultūras organismiem.

- 10) Akvakultūras organismu izņemšana no ūdens vides un venozo vai kapilāro asins paraugu iegūšana venopunktūras vai kaardiocentēzes rezultātā, var izraisīt nopietnas hematokrīta rādītāju izmaiņas (līdz 25 %), atkarībā no laika, kad organisms atrodas ārpus ūdens vides. Jau pirmo 20 sekunžu laikā notiek kateholamīna izdalīšanās asinīs un jonu apmaiņa abpus eritrocītu šūnas membrānas. Notiek šūnu osmotiskā atūdeņošānā, kā rezultātā notiek eritrocītu sarecēšana. Rezultātā hematokrīta rādītāji pieaug, bet hemoglobīna līmenis paliek nemainīgs. Literatūra iesaka iegūt asins paraugus no zivīm, kas ir ne mazākas par 7.5 cm garumā. Atrašanās ārpus ūdens vides un kustību ierobežošana asins paraugu iegūšanas gaitā var izraisīt lielu stresu, kas ievērojami ietekmēs hematoloģiskus rādītājus. Tāpēc asins paraugu iegūšanai, pamatojoties uz literatūras datiem un kolēģu pieredzi, tika izlemts izmantot vispārējo anestēziju.

2.3. Etoloģija

Lai sagatavotu izlaižamo zivju mazuļu izdzīvotības un stresa pētījumentus *ex-situ* eksperimentos, analizējot oksidatīvo stresu un izdzīvošanas (atgūvuma) koeficientu atskaites periodā tika veikti sekojoši pētījumi:

- 1) Aktivitātēs „Etoloģija” realizācija Projekta šajā posmā paredz esošo zinātnisko datu par izlaižamo zivju mazuļu bojāeju stresa un pretplēsēju adaptāciju trūkuma dēļ vākšanu un analīzi. Plēsēju-upuru etoloģisko attiecību izpēte dos iespēju izprast plēsonības faktora ietekmi uz izlaižamo zivju izdzīvotību un izstrādāt metodes, kas sekmēs zivju mazuļu spējas reaģēt uz dabiskajā vidē mītošajiem svarīgākajiem plēsējiem un palielinās nozvejas vecumu sasniegušo vērtīgo zivju skaitu.
- 2) Akvakultūrā daudzi ekoloģiski un etoloģiski faktori darbojas vienlaicīgi, eventuāli samazinot izlaižamo zivju izdzīvotību un rezultātā graujot atražojamās zivju populācijas vitalitāti un pielāgotību dzīvei savvaļā.
- 3) Lai saprast etoloģisko faktoru nozīmi akvakultūrā, definēt lašveidīgo akvakultūras etoloģiska rakstura pamatproblēmas no cita rakstura (ģenētiskā, imunoloģiskā, vides faktoru u.c.), problēmām un izvēlēties etoloģiskā pētījuma akvakultūras modernizācijai aktuālus vektorus un lauku, turpmākās akvakultūras etoloģiskā



ESF projekts

„Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

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

rakstura modernizācijas virzienus, bija nepieciešamas etoloģisko problēmu pētījumu sākumā dziļāk izpētīt akvakultūru pamattehnoloģijas.

- 4) Lai sagatavoties Etoloģijas pētījuma eksperimentālai daļai, kas paredz zivju mazuļu uzturēšanu regulējamos eksperimenta apstākļos un speciāli organizēto etoloģiska rakstura ietekmi uz tiem, bija nepieciešams iedziļināties akvakultūru uzturēšanas modernās un tradicionālās tehnoloģijās, lai novērst neprognozējamu faktoru ietekmi uz eksperimenta rezultātiem.
- 5) Lai izstrādātu eksperimentiem nepieciešamus apstākļus un nodrošināt eksperimentālo zivju normatīvo dzīvi, bija nepieciešams izpētīt arī plašu zinātniski - tehnisko literatūru par akvakultūru uzturēšanu, barošanu, temperatūru, filtrācijas sistēmām, ūdens sastāvu u.c.
- 6) Katrs no Etoloģijas aktivitātes pētniekiem pētīja savu specializēto augstāk minēta zinātnisko un praktisko virzienu atbilstoši personīgajam plānam, kopēja darba saskaņošanai mēs apspriedām rezultātus darba sapulcēs, ka arī nepieciešamības gadījumā pētījām aktuālus citu Etoloģijas aktivitātes pētnieku virzienus.
- 7) Tika veikta zinātnisko elektronisko datu bāzes Directory of Open Access Journals (DOI) izpēte attiecībā uz zinātniskās literatūras pieejamību akvakultūras nozarē. Kopa janvārī atrasti 3 783 zinātniski raksti un žurnāli. Tika veikta arī zinātnisko elektronisko datu bāzes Google Scholar izpēte, kur janvārī atrasti 647 000 zinātniski un tehniski raksti, grāmatas un žurnāli par akvakultūru un 63 200 informācijas avoti par akvakultūras aprīkojumu.
- 8) Zinātniskās literatūras viena no pētāmām tēmām bija zivju stress akvakultūrā no fiziskās traucēšanas, ķeršanas, transportēšanas u.c.; pētnieki analizēja materiālus par fizioloģisko izmaiņu un kortikosteroīdu efekta pētījumiem akvakultūrā. Tā, stress var būt par iemeslu izmaiņām zivju bioloģiskajā kondīcijā, draudēt viņu veselībai. Stresa izsauktās izmaiņas tika grupētas kā primāras un sekundāras, kas iekļāva metaboliskas, hematoloģiskas, hidrominerālas un strukturālas; arī terciārās izmaiņas.
- 9) Tika pētīti materiāli par akvakultūras ģenētiskiem pamatiem un DNS marķieru lomu, pētnieki pētīja materiālus par inbrīdinga nozīmi lašveidīgo akvakultūrā, par gēnu manipulācijas metodēm akvakultūrā un transgēnu lašveidīgu zivju producēšanu.
- 10) Lai nodrošinātu Etoloģijas eksperimentiem zivju vajadzībām atbilstošu vidi, tika pētītas slāpekļa izņemšana no ūdens tehnikas akvakultūrā, bio-flock tehnoloģijas, probiotisko baktēriju, ka bioloģiskas kontroles aģentu izmantošanu, ūdens sastāva kontroles un ūdens filtrācijas metodes.
- 11) Akvakultūras zivju trenēšana dzīvas barības medījumos ir svarīga adaptācijai dabā, tāpēc tika pētīti materiāli par dzīvas barības un „zaļo ūdeni” izmantošanu zivju kāpuru audzēšanai zookultūrā. Pētīti tika arī materiāli par fosfolipīdu lomu zivju dietā stresa samazināšanā un vitalitātē.



ESF projekts

„Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

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

- 12) Lai infekcijas neietekmētu plānotus eksperimentus etoloģijā, pētnieki papildus pētīja arī zinātnisku literatūru par patogēnām baktērijām, quorum sensing, zivs slimībām, to menedžmentu un profilaksi, antibiotiku un dezinfekcijas līdzekļu lomu. Noskaidrots, ka smagu antubiotiku lietošana akvakultūra ir progresējoša problēma cilvēkiem un dzīvniekiem, ka arī apkārtējai videi (īpaši nebiodegradējošas antibiotikas non-biodegradable antibiotics).
- 13) Akvakultūras tehnoloģiju modernizācijas svarīguma novērtēšanai tika pētītas akvakultūru rokasgrāmata un kultūru intensīva kombinētā uzturēšana, noskaidrots, ka 1-ha platības sauszemē bāzēta jūras akvakultūru ferma var producēt 25 tonnas zivs, 50 tonnas molusku un 30 tonnas jūras aļģes. Tādas fermas ir perspektīvas arī saldūdens akvakultūrām.
- 14) Modernizācijas viens no mērķiem ir akvakultūras intensifikācija. Tāpēc tika pētīti akvakultūras sugu – kandidātu kritēriji, kur galvenais ir akvakultūras ekonomiskā efektivitāte.
- 15) Vides aizsardzības prasības ir ļoti svarīgas, intensificējot akvakultūru, tas pieprasa recirkulācijas sistēmu izmantošanu un pilnveidi, it īpaši regulējot notekūdeņu sastāvu un apjomu, kas realizējas pasaules valstīs (ASV, Austrālijā, Āzijā u.c.) atbilstoši izstrādātajiem vadošās organizācijās (Food and Agriculture Organization of the United Nations and International Finance Corporation, Global Aquaculture Alliance, Australian Prawn Producers Association, Marine Shrimp Culture Industry of Thailand, and Alabama Catfish Producers, Coastal Resources Center, University of Rhode Island, Missouri Department of Natural Resources, Florida Department of Agriculture and Consumer Services labāka menedžmenta pieredzes ieteikumos (best management practices).
- 16) Lai sagatavotu eksperimentālo aprīkojumu un nodrošinātu eksperimenta objektiem – hidrobiontiem nepieciešamu ūdens vidi, svarīgas ir arī praktiskas zināšanas un iemaņas akvakultūru recirkulācijas sistēmās. Šiem nolūkiem tika apmeklēts LIFE zookultūru centrs (att.1.), kur pētnieki praktiski iepazinās ar recirkulācijas sistēmu aprīkojumu, darbības principiem u.c.

2.4. Ekotoksikoloģija

Lai eksperimentālos apstākļos noteiktu bīstamāko vides piesārņotāju - HELCOM norādīto prioritāro bīstamo vielu, kuru skaitā ietilpst kancerogēnas un endokrīno sistēmu degradējošas vielas (HELCOM, 2009) - akūta un hroniska iedarbība uz zivju akvakultūras attīstību atskaites periodā tika apkopoti sekojoši pētījumi:

- 1) Pētot zilaļģu toksīnu ietekmi uz zivīm, ir noteikti saindēšanās klīniskie simptomi un patoloģiskās izmaiņas. Zivis var tikt pakļautas zilaļģu iedarbībai uzņemot tos orāli vai caur virsmas audiem (epitēliju). Aļģu toksīni zivju organismā galvenokārt tiek absorbēti caur zarnu traktu, kamēr toksīnu nokļūšana caur ādu un žaunām ir niecīga. Caur zarnu traktu zivīs nonāk aļģu šūnās ieslēgtie toksīni, taču caur žaunām vai ādu zivis saņem tikai ūdenī izšķīdušos toksīnus, kas atbrīvojušies šūnu novecošanās un lizēšanās ceļā.



ESF projekts

„Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

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

- 2) Visvairāk no kaitīgo zilaļģu iedarbības cieš augēdājzivis (kas barojas galvenokārt ar fitoplanktonu). Salīdzinoši daudz pētījumi veikti par zilaļģu toksīnu ietekmi uz karpām. Mikrocistīna - LR toksiskā ietekme uz karpām pēc orālas uzņemšanas izpaužas kā apātija un kā refleksu zudums, ādas, acu dobumu un iekšējo orgānu asiņošana. Ievērojami bojājumi atrasti arī zivju nierēs un aknās (bojāti aknu audi). Attiecībā uz karpām pastāv 2 pretēji viedokļi par zilaļģu toksisko iedarbību. Daļa autoru uzskata, ka karpas reti uzņem zilaļģes kā barību, un to gremošanas trakta vāji sārmainā vide un tās enzīmi kavē cianobaktēriju gļotveida apvalku noārdīšanos, tādējādi samazinot to toksisko iedarbību. Taču citi pētījumi liecina, ka karpu salīdzinoši garais zarnu trakts, kas raksturojas ar lielu virsmas laukumu un augstu uzsūkšanas spēju, var akumulēt vairāk toksīnus nekā plēsējzivis. Toksīnus uzņemot ar barību, tie pamatā uzkrājas karpu muskulatūrā (vidēji 55%), 38% - gremošanas traktā, bet atlikušie tiek izvadīti ar ekskrementiem.
- 3) Pārbaudot zilaļģu toksīnu ietekmi uz karpu, kā arī Atlantijas lašu mazuļu attīstību, konstatēta to ietekme uz asins sastāvu un plazmas enzīmu aktivitāti. Noteikta zilaļģu izdalīto toksīnu ietekme uz lašu mazuļu leukocitārās formulas izmaiņām, kas izpaužas kā neitrofilo granulocītu pieaugums.
- 4) Savukārt pētījumi par potenciāli toksisko zilaļģu ietekmi uz Baltijas reņģēm, liecina par novirzēm to embrionālajā attīstībā, šķilšanās režīma izmaiņām un paaugstinātu mirstību.
- 5) Zilaļģu klātbūtnē konstatēts arī saldūdens zivju tiamināzes (enzīms, kas izraisa B vitamīnu sadalīšanos) aktivitātes pieaugums.
- 6) Zivis galvenokārt ir apdraudētas no novecojošu cianobaktēriju populāciju šūnu toksīniem, kuru apvalki jau ir daļēji lizējušies.
- 7) Zivis ir daudz jutīgākas pret toksīniem savas dzīves agrīnās attīstības stadijās. To nosaka plānie epitēlija slāņi; lielā ķermeņa virsma attiecībā pret ķermeņa tilpumu; augstais metabolisma ātrums, kā arī traumētie jauno audu un orgānu attīstības procesi.
- 8) Iesāļos ūdeņos zivju mirstību bieži izraisa arī sīkie vicaiņi *Prymnesium* spp, kuri producē hemolītiskas un neurotoksiskas vielas. Tā piem. neurotoksisko vicaiņu *Prymnesium* sp. un hepatoksisko zilaļģu *Planktothrix agardhii* „ziedēšana” un plaša zivju mirstība 1997. gada vasarā tika novērota Somijā (iesālā ūdens ezerā Vargsunder), mikrocistīna-LR maksimumam sakrīt ar *P. agardhii* maksimumu.
- 9) Pirmie lielākie pētījumi par Rīgas līča fitoplanktonu, tai skaitā arī par potenciāli toksiskajām aļģēm veikti jau 1908. - 1909. g. profesora Grimma vadītās Krievu - Baltijas ekspedīcijas laikā. Šīs ekspedīcijas materiāli publicēti Krabbi darbā “Baltijas jūras planktons” (Краббн, 1913). Ekspedīcijā iegūtas ziņas par potenciāli toksisko zilaļģu *Aphanizomenon flos - aquae*, *Anabaena* sp., *Nodularia spumigena* izplatības tendencēm Rīgas līcī.



ESF projekts

„Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

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

- 10) Epizodiskus mikroskopisko aļģu pētījumus veicis E. Taube (Taube, 1911), kurš 1910. g. jūlijā, braucot cauri Rīgas līcim, arī konstatējis *Aphanizomenon flos - aquae* un *Nodularia spumigena* klātbūtni fitoplanktona kopējā sugu sastāvā un autors norāda uz *Aphanizomenon flos - aquae* ievērojamu attīstību.
- 11) Ziņas par Rīgas līča aļģēm, ieskaitot potenciāli toksiskās zilaļģes, atrodamas arī H. Skujas (Skuja, 1926; 1932) darbos. Tie ir taksonomisku informāciju apkopojošī pētījumi, kuros autors devis dažādu sugu šūnu formu sistemātiskās iezīmes, izmērus un attēlojumus. Arī H. Skuja līča dienvidu daļā atzīmējis intensīvu *Aphanizomenon flos - aquae* attīstību.
- 12) 1925. g. LU Hidroloģiskā stacija izdarīja plašus vākumus Rīgas līča ūdens virskārtā (Rappoport, 1930). Pētījumi raksturo fitoplanktona sezonālo attīstības dinamiku un atzīmē lielu zilaļģu, sevišķi potenciāli toksiskās zilaļģes *Aphanizomenon flos - aquae*, skaita pieaugumu vasarā.
- 13) 40-tos un 50-tos gados ar Baltijas jūras un Rīgas līča planktonaļģu pētījumiem visintensīvāk nodarbojās profesors I. Nikolajevs. Bīstamo zilaļģi *Aphanizomenon flos-aquae* autors uzskata par obligātu vasaras fitoplanktona sastāvdaļu (Николаев, 1950; 1953; 1954; 1957).
- 14) 70-to gadu sākumā Rīgas līča planktonaļģu kvalitatīvā sastāva pētījumus veicis A. Rudzroga, viņš apraksta 147 fitoplanktona sugas, ieskaitot jau iepriekš minētās potenciāli toksiskās zilaļģes (Рудзрога, 1965; 1974).
- 15) Sākot ar 70 - to gadu otro pusi, kompleksus pētījumus Baltijas jūrā un Rīgas līcī veicis Baltijas Zivsaimniecības Zinātniski Pētnieciskais Institūts (Balt NIIRH). Arī šajos pētījumos ir raksturota fitoplanktona sezonālā attīstības dinamika ar raksturīgu zilaļģu attīstību vasaras periodā (Jurkovskis u.c. 1976; 1977; 1978; 1979, Калвека, 1980; 1983). Jāatzīmē, ka 70 –to gadu vidū bīstamā zilaļģe *Aphanizomenon flos-aquae* novērota reti, kaut gan Profesors Nikolajevs 40-to gadu beigās raksturo to kā dominējošu vasaras fitoplanktona sugu.
- 16) Nozīmīgs zilaļģu *Anabaena flos - aquae*, *Anabaena lemmermannii*, *Anabaena spiroides*, *Aphanizomenon flos - aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *Nodularia spumigena* pieaugums atzīmēts 80 - to gadu beigās un 90- to gadu sākumā (Balode, 1993; 1996; 1997, Balode un Puriņa, 1995; 1996). Minēto aļģu izplatība Rīgas līcī novērota plankumu veidā, gan līča piekrastē, gan atklātajā daļā, maksimālās attīstības laikā biomasai sastādot vairākus g/m³.
- 17) 90 – to gadu beigās uzsākti eksperimentāli darbi, lai noskaidrotu vides faktoru ietekmi uz potenciāli toksisko zilaļģu attīstību Rīgas līcī. 1996. un 1997. gadā Rīgas līcī tika veikti eksperimenti, lai noskaidrotu aļģu augšanas potenciālu limitējošos elementus (Maestrini et al., 1997, 1999). Tika apstiprināta hipotēze, ka vasaras periodā, kad upju notece ir vismazākā, visā līča teritorijā fitoplanktona attīstību limitēja slāpekļis, radot priekšrocības N₂-fiksējošo un vienlaikus arī potenciāli toksisko zilaļģu attīstībai. Šos datus apstiprina arī agrākie novērojumi,



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

ESF projekts

„Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

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

kad augstākas potenciāli toksisko zilaļģu biomasas tika novērotas rajonos ar zemu N/P attiecību (Balode & Purina, 1996).

- 18) Ņemot vērā slāpekļa limitējošo lomu vasaras fitoplanktona attīstībā, tika veikti vairāki biogēnu bagātināšanas eksperimenti, lai precizētu to ietekmi uz fitoplanktona sugu sukcesijām un to augšanas ātrumu. Rīgas līča ūdens vasaras paraugi tika bagātināti ar dažādiem neorganiskā slāpekļa un fosfora savienojumiem, lai iegūtu neorganiskā slāpekļa/fosfora (DIN/DIP) attiecības robežās no 2 līdz 50. Eksperimenta sākumā fitoplanktona populācijā skaita ziņā dominēja kriptofīti un diatomejas, taču bija pārstāvēti arī citi aļģu taksoni (dinoflagellāti, zaļaļģes un zilaļģes, galvenokārt- *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis reinboldii* un *Snowella lacustris*). Eksperimenta gaitā konstatēts, ka vasaras fitoplanktons vispirms patērē reducētās neorganiskā slāpekļa formas-amonija jonus un urīnvielu, bet to koncentrācijām krītoties sāk patērēt arī nitrātu un nitrītu jonus. Neorganisko slāpekļa savienojumu pievienošana eksperimenta sākumā veicināja strauju kriptofītu, diatomeju un dažu zaļaļģu sugu (*Scenedesmus spp.*) attīstību. Eksperimenta beigās, kad neorganiskie biogēni jau pilnībā patērēti, augstāko augšanas ātrumu uzrādīja zilaļģes – *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *M.wessenbergii* un *Snowella lacustris*, kā arī zaļaļģe *Oocystis borgei*, kamēr citu taksonu īpatsvars kļuva nenozīmīgs (1. att.). Tas ļāva izdarīt secinājumu, ka potenciāli toksiskās zilaļģes un arī zaļaļģes spēj izmantot ne tikai neorganiskās, bet arī organiskās slāpekļa formas (Balode et al., 1998).
- 19) Baltijas jūras austrumdaļā ievākto un izzolēto zilaļģu streinu NSGR-2 un MAGR-2, kā arī no Skotijas ūdeņiem izzolētā streina PCC-7820 ietekme uz kopepodu olu produkciju un izdzīvotību tika noteikta, kā testobjektus izmantojot divu Baltijas jūras austrumdaļā ievāktu sugu *E. affinis* and *A. bifilosa* īpatņus. Pirms eksperimenta sākuma aļģu kultūras tika filtrētas caur nukleoporu filtru, lai atdalītu biogēnus saturošo ASM-1 vidi (Gorham et al., 1964).
- 20) Vidējais šūnu blīvums abu *Microcystis* strainu kultūrās sastādīja 10^6 šūnas ml^{-1} . Fluorescences mērījumi nodrošināja līdzīgu biomasu arī *Nodularia spumigena* kultūrai, sastādot 3×10^3 pavedienus ml^{-1} . Aļģu toksīnu koncentrācija tika noteikta Friedrich-Schiller Universitātes Pārtikas un Vides institūtā (Jena, Vācija) ar HPLC-DAD (Lawton et al., 1994; Anon., 1998). Nodularina koncentrācija *N. spumigena* kultūrā sastādīja $0.1 \mu g mg^{-1}$ aļģu sausā svara, bet mikrociestīnu koncentrācijas *Microcystis* streinu MAGR-2 un PCC-7820 kultūrās attiecīgi - 0, 2 un $5.0 \mu g mg^{-1}$ sausā svara.
- 21) Kopepodi tika ievākti ar 100 μm plankton tīklu, atšķaidīti ar virskārtas ūdeni, ievietoti 5L plastmasas konteineros un transportēti uz laboratoriju.
- 22) Pēc 48 st. adaptācijas pie $15 \pm 1^\circ C$ temperatūras, kopepodi tika ar 200 μm tīkla palīdzību atdalīti no fitoplanktona un mikrozooplanktona un pārvietoti caur 50 μm tīklu filtrētā jūras ūdenī.



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

ESF projekts

„Jaunas zinātniskās grupas izveide akvakultūras tehnoloģiju modernizēšanai”

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

- 23) Izdzīvotības eksperimenti ar *E. affinis* tika veikti 96-iedobju platēs (1 mātīte / 0.5 ml tilpumā), saturošas dažādu koncentrāciju barības (potenciāli toksisko zilaļģu) šķīdumos. Katram dienas veidam tika veikti 8 līdz 10 atkārtojumi. Kā kontrole tika izmantots caur 50 µm tīklu filtrēts jūras ūdens (bez aļģēm). Ekspozīcijas laiks potenciāli toksisko aļģu klātbūtnē sastādīja 5 dienas. Eksperimenta laikā netika veikta ūdens vai aļģu nomaiņa. Organismi tika uzskatīti par bojā gājušiem, tiem neuzrādot kustību pazīmes.
- 24) *E. affinis* olu produkcijas eksperimentiem tika izmantotas olu-maisus saturošas mātītes. 24 st olu produkcija tika aprēķināta pēc formulas $P=N_e/(N_f D)$, kur P ir olu produkcija (mātītes olas¹d⁻¹), N_e - olu skaits eksperimenta beigās, N_f - mātīšu skaits un D - olu attīstības laiks (D at 15°C=2.2 d) (Andersen and Nielsen, 1997).
- 25) Eksperimenti ar *A. bifilosa* tika veikti pēc īpatņu 24-h aklimatizācijas pie eksperimentālās temperatūras 15±1°C. *A. bifilosa* īpatņi tika ievietoti 20 ml tilpuma vārglāzēs un 5 dienas inkubēti dažādu koncentrāciju potenciālo zilaļģu klātbūtnē (4 atkārtojumos). Katru dienu tika veikta svaigas vides nomaiņa, saglabājot konstantu aļģu koncentrāciju. Eksperimenta beigās tika noteikts bojā gājušo īpatņu skaits.
- 26) Olu produkcijas mērījumiem tika atlasītas veselīgas *A. bifilosa* mātītes, ievietotas 20 ml traukos (1 mātīte katrā) un veikta 24 st. ekspozīcija.

2.5. Publikāciju sagatavošana

Ir uzsākts darbs pie zinātnisko rakstu sagatavošanas eko-imunoloģijā, etoloģijā un ekotoksikoloģijā.

15.04.2014.