



EESTI MAAÜLIKOOL
Põllumajandus- ja keskkonnainstituut
Limnoloogiakeskus



Ettekasvatatud angerja keemiline määrgistamine

ARUANNE

Koostajad: Maidu Silm
Ain Järvalt
Priit Bernotas

Tartu 2017

Sisukord

1. Sissejuhatus.....	3
2. Kirjanduse ülevaade.....	4
2.1 Märgistamine transpordil.....	4
3. Metoodika.....	5
3.1 Märgistamine ja asustamine	5
3.2 Märgise tuvastamine.....	6
4. Tulemused.....	6
4.1 Märgistamine eluskala transpordil	6
4.2 Viljandi järve angerjate massmärgistamine	8
5. Arutelu	10
6. Kokkuvõte.....	12
Summary	12
7. Kasutatud kirjandus	13

1. Sissejuhatus

Euroopa Komisjoni määrusest (Council Regulation (EC) No 1100/2007) ja Eesti angerjamajanduse tegevuskavast (EMP) lähtuvalt (Järvalt, 2008), on vaja hinnata looduslikku angerja rännet siseveekogudesse ja rändele suunduvate angerjate väljapääsu võimalusi kudealale. Narva jõe vesikonda looduslikult angerjad ei pääse alates 1950-datest aastate algusest, kui valmis Narva hüdroelektrijaam. Kuna rändangerjate pääs merre on läbi hüdroelektrijaama tagatud, siis asustamine Euroopa Komisjoni määrusest tulenevalt on lubatud (Järvalt *et al.*, 2010).

Kalade märgistamisest saadav informatsioon on abiks kalavarude jätkusuutlikul majandamisel. Massmärgistamisel saab märgistada palju kalu korraga võrrelduna teiste märgistamiste meetoditega. Keemilise märgistamise protseduur ei häiri kalade elutegevust ega mõjuta nende söödavust (Williamson *et al.*, 2009). Angerjate massmärgistamist on soovitanud ka Rahvusvaheline Mereuurimuse Nõukogu (EIFAAC/ICES, 2011). Tänu märgistamisele on tulevikus võimalik hinnata angerjate rändeid nii Eesti siseveekogudes kui ka Läänemeres. Keemiliselt märgistatud kalad annavad täpset informatsiooni iga analüüsitud kala asustamise aja ja vanuse kohta, mis läbi on angerjavarusid võimalik täpsemalt hinnata.

Käesoleva projekti käigus vannitati keemilise märgistamise eesmärgil kõik 2016. aastal Eestisse asustatud ettekasvatatud angerjad (ca 221 200 tk). Lisaks massmärgistati samal aastal Viljandi järve asustatud ettekasvatatud angerjad kahel korral – 15 000 ja 5400 tk. Euroopa Kalandusfondi toel on Eesti järvedesse asustatud angerjaid varasemalt massmärgistatud 2014. ja 2015. aastal (Silm *et al.*, 2015).

Projekti valmimisele aitasid kaasa asustusmaterjali hanke võitnud Interfish Balti AS, Hollandi kalakasvandus Koman's Vishandel B.V., Viiratsi angerjafarm BM Trade OÜ, TÜ Mereinstituut, TÜ geoloogia osakond ning FIE Taavi Kobin. Samuti täname kalureid ning vabatahtlikke, kes otseselt või kaudselt olid projektiga seotud.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1 Märgistamine transpordil

Eluskala transpordi käigus on seni oksütetratsükliiniga märgistatud ahvenlaste sugukonda kuuluvaid maime (Fielder, 2002). Klaasangerjate püügi ja müügiga tegeleva ettevõtte UK Glass Eels Ltd andmetel on neil õnnestunud massmärgistada transpordi käigus klaasangerjaid oksütetratsükliiniga. Teadaolevalt ei ole angerjaid transpordi käigus rohkem märgistatud.

Klaasangerjast suurema eluskala transpordil peab olema tagatud vee kvaliteet ja piisav õhustamine. Äärmiselt olulised on optimaalne vees lahustunud hapniku sisaldus, madal süsihappegaasi tase ja pH ning viimasest sõltuv ammoniaagi hulk vees. Transpordil tekitavad kaladele stressi ümberlaadimine, sorteerimine ja transport (Boerrigter *et al.*, 2015). Oma olemuselt toimub ettekavatatud angerjate massmärgistamine eelmainitud parameetrite alusel, suletud veeringes strontsiumkloriidi (SrCl_2) lahuses 1 g/L, tavaliselt kuni 24 tundi. Varasemad katsed märgistada baariumkloriidiga (BaCl_2) kontsentratsioonil 0.75 g/L pole õnnestunud (Wickström & Sjöberg, 2014). Sarnaselt transpordile tuleb ka siin tõsta kalu kaks korda – esmalt märgistuslahusesse ja seejärel tagasi puhtasse vette.

Vee parameetritest lähtuvalt on ka transpordi käigus massmärgistamine võimalik. Oluliselt rohkem stressi põhjustab kalade massmärgistamine kohe peale transporti, sest siis tuleb lisaks kalu veel vähemalt ühe korra ümber tõsta ning pikeneb aeg mille järel kalad veekogusse lastakse. Isegi kui kaladele jäetakse aega aklimatiseerumiseks, tähendab see täiendavaid kalakasvanduse ülalpidamise kulusid, kalade toitmist ja ümbertõstmist märgistuslahusesse. Kala seisukohast on parem nad esimesel võimalusel lasta looduslikku vette.

3.1 Märgistamine ja asustamine

Viljandi järve asustati Viiratsi Angerjafarmist BM Trade OÜ ostetud ettekasvatatud angerjad, kes massmürgistati vahetult enne asustamist samuti käesoleva projekti raames (tabel 1). Asustamine sai teoks paljude kalahuvilistest annetajate toel ja FIE Taavi Kobin organiseerimise tulemusel. Talletunud mürgise analüüsiks võetud valim, kokku 30 kala, kasvatati akvaariumites esimesest asustamisest 4 kuud ja baarium mürgistatud kalu 2.5 kuud enne kui nad edasise analüüsi tarbeks sügavkülmutati.

Järel kasvatamisel toideti angerjaid merelist päritolu Skretting graanulitega 1 kuni 3 korda päevas ja vahetati akvaariumivett üle kolme-nelja päeva ca 50 % ulatuses. Massmürgistamisest tulenenud suremust ei täheldatud.

Järv	Märgistus			Temperatuur (°C)			Asustamise kuupäev	Keskm. kaal (g)	Isendite arv
	Aine	Sisaldus g/L	Aeg tund	Transpordi algul	Mahut	Vee-kogu			
Võrtsjärv	SrCl ₂	0.4	40	15	18	17.8	22.06.	11.5	193 000
Saadjärv	SrCl ₂	0.4	53	15	18.2	20.3	23.06.	8	10 400
Kaiavere	SrCl ₂	0.4	52	15	18.2	20.1	23.06.	8	6 500
Kuremaa	SrCl ₂	0.4	50	15	17.8	17.8	23.06.	8	5 100
Vagula	SrCl ₂	0.4	55	15	18.5	21.2	23.06.	8	6 000
Viljandi	SrCl ₂	1.05	30	25	N/A	N/A	17.06.	1.8	15 000
Viljandi	BaCl ₂	0.3	24	23.2	N/A	N/A	31.08.	2.5	5 400
Kokku:								241 400	

3.2 Märgise tuvastamine

Märgise tuvastamiseks varasemalt sügavkülmutatud kalad sulatati, eemaldati kuulmekivid, puhastati ning hoiustati kuivalt eppendorfi tuubides. Seejärel valati otoliidid läbipaistvasse Buehler epoksiidvaiku. Proovid lihviti ja poleeriti Tartu Ülikooli Eesti Mereinstituudi laboris lihvijaga Buehler Metaserv 250 kuni tuumani. Seejärel lihviti need teiselt poolt õhukeseks (ca 0.45mm), lõigati skalpelliga väiksemaks ning liimiti nummerdatult alusklaasile.

Kokku võeti analüüsiks 60 massmärgistatud angerjat, kellest 36 olid toodud Hollandi kasvandusest ja 24 Viiratsi kasvandusest, kusjuures erinevatest massmärgistatud ja asustatud partiidest mõlemast 12 kala. Analüüs teostati Tartu Ülikooli Geoloogia osakonnas kasutades laserablatsioonisüsteemi Cetac LSX-213 G2+ koos HelEx proovikambriga, mis oli ühendatud induktiivsidestatud plasma mass-spektromeetriga Agilent 8800 QQQ ICP-MS. Laseri liikumise kiirus sirgel trajektooriga oli 2 µm/s ja laserkiire punkti diameeter 20 µm. Laseri lainepikkus oli 213 µm, impulsi pikkus 10 ns ning pulsi sagedus 10 Hz. Plasmagaasina kasutati puhta argooni ja heeliumi segu. Gaase kasutati proovimaterjalide plasmasse kandmiseks. Otoliitidelt analüüsiti ^{43}Ca , ^{44}Ca , ^{86}Sr , ^{88}Sr , ^{137}Ba ja ^{138}Ba isotoope.

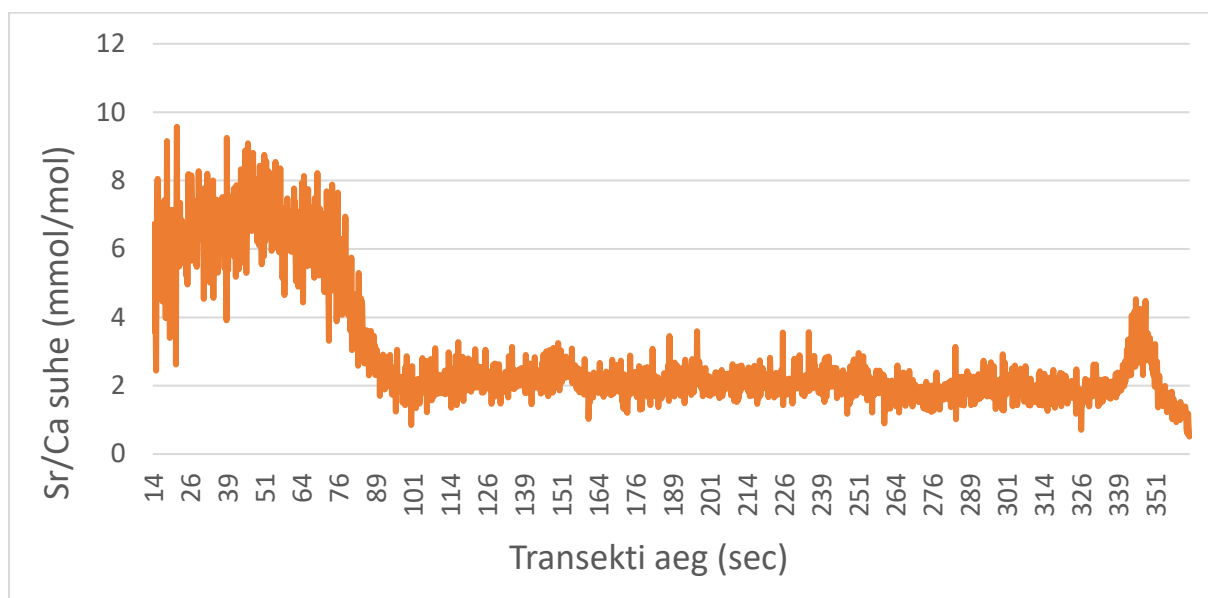
Märgise elementide suhet võrreldi kasvanduse perioodil, vahetult enne märgise tekitamist ja märgistamise ajal. Maksimaalseks (max) väärtuseks võeti märgise alas 1 sekundi pikkune aeg, mis vastab 2 µm pikkusele alale otoliidil.

Täiendavalt prooviti nõrka märgist otoliitidelt tuvastada Tartu Ülikooli Geoloogia osakonnas skaneeriva elektronmikroskoobiga (SEM) EDS (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) režiimis.

4. Tulemused

4.1 Märgistamine eluskala transpordil

Analüüsitud 36 angerja otoliidist suudeti strontsiummärgis tuvastada selgelt 35 kalal. Joonisel 1 on toodud näitena ühe edukalt massmärgistatud angerja otoliidi elementsisaldus, kus sekundite vahemik 0-95 kajastab eelvastse ja klaasangerja elu ookeani soolases vees. Vahemikku 95 kuni 337 jääb kasvanduse periood ja vahemikus 337 kuni 350 on näha massmärgistamisest tekkinud strontsiumi kõrgemat sisaldust.

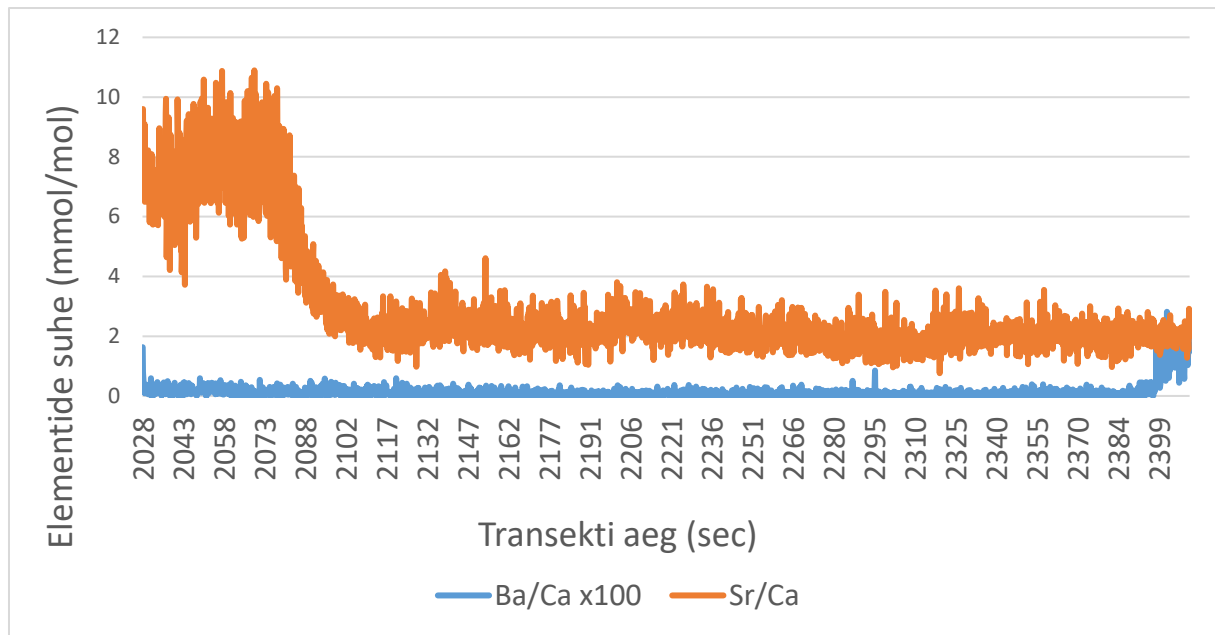


Joonis 1. Strontsiumkloriidiga massmärgistatud angerja otoliidi Sr/Ca sisaldus. Vasakult paremale on näidatud otoliidi Sr/Ca koostis angerja sünnist surmamiseni

Ainult ühe angerja otoliidil ei suudetud selget märgist tuvastada. Tabelis 2 on toodud selle isendi täpsemad elementide parameetrid ja joonisel 2 sama kala elementkoostis. Sellel angerja otoliidil võib tähendada kasvanduse perioodil isegi kõrgemat Sr sisaldust kui märgise alas. Vahetult enne märgist oli siiski madalam Sr sisaldus. Analüüsides baariumi sisaldust, näeme et enne märgise ala oli Ba sisaldus tõusnud kasvanduse perioodiga võrreldes üle 9 korra ning märgise alas üle 14 korra. Sarnaselt eelnevaga olid kõrgema Ba märgisega ka teised Hollandist tarnitud angerjate otoliidid. Täiendavad analüüsid SEM EDS režiimis paremat tulemust ei näidanud, mistõttu neid siin ka ei kajastata.

Tabel 2. Nõrga strontsiumi märgisega angerja otoliidi elementkoostis.

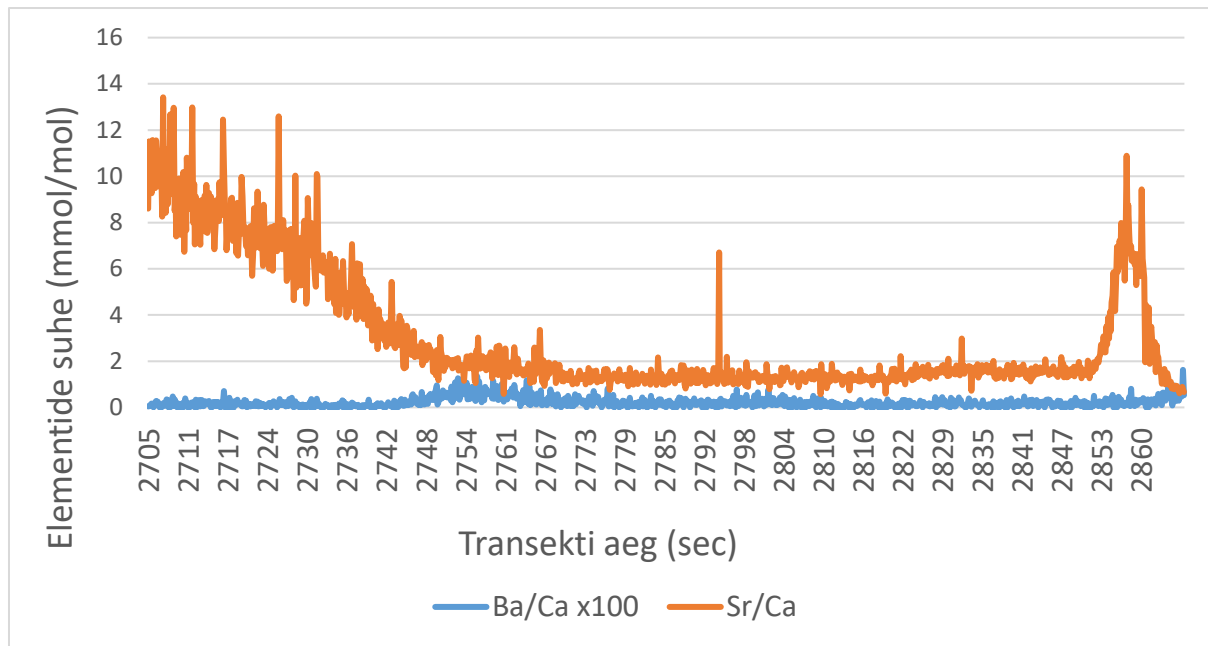
Isend nr. 15	Märgise ala ⁸⁸ Sr		Sr/Ca suhe		Märgise ala ¹³⁸ Ba		Ba/Ca suhe	
	Keskmine	Max	Keskmine	Max	Keskmine	Max	Keskmine	Max
Märgise ala	561894	638243	2.013	2.030	6227	6339	0.0122	0.0127
Enne märgist	502471	509809	1.901	1.925	3889	3894	0.0075	0.0087
Kasvanduse ala	614329	n/a	2.143	n/a	424	n/a	0.0007	n/a



Joonis 2. Nõrga strontsiumi märgisega angerja otoliidi elementkoostis

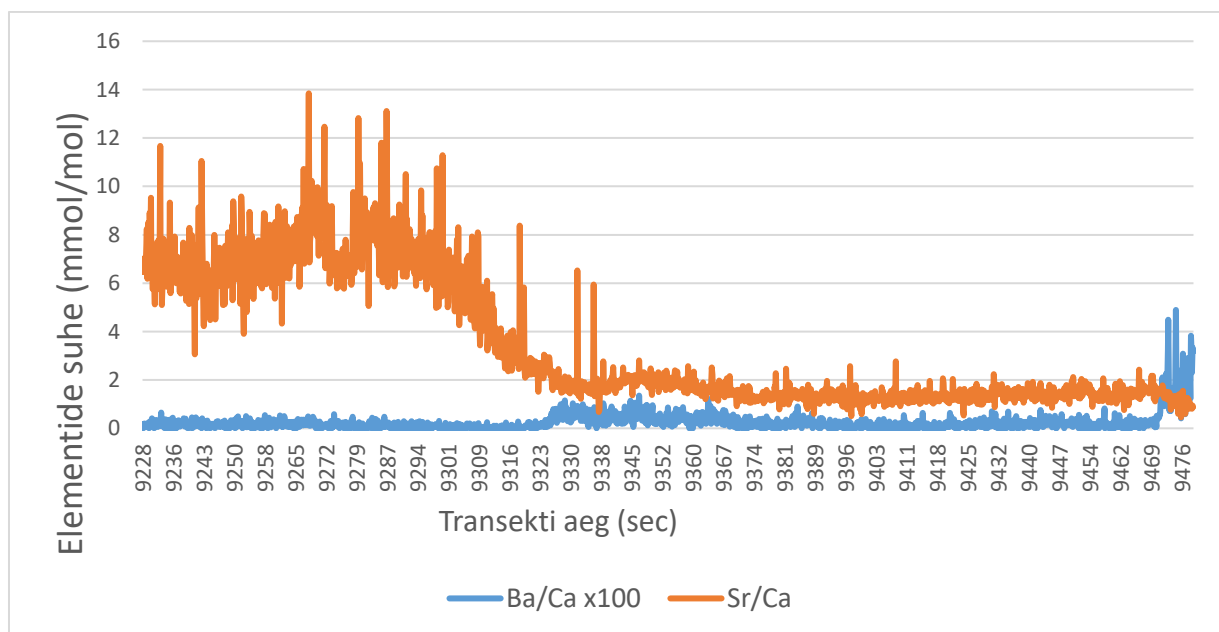
4.2 Viljandi järve angerjate massmärgistamine

Lisaks Hollandist toodud angerjatele märgistati edukalt ka samal aastal Viljandi järve asustatud ettekasvatatud angerjad. Esimesel asustamisel kasutati samuti strontsiumkloriidi lahust (tabel 1). Sellest märgistamisest võeti analüüsimiseks 12 kala, millest kõigil tuvastati selge märgis (tabel 3). Joonisel 3 on toodud ühe SrCl_2 märgistatud angerja otoliidi analüüsi näidis, kus vahemikus 2855-2860 on näha selge Sr taseme tõus.



Joonis 3. Viljandi järve asustatud ettekasvatatud angerja strontsiumiga märgistatud otoliidi elementide suhe

Teisel korral märgistati Viljandi järve asustatavad ettekasvatatud angerjaid baariumi lahuses (tabel 1). Valimisse võetud 12 isendi otoliidi elementkoostised näitasid kõigil juhtudel kõrgemat Ba sisaldust (tabel 3; joonis 4).



Joonis 4. Baariumiga märgistatud Viljandi järve angerja otoliidi profiil, märgise ala jääb vahemikku 9473-9476 sek

Tabel 3. Massmärgistuse andmed.

Päritolu	Märgistusaine	Analüüsitud (tk)	Tuvastatud (tk)	Edukus (%)	Märgistatud (TK)
Holland*	SrCl ₂	36	36*	100	221 000
Viljandi	SrCl ₂	12	12	100	15 000
Viljandi	BaCl ₂	12	12	100	5 400
Kokku:					241 400

Holland* - Võrtsjärve, Saadjärve, Kuremaa, Kaiavere ja Vagula järve asustatud angerjad.

36* - Sr tuvastatud isendite hulgas ühel nõrga märgisega isendil leiti alternatiivse märgisena kõrgem Ba sisaldus.

5. Arutelu

Teadaolevalt oli transpordi käigus ettekasvatatud angerjate massmärgistamine esmakordne. Vähendamaks riske, mis transpordi käigus võisid tekkida, otsustati algse 1 g/L SrCl₂ asemel kasutada nõrgemat lahust – 0.4 g/L. Ühtlasi tuli arvestada ka võimalike viivitustega teel, mis võivad transpordi aega pikendada. Koman's Vishandel B.V. omaniku Jaco Komani sõnul võib kalade transport pikeneda asjaoludest sõltuvalt paarist tunnist kuni ühe ööpäevani.

Transpordi aega, temperatuuri ja märgistusaine kogust arvestades olid tulemused ootuspärased. Hollandist toodud kaladel oli vaid ühel otoliidil valimist nõrk ja raskesti tuvastatav märgis (tabel 2, joonis 2). Nii antud Hollandi angerjakasvanduses, kui ka Viiratsi angerjafarmis BM Trade OÜ tehakse kasvatuse käigus angerjatele regulaarselt soolavanne, stimuleerimaks immuunsust, toitumist ja pärssimaks parasiitide levikut. Soolases vees on Sr sisaldus suurem kui magevees (Rohtla *et al.*, 2012) Kuna angerjakasvandused on retsirkulatsiooni süsteemiga ehk taaskasutavad vett väga suurel hulgal, siis kulub palju aega kuniks soolane vesi süsteemis on täielikult vahetunud ja ilmselt sellega on seletatav ka üldine suurem Sr sisaldus kasvanduse perioodil. Samal ajal kasutavad angerjad kasvamisel ära vees leiduvaid mikroelemente, sealhulgas baariumit. Vahetult enne transporti vahetati kasvanduse vesi suures hulgas puhta mageda vee vastu, mis kajastus enamikel analüüsitud otoliitidel enne märgist kõrgema Ba ja pisut väiksema Sr sisalduses. Eluskala auto mahutitesse juurde lisatud SrCl₂-ga tõusis koos strontsiummärgisega ka baariumi sisaldus. Angerja toiduks, nii kalakasvanduse perioodil, kui ka märgise järel kasvatamiseks, kasutati merelist päritolu angerja graanulit.

Nõrgemast massmärgistamise lahusest tingituna ladestus kaladele ka nõrgem Sr märgis. Võrrelduna 2014 aastal kasvanduses massmärgistatud ettekasvatatud angerjatega, oli seekord

märgistusaeg oluliselt lühem ja kontsentratsioon madalam (Silm *et al.*, 2015). Nii kasvanduses kui ka transpordi käigus massmärgistamisel suurenenud suremust ei tähendatud. Soovitame sarnasel transpordi käigus massmärgistamisel kasutada üle kahe korra kangemat lahust ehk 0,7 kuni 1 g/L SrCl_2 . Samuti pikem transpordi aeg suurendab aine ladestumist.

Annetatud raha toel Viljandi järve asustatud ettekasvatatud angerjad massmärgistati samuti käesoleva projekti raames. Mõlemal korral nii SrCl_2 -ga kui ka BaCl_2 -ga märgistamisel oli edukus 100%. Huvitav on märkida, et märgistamisel BaCl_2 -ga osutusi antud katses kõik kalad märgistatuks, kusjuures Rootsi teadlaste andmeil ei ole nende märgistamised BaCl_2 -ga nii edukaks osutunud (Wickström & Sjöberg, 2014). H. Wickström'i suulistel andmetel ei analüüsinud nad Ba märgisega angerja otoliite tulenevalt analüüsimeetodist päris servani välja, mis võis mõjutada märgise tuvastamist. Käesoleva uurimuse raames osutus BaCl_2 -ga märgistamine edukaks juba kontsentratsioonil 0.3 g/L, mis on enam kui kaks korda madalam kontsentratsioon, mida kasutasid rootslased (Wickström & Sjöberg, 2014). Kuigi Ba märgis ladestus edukalt ja suremust ei täheldatud, oli märgata angerjate passiivsust. Kui SrCl_2 lisamisel ei täheldatud märkimisväärset mõju angerja käitumisele, siis BaCl_2 lisamisel 0.3 g/L oli märgata mõningast ujumise aktiivsuse langust. Pärast märgistamist angerjad taastusid pealtnäha kiiresti, kuid võrreldes SrCl_2 märgistatud kaladega hakkasid toituma hiljem. Ilmselt oli see põhjustatud suuremast stressist märgistamise ajal. Stressi leevendamiseks võib proovida märgistada angerjaid 3 – 5 päeva kontsentratsioonil 0.05 – 0.1 g/L BaCl_2 .

Viljandi järve asustatud angerjatel on võimalus pääseda läbi Raudna, Halliste, Navesti ja Pärnu jõe merre.

Käesoleva projekti raames massmärgistatud angerjad hakkavad hinnanguliselt püükidesse jõudma alates aastast 2021. Hilisemad otoliitide analüüsid juhuslikust valimist võimaldavad hinnata ettekasvatatud angerjate põlvkonna suremust, kasvukiirust ja rändeid, mis on aluseks angerjavaru paremal majandamisel.

Projekti kõige olulisema tulemusena selgus, et transpordi käigus on ettekasvatatud angerjate massmärgistamine võrdlemisi kergesti teostatav, juhul kui on tagatud kaladele transpordil vee kvaliteet. Tagamaks otoliidile piisavalt tugeva märgise tekkimist, tuleb valida sobiv märgiseaine kontsentratsioon, mis omakorda sõltub veetemperatuurist transpordimahutites ja sõidu kestvusest.

6. Kokkuvõte

Kalade märgistamine on efektiivne meetod kalavarude teaduspõhiseks majandamiseks. Teadaolevalt oli transpordi käigus ettekasvatatud angerjate massmärgistamine esmakordne kogemus maailmas. Transport Hollandist Eestisse vältas 40 tundi. Mahutivette oli lisatud strontsiumkloriid, lahuse kontsentratsioon oli 0.4 g/L, mille käigus said ca 221 000 angerjat otoliidile eristuva nõ „keemilise markeeringu“. Märgistamise edukus oli 100%. Keemiliselt märgistatud angerjatest 85% asustati Võrtsjärve ja 15% väikejärvedesse (Saadjärv, Kaiavere, Vagula ja Kuremaa järv).

Viljandi järve asustati ettekasvatatud angerjaid kahel korral kokku ca 20 400 isendit. Käesoleva projekti raames õnnestus massmärgistamine mõlemal korral 100 %. Esimesel asustamiskorral märgistati kõik 15 000 isendit strontsiumkloriidi lahuses 1.05 g/L. Teisel asustamiskorral märgistati 5 400 ettekasvatatud angerjat baariumkloriidi lahuses (0.3 g/L).

Summary

Chemical mass-marking is an effective way to tag high number of fish with relatively small amount of work and price. Marked specimens give essential information on the size, growth, migration and behavior of the studied fish stock. In this study pregrown eels were successfully mass marked during the 40 to 55 hour transportation from Netherlands to Estonia. The concentration of the SrCl_2 marking chemical were 0.4 g/L and the temperature ranged from 15 °C from the beginning to approx 18 °C til stocking. The weight of the eels ranged from 5-10 and 10 to 15 gramms, with total of 221 000 specimens. For mark detection from the otolith a 213 nm LA-ICP-MS was used. To have a stronger strontsium mark on the otolith a concentration of SrCl_2 between 0.7 - 1 g/L would be recommended. Extended bathing time in the chemical would also strengthen the mark.

Additionally, 15 000 pregrown eels (1 – 3 g) were successfully marked with SrCl_2 (1.05 g/L) at a temperature of 25 °C for 30 hours. For another 5 400 pregrown eels BaCl_2 (0.3 g/L) for 24 hours at 23.2 °C was successfully used. No mortality was observed due to mass marking but greater stress for fishes in BaCl_2 solution was noticed. Lower BaCl_2 concentration and longer bath time may cause less stress for the fish.

7. Kasutatud kirjandus

- Boerrigter, J. G. J., Manuel, R., van den Bos, R., Roques, J. A. C., Spanings, T., Flik, G. & van de Vis, H. W. (2015) Recovery from transportation by road of farmed European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture Research*. 46, 1248–1260.
- Council regulation (EC) No 1100/2007. 18 September 2007. Establishing measures for the recovery of the stock of European eel. L 248/17-23
- EIFAAC/ICES. (2011) The report of the 2011 Session of the Joint EIFAAC/ICES Working Group on Eels. Lisbon, Portugal. 5 - 9 September 2011. ICES CM 2011/ACOM:18. 244 pp.
- Fielder, D. G. (2002) Methodology for Immersion Marking Walleye Fry and Fingerlings in Oxytetracycline Hydrochloride and Its Detection with Fluorescence Microscopy. Michigan Department of Natural Resources, Fisheries Division. 22 pp.
- ICES. (2009) Workshop on Age Reading of European and American Eel. Bordeaux, 20-24 April, 2009. Copenhagen. 68 pp.
- Järvalt, A. (2008) Eel management plan. 22 pp.
- Järvalt, A., Kask, M., Krause, T., Palm, A. & Tambets, M. (2010) Potential Downstream Escapement Of European Eel From L. Peipsi Basin (Estonia-Russia). 467, 6. 1-11.
- Rohtla, M., Vetemaa, M., Urtson, K. & Soesoo, A. (2012) Early life migration patterns of Baltic Sea pike *Esox lucius*. *Journal of Fish Biology*. 80, 886–893.
- Silm, M., Järvalt, A. & Mäe, A. (2015) Angerja keemiline märgistamine. Eesti Maaülikooli põllumajandus- ja keskkonnainstituut. Aruanne. 21 pp.
- Wickström, H. & Sjöberg, N.B. (2014) Traceability of stocked eels - the Swedish approach. *Ecology of Freshwater Fish*. 23, 33–39.
- Williamson, D.H., Jones, G.P., Thorrold, S.R. & Frisch, A.J. (2009) Transgenerational marking of marine fish larvae: stable-isotope retention, physiological effects and health issues. *Journal of Fish Biology*. 74, 891–905.

LISAD



Joonis 5. Angerjaid Hollandist Eestisse transportinud eluskala auto (foto: M. Silm)



Joonis 6. Eluskala auto mahutites toimub intensiivne vee aereerimine (foto: M. Silm)