TARTU ÜLIKOOL
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
LOODUSRESSURSSIDE ÕPPETOOL

Jürgen Karvak

Oomütseedist parasiidiga *Saprolegnia* Nees, 1823 nakatumise mõju atlandi lõhe (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) noorkalade kortisoolitasemetele Kunda ja Keila jões

Magistritöö

Juhendajad: MSc Roland Svirgsden

PhD Richard Meitern

TARTU 2022

Infoleht

Oomütseedist parasiidiga *Saprolegnia* Nees, 1823 nakatumise mõju atlandi lõhe (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) noorkalade kortisoolitasemetele Kunda ja Keila jões

Parasiidid on ökosüsteemides olulised ning tagavad teiste mõjurite hulgas populatsioonide geneetilist mitmekesisust. Mõned parasiidid on aga osades elupaikades tunduvalt suurema levimusega, mõjutades potentsiaalselt peremeesorganismide heaolu. Üheks mõõdetavaks organismi füsioloogiliseks heaolu indikeerivaks tunnuseks on stressihormoon kortisooli hulk. Siinse töö eesmärk on uurida oomütseedist parasiidi *Saprolegnia* mõju atlandi lõhe (*Salmo salar*) noorkalade vereplasma kortisoolisisaldusele. Peamiste tulemustena leiti, et kortisoolitasemed polnud tervete ja nähtavalt oomütseediga nakatunud lõhe noorkalade vahel erinevad ning parasiidi suhteline katvus kala kehast polnud seotud kortisoolitasemega. See-eest oli parasiidi suhteline katvus kala kehast keskmiselt oluliselt suurem Kunda jões kui Keila jões.

Märksõnad: atlandi lõhe (*Salmo salar*), tähnik, parasiidid, *Saprolegnia*, kalahallitus, stress, kortisool

CERCS teadusala: hüdrobioloogia, mere-bioloogia, veeökoloogia, limnoloogia (B260); loomafüsioloogia (B360)

The impact of oomycete parasite *Saprolegnia* Nees, 1823 infection to the cortisol levels of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) 1+ age-class parrs in Kunda and Keila rivers

Parasites are important part of an ecosystem, that among other factors ensure genetic diversity in populations. However in some habitats some parasites are more prevailed and having potential impacts to the health of the host organisms. The amount of the stresshormone cortisol is one parameter that indicates the physiological welfare of an organism. The objective of this work is to study the impact of oomycete parasite *Saprolegnia* to the plasma cortisol levels of 1+ Atlantic salmon (*Salmo salar*). The main results are that plasma cortisol levels were not different between healthy and visibly infected salmon parrs and the relative parasite coverage to fish body area was not correlated with cortisol levels. Although the relative parasite cover was significantly higher in Kunda River compared to Keila River.

Märksõnad: Atlantic salmon (*Salmo salar*), parr, parasites, *Saprolegnia*, stress, cortisol

CERCS teadusala: hydrobiology, marine biology, aquatic ecology, limnology (B260); animal physiology (B360)

Sisukord

Infoleht 2

Töös kasutatud olulisemad mõisted 4

Sissejuhatus 5

1. Kirjanduse ülevaade 7

1.1. Atlandi lõhe 7

1.2. Perekond *Saprolegnia* 8

1.3. Kalade stress 11

2. Materjal ja meetodid 15

2.1. Uurimisalad 15

2.2. Bioloogilised andmed 18

2.3. Kortisooli mõõtmine vereplasmast 20

2.4. Oomütseedi ja kala pindala mõõtmine 20

2.5. Statistika 21

2.6. Töö autori roll 21

3. Tulemused 22

4. Arutelu 29

Kokkuvõte 34

Summary 36

Tänuavaldused 38

Kirjanduse loetelu 39

Lisa 1. Sagedusjaotused 44

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks 45

Töös kasutatud olulisemad mõisted

Samasuvine (0+) lõhe noorkala – sama aasta kevadel koorunud kala.

Kahesuvine (1+) lõhe noorkala – eelneva aasta kevadel koorunud kala, elanud aasta ja ühe suve vanuseks.

Tähnik – magevees elav lõhe noorkala vastse ja smoldi elustaadiumi vahel (nt samasuvised ja kahesuvised on tavaliselt tähnikud).

Smoltifitseerumine – lõhe kehas toimuvad füsioloogilised muutused kohanemaks soolases merevees elamiseks. Lõhe keha värvus muutub rohekast hõbedaseks.

Laskuja ehk smolt – smoltifitseeruv või smoltifitseerunud lõhe, kes rändab jões allavoolu mere suunas. Vahel võivad laskujad olla ka tähniku välimusega.

Kääbusisane – lõhe isane noorkala, kes juba jões enne merre laskumist saavutab suguküpsuse ning osaleb kudemisel.

„Terved“ lõhed – siinses töös atlandi lõhe noorkalad, kelle kehal pole silmaga nähtavaid oomütseedist parasiidi koldeid.

„Nakatunud“ lõhed – siinses töös atlandi lõhe noorkalad, kelle kehal on silmaga nähtavad oomütseedist parasiidi helehallikad vatjad kolded.

Sissejuhatus

Vee-elustiku omavahelised seosed on mitmekesised ja teineteist vastastikku mõjutavad. Lisaks avaldavad vee-elustikule mõju ka abiootilised tegurid. Samuti saab sageli tavapärastest looduslikke populatsioone mõjutavatest teguritest eristada inimmõjud, millel võib olla nii otsene kui ka kaudne (nt looduslikke mõjureid võimendav) mõju populatsioonidele. Ligi 50 aastaga (1970–2016) on Euroopas mageveega seotud rändekalade arvukus langenud 93% (Deinet jt 2020). Seejuures erineb atlandi lõhe (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) looduslike populatsioonide olukord Läänemere regioonide vahel: enamikes Põhjalahe jõgedes on olnud näha smoltide arvu tõusu, seevastu paljude Läänemere keskosa jõgede puhul on tuvastatud smoltide langevat või stabiilset arvukust (ICES 2020).

Kalade arvukuse languse üheks põhjustajaks võivad olla ka parasiidid. Windsor (1998) tõi välja, et parasiitse eluviisiga organisme on vabalt elavatest rohkem ning parasiitidel on oluline mõju kõigile organismidele. Seejuures rõhutab autor, et parasiite ei peaks käsitlema ainult uuritavatele liikidele kahjulikena, vaid kui loomulikku osa looduslikest populatsioonidest. Parasiidid on tõenäoliselt üks alustala peremeesorganismide populatsioonide geneetilise varieeruvuse tekkimisel ning säilitamisel (Miller jt 2014). Siiski on tähtis arvestada, et paljud parasiidid on oportunistlikud ja ei mõjuta peremeesorganismide ellujäämust, kuid teiste immuunsüsteemi mõjutavate lisafaktorite (nt halb veekvaliteet) tõttu võib kahjustuda immuunsüsteemi adekvaatne vastus, teiste hulgas stressihormoon kortisooli ebakohase eritamise tõttu (Miller jt 2014). Lisastressoriteks võivad olla mitmed inimtekkelised tegurid (elupaikade muutmine, rändetakistused, saasteained, kliimamuutus jt), mis võivad omakorda muuta parasiidid populatsioonidele ohtlikumaks. Nende põhjustatud kroonilised nakkused võivad mõjutada kalade käitumist, konditsiooni ja kohasust, mis muudab kala võimekust edukaks rändeks, kiskjatele kergemaks saagiks langemist või põhjustab nälgimist (Miller jt 2014). Näiteks on 2014. aastast mitmete Rootsi ja Soome lõhejõgede ääres raporteeritud aina enam surevatest või surnud lõhedest, kellel on märgatud seenhaiguse tagajärjel tekkinud nahakahjustusi (ICES 2020).

Siiani on rohkem uuritud erinevate tegurite mõju populatsioonide arvukusele ja liigirikkusele, kuid vähem elusorganismide heaolu (nt stressi) indikeerivatele tunnustele. Miller jt (2014) tõid välja, et teadmised haiguste ökoloogilistest ja evolutsioonilistest

rollidest looduslike lõhede populatsioonidele on puudulikud. On küll mitmeid uurimusi haigustekitajate mõjudest kalakasvandustes, kus nad põhjustavad majanduslikku kahju, kuid vähem on uuritud looduslikke populatsioone, mida on mõjurite rohkuse tõttu keerulisem uurida. Sarnaselt on pakutud ühe olulise uurimisteemana haiguste ja parasiitide mõju kala füsioloogilistele tunnustele (nt stress) ning selle kaudu migratsiooniga seotud protsessidele (Lennox jt 2019).

Käesoleva magistritöö peamiseks eesmärgis on peremeesorganismi atlandi lõhe ja tema oomütseedist parasiidi *Saprolegnia* Nees, 1823 interaktsioonide alusteadmistesse panustamine, et mõista paremini veeökosüsteemide võrgustike toimimist ning mõju organismide vähenähtavatele füsioloogilistele protsessidele. Mõningal määral käsitletakse ka teemaga seonduvaid looduskaitselisi seoseid. Töö mudelliigiks valiti atlandi lõhe, sest lisaks eelnevalt mainitud vajalikele uurimisteemadele (Miller jt 2014; Lennox jt 2019) on Tartu Ülikooli Eesti Mereinstituudi lõheliste seires märgatud Kunda ja Keila jões tunduvalt suuremat saprolegnioosi levimust lõhe noorkaladel võrreldes teiste Eesti jõgedega. Lõhe noorkalade stressi indikeerivaks tunnuseks valiti vereplasma kortisoolitase, sest selle hormooni eritamine on oluline osa kalade stressivastusest. Kortisooliga kaasnevalt uuriti lõhede vere glükoositaset, sest varasemad uurimused on näidanud selle nõrka seost kortisoolitasemega. Magistritöö hüpoteesid on järgnevad: (1) oomütseediga nähtavalt nakatunud kaladel on kõrgem vereplasma kortisoolitase kui tervetel kaladel; (2) kortisoolitase on seda kõrgem, mida suurem on oomütseedi kolde pindala kala keha pindalast ja (3) oomütseediga nähtavalt nakatunud kaladel on kõrgem vere glükoositase kui tervetel kaladel.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Atlandi lõhe

Atlandi lõhe kuulub perekonda lõhe (*Salmo* Linnaeus, 1758), mis omakorda klassifitseeritakse lõhilaste (*Salmonidae* Jarocki/Schinz 1822) sugukonda (Fricke jt 2022; Van der Laan 2022). Atlandi lõhe looduslik levila on Atlandi ookeani põhjaosa ida- ning läänerannik, kus ta esineb nii anadroomse kui ka järves toituva, kuid ikkagi vooluveekogudes kudeva liigina (Klemetsen jt 2003). Eestis on teada 11 lõhejõge ja lisaks veel neli jõge, kus lõhe koeb vähearvukalt ning ebaregulaarselt (Kesler jt 2022). Eelmainitutest kõik peale Pärnu jõe asuvad Põhja-Eestis ja suubuvad Soome lahte. Kunda, Keila ja Vasalemma jõe lõhepopulatsioone peetakse looduslikeks ja nendesse jõgedesse ei asustata kasvanduses ettekasvatatud lõhet (ICES 2018).

Atlandi lõhe elutsükkel algab magevees, millele järgneb mereline elujärk, kuid sigimiseks siirdutakse taas magevette. Noorkalad elavad elu esimesel või esimestel aastatel kiirevoolulistes kivise põhjaga jõelistes elupaikades, mille laius on tavaliselt üle kümne meetri. Täiskasvanud kudelõhed kaevavad jõe põhja kruusa sisse pesa, kuhu koetakse sügisel mari ning see haudub seal viis kuni kuus kuud kevadeni. Lõhed kooruvad aprillis–mais ning elavad esimesed 1–3 aastat sünnijões, peamiselt territoriaalse eluviisiga tähniku elustaadiumis (Kangur jt 2003). Tähnikuna toitub lõhe valdavalt erinevatest selgrootutest. Peamiselt kevadel merre laskudes läbib noorkala füsioloogilised muutused, et kohaneda eluks soolases vees – lõhe smoltifitseerub rohekast tähnikust hõbedaseks smoldiks. Seevastu paljud (60–70%) isased lõhed saavad hoopis kahesuvistena jões suguküpseks ning osalevad kääbusisastena kudemises (Kangur jt 2003). Ka kääbusisased rändavad pärast kudemist merre, kuid on leitud, et nende ellujäämus meres on võrrelduna tavaliste isastega oluliselt väiksem (Lundqvist jt 1988). Valdavalt laskuvad atlandi lõhe noorkalad smoldina mere suunas ühe- ja kaheaastaselt. Norras Imsa jões olid smoltidest 14% üheaastased, 78% kaheaastased ja 8% kolmeaastased (Jonsson jt 1998). Seevastu domineerisid Eestis Pirita jões just üheaastased laskujad (Kesler jt 2022). Üldiselt laskuvad atlandi lõhe smoldid jõgedest merre kevadel, kuid on näidatud, et osad noorkalad võivad merre laskuda juba sügisel, kusjuures laskujateks võivad olla ka samasuvised tähnikud (Taal jt 2014; Birnie-Gauvin jt 2019). Norras Imsa jõe lõhepopulatsiooni puhul paistis suremus olevat tihedusest sõltuv magevees (marjast laskujateni), kuid tihedusest mittesõltuv meres (laskujatest täiskasvanuteni) (Jonsson jt 1998). Seejuures 73% suremuse

varieerumisest oli seletatud marja tiheduse varieerumisest jões. Järeldati, et magevee ellujäämus oli põhiline faktor kuderändajate arvukuse puhul.

Meres on lõhe pelaagilise eluviisiga ning paikneb tavaliselt rannikust eemal avameres. Peale umbes 25 cm kehapikkuse saavutamist toitub lõhe valdavalt kilust ning teistest väiksematest kaladest. Kui magevees kasvab lõhe aeglaselt, siis meres on kasv kiire (Kangur jt 2003). Peale poolt kuni nelja ja poolt aastat meres rändavad suguküpsuse saavutanud lõhed taas sünnijõgedesse. Norras Imsa jõe populatsiooni atlandi lõhed said suguküpseks peamiselt peale ühte talve meres (Põhja-Atlandi ookeanis) – 82% kuderändel jõkke tõusvatest lõhedest moodustasid ühe talve meres olnud ning 18% rohkem kui ühe talve meres olnud kalad (Jonsson jt 1998). Seejuures kaalusid nooremad kuderändajad keskmiselt umbes 2 kg ja vanemad 5,5 kg. Enamik (60%) ühe talve meres olnud lõhedest olid isased ning enamik (76%) kaks talve meres olnud lõhedest olid emased. Pirita jõkke naasid kudema hinnanguliselt valdavalt poolteist ning kaks ja pool aastat meres elanud lõhed, kuid kudejate hulgas leidus ka kolm ja enam aastat meres elanud lõhesid (Kesler jt 2022). Pirita jões arvestati 45,5–75 cm ning 75,5–95 cm pikkused lõhed vastavalt pooleteise ning kahe ja poole aasta vanusteks. Peale kudemist hukkub suurem osa atlandi lõhedest ja hinnanguliselt vaid 4–6% koeb teist korda ning veel vähem rohkem kui kaks korda, kusjuures eriti suur on suremus isaste kalade seas (Kangur jt 2003). Kokku on tavapärane atlandi lõhe eluiga 4–6 aastat, küündides maksimaalselt kümne aastani.

1.2. Perekond *Saprolegnia*

Oomütseedid (klaadist *Stramenopila*) on arvatavasti kõige laiemalt levinud seenelaadsed kalade haigustekitajad, eriti perekondade *Achlya* Nees ja *Saprolegnia* Nees, 1823 liigid (Astrofsky jt 2002; Boddy 2015). Eelmainitud ja veel mõnede perekondade haigustekitajad põhjustavad kaladel haigust nimega saprolegnioos ehk dermatomükoos, mida nimetatakse ka kalahallituseks (Boddy 2015; Päkk jt 2016). Boddy (2015) järgi on tegu kala keha epidermise haigusega, mis tüüpiliselt algab uimedelt või pea pealt ning tihti levib üle keha ja on nähtav valge või hallika seeneniidistiku laikudena (Joonis 1). Autorid kirjeldavad, et kala keha epidermise ja selle all oleva koe hävimine muudab kala käitumise loiuks, tõstes kiskja saagiks langemise riski (Van den Berg jt 2013). Seejuures võib haiguse lõpustaadiumis peremeesorganismi hukkumise põhjustada haigustekitaja otsene mõju kala keha funktsioonide toimimisele, kuid üldjuhul hukub organism varem muu põhjuse tõttu. Lõhilastel seostatakse saprolegnioosi stressiga (Boddy 2015). Saprolegnioosi haigestumist

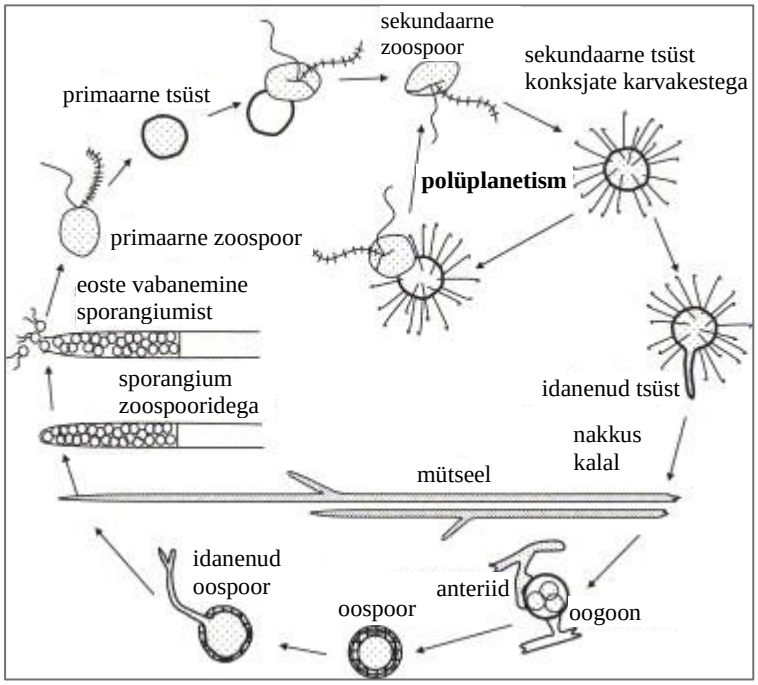
on tuvastatud mitmetel mageveelistel kalaliikidel, kahepaiksetel, nende koetud marjal ja vähilaadsetel (Van den Berg jt 2013). Üks kalade laastavamaid oomütseedist patogeene on *Saprolegnia parasitica* Coker, kes on looduslikult levinud maailma mageveekogudes ning arvatakse osaliselt põhjustavat looduslike lõhilaste ja teiste mageveekalade populatsioonide arvukuse langust (Van West 2006). Erinevatel kalaliikidel leiti olevat erinev vastupanuvõime *S. parasitica* parasiidile ning seejuures vähendas vigastus enamike uuritud liikide vastupanuvõimet parasiidiga nakatumisele (Tiffney 1939). Kusjuures haiguse sümptomid olid nakatatud liikide vahel sarnased. Sageli märgati kalade toitumist elusast *S. parasitica* mütseelist, kuid see ei paistnud põhjustavat kalade kahjustumist (Tiffney 1939). Vöödilise daanio (*Danio rerio* Hamilton, 1822) puhul on leitud, et *Saprolegnia* ei koloniseeri tavaliselt tervet eluskudet ja mõned tüved on teistest patogeensemad (Astrofsky jt 2002). Mõnel juhul toimub nakatumine kiiresti ja kala põletikuline vastus näib puuduvat – seetõttu arvatakse, et *S. parasitica* suudab kala immuunvastust maha suruda. Seejuures võib *S. parasitica* peremeesorganismi sisestada valgud, mis vastutavad immuunvastuse mahasurumise eest. Äge *Saprolegnia*-ga nakatumine on tavaliselt letaalne (Van West 2006).

Joonis 1. Välitööde käigus püütud nähtavalt oomütseediga nakatunud atlandi lõhe noorkala. Oomütseet kattis arvestuslikult ligi 16% kala keha pindalast. Foto: Jürgen Karvak.

Saprolegnia perekonna sees on liikide sarnasuste tõttu olnud neid raske määratleda. Sandoval-Sierra jt (2014) tõid välja, et perekond *Saprolegnia* klassifitseerimine on olnud keeruline liikide morfoloogilise plastilisuse, perekonna bioloogilise mitmekesisuse ning molekulaarsete uurimuste vähesuse tõttu. Nende analüüsid toetasid molekulaarsete

klastrite järgi 18 varem teatud liigi paikapidavust ning tuvastasid 11 võimaliku uue liigi olemasolu. Näiteks *Saprolegnia diclina–parasitica* liikide kompleksis on autorite analüüside järgi erinevad liigid – *S. parasitica* ja *S. diclina* Humphrey (Sandoval-Sierra jt 2014).

Van West (2006) kirjeldab *Saprolegnia* elutsüklit, kus kala kehal kasvava oomütseedi mütseeli hüüfi rakkude tippudes asuvates sporangiumites arenevad aseksuaalsed eosed (Joonis 2). Sporangiumid suudavad vabastada palju liikuvaid primaarseid zoospoore, mis ujuvad lühikest aega, misjärel need entsüsteeruvad. Tsüstidest arenevad sekundaarsed zoospoorid, mis on pikemalt liikuvad ning mida peetakse *Saprolegnia* peamiseks levimise ja nakatamise eoseks. Kala külge paremini haakumiseks on mitmetel perekonna esindajatel konksjate otstega karvakesed. Peale uuesti entsüsteerumist arenevad taas uued zoospoorid. Niimoodi suudab oomütseet korduvalt tsüste moodustada, kuni leiab sobiva peremeesorganismi (Van West 2006).



Joonis 2. *Saprolegnia parasitica* elutsükkel (Van West 2006).

Arvatakse, et *Saprolegnia* ei põhjusta suurt ohtu looduslikele populatsioonidele. Van den Berg jt (2013) toovad välja, et arvatavasti nakatab *Saprolegnia* organismi olemasolevate haavade, teiste patogeenide või parasiitide nakatamiskohtade kaudu. Üldiselt peetakse terve – haavadeta ning haigustekitajate vaba – kala *Saprolegniaga* nakatumist vähetõenäoliseks. Küll aga on mõned *S. parasitica* tüved väga virulentsed ja võimelised tekitama lõhilastel ka primaarseid infektsioone (Van West 2006). *Saprolegnia* võivad

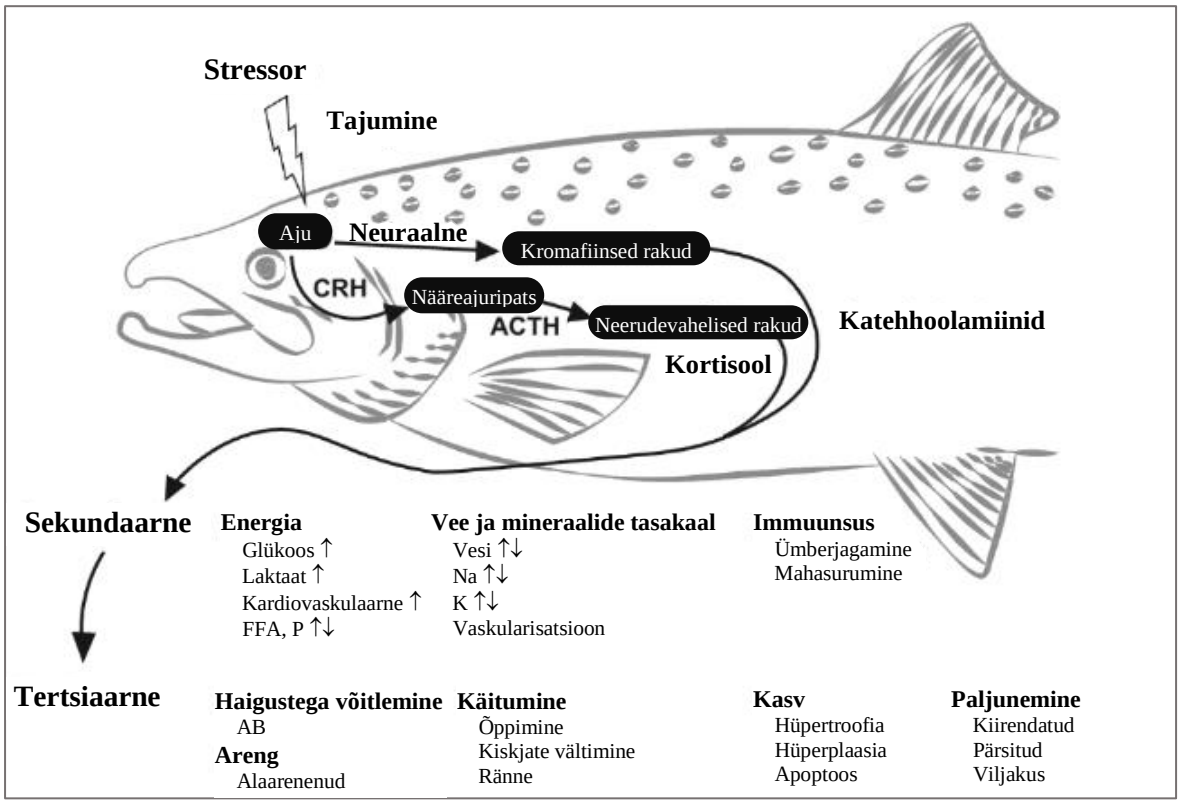
ohtlikumaks muuta laialdased inimtekkelised stressorid looduslikes elupaikades. On leitud, et saasteained muudavad kala stressivastust (Rohonczy jt 2021), mis omakorda võib immuunvastuse nõrgestamise kaudu põhjustada *Saprolegniaga* nakatumist.

1.3. Kalade stress

Organismi stressivastus stressorile on füsioloogiline tunnus, mida uuritakse mõistmaks organismi heaolu. Seejuures on stress sageli kasutatav mõiste, millel on tihti negatiivne alatoon. Selguse mõttes tuuakse välja siinses töös kasutatud stressi definitsioon. Stress – füsioloogiliste reaktsioonide kaskaad, kui organism proovib taastada homeostaasi rünnaku või muu mõjuri järel (Schreck ja Tort 2016). Seega on stress organismi füsioloogiline vastus teda ohustavale olukorrale ehk stressorile. Lühiajaliste ehk akuutsete stressorite (nt kiskja eest põgenemine) puhul on organismi stressivastusel positiivsed mõjud (eustress), liigutades kehas ressursid ümber, et taastada homeostaas. Seevastu tõsisemad stressorid võivad tekitada nii adaptiivse kui ka kroonilise stressi (nt suur asustustihedus ja liigisisene konkurents) puhul maladaptiivse vastuse (distress), millega kaasnevad negatiivsed tagajärjed organismile. Stressivastust initsieerivad ja kontrollivad kaks hormonaalset süsteemi: (1) kortikosteroidide (peamiselt kortisool) rada ja (2) katehhoolamiinide (nt adrenaliin ja noradrenaliin ning nende eelühend dopamiin) rada. Eelmainitud koos reguleerivad sekundaarse stressivastuse faktoreid, mis muudavad organismile vajalike ressursside – energiaallikate ja hapniku – jaotumist keha hädavajalikesse piirkondadesse, häirivad vee ja mineraalide tasakaalu ja immuunsüsteemi. Pikalt kestva ehk kroonilise stressi mõjud organismile on ebakohased, mõjutades negatiivselt teisi vajalikke keha funktsioone nagu kasv, areng, vastupanu haigustele, käitumine ja paljunemine ning seda suuresti stressivastuse energeetilise kulu tõttu (allostaatiline koormus) (Schreck ja Tort 2016).

Stressori tajumine algatab kohese keemiliselt vahendatud kaskaadi ehk primaarse stressivastuse, millele järgnevad sekundaarsed ja tertsiaarsed stressivastused (Joonis 3). Primaarse stressivastuse ajal vabastatakse katehhoolamiinid kiiresti verre, mistõttu on seda kalade puhul keeruline uurida. Teiste hormoonide vabastamised (nt kortisooli) on aeglasemad ja pikema aja jooksul (minutite jooksul ja tunde kestev) ja algatatakse kortikotropiini vabastava hormooni tootmisega (CRH (või CRF)) aju hüpotalamuse rakkudes. CRH liigub adrenokortikotroopset hormooni (ACTH) tootvate rakkude juurde nääreajuripatsis, mis omakorda sekreteerib ACTH-d vereringesse. ACTH sihib

neerudevahelisi rakke vaid luukaladele omases *head kidney* organis, põhjustades kortisooli sünteesi ja sekreteerimist vereringesse. CRH ja ACTH mõlemad saavad otseselt mõjutada sekundaarset stressireaktsiooni ja mõlemad toimivad perifeerselt ka immuunsüsteemile. Vere kortisoolitaseme suurenemine peale stressorit varieerub eri liikide vahel (Schreck ja Tort 2016).



Joonis 3. Primaarne (joonisel kujutatud kala sees), sekundaarne ja tertsiaarne kala stressivastus distressi ajal. CRH (kortikotropiini vabastav hormoon), ACTH (adrenokortikotroopne hormoon), FFA (vabad rasvhapped), P (valgud), AB (antikehad) (Schreck ja Tort 2016).

Akuutne stressor põhjustab tavaliselt organismis lühiajalist stressivastuse suurenemist, mille kestus varieerub. Fast jt (2008) mõõtsid, et lühiajalise stressi (15 sek veest väljas hoidmist) järel olid vereplasma kogu ja vaba kortisooli tasemed oluliselt kõrgemad üks ja kolm tundi peale stressorit, taastudes hiljem enne-stressi tasemetele. Sarnaselt leidsid uurijad ka, et vereplasma glükoositase oli lühiajalise stressi järel oluliselt kõrgem kuni kolm tundi peale stressorit ning 12 tunni järel oli taastunud endisele tasemele.

Seevastu võib kroonilise stressi puhul organism ühetaolise stressoriga harjuda ning stessivastuse tugevus langeda. Fast jt (2008) ei leidnud olulist erinevust vereplasma kogu

kortisooli, vaba kortisooli ning vaba kortisooli osakaalu puhul võrreldes kontrollgrupiga nelja nädala (lühiajalise stressori kordamine) jooksul. Vereplasma glükoositase oli oluliselt kõrgem esimesel nädalal alates katse algusest, kuid ei erinenud oluliselt järgnevatel nädalatel (Fast jt 2008). Lai jt (2021) tõid välja, et tund peale esimest stressorit ning ühe päeva järel olid kortisoolitasemed oluliselt kõrgemad. Kaheksa päeva järel oli kortisoolitaseme vastus hoolimata püsinud korduvatest stressoritest vähenenud. Kõikide gruppide (ka kontrollgrupi) kortisoolitasemed tõusid oluliselt kõrgemale kui varem eksperimendi jooksul üheksandal päeval peale uue akuutse stressori (väiksesse akvaariumisse panemine) kogemist (Lai jt 2021). Autorid pakkusid, et kalad harjusid või „väsis“ nende endokriinsüsteem korduva, kuid sarnase stressoriga kokkupuutel ning nende kortisoolitase ei tõusnud enam vastusena stressorile aja edenedes sama palju. Sarnaselt eelnevate stressoritega mõjutavad kalade kortisoolitaset ka saasteainetega kokkupuutumine. Rohonczy jt (2021) leidsid oma ülevaateuuringus, et saasteainete (PCB (*Polychlorinated biphenyl*), pestitsiidid, ravimid) mõju suurus kalade kortisoolitasemetele ja saasteainega kokkupuute kestuse vahel olid seotud negatiivselt – kortisoolitasemed vähenesid, mida pikemalt kalad puutusid kokku saasteainetega. Keskmiselt suurendasid saasteained kalade kortisooli baastasemete kasvu poolteist korda, seejuures ravimid kaks ja pool korda. Üldine trend kortisoolitasemete suurenemise kohta oli ka metallidel ja PAH-idel, teised saasteainete rühmad ei näidanud mõju. Autorid pakuvad, et saasteained kroonilise stressorina võivad vähendada kalade tervist ja kohasust, põhjustades kala võimetust piisavaks kortisooli vastuseks uuele stressorile (Rohonczy jt 2021). Seega paistab kroonilise ühesuguse stressi puhul organism stressoriga kohanevat, mistõttu stressivastus nõrgeneb ning võib jõuda samale tasemele, mis oli enne stressori ilmnemist. Uue teistsuguse stressori puhul võib stressivastus aga muudetud olla. Ka Rohonczy jt (2021) tõid välja, et kauakestev stressor võib avaldada mõju selgroogsete glükokortikoidide tasemete pikenenud tõusule või langemisele, millel võivad olla kahjulikud mõjud selgroogsete tervisele ja sigimisele.

Kroonilise stressi puhul võib kortisoolitase taastuda tavapärastele väärtustele, kuid immuunvastus võib seejuures kahjustuda. Fast jt (2008) leidsid, et lühi- ja pikaajaline stress mõjutasid lõhedel põletikku põhjustava geeni (interleukin 1β (IL-1β)) avaldumist. Fast jt (2008) kogusid lõhedelt makrofaage, mis nakatati bakteriaalse parasiidiga *Aeromonas salmonicida*. Neljandal nädalal oli stressi-grupi lõhede nakatatud makrofaagidel oluliselt suurem suremus võrreldes kontrollgrupi nakatatud

makrofaagidega. Kuigi kroonilise stressi puhul naasid kalade stressinäitajad tavapärastele tasemetele, täheldati immuunvastuse nõrgenemist (geeniekspressioon ja peremeesorganismide makrofaagide suremus) ning arvati, et krooniline stress võis põhjustada allostaatilist koormust ja kahjustada immuunvastust (Fast jt 2008).

Erinevad stressorid võivad mõjutada ka kala morfoloogilisi tunnuseid, näiteks kasvu. Krooniline stress (iga päev lühiajaline veest välja tõstmine) ei mõjutanud nelja nädala jooksul kalade kasvu (Fast jt 2008). Lai jt (2021) leidsid aga, et kaheksa päeva jooksul korratud stressori (tagaajamine, hapnikupuudus või mõlemad koos) ning lisaks üheksandal päeval uue stressori (väiksesse akvaariumisse panemine) lisamise järel vähenes atlandi lõhe post-smoltide kasv oluliselt. Eelnev viitab, et mõni stressor võib negatiivselt mõjutada ka kalade kasvu, kuid Visse jt (2015) leidsid, et Vasalemma ja Keila jões olid lühemad lõhed efektiivsema immuunvastusega kui pikemad kalad.

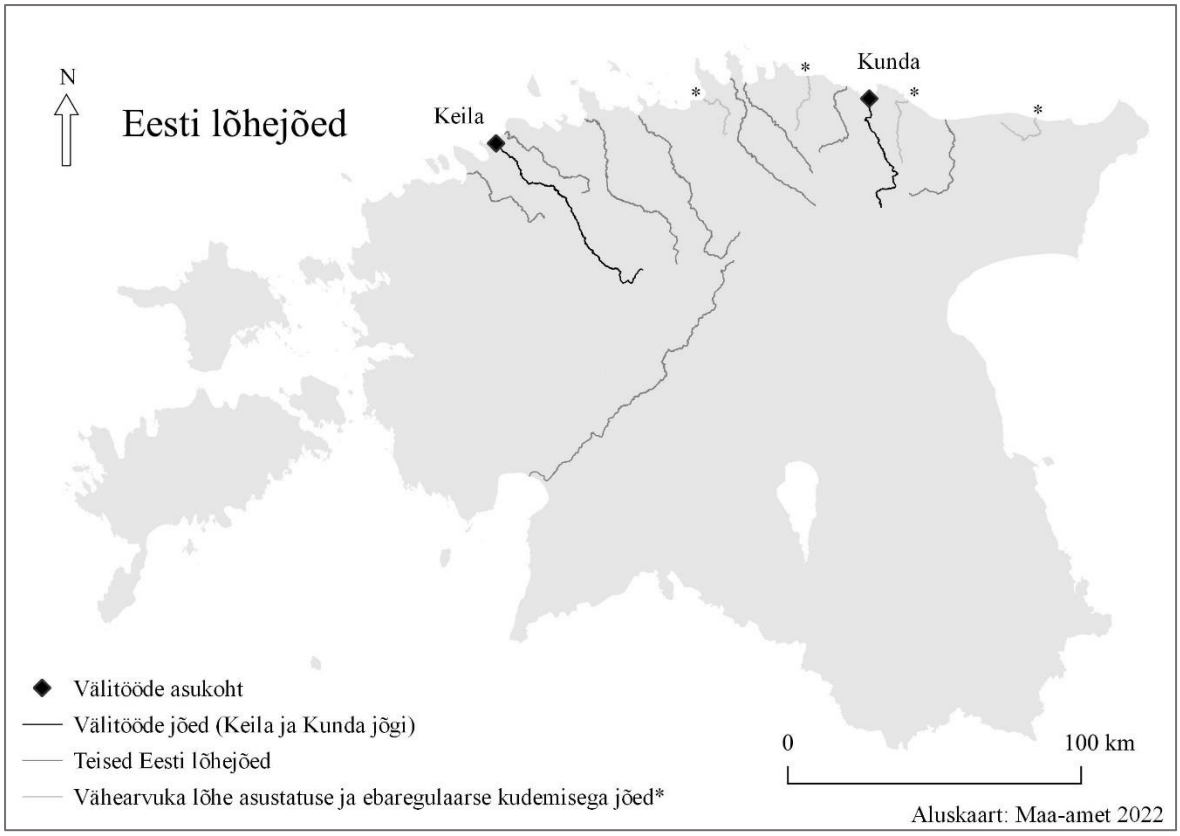
2. Materjal ja meetodid

2.1. Uurimisalad

Välitööd proovide kogumiseks toimusid 2021. aasta sügisel Põhja-Eestis Kunda ja Keila jõe alamjooksul (Joonis 4). Kunda ja Keila jõe proovide kogumise välitööde aegsed veeparameetrid on näidatud Tabelis 2.

Tabel 2. Kunda ja Keila jõe välitööde veeparameetrid tööde alguses ja lõpus vastavalt 27. septembril ning 1. oktoobril 2021.

Jõgi	Kellaaeg	Temperatuur (°C)	Hapnikusisaldus (mg/l)	Hapniku küllastusaste (%)
Kunda	11:50	8,4	11,5	97,7
27.09.2021	16:20	8,6	11,1	95,3
Keila	12:33	9,3	11,2	99,0
01.10.2021	17:06	9,5	10,9	95,0



Joonis 4. Eesti lõhejõed ja välitööde asukohad. Eesti lõhejõed kaardil põhjarannikul vasakult paremale: Vasalemma, **Keila**, Vääna, Pirita, Jägala, Pudisoo jõgi*, Valgejõgi, Loobu jõgi, Mustoja*, Selja, **Kunda**, Pada*, Purtse jõgi ja Pühajõgi*. Edela-Eestis suubub Pärnu lahte lõhejõgi Pärnu jõgi. Paksus kirjas siinse magistritöö raames uuritavad jõed; * – lõhe koeb vähearvukalt ja ebaregulaarselt.

Kunda jõgi saab alguse Pandivere kõrgustiku idaservalt ning suubub Kunda lahte (Joonis 4). Jõe pikkus on 65,8 km ning valgala suurus 535,9 km^2 (EELIS 2022a). Suure languga ja pikalt kärestikulisel alamjooksul on jõgi valdavalt 20 m lai ja 0,5 m sügav, vee vool on kiire, valdavalt 1 m/s, ning suvine madalvee vooluhulk 2,9 m^3/s (Järvekülg 2001) ja keskmine vooluhulk 5,5 m^3/s (Timm jt 2019). Kunda jõe keskjooksul oli 2015. aastal väikseim vooluhulk 1,2 m^3/s ja suurim 10,5 m^3/s (KAUR 2017). Samas mõõtejaamas oli aasta keskmine veetemperatuur 7,4 °C ning maksimaalne 18,5 °C. Alamjooksul on jõepõhi peamiselt kivine koos väiksemate liivaste ja kruusaste aladega (Järvekülg 2001). Ligikaudu 2,3 km kaugusel jõe suudmest asub Kunda I pais, mis on kaladele inimtekkeline rändetõke ning sealt ülesvoolu Kunda jões lõhet ei leidu. Kunda jõe alamjooks kuulub tüüpi 2B (heledaveelised ja vähese orgaanilise aine sisaldusega jõed valgala suurusega >100–1000 km²). 2014. aasta jõgede hüdrobioloogilise seirel registreeriti 11 kalaliiki. Indikaatorliikidest esines arvukalt lõhe ja forelli (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) noorkalasid

ja vähearvukalt harjust (*Thymallus thymallus* Linnaeus, 1758) (Pall jt 2015). Hüdrobioloogilise seire tulemusena hinnati jõe seisund Kunda jõe alamjooksul heaks. Vee füüsikalis-keemilise kvaliteedinäitajate koondmäärangu järgi oli Kunda jõe alamjooks 2020. aastal heas seisundis (Laht ja Hindrikson 2021). Küll aga tehti erinevatel aastatel eri hulgal keemilisi analüüse ning 2018. aastal oli Kunda jõe keemiline seisund halb, sest jões leiti olevat oluline raskmetallide surve (Hindrikson ja Laht 2019). Välitööd käesoleva magistritöö proovide kogumiseks toimusid umbes 1,4 km kaugusel jõe suudmest.

Keila jõgi saab alguse Ida-Raplamaal paiknevast Viirika rabast ning suubub Lohusalu lahte (Joonis 4). Jõe pikkus on 111,8 km ning valgala suurus 669,3 km^2 (EELIS 2022b). Umbes 1,8 km kaugusel jõe suudmest asub Keila juga, mis on kaladele looduslik rändetõke ning sealt ülesvoolu Keila jões lõhet ei leidu. Alamjooksul on jõgi valdavalt 25 m lai ja 1 m sügav (Keila-Joast ülalpool), voolukiirus muutlik, alla 0,1 kuni üle 1 m/s, ning suvine madalvee vooluhulk Keila linnas 1 m^3/s (Timm jt 2019) ja keskmine vooluhulk alamjooksul 6 m^3/s (Järvekülg 2001). Keila jõe alamjooksul oli 2015. aastal väikseim vooluhulk 0,64 m^3/s ja suurim 22,5 m^3/s (KAUR 2017). Samas mõõtejaamas oli aasta keskmine veetemperatuur 8,5 °C ning maksimaalne 21,1 °C. Alamjooksul (joast ülesvoolu) katavad jõepõhja paeplaadid ja klibu (Timm jt 2019). Keila jõgi Keila-Joast allavoolu kuulub tüüpi 2B. 2019. aasta jõgede hüdrobioloogilisel seirel registreeriti 10 kalaliiki, arvukalt esineb lõhe noorkalasid ja ka võldast (*Cottus gobio* Linnaeus, 1758) (Pall jt 2020). TÜ EMI seirepüükide järgi elab alamjooksul ka forell (Kesler jt 2022). Hüdrobioloogilise seire tulemusena hinnati jõe seisund allpool Keila juga kesiseks (Pall jt 2020). Vee füüsikalis-keemilise kvaliteedinäitajate koondmäärangu järgi oli Keila jõe alamjooks 2020. aastal heas seisundis (Laht ja Hindrikson 2021). Kuigi Keila jõe alamjooks oli spetsiifiliste saasteainete poolest normide järgi heas seisundis, hinnati ekspertarvamuse põhjal vastava ökoloogilise seisundi komponent siiski halvaks peamise põhjendusega, et jõelõigule avaldub inimtekkeline surve. Püreen vees ületas ökotoksikoloogilise mõjupiiri ja vähemalt 12 sünteetilise saasteaine sisaldus ületas määramispiiri, mistõttu esines suur koosmõjude risk ökosüsteemidele (Hindrikson ja Laht 2019). Samuti peetakse Keila jõe halva keemilise seisundi põhjuseks liigset elavhõbeda sisaldust elustikus (kalades ja karpides) (Hindrikson jt 2020). Välitööd käesoleva magistritöö proovide kogumiseks toimusid umbes 1,3 km kaugusel jõe suudmest.

Keila ja Kunda jõgi on mitme viimase aasta jooksul olnud samasuviste lõhede asustustiheduste poolest Eesti kõrgeimate väärtustega ja seejuures ületanud teiste jõgede

asustustihedusi kohati kordades (Kesler jt 2022). Ka vanemate lõhe tähnikute (enamasti 1+) asustustihedused on vähemalt viimasel kahel aastal Keila ja Kunda jõgedes olnud märkimisväärselt kõrgemad kui teistes Eesti lõhejõgedes. 2021. aastal hinnati Kunda jões samasuviste lõhede asustustiheduseks 181 is/100 m^2 ning vanemate tähnikute (enamik 1+) asustustiheduseks 34 is/100 m^2. Keila jões mõõdeti samasuviste lõhede asustustiheduseks 93 is/100 m^2 ja vanemate tähnikute (enamik 1+) asustustiheduseks 33 is/100 m^2 (Kesler jt 2022).

Tartu Ülikooli Eesti Mereinstituudi (TÜ EMI) lõheliste seire käigus on täheldatud Kunda ja Keila jões oomütseediga nähtavalt nakatunud kahesuviste lõhede suhteliselt suurearvulist esinemist. Viimase viiel aastal (2017−2021) oli nakatunud kalade osakaal Kunda jões keskmiselt 17% (TÜ EMI avaldamata andmed 2021). Käesoleva magistritöö välitöödega samal aastal (2021) oli Kunda jõe lõhede keskmine nakatumise määr 38%. Keila jões oli nakatunud kalade osakaal keskmiselt 16% (2017–2021) (TÜ EMI avaldamata andmed 2021). Kusjuures aastal 2021 oli Keila jõe lõhede keskmine nakatumise määr 17%. Tuleb mainida, et kummaski jõest pole seire käigus tabatud viimase viie aasta jooksul ühtegi nähtavalt oomütseediga nakatunud lõhe samasuvist noorkala. Seirepüügid toimusid Kunda jões augusti lõpus ja septembri alguses ning Keila jões augusti keskel, lõpus ja septembri alguses siinse magistritöö välitööde asukoha läheduses.

2.2. Bioloogilised andmed

Siinses töös kasutatakse 2021. aasta sügisel kogutud atlandi lõhede proovide andmeid Kunda (27.09) ja Keila (01.10) jõest. Kokku kasutati töös 90 kahesuvise lõhe noorkaladelt kogutud andmeid, täpsemad valimi suurused on ära toodud Tabelis 3. Kalade püüdmiseks kasutati elektripüügiaparaati. Iga püütud lõhe pildistati (hilisemaks oomütseedi pindala hindamiseks), mille järel mõõdeti kala morfoloogiliste tunnuste väärtused – pikkus (mm) ja mass (g). Seejärel koguti veri, mis tsentrifuugiti (5 min 6000 RPM), et eraldada vereplasma hilisemaks kortisoolisisalduse mõõtmiseks laboris. Järgnes glükomeetriga (*EasyTouch GCHb*) vere glükoosisisalduse mõõtmine (glükoosi mõõtmine toimus tehnilistel põhjustel ainult Keila jõe kaladelt). Osadelt lõhedelt (n = 6) lõigati ka eraldi oomütseedi tükk kala kehalt, et hiljem määrata geneetiliste meetodite abil kindlaks täpne oomütseedi liik või liigid. Viimasena määrati lõhe sugu ning suguküpsus. Lisaks fikseeriti kala tabamise hetkest kuni vere kogumiseni kulunud aeg (sekundites) ning proovivõtu kellaaeg. Kogutud bioloogilised proovid säilitati vedelas lämmastikus. Konditsiooni

hindamiseks kasutati Fultoni indeksit (K=100000*(mass/pikkus^3)). Kõik püütud emased lõhed (n = 54 (32)) olid juveniilsed ning isased jagunesid juveniilseteks (n = 13 (8)) ja suguküpseteks (n = 23 (15)) kääbusisasteks. Sulgudes on kalad, kellelt on mõõdetud ka kortisooli väärtused.

Mõlemast jõest püüti viis tervet lõhe noorkala, keda hoiti umbes poolteist tundi enne vere kogumist ämbris, et kontrollida, kas ilmselge stressi (stressoriks ämbris ehk väikses tehislikus ja harjumatus ruumis viibimine, madal hapnikutase ning ebaregulaarne „hirmutamine“) puhul on kalade kortisoolitase kõrgem kui ainult looduslikes tingimustes viibinud kaladel. Eesmärgiks oli kontrollida ega lõhede stressivastus märgatavalt kahjustunud pole, mistõttu ei tõuseks kortisoolitase ka tugeva stressori puhul. Need lõhed moodustasid siinses töös testgrupi.

Tabel 3. Kunda ja Keila jõest püütud kahesuviste lõhe noorkalade valimi eri rühmade suurused. Sulgudes on märgitud kalade arv, kellelt on mõõdetud kortisoolitaseme väärtused. Kõikidel nakatunud kaladel mõõdeti oomütseedi katvuse osakaal kala kehast.

Jõgi	Kokku	Terved	Nakatunud	Testgrupp	Glükoos
Kunda	45 (27)	20 (12)	20 (12)	5 (3)	–
Keila	45 (28)	20 (12)	20 (11)	5 (5)	45 (28)
Kokku	90 (55)	40 (24)	40 (23)	10 (8)	45 28)

2.3. Kortisooli mõõtmine vereplasmast

Vereplasma kortisooli mõõdeti *Arbor Assays DetectX Cortisol Enzyme Immunoassay Kit* kitiga, järgides tootja juhendit (https://www.arborassays.com/documentation/inserts/K003-H.pdf). Vastavalt juhendile valmistati ette kortisooli standardid, mille värvi intensiivsust võrreldi analüüsi lõpus kaladelt kogutud ja juhendi järgi töödeldud proovidega. Mõned proovid analüüsiti korduvalt. Vajadusel proove lahjendati, et saadav väärtus mahuks standardite väärtuste vahemikku ning hiljem arvutati kortisoolitaseme väärtus vastava lahjenduskoefitsiendiga korrutades.

2.4. Oomütseedi ja kala pindala mõõtmine.

Oomütseedist parasiidi pindala mõõdeti kõikidelt nakatunud kaladelt, kasutades mõõtmiseks rakendust ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, https://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2018). Välitöödel tehti mõõtelaual iga kala mõlemast küljest foto, mõne kala puhul tehti ülesvõte ka dorsaalses ja ventraalses vaates (kui seal esines oomütseet). ImageJ rakenduses võeti võrdlusskaalaks mõõtelaualt 40 mm pikkune vahemik ning mõõdeti selle järgi kala keha ja oomütseedi pindala. Mõõtmised on ligikaudsed, kuna kala keha on kolmemõõtmeline, kuid fotodelt mõõdeti kahemõõtmelise kujutise pindala. Iga kala puhul mõõdeti ühe külje pindala (ilma uimedeta) ning saadud tulemus korrutati kahega, sest polnud alust arvata, et kala kehapooled omavahel pindala poolest märkimisväärselt erineksid. Saadud tulemust nimetatakse antud töö kontekstis kala keha pindalaks. Ka mõõdetud oomütseedi pindalad on ligilähedased hinnangud, sest mõnel juhul kasvas oomütseet kala keha kumerusel või uimel, mis raskendas täpse pindala mõõtmist. Lisaks määrati parasiidi kollete arv (silmale nähtavalt erinevad kolded) ja parasiidi kasvukoht: kehal, uimedel või mõlemal.

2.5. Statistika

Statistilised analüüsid viidi läbi vabavara rakenduses R, kasutades Rstudio-t (Rstudio Team 2022). Statistilistest analüüsidest kasutati Studenti *t*-testi, Spearmani korrelatsioonanalüüsi (valimite normaaljaotusest hälbimise tõttu) ning mitmefaktorilist koosmõjudega dispersioonanalüüsi (ANOVA) ning kovariatsioonanalüüsi (ANCOVA). Rühmade võrdlemisel (*t*-test, ANOVA) kasutati valimi normaaljaotusest hälbimise korral logaritmitud väärtusi (Lisa 1). Statistilistes analüüsides võeti arvesse vereplasma kortisoolitasemete väärtused, mis olid mõõdetud vähemalt duplikaatides ning mille väärtuste varieerumine duplikaatide vahel oli ≤ 20%. Seejuures olid kasutatud kortisoolitasemete väärtused duplikaatide või rohkemate mõõtmiste keskmised. Vere glükoosisisaldus mõõdeti aga igalt kalalt ühe korra ja seepärast mõõtmiste varieeruvuse väärtused puuduvad ning statistilistes analüüsides kasutati kõiki mõõdetud glükoosisisalduse väärtusi.

2.6. Töö autori roll

Siinse magistritöö autor panustas juhendajatega koostöös välitööde planeerimisse, osales välitöödel, analüüsis laboris vereplasma kortisoolisisaldust, analüüsis mükoloogide juhendamisel laboris oomütseedist parasiidi liigilist kuuluvust (DNA eraldamine, PCR), mõõtis parasiitide ja kalade pindalasid ning viis juhendajate abiga läbi statistilised analüüsid.

3. Tulemused

Antud töö raames mõõdetud kahesuviste lõhede morfoloogiliste ja füsioloogiliste parameetrite väärtused tervete ning nakatunud lõhede puhul ja oomütseedist parasiidi morfoloogiste parameetrite väärtused on välja toodud Tabelis 4.

Tabel 4. Töös mõõdetud lõhede morfoloogiliste ja füsioloogiliste tunnuste ning nakatunud lõhedel parasiteeriva oomütseedi karakteristikute keskmised väärtused koos standardhälvetega.

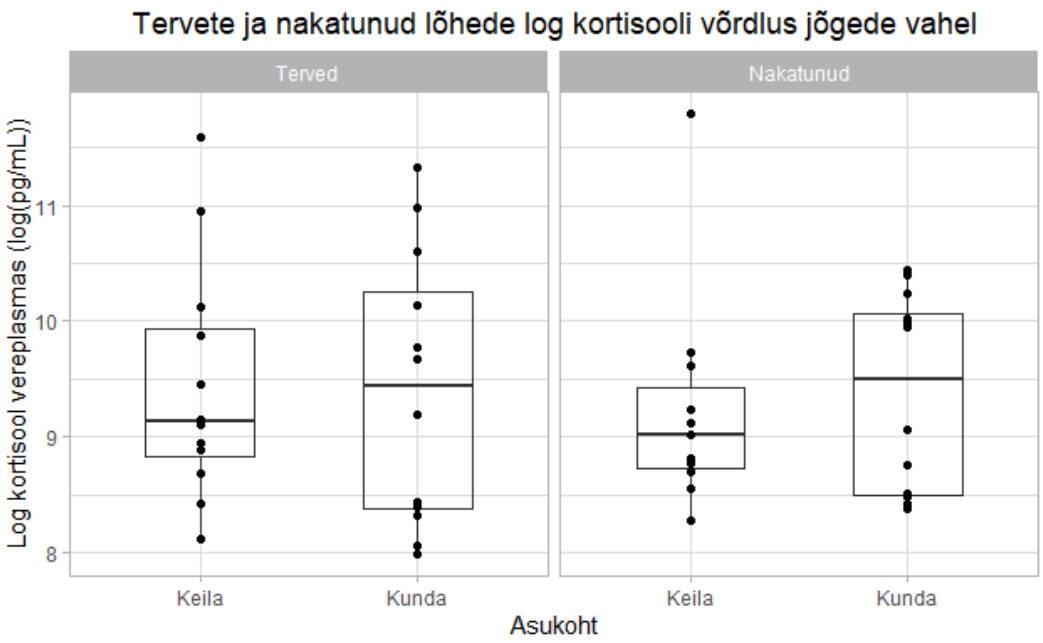
Mõõdetud tunnus	Kunda jõgi			Keila jõgi		
	Terved	Nakatunud	Testgrupp	Terved	Nakatunud	Testgrupp
Pikkus (mm)	114,5 ± 10,9*	114,1 ± 10,7*	112,0 ± 9,2	126,4 ± 12,6*	123,7 ± 13,5*	121,6 ± 15,4
Mass (g)	13,6 ± 4,1*	13,2 ± 3,8*	12,2 ± 3,1	18,6 ± 6,1*	18,0 ± 5,4*	17,1 ± 6,3
Fulton	0,88 ± 0,04	0,87 ± 0,05*	0,86 ± 0,07	0,89 ± 0,06	0,93 ± 0,09*	0,92 ± 0,06
Kortisool (ng/mL)	22,4 ± 25,6	16,2 ± 11,8	89,6 ± 16,7	22,5 ± 30,9	20,0 ± 37,5	128,4 ± 23,42
Glükoos (mg/dL)	–	–	–	73,8 ± 15,9	76,2 ± 17,8	162,8 ± 28,8
Oomütseedi pindala (mm^2)	–	345,0 ± 194,9	–	–	202,0 ± 184,0	–
Oomütseedi katvus kala kehast (%)	–	10,8 ± 5,9	–	–	5,5 ± 5,0	–
Oomütseedi kollete arv (tk/isend)	–	2,5 ± 1,4	–	–	2,4 ± 1,6	–
Oomütseet ainult kehal (kalade arv)	–	9	–	–	13	–
Oomütseet kehal ja uimel (kalade arv)	–	11	–	–	7	–

* – morfoloogiliste kala tunnuste (pikkus, kaal ja Fulton) statistiliselt oluline erinevus jõgede vahel. Jõgede sees polnud tervete ja nakatunud lõhede pikkuse, kaalu ja Fultoni konditsiooniindeksi vahel statistiliselt olulisi erinevusi.

Kunda ja Keila jõe lõhe noorkaladel ei tuvastatud, et asukoht (Kunda/Keila jõgi) ning oomütseediga nakatumine omaks statistiliselt olulist mõju kortisoolitasemele, samuti ei leitud, et nakatumisel ja asukohal esineks olulist koosmõju (Tabel 5; Joonis 5 ja 6 A). Sellest tulenevalt on siinses töös kortisoolitasemete väärtusi hõlmavates rühmadevahelistes võrdlustes ning korrelatsioonanalüüsides pandud mõlema jõe kalade andmed kokku. Jooniselt 5 on näha, et kuigi jõgede vahel kortisoolitasemetes olulisi erinevusi ei olnud, oli Kunda jõe lõhede vereplasma kortisoolitasemete varieeruvus suurem, kui Keila jõe kaladel.

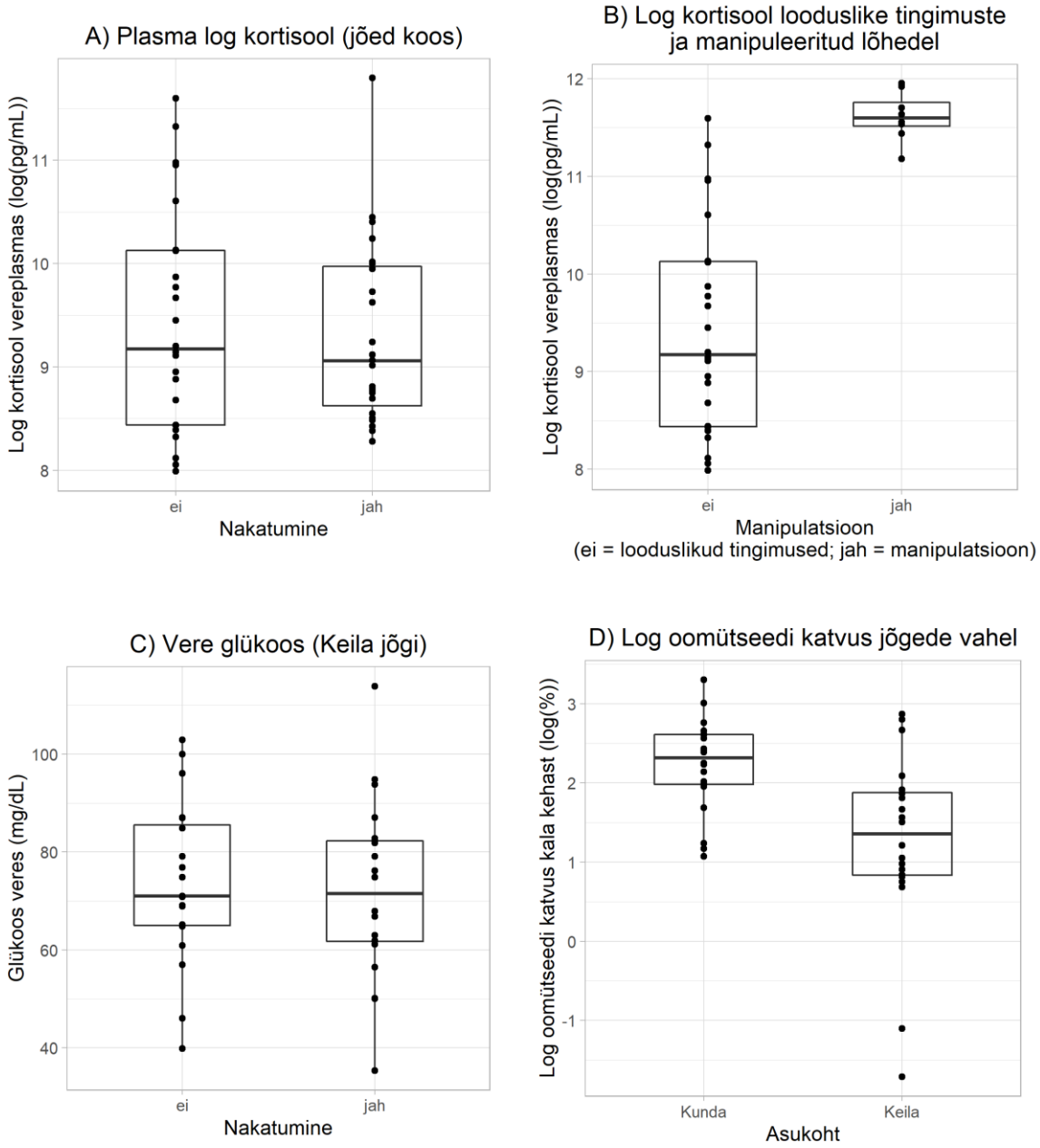
Tabel 5. Asukoha ja oomütseediga nakatumise (terve/nakatunud) mõju ning nende koosmõju lõhede kortisoolitasemele.

Mõju	df	*SS*	*F*	*p*
Asukoht	1	697e+07	0,1	0,807
Nakatumine	1	276e+08	0,3	0,591
Asukoht*nakatumine	1	276e+08	0,1	0,818
Jäägid	43	333e+10		



Joonis 5. Tervete ja nakatunud lõhede vereplasma log kortisooli sisaldutse võrdlus Keila ja Kunda jões. Must paks joon: rühma mediaan; kastid: rühma kvartiilid; püstised mustad jooned kastide üleval ja all: väikseim ja suurim väärtus alumise ja ülemise kvartiili vahe 1,5-kordses vahemikus; mustad punktid: üksikute proovide väärtused.

Testgrupi poolteist tundi ämbris hoitud kaladel oli kortisoolitase oluliselt kõrgem kui kohe peale püüdmist surmatud kaladel (t = –5,6; df = 30; p < 0,001) (Joonis 6 B). See tulemus kinnitab, et antud jõgede lõhe noorkalade stressivastus on adekvaatne ja toimiv. Keila jõe tervete ja oomütseediga nähtavalt nakatunud lõhe noorkalade glükoositasemete vahel ei leitud olulist erinevust ka siis, kui aeg püügist ning proovivõtu kellaaeg ja nende koosmõjud olid arvesse võetud (Tabel 6; Joonis 6 C). Ajaga püügist ning kellaajaga arvestati mudelis, sest kalade vere glükoositasemel leiti oluline positiivne seos ajaga püügist ja oluline negatiivne seos proovivõtu kellaajaga. Oomütseedi katvus oli jõeti oluliselt erinev (Joonis 6 D) – oomütseedist parasiidi katvus erines Kunda ja Keila jõe lõhe noorkalade vahel oluliselt (t = 3,4; df = 38; p = 0,002). Kunda jões kattis oomütseet nakatunud lõhede kehast arvutuslikult keskmiselt (± standardhälve) 10,8 ± 5,9% ning Keila jões 5,5 ± 5,0%.



Joonis 6. A) Kahesuviste atlandi lõhede vereplasma log kortisooli sisaldus oomütseedist parasiidi nähtaval esinemisel ja puudumisel. B) Lühiajaline intensiivne häiring tõstis kalade kortisoolitaset väga olulisel määral. C) Vere glükoositasemete võrdlus tervetel ja nakatunud lõhedel Keila jões. D) Kahesuviste atlandi lõhede log oomütseedi katvuse võrdlus Kunda ja Keila jões 2021. aasta sügisel. Must paks joon: rühma mediaan; kastid: rühma kvartiilid; püstised mustad jooned kastide üleval ja all: väikseim ja suurim väärtus alumise ja ülemise kvartiili vahe 1,5-kordses vahemikus; mustad punktid: üksikute proovide väärtused.

Tabel 6. Oomütseediga nakatumise, aeg püügist ja proovivõtu kellaaja mõju Keila jõe lõhe noorkalade vere glükoositasemele.

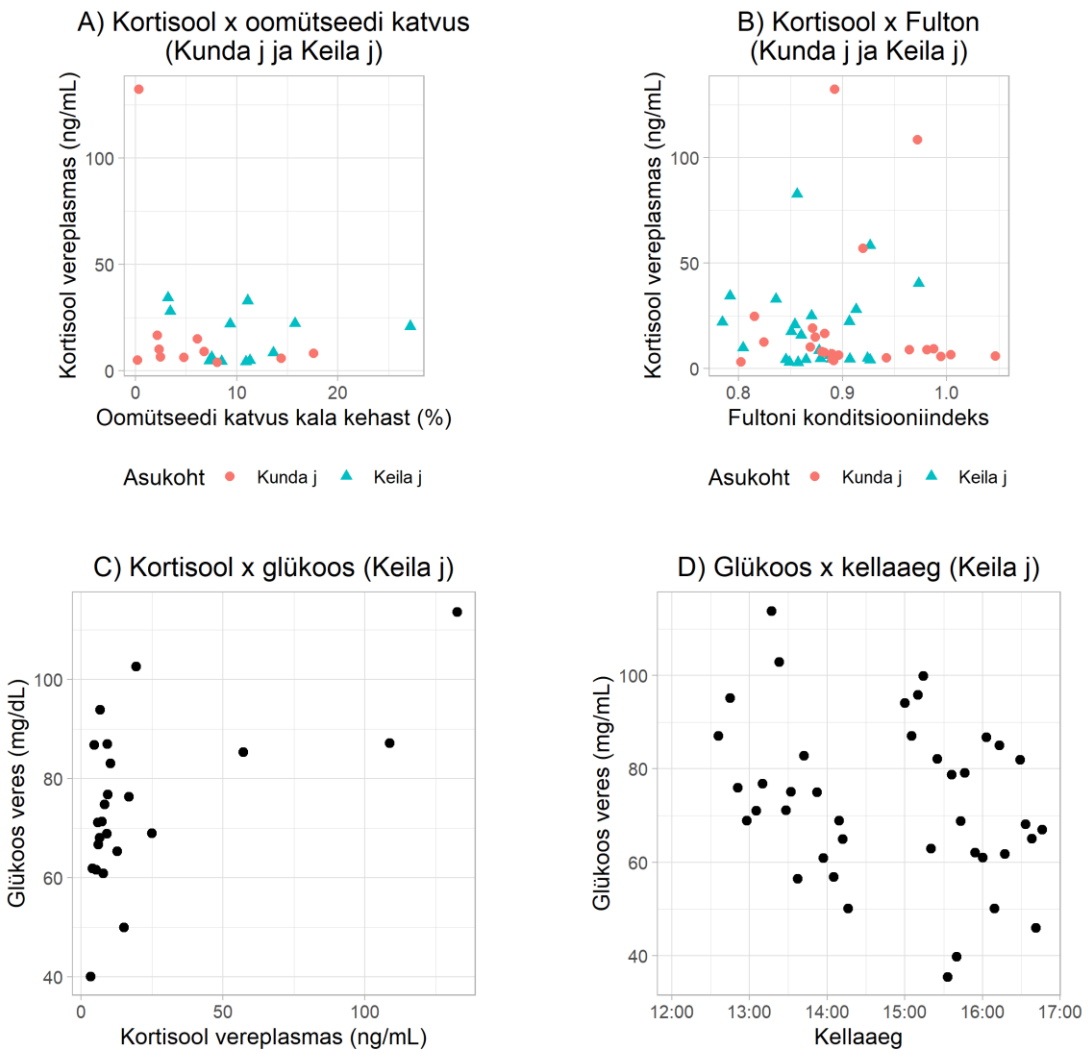
Mõju	df	*SS*	*F*	*p*
Nakatumine	1	23	0,1	0,785
Aeg püügist	1	1530	5,1	0,030
Kellaaeg	1	26	0,1	0,769
Nakatumine*aeg püügist	1	278	0,9	0,341
Nakatumine*kellaaeg	1	0	0,001	0,978
Jäägid	32	9519		

Mõlema jõe kalasid koos analüüsides ei tuvastatud, et sugu ega ka suguküpsus mõjutaks oluliselt lõhe noorkalade vereplasma kortisoolitasemeid (Tabel 7).

Tabel 7. Erinevate soo ja suguküpsuse kombinatsioonidel puudusid olulised mõjud lõhede kortisoolitasemetele.

Analüüsitud tunnused	*t*	df	*p*
Log(kortisool) – sugu	–1,1	45	0,285
Log(kortisool) – sugu (ainult juveniilsed)	–0,9	33	0,381
Log(kortisool) – suguküpsus (ainult isased)	–0,2	18	0,877

Erinevate korrelatsioonanalüüside tulemused on välja toodud Tabelis 8. Oomütseedi katvus ei korreleerunud vereplasma kortisoolitasemega Kunda ja Keila jões eraldi ega ka jõed koos valimis (Joonis 7 A). Lõhede keha morfoloogilised parameetrid ei korreleerunud vereplasma kortisoolitasemetega kummaski jões (Joonis 7 B). Lisaks leiti statistiliselt oluline seos vereplasma kortisoolisisalduse ning vere glükoosisisalduse vahel (Joonis 7 C). Lõhe püüdmise kellaaeg ja aeg püüdmise hetkest kuni vereproovi kogumiseni ei korreleerunud lõhe vereplasma kortisoolitasemega, mistõttu võib väita, et antud töös need faktorid ei mõjutanud kortisoolitaset ja mõõdetav väärtus kajastab organismi vereplasma kortisooli baastaset. See-eest tuvastati statistiliselt oluline seos Keila jõe lõhede vere glükoosisisalduse ning aeg püügist ja samuti glükoosisisalduse ning proovivõtu kellaaja vahel (Joonis 7 D).



Joonis 7. A) Korrelatsiooni puudumine oomütseedi katvuse ning lõhe kortisoolitaseme vahel Kunda ja Keila jões. B) Korrelatsiooni puudumine Fultoni konditsiooniindeksi ning lõhe kortisoolitaseme vahel Kunda ja Keila jões. C) Positiivne seos lõhe vereplasma kortisoolitaseme ja vere glükoosisisalduse vahel Keila jões. D) Negatiivne seos lõhe vere glükoosisisalduse ja proovivõtu kellaaja vahel Keila jões.

Tabel 8. Erinevate mõõdetud tunnuste korrelatsioonid. Paksus kirjas tärniga *p*-väärtus on statistiliselt oluline.

Mõõdetavad tunnused	*r*	*n*	***p* (* – statistiliselt oluline)**	Meetod
Kortisool x oomütseedi katvus (jõed koos)	–0,15	23	0,491	Spearman
Kortisool x oomütseedi katvus (Kunda j)	–0,10	12	0,762	Spearman
Kortisool x oomütseedi katvus (Keila j)	–0,34	11	0,312	Spearman
Kortisool x glükoos (Keila j)	0,47	23	**0,023***	Spearman
Kortisool x aeg püügist (jõed koos)	0,18	46	0,234	Spearman
Kortisool x kellaaeg (jõed koos)	–0,15	47	0,330	Spearman
Kortisool x kala pikkus (Kunda j)	0,32	24	0,127	Spearman
Kortisool x kala kaal (Kunda j)	0,33	24	0,118	Spearman
Kortisool x Fulton (Kunda j)	–0,02	24	0,920	Spearman
Kortisool x kala pikkus (Keila j)	0,27	23	0,205	Spearman
Kortisool x kala kaal (Keila j)	0,17	23	0,449	Spearman
Kortisool x Fulton (Keila j)	–0,18	23	0,417	Spearman
Glükoos x oomütseedi katvus (Keila j)	–0,16	20	0,498	Spearman
Glükoos x aeg püügist (Keila j)	0,38	40	**0,016***	Spearman
Glükoos x kellaaeg (Keila j)	–0,33	40	**0,036***	Spearman
Glükoos x kala pikkus (Keila j)	0,24	40	0,140	Pearson
Glükoos x kala kaal (Keila j)	0,25	40	0,114	Pearson
Glükoos x Fulton (Keila j)	0,03	40	0,854	Spearman
Oomütseedi katvus x kala pikkus (Kunda)	0,21	20	0,385	Spearman
Oomütseedi katvus x kala kaal (Kunda)	0,19	20	0,431	Spearman
Oomütseedi katvus x Fulton (Kunda)	–0,01	20	0,968	Pearson
Oomütseedi katvus x kala pikkus (Keila)	–0,36	20	0,124	Spearman
Oomütseedi katvus x kala kaal (Keila)	–0,37	20	0,103	Spearman
Oomütseedi katvus x Fulton (Keila)	0,15	20	0,535	Spearman

4. Arutelu

Antud töös ei leitud oomütseediga nakatumise ning parasiidi katvuse suurusel olevat olulist mõju lõhede vereplasma kortisoolitasemele. Seejuures nakatusid uuritavate alade lõhed arvatavasti juba augusti alguses (autori tähelepanekud varasematest välitöödest) ja vähemalt augusti lõpus või septembri alguses paistis parasiidiga nakatumine lõhedel selgelt välja (Tartu Ülikooli Eesti Mereinstituudi avaldamata andmed). Seega võib eeldada, et oomütseet oli jõudnud lõhedel parasiteerida vähemalt 1–2 kuud. Seejuures viitavad Hoogenboom jt (2012) tulemused, et kudevate forellide (*Salmo trutta*) kortisoolitaseme ja määramata seenhaigusega nakatumise positiivne seos algab mitu nädalat enne, kui haigustekitaja kolded muutuvad silmale nähtavaks. Võimalik, et ka Kunda ja Keila jões mõjutas oomütseet nakatumise alguses lõhede kortisoolitasemeid. Varasemad uurimused on leidnud, et akuutse (üks tund kuni nädal) stressori puhul suureneb kalade stressivastus (Fast jt 2008; Lai jt 2021), kuid pikaajalise stressi (nädalast kauem) puhul ei leitud mitmel juhul, et kalade stressivastus oleks suurem, võrreldes ajaga enne stressori ilmumist (Fast jt 2008; Lai jt 2021; Rohonczy jt 2021). Seejuures pakuti, et sama stressori puhul organismid harjuvad sellega või väsib nende endorkiinsüsteem korduvalt krooniliselt esinevale stressorile reageerimisel ja nende stressivastus langeb seda rohkem, mida kauem sama stressoriga kokku puututakse, jõudes aja möödudes sarnasele tasemele, mis oli enne stressi. Võimalik, et ka Kunda ja Keila jões olid lõhed juba oomütseedi parasiteerimise stressori käes pikaajaliselt kannatanud ning nende organismi stressivastus langes samale tasemele tervete lõhedega. See-eest pakkusid eelnevad uurimused (Fast jt 2008; Lai jt 2021; Rohonczy jt 2021), et isegi kroonilise stressi all kannatavate kalade sarnased kortisooli väärtused stressita kaladega puhul võib pikaajaline stress mõjutada nende stressivastuse suurenemise ja langemise kiirust ning immuunsüsteemi toimimist. Rohonczy jt (2021) tõid välja, et kauakestev stressor võib avaldada mõju selgroogsete glükokortikoidide tasemete pikenenud tõusule või langemisele, millel võivad omakorda olla kahjulikud mõjud selgroogsete tervisele ja sigimisele. Fast jt (2008) leidsid, et nii lühi- kui ka pikaajaline stress mõjutasid põletikku põhjustava geeni (interleukin 1β (IL-1β)) avaldumist. Samuti selgus nende uurimuses, et kolme nädala jooksul ei mõjutanud kalade immuunsüsteemi makrofaagidest kaitserakkude ellujäämust bakteriaalse parasiidiga *Aeromonas salmonicida* nakatamine, kuid neljandal nädalal oli kroonilist stressi kogevate lõhede makrofaagide suremus parasiidiga nakatamisel oluliselt suurem kroonilise stressita lõhedega võrreldes. Järelikult polnud

uuritud kalade kortisoolitase pikaajalise stressi tõttu kõrgem, kuid immuunvastuse efektiivsus vähenes stressi tõttu. Käesoleva töö tulemuste tagamaadeks võib samuti olla põhjus, et kalade immuunsüsteem harjus või väsis vähemalt 1–2 kuud kestnud saprolegnioosi tõttu ja seetõttu ei erinenud kortisooli- ja glükoositasemed tervete ja nakatunud kalade vahel ning oomütseedi katvus polnud seoses kortisoolitasemetega. Samas on nakkus progresseeruv ehk parasiidi kolded laienevad, millest tulenevalt võiks stressori mõju ajas suureneda. Teisalt on ka leitud, et *S. parasitica* võib peremeesorganismi nakatamisel eritada valke, mis suruvad kala immuunvastuse maha ja põletikuline vastus puudub (Van West 2006). Sellest võiks järeldada, et parasiidi osavuse tõttu ei märkagi kala immuunsüsteem sissetungijat, immuunvastust ei järgne ja seetõttu kortisoolitase ka ei tõuse. See tundub aga ebatõenäoline, arvestades et ligi 6–11% kala kehast oli kaetud parasiidiga, mis hävitab kala keha pealmiseid kudesid, takistades potentsiaalselt erinevate füsioloogiliste protsesside toimimist. Isegi kui *Saprolegnia* suudaks mööda hiilida peremeesorganismi immuunsüsteemist, siis peaks haiguse süvenedes olema kalale stressoriks füsioloogiliste protsesside takistamine. Siiski tekivad küsimused, kas oomütseediga nakatumine on toimunud stressivastuse muutuste tõttu ja kas kohe peale nakatumist erinevad tervete ja nakatunud kalade kortisoolitasemed ning teised füsioloogilised tunnused? Eelnev arutelu tekitab ka küsimused, kas Kunda ja Keila jõe lõhede noorkalad nakatusid oomütseedist parasiidiga ebapiisava immuunvastuse tõttu, sest stress või muud faktorid olid nõrgendanud nende immuunvastust? Lisaks, kas oomütseet võib langetada lõhel parasiteerides edaspidi kroonilise stressi tõttu kala immuunvastust edasistele stressoritele või mõjutada muid füsioloogilisi protsesse (nt kasv, sigimine)? Siinse töö tulemuste järgi ei leitud tervete ja nakatunud kalade suuruses erinevusi ning ka nakatunud kalade hulgas leidus kääbusisaseid.

Siinses töös leiti, et vereplasma kortisoolitaseme ja vere glükoosisisalduse vahel oli nõrk positiivne korrelatsioon. Ka varem on leitud nõrk seos mainitud tunnuste vahel (Lai jt 2021). Suurem kortisooli tootmine peaks sekundaarses stressireaktsioonis tõstma ka vere glükoosisisaldust (Schreck ja Tort 2016) ning seetõttu on oodatav kortisooli ja glükoosi korreleerumine. Glükoosi oli siinse töö andmeid kogudes oluliselt lihtsam mõõta kui kortisooli ja võiks eeldada, et glükoos on samuti oluline tunnus, mida mõõta kalade stressivastuse uurimisel.

Kunda ja Keila jões mõlemas on aeg-ajalt olnud probleeme mõnede inimtekkeliste saasteainete (nt elavhõbe ja PAH-id) piirmäära ületamisega või koosmõjude ohuga

(Hindrikson ja Laht 2019; Hindrikson jt 2020; Laht ja Hindrikson 2021). Rohonczy jt (2021) leidsid oma ülevaateartiklis, et üldiselt suurendas saasteainetega kokkupuutumine kalade kortisooli baastaset poolteist korda, seejuures ravimid kaks ja pool korda, üldine stressivastust tõstev trend oli ka metallidel ja PAH-idel, kuid teiste saasteainete puhul ei leitud olulist mõju kalade kortisooli baastasemetele. Kusjuures saasteainete mõju suuruse kalade kortisoolitasemele ja saasteainega kokkupuute kestuse vahel tuvastati negatiivne korrelatsioon – kortisoolitasemed vähenesid, mida pikemalt kalad puutusid kokku saasteainega. Autorid pakkusid, et on oht, et krooniline stressor võib põhjustada kala võimetust piisavaks kortisoolivastuseks uutele stressoritele (Rohonczy jt 2021). On ka leitud, et kalade evolutsiooni käigus arenenud vastupanu endeemilistele parasiitidele võib väheneda, kui keskkond muutub stressi tekitavamaks (Miller jt 2014). Üks võimalus on, et Kunda ja Keila jõe vee saasteainete sisaldus langetab lõhe noorkalade immuunvastuse efektiivsust, põhjustades ebakohaselt nõrka või hoopis tugevat immuunvastust, mistõttu võib tavalise veeökosüsteemi oomütseedist parasiidiga nakatumine lihtsamini toimuda. Ebakohane immuunvastus oleks näiteks see, kui saasteainetest stressori tõttu ei suudaks kalade immuunsüsteem kortisooli ala- või ületootmise tõttu suunata piisavalt ressursse immuunvastuse efektiivselt toimimiseks oomütseedist parasiidiga nakatumise vastu. Kuigi olulise mõjuga võivad olla ka hoopis teised tegurid (nt lõhede suur asustustihedus) või mitmete tegurite koosmõjud. Samuti on antud jõgedes sügiseti palju täiskasvanud kudekalasid, kes peavad mahtuma lühikesse jõelõiku ning suhteliselt paljudel neist on näha kalahallitusega nakatumist (Roland Svirgsdeni ja töö autori isiklikud tähelepanekud), mistõttu võib parasiidile *Saprolegnia* olla palju kasvusubstraati ja seetõttu vees esineda rohkelt haigustekitaja eoseid. Kui vees leiduvad saasteained on üheks nakatumist soodustavaks faktoriks, siis tekitab see lisaküsimuse, kas kroonilise stressori (saasteained) järel uue stressori tekkimine (oomütseedist parasiit) suurendab vere kortisoolitasemeid oluliselt ja isegi rohkem, kui esialgne stressor (nagu leidsid Lai jt 2021) või on hoopis lõhede immuunsüsteem esialgsest stressorist piisavalt kurnatud ja ka kohe nakatumise järel ei suurene nakatunud kalade kortisoolitasemed tervetega võrreldes. Samas tekib ka küsimus, miks ei ole märgatud samasuviste lõhede nakatumist uuritud parasiidiga, arvestades, et paljud saasteained on jõe vees pidevalt esindatud. Ehk on hoopis teised faktorid olulisemad, näiteks suvine madal veetase ja kõrge veetemperatuur, mis vastavalt suurendab kalade asustustihedust vee ruumala kohta ning võib olla stressoriks külmalembestele lõhedele.

Uuritud jõgedes oli Kunda jõe nakatunud lõhede oomütseedi suhteline katvus oluliselt suurem Keila jõe kaladest. Lisaks olid nii terved kui ka nakatunud Kunda jõe lõhed Keila jõe lõhedest oluliselt lühemad ja kergemad ning nakatunud Kunda jõe lõhede konditsiooniindeks oli oluliselt madalam Keila jõe nakatunud lõhedest. Antud tulemus aga ei viita, et parasiit mõjutaks lõhe noorkalade kasvu või konditsiooni, sest samasuunalised erinevused olid ka jõgede tervete kalade vahel ning jõgede sees polnud tervete ja nakatunud kalade morfoloogilistes parameetrites olulisi erinevusi. See-eest võib aga järeldada, et millegipärast on Kunda jões saprolegnioosi põhjustav parasiit kala kehal kasvamises edukam. Seejuures märgati 2021. aastal ka Tartu Ülikooli Eesti Mereinstituudi seires, et Kunda jões on parasiit tunduvalt levinum kui Keila jões (vastavalt 38% ja 17%). Kas Kunda ja Keila jões on erineva virulentsusega oomütseedid, Kunda jõe lõhe noorkalade immuunvastus kehvem, Kunda jões *Saprolegnia* eoseid rohkem või on põhjuseks hoopis mõni muu tegur või koosmõjud? Samas Visse jt (2015) uurimuses leiti, et atlandi lõhe lühemad noorkalad olid Keila ja Vasalemma jões efektiivsema immuunvastusega kui pikemad kalad. Samuti erinesid kahest jõest (Vasalemma ja Keila) püütud kalad viie mõõdetud tunnuse (immunoloogilised, füsioloogilised või morfoloogilised) poolest 12 mõõdetud tunnuse hulgast (Visse jt 2015), mis vihjab, et jõgedevaheliste erinevuste tõttu tasuks ehk oomütseedi mõju kalade kortisoolitasemetele uurida lisaks suure parasiidi levimusega jõgedes ka seal, kus parasiidiga nakatumist on suhteliselt vähem.

Kunda jões on suvel madalamad veetemperatuurid kui Keila jões ning ka aasta suurimad veetemperatuurid on Kunda jões madalamad (2015. aastal Kundas jões 18,5 °C ja Keila jões 21,1 °C) (KAUR 2017). Samuti on Kunda jões peamiselt talvel ja kevadel väiksemad vooluhulgad kui Keila jões ning aasta suurima ja väikseima veetaseme vahe ehk vooluhulga amplituud on Keila jões suurem. Seega võib järeldada, et Kunda jõgi on vooluhulga ja veetemperatuuri kõikumiste osas stabiilsem kui Keila jõgi. Seejuures on Kunda jões jahedam vesi (suviste veetemperatuuride tõttu). Mainitud jõgede hüdroloogiline ja veetemperatuuri režiim võib olla otseselt või kaudselt üheks põhjuseks, miks erineb lõhede kasv ja oomütseedist parasiidi suhteline katvust Kunda ja Keila jões. Matthews (2019) leidis, et keskmise kevadise vooluhulga ja jões leiduva parasiit *Saprolegnia* hulga vahel on oluline negatiivne seos – väiksemate kevadiste vooluhulkadega leidus rohkem oomütseeti. Üldiselt suurenes parasiidi vegetatiivne kasv laboris veetemperatuuri kasvuga. Seevastu olid *S. parasitica* zoospoorid elujõulisemad

jahedas vees – suurim elujõulisus 5–15 °C juures, 25 °C juures langes elujõulisus oluliselt. Zoospooride elujõulisusega samade veetemperatuuride juures oli ka zoospooride tootmine suurim (Matthews 2019). Ka Kunda ja Keila jões võib vooluhulgal ning veetempretuuril olla oluline roll oomütseediga nakatumisel, eriti sügisel, kui jõevesi jaheneb ning Saprolegnia zoospooride elujõulisus ning tootmine potentsiaalselt suureneb. Samal ajal võib veetemperatuuri muutumine põhjustada lõhe noorkaladel kortisoolitaseme suurenemist, nõrgendades omakorda ajutiselt immuunvastust.

Magistritöö käigus tekkinud mõtted edasisteks uurimusteks: (1) Kas jõgedes, kus oomütseedist parasiit on vähem levinud, on lõhede kortisoolitase erinev Kunda ja Keila jõest, kus on märgatud uuritud parasiidi suurimat levimust lõhe noorkalade hulgas Eestis, (2) Kas on võimalik, et mõned nakatunud kalad suudavad rännata merre ning oomütseedi nakkusest soolase vee tõttu terveneda? (3) Kas oomütseediga nakatunud kalade immuunvastus on uuele akuutsele stressorile erinev võrrelduna sama jõe tervete kalade immuunvastusega? (4) Kas suur kalade asustustihedus mõjutab otseselt (tihedam kalade kokkupuutumine) või kaudselt (suurest asustustihedusest tekkinud stress toiduressursside või mikroelupaikade pärast konkureerimise tõttu) saproleegniasse haigestumist? (5) Kas nähtava oomütseedita lõhed on ka nakatunud või kas nende limas on *Saprolegnia* tsüste?

Kokkuvõte

Töö eesmärk oli uurida, kas oomütseedist parasiidiga *Saprolegnia* nakatumine mõjutab atlandi lõhe noorkalade stressivastust võrreldes tervete (väliste haigustunnusteta) kaladega. Lõhede arvukust mõjutavad mitmed faktorid ning üheks neist on ka parasiidid. Parasiidid on veeökosüsteemide loomulik osa, mis tõenäoliselt tagab ühe mõjurina populatsioonide geneetilist varieeruvust. Küll aga on oht, et keskkonnatingimuste muutumise (nt saasteainete hulga suurenemine, elupaikade degradeerumine, rändetakistused, kliimamuutus) tõttu võivad ka endeemilised parasiidid muutuda lõhepopulatsioonidele varasemast kurnavamaks.

Siinses töös uuriti maailmas looduslikult laialt levinud oomütseedist parasiidi *Saprolegnia* mõju atlandi lõhe noorkaladele, täpsemalt nakatumise mõju vereplasma kortisoolitasemetele. *Saprolegnia* perekonna esindajad põhjustavad magevee kaladel, kahepaiksetel ja vähilaadsetel keha pinnal heleda vatja seenelaadse väljanägemisega haigust nimega saprolegnioos. Üldiselt on suurem tõenäosus haigestuda saprolegnioosi vigastuse või mõne muu immuunvastust kahjustava mõjuri (nt stress) tõttu, kusjuures haigus lõpeb enamikel juhtudel letaalselt. Nakatumise tagajärjel võib kaladel tekkida stress või siis võib eelnev stress ise olla üheks nakatumist soodustavaks teguriks. Stress on organismide loomulik vastus neid ohustavale stressorile, misjärel koondatakse organismis lühiajaliselt teiste organismi funktsioonide arvelt (nt kasv, immuunsüsteem, sigimine jt) ressursse, et seista vastu stressorile ning taastada organismi stabiilne olek. Krooniline stress mõjutab organismi negatiivselt, sest stressivastuse energia tuleb sel juhul pikaajaliselt keha muude funktsioonide arvelt.

Käesolevas töös kasutati 90 Kunda ja Keila jõest pärineva kahesuvise atlandi lõhe noorkaladelt kogutud andmeid. Neist 45 kala olid terved ning 45 oomütseediga nakatunud. Püütud kaladelt mõõdeti morfoloogilisi parameetreid ning stressivastust uuriti vereplasma kortisooli- ja vere glükoositasemete mõõtmiste põhjal, samas hinnati ka parasiidi kolde pindala ning selle suhteline suurus võrrelduna keha pindalaga.

Magistritöös püstitatud hüpoteesid ei leidnud kinnitust: (1) analüüsitud valimi põhjal ei erinenud Kunda ja Keila jõe tervete ja nakatunud atlandi lõhede vereplasma kortisoolitasemed oluliselt; (2) samuti polnud oomütseedist parasiidi katvuse osakaal kala kehast seotud lõhe noorkalade kortisoolitasemetega ning (3) tervete ja nakatunud lõhede vere glükoositasemed ei erinenud oluliselt.

Varasemalt tehtud uurimuste tulemused näitavad, et kroonilise stressi puhul võib vere kortisooli- ja glükoositase langeda samale tasemele, mis oli organismil enne uuritava stressoriga kokku puutumist sest organism harjub stressoriga või on endokriinsüsteem pidevast stressivastusest kurnatud. Seega võib ka siinses töös mõõdetud kalade vere kortisooli- ja glükoositasemete erinevuse puudumine viidata asjaolule, et nakatunud kalade endokriinsüsteem oli pikaajalise haiguse tõttu stressorist kurnatud või haigusega harjunud. Siiski võib seejuures muutuda stressivastuse laad ning immuunsüsteem saada kahjustatud, mistõttu ei pruugi immuunvastus enam uutele stressoritele adekvaatselt reageerida, langetades omakorda veel potentsiaalselt nakatunud kalade kohasust. Kuna *Saprolegnia* nakatab tavaliselt vigastatud või nõrgenenud immuunsüsteemiga kalasid, siis võib esmaseks nakatumise põhjuseks ning potentsiaalseks stressivastuse kahjustajaks olla hoopis mõni muu tegur või nende koosmõjud (saasteained, suur asustustihedus, suvine madalvesi või kõrge veetemperatuur) ja *Saprolegnia* parasiidiga nakatumine selle tagajärg.

Summary

The impact of oomycete parasite *Saprolegnia* Nees, 1823 infection to the cortisol levels of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) 1+ age-class parrs in Kunda and Keila Rivers

The aim of the master thesis was to study if infection with an oomycetic parasite *Saprolegnia* impacts the stress response of young Atlantic salmon compared to uninfected fish (without visible symptoms of saprolegniosis). Salmon abundance is impacted by various factors and one of them is parasites. Parasites are natural part of aquatic ecosystems and probably one of the factors ensuring genetic variations in populations. Although changes in environmental conditions (e.g. increasing amounts of pollutants, habitat degradation, migration barriers, climate change) are threatening to change also the endemic parasites to be more difficult to tolerate by salmon populations.

In this work the impact of globally widely distributed oomycetic parasite *Saprolegnia* to young Atlantic salmon was researched, in particular the effect of infection to blood plasma cortisol levels. Species of the *Saprolegnia* genus are causing light-coloured cotton- and fungal-like disease called saprolegniosis on the bodies of freshwater fish, amphibians and crustaceans. In general fish are more likely to get the infection after an injury or some other factor harming the immune response (e.g. stress). The disease is mostly lethal. As a result of the infection fish may be stressed or earlier stress may itself be one of the factors contributing to the initial infection. Stress is a natural response to a stressor threatening the organism. After the stress response the resources in organism are redistributed to resist the stressor and restore the stabile state of the organism at the expense of other body functions (e.g. growth, immune system, reproduction *et al.*). Chronic stress impacts the organism negatively, because the energy required for stress response is used long-termly at the expense of other body functions.

In the thesis data from 90 1+ age-class Atlantic salmon parrs from Kunda and Keila Rivers were used. 45 fish were uninfected and 45 infected with the oomycete. Morphological parameters of the fish were measured and stress response was studied on the basis of blood plasma whole cortisol and blood glucose content. At the same time the area of the parasite foci and its relative size compared to the fish body size were evaluated.

Hypotheses of the thesis were not confirmed: (1) on the basis of analysed sample the plasma cortisol levels were not statistically different between uninfected and infected

Atlantic salmons in Kunda and Keila Rivers; (2) likewise the relative coverage of the oomycetic parasite on fish body was not related to young salmon cortisol levels and (3) blood glucose levels were not statistically different between uninfected and infected salmons.

Results from previous reasearch indicate that in the case of chronic stress the blood cortisol and glucose levels may fall to the same values as were present in the organism before being exposed to the stressor. The reason behind that may be that the organism gets used to the stressor or the endocrine system is exhausted from the constant stress response. Therefore the lack of difference in blood cortisol and glucose levels between uninfected and infected fish may refer to the reason that the endocrine system of the studied salmons may be exhausted from the long-termed disease caused by the stressor or the endocrine system may be used to the disease. However the immune response may have been altered and immune system affected, so that the new immune response in the future may not respond adequately to a new stressor, which can potentially decrease fitness of the infected fish even more. Since *Saprolegnia* is usually infecting fish with injury or impaired immune system, then the primary cause of the infection and potentially inadequate immune response may be some other factor or their interaction (e.g. pollutants, high population density, summer low water level or high water temperature) and the *Saprolegnia* infection may be the consequence of that.

Tänuavaldused

Autor tänab Roland Svirgsdenit suurepäraste nõuannete, abi ja toetuse eest töö koostamisel. Samuti on autor tänulik, et sai tema poole pöörduda ka kiirete küsimustega igal ajal ning arutada magistritööga seonduvaid küsimusi, olgu see telefonitsi, õppehoones, rattaga sõites või jõe ääres. Autor tänab samuti Richard Meiternit suurepärase juhendamise, nõuannete, julgustamise ning kaasamõtlemise eest laboris, samuti abi eest R-iga ja kiire tagasiside eest kiirel ajal. Autor on väga tänulik ka Tuul Sepale alati positiivse ja innustava („kuidas saab, mitte miks ei saa“) suhtumise ning nõuannete ja kaasamõtlemise eest. Rolandile, Richardile, Tuulele ja Randel Kreitsbergile soovib autor öelda aitäh ka välitöödel abistamise, planeerimise ja varustuse pakkumise eest. Autor on ka üldiselt tänulik Tuul Sepa juhitud evolutsioonilise ökofüsioloogia töörühma liikmetele nende aja, välitöödele sõidu kütuse ja varustuse eest.

Thank you Jeffrey Malherbe Carbillet for the great advice during lunches at university and other occasions and also articles about cortisol. Thank you Ciara Baines for encouraging, if things didn’t work out in the lab.

Aitäh Leho Tedersoole ja Rasmus Puusepale mükoloogiaalast nõu jagamast ning laboris juhendamast.

Autor tänab ka Martin Keslerit ja Imre Taali lõheliste seireandmete jagamise ning üldise lõhedega seotud teadmiste ja nõu jagamise eest. Lisaks on autor tänulik Tartu Ülikooli Eesti Mereinstituudile kortisooli analüüsimise kit-i ostmise rahastamise eest.

Üleüldiselt tänab autor ülikooli koridoris kohatud inimesi, kes juhuslike vestluste käigus head nõu andsid.

Suured tänud lähevad ka kaastudengile Birgit Purgale, kellega magistritöö kirjutamise lõpuperioodil rõõme ja muresid jagatud sai.

Samuti on autor tänulik lähedastele ja sõpradele, kes tundsid huvi õpingute vastu, olid toetavad, kohati erialaselt kauged olles kuulasid ikkagi ning andsid nõu veidralt detailsetele erialastele küsimustele ning õhutasid siinset tööd kirjutama.

Autor on äärmiselt tänulik kõigile, kes jäid nimetamata, kuid aitasid otseselt või kaudselt kaasa käesoleva magistritöö valmimisele.

Kirjanduse loetelu

(Kirjanduse loetelu koostamisel on järgitud teadusajakirja Freshwater Science stiili.)

Astrofsky, K. M., Bullis, R. A., Sagerstrom, C. G. 2002. Chapter 19 – Biology and Management of the Zebrafish: 861–883. Laboratory Animal Medicine (Second Edition). Toimetajad: Fox, J. G., Anderson, L. C., Loew, F. M., Quimby, F. W. American College of Laboratory Animal Medicine. Academic Press.

Birnie-Gauvin, K., Thorstad, E. B., Aarestrup, K. 2019. Overlooked aspects of the Salmo salar and Salmo trutta lifecycles. Reviews in Fish Biology and Fisheries 29: 749–766.

Boddy, L. 2015. Chapter 9 - Interactions with Humans and Other Animals. Pages 293–336 *in* S. C. Watkinson, L. Boddy and N. P. Money (editors). The Fungi. 3rd edition. Academic Press, United Kingdom.

Deinet, S., Scott-Gatty, K., Rotton, H., Twardek, W. M., Marconi, V., McRae, L., Baumgartner, L. J., Brink, K., Claussen, J. E., Cooke, S. J., Darwall, W., Eriksson, B. K., Garcia de Leaniz, C., Hogan, Z., Royte, J., Silva, L. G. M., Thieme, M. L., Tickner, D., Waldman, J., Wanningen, H., Weyl, O. L. F., Berkhuysen, A. 2020. The Living Planet Index (LPI) for migratory freshwater fish – Technical Report. World Fish Migration Foundation, The Netherlands.

EELIS. 2022a. Eesti Looduse Infosüsteem. Keskkonnaagentuur. https://eelis.ee/default.aspx?state=3;68547593;est;eelisand;;&comp=objresult=veekogu&obj_id=901091020. Vaadatud 20.04.2022.

EELIS. 2022b. Eesti Looduse Infosüsteem. Keskkonnaagentuur. https://eelis.ee/default.aspx?state=3;68547593;est;eelisand;;&comp=objresult=veekogu&obj_id=620978939. Vaadatud 19.04.2022.

eElurikkus. 2022. PlutoF Taxonomy. https://elurikkus.ee/bie-hub/species/25148#classification. Vaadatud 24.04.2022.

Fast, M. D., Hosoya, S., Johnson, S. C., Afonso, L. O. B. 2008. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. Fish & Shellfish Immunology 24: 194–204.

Fricke, R., Eschmeyer, W. N., Fong, J. D. 2022. ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: GENERA/SPECIES BY FAMILY/SUBFAMILY. (http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp). Vaadatud 24.04.2022.

Hindrikson, M., Laht, M. 2019. Jõgede hüdrokeemiline seire ja ohtlikud ained 2018. OÜ Eesti Keskkonnauuringute Keskus.

Hindrikson, M., Laht, M., Alumaa, P. 2020. Jõgede hüdrokeemiline seire ja ohtlikud ained 2019. OÜ Eesti Keskkonnauuringute Keskus.

Hoogenboom, M. O., Metcalfe, N. B., Groothuis, T. G. G., de Vries, B., Costantini, D. 2012. Relationship between oxidative stress and circulating testosterone and cortisol in pre-spawning female brown trout. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 163: 379–387.

ICES. 2018. Report of the Baltic Salmon and Trout Assessment Working Group (WGBAST). Turku, Finland. ICES CM 2018/ACOM: 10. 369 pp.

ICES. 2020. Baltic Salmon and Trout Assessment Working Group (WGBAST). ICES Scientific Reports 2.

Jonsson, N., Jonsson, B., Hansen, L. P. 1998. The relative role of density-dependent and density-independent survival in the life cycle of Atlantic salmon *Salmo salar*. Journal of Animal Ecology 67: 751-762.

Järvekülg, A. 2001. Kunda jõgi. Leheküljed 431–437. Keila jõgi. Leheküljed 501–508 raamatus A. Järvekülg (koostaja). Eesti jõed. Tartu Ülikooli Kirjastus, EPMÜ Zooloogia ja Botaanika Instituut, Tartu.

Kangur, M., Paaver, T., Drevs, T. 2003. Salmon, *Salmo salar* L. Pages 91–97 *in* E. Ojaveer, E. Pihu and T. Saat (editors). Fishes of Estonia. Estonian Academy Publishers, Tallinn.

KAUR. 2017. Hüdroloogiline aastaraamat 2015. Keskkonnaagentuur. Tallinn.

Kesler, M., Svirgsden, R., Taal, I. 2022. Kalanduse riikliku andmekogumise programmi täitmine, teadusvaatlejate paigutamine Eesti lipu all sõitvatele kalalaevadele ning teadussoovituste koostamine kalavarude haldamiseks 2020-2021. aastal. Töövõtulepingu nr 4-1/20/3 lõpparuanne 2021.a. kohta. Osa: Lõhe ja meriforell. Tartu Ülikool, Eesti Mereinstituut.

Klemetsen, A., P.-A. Amundsen, J. B. Dempson, B. Jonsson, N. Jonsson, M. F. O'Connell, E. Mortensen. 2003. Atlantic salmon Salmo salar L., brown trout Salmo trutta L. and Arctic charr Salvelinus alpinus (L.): a review of aspects of their life histories. Ecology of Freshwater Fish 12: 1–59.

Laht, M., Hindrikson, M. 2021. Jõgede hüdrokeemiline seire ja ohtlikud ained 2020. OÜ Eesti Keskkonnauuringute Keskus.

Lai, F., Royan, M. R., Gomes, A. S., Espe, M., Aksnes, A., Norberg, B., Gelebart, V., Rønnestad, I. 2021. The stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): identification and functional characterization of the corticotropin-releasing factor (*crf*) paralogs. General and Comparative Endocrinology 313.

Lennox, R. J., Paukert, C. P., Aarestrup, K., Auger-Méthé, M., Baumgartner, L., Birnie-Gauvin, K., Bøe, K., Brink, K., Brownscombe, J. W., Chen, Y., Davidsen, J. G., Eliason, E. J., Filous, A., Gillanders, B. M., Helland, I. P., Horodysky, A. Z., Januchowski-Hartley, S. R., Lowerre-Barbieri, S. K., Lucas, M. C., Martins, E. G., Murchie, K. J., Pompeu, P. S., Power, M., Raghavan, R., Rahel, F. J., Secor, D., Thiem, J. D., Thorstad, E. B., Ueda, H., Whoriskey F. G., Cooke, S. J. 2019. One Hundred Pressing Questions on the Future of Global Fish Migration Science, Conservation, and Policy. Frontiers in Ecology and Evolution 7.

Lundqvist, H., Clarke, W.C. Johansson, H. 1988. The influence of precocious sexual maturation on survival to adulthood of river stocked Baltic salmon, Salmo salar, smolts. Ecography 11: 60–69.

Matthews, E., 2019. Chapter 5 - Temperature and water flow impact *Saprolegnia* infections. Pages 68–85. Environmental factors impacting *Saprolegnia* infections in wild fish stocks. A thesis submitted to Cardiff University for the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in the School of Biosciences..

Miller, K. M., Teffer, A., Tucker, S., Li, S., Schulze, A. D., Trudel, M., Juanes, F., Tabata, A., Kaukinen, K. H., Ginther, N. G., Ming, T. J., Cooke, S. J., Hipfner, J. M., Patterson, D. A., Hinch, S. G. 2014. Infectious disease, shifting climates, and opportunistic predators: cumulative factors potentially impacting wild salmon declines. Evolutionary Applications 7: 812–855.

Pall, P., Järvekülg, R., Järvekülg, T., Sinimets, A., Timm, H., Vilbaste, S. 2020. JÕGEDE HÜDROBIOLOOGILINE SEIRE JA UURINGUD 2019. AASTA ARUANNE. Eesti Maaülikool.

Pall, P., Järvekülg, R., Käiro, K., Pihu, R., Timm, H., Vilbaste, S. 2015. JÕGEDE HÜDROBIOLOOGILINE SEIRE JA UURINGUD 2014.A. ARUANNE. Eesti Maaülikooli PKI Limnoloogiakeskus.

Päkk, P., Must, K., Kass, M., Tuvikene, A. 2016. 9. Seenhaigused. Leheküljed 101–103 raamatus K. Palo (toimetaja). Kasvatatavate kalade haigused. Õpik kõrgkoolidele. Eesti Loodusfoto, Eesti Maaülikool, Tartu.

Rohonczy, J., O'Dwyer, K., Rochette, A., Robinson, S. A., Forbes, M. R. 2021. Meta-analysis shows environmental contaminants elevate cortisol levels in teleost fish – Effect sizes depend on contaminant class and duration of experimental exposure. Science of The Total Environment 800.

RStudio Team. 2022. RStudio: Integrated Development Environment for R. Rstudio. PBC. Boston. MA. http://www.rstudio.com/.

Sandoval-Sierra, J. V., Martín, M. P., Diéguez-Uribeondo, J. 2014. Species identification in the genus *Saprolegnia* (Oomycetes): Defining DNA-based molecular operational taxonomic units. Fungal Biology 118: 559–578.

Schreck, C. B., Tort, L., 2016. 1 – The Concept of Stress in Fish. Pages 1–34 in C. B. Schreck, L. Tort, A. P. Farrell and C. J. Brauner (editors). Fish Physiology. Volume 35: Biology of Stress in Fish. Academic Press, London, England.

Taal, I., Kesler, M., Saks, L., Rohtla, M., Verliin, A., Svirgsden, R., Jürgens, K., Vetemaa, M. 2014. Evidence for an autumn downstream migration of Atlantic salmon *Salmo salar* (Linnaeus) and brown trout *Salmo trutta* (Linnaeus) parr to the Baltic Sea. Helgoland Marine Research 68: 373–377.

Tiffney, W. N. 1939. The Host Range of Saprolegnia Parasitica. Mycologia 31: 310–321.

Timm, H., Järvekülg, R., Pall, P., Vilbaste, S. 2019. 20. Kunda jõgi. Leheküljed 156–158. 31. Keila jõgi. Leheküljed 196–198 raamatus K. Leppikson (toimetaja). Eesti jõed. Kirjastus Varrak, Tallinn.

Van den Berg, A. H., McLaggan, D., Diéguez-Uribeondo, J., van West, P. 2013. The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on

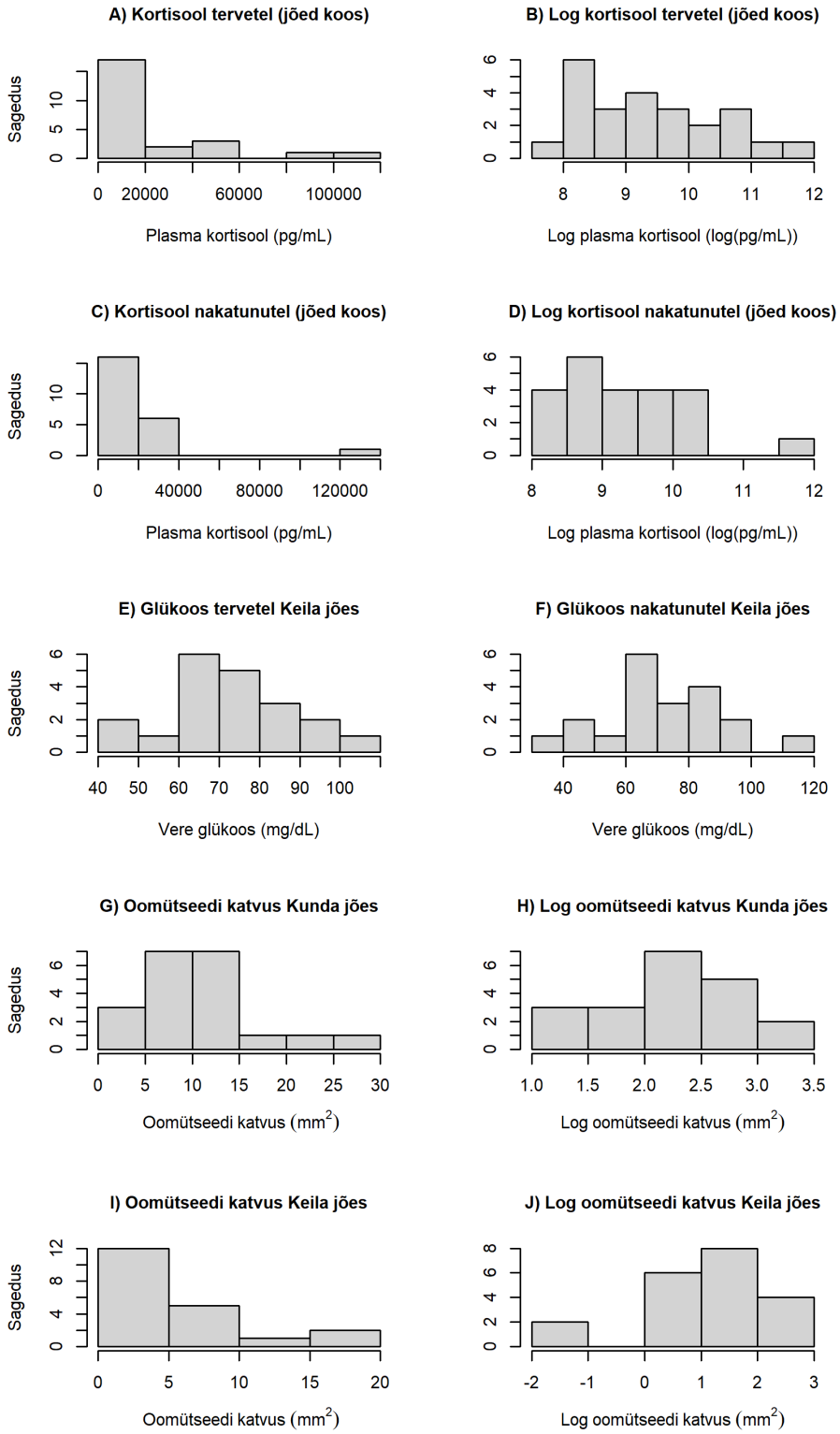
natural ecosystems and the aquaculture industry. Fungal Biology Reviews 27: 33–42.

Van der Laan, R., Fricke, R.; Eschmeyer, W. N. (eds). 2022. ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: CLASSIFICATION. (http://www.calacademy.org/scientists/catalog-of-fishes-classification/). Vaadatud 24.04.2022.

Van West, P. 2006. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. Mycologist 20: 99-104.

Windsor, D. A. 1998. Controversies in parasitology, Most of the species on Earth are parasites. International Journal for Parasitology 28: 1939–1941.

Lisa 1. Sagedusjaotused



Erinevate valimite sagedusjaotused on: A) n = 24; B) n = 24; C) n = 23; D) n = 23; E) n = 20; F) n = 20; G) n = 20; H) n = 20; I) n = 20; J) n = 20.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Jürgen Karvak,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Oomütseedist parasiidiga *Saprolegnia* Nees, 1823 nakatumise mõju atlanti lõhe (*Salmo salar*) noorkalade kortisoolitasemetele Keila ja Kunda jões“, mille juhendajad on Roland Svirgsden ja Richard Meitern, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Jürgen Karvak

25.05.2022