

Mikrobiālās ķēdes elementu daudzveidība Latvijas teritoriālajos ūdeņos

**Eiropas Savienības Eiropas Jūrlietu, zvejniecības un
akvakultūras fonda finansēts projekts “Pētījumi
zināšanu uzlabošanai par jūras vides stāvokli integrētās
jūrlietu politikas ieviešanai” (NR 24-00-U1010801-000001)**

Līguma Nr. IL/58/2024 (12.06.2024)



Zemkopības ministrija



Lauku atbalsta dienests



Klimata un enerģētikas
ministrija

Izpildītājs: **Latvijas Hidroekoloģijas institūts**

Rīga, 2025

Saturs

Saturs	1
1. Ievads	2
2. Materiāli un metodes.....	4
2.1. Plūsmas citometra metodes	4
2.2. Vides DNS noteikšanas metodes	5
3. Rezultāti un diskusija.....	6
3.1. Plūsmas citometra metodes aprobācija un analīžu rezultāti	6
3.1.1. Metodes pielāgošana - parauga iekrāsošana ar proflavīnu	6
3.1.2. Paraugu analīze – aprīļa paraugi kā piemērs	7
3.1.3. Salīdzinājums filtrēšanas sietiem	10
3.1.4. Dziļuma ietekmes mērījumi	11
3.1.5. Eksperiments ar aļģu kultūrām.....	13
3.1.6. Datu failu analīze ar citām datu apstrādes programmām.....	14
3.2. DNS analīžu rezultāti.....	15
4. Secinājumi	18
5. Rekomendācijas jūras vides monitoringam un turpmākai metožu attīstībai	19
LITERATŪRA.....	21

1. Ievads

Mikroorganismi, kas veido mikrobiālās ķēdes, pārstāv vairākas funkcionāli ļoti atšķirīgas organismu grupas. Baltijas jūras pelāģiskajā ekosistēmā pārsvarā ir sastopamas baktērijas, autotrofās aļģes, heterotrofiski organismi (protozoa), miksotropi organismi (var funkcionēt gan kā autotrofi, gan kā heterotrofi), mikrozooplanktons (kopepodas, kladoceras). Mikroorganismu kopējā biomasa salīdzinājumā ar sauszemes augiem ir relatīvi neliela, bet to produktivitāte būtiski pārsniedz sauszemes augu produktivitāti.

Apskatot mikroorganismu lomu jūras ekosistēmā, ir divi lieli izaicinājumi. Pirmais ir mikroorganismu kvantificēšana, un otrais ir sugu sastāva noteikšana. Sugu sastāva noteikšana ir būtiska ekosistēmas analīzes komponente, jo ir svarīgi apzināt mikroorganismu sadalījumu pa funkcionālām nišām. Respektīvi, mikroorganismi veido nosacītu ciklu, kur viena sugu grupa patērē izšķīdušo organisko materiālu un izdala neorganiskos slāpekļa un fosfora savienojumus, kurus savukārt asimilē autotrofi fotosintezējoši organismi, un ciklu noslēdz heterotrofi mikroplanktona organismi, kas pārtikā patērē citus organismus un izdala organiskos izšķīdušos savienojumus.

Šai etapā pētījumi tika fokusēti uz planktoniskajiem mikroorganismiem, jo fitoplanktons (mikro, piko un nanoplanktons) ir viens no galvenajiem primārās produkcijas ražotājiem Baltijas jūras ekosistēmā, un tā sastāva un daudzuma izmaiņas tieši ietekmē barības ķēdes struktūru, bioķīmiskos ciklus un ūdens kvalitāti (*Kuliński u.c., 2022*). Tāpēc regulārs fitoplanktona monitorings ir būtisks jūras vides stāvokļa novērtēšanai Eiropas Jūras stratēģijas pamatdirektīvas un Baltijas jūras rīcības plāna ietvaros. Tradicionāli Baltijas jūrā fitoplanktona monitorings tiek veikts, izmantojot HELCOM standartizētas metodes (*HELCOM, 2024*), kas nodrošina labu datu kvalitāti, salīdzināmību starp reģioniem. Sugu identificēšana balstās uz šūnu morfoloģiskām pazīmēm, izmantojot gaismas mikroskopu. Tomēr šī metode ir laikietilpīga, prasa augstas taksonomiskās zināšanas un ir ierobežota ļoti mazu šūnu (<10 µm) vai morfoloģiski mainīgu sugu noteikšanā.

Attiecīgi, lai iegūtu pilnvērtīgāku ieskatu ūdens ekosistēmu procesos, ir nepieciešams pētīt arī mazākus organismus kā pikoplanktonu un bakterioplanktonu, kas ir izmēros no 0,2 µm līdz 2 µm. Tiek lēsts, ka pikocianobaktērijas *Prochlorococcus* un *Synechococcus* ģintis veido aptuveni 25% no okeāna primārās produktivitātes. To globālā izplatība padara *Prochlorococcus* un *Synechococcus* par būtisku jūras barības tīklu sastāvdaļu, galvenokārt piegādājot fiksētu oglekli augstākajiem trofiskajiem līmeņiem (*Flombaum et al. 2013*).

Pikoplanktons LHEI tiek analizēts kopš 2010.gada, taču novērojumi tika veikti tikai atsevišķās Rīgas līča stacijās, kurās tiek ievākts arī fitoplanktons. Paraugus ievāc paralēli fitoplanktona paraugiem ar plastmasas cauruli 0-10m ūdens slānī. Analizēti ar epifluorescences mikroskopijas metodi, kas ietver paraugu fiksēšanu glutāraldehīdā, filtrēšanu uz melniem 0.2 µm poru izmēra Nuclepore polikarbonāta filtriem un iekrāsošanu ar proflavīna krāsvielu (*HAAS 1982, Hobbie et al., 1977*).

Epifluorescences mikroskopijas metode ir laukietilpīga un mūsdienās aizvien vairāk pikoplanktona analīzei tiek izmantota plūsmas citometrija, jo šī metode ļauj izanalizēt ievērojami lielāku paraugu skaitu.

Pikoplanktons sāk kļūt par populārāku pētījumu objektu, jo šobrīd ūdens ekosistēmu barības ķēžu pētījumos trūkst datu par šo organismu grupu. Šogad ir izveidota jauna HELCOM darba grupa EG Pelagic, kuras darbības princips ir sniegt pārskatu par pelaģisko dzīvotņu stāvokli un kā viens no interešu objektiem ir pikoplanktons. Plūsmas citometrija ir veids kā iegūt lielu datu apjomu un paplašināt pētījumu virzienus.

Savukārt sugu noteikšanas virzienā pēdējos gados arvien vairāk tiek strādāts pie vides DNS (eDNS) metožu attīstības, piemēram, metabarkodēšanas, kas ļauj identificēt fitoplanktona un mikrozooplanktona taksonus, izmantojot molekulāros marķierus. Atšķirībā no mikroskopijas eDNS noteikšana nav atkarīga no šūnu lieluma vai morfoloģijas (*Taberlet et al., 2018; Deiner et al., 2017*). Līdz ar to DNS ļauj konstatēt sugas, ko mikroskopējot ir grūti vai neiespējami noteikt, un tādējādi rezultāti varētu aptvert plašāku bioloģiskās daudzveidības spektru. Šīs metodes piemērošana gan lielā mērā ir atkarīga no starptautiskajās DNS datubāzēs pieejamās references (šūnu DNS fragmentu) informācijas, kas Baltijas jūras sugām vēl nav pilnīga. Papildus jāņem vērā, ka sekvenēšanas rezultātu nolasījumu ("reads") skaits ne vienmēr atspoguļo sugas faktisko biomasu.

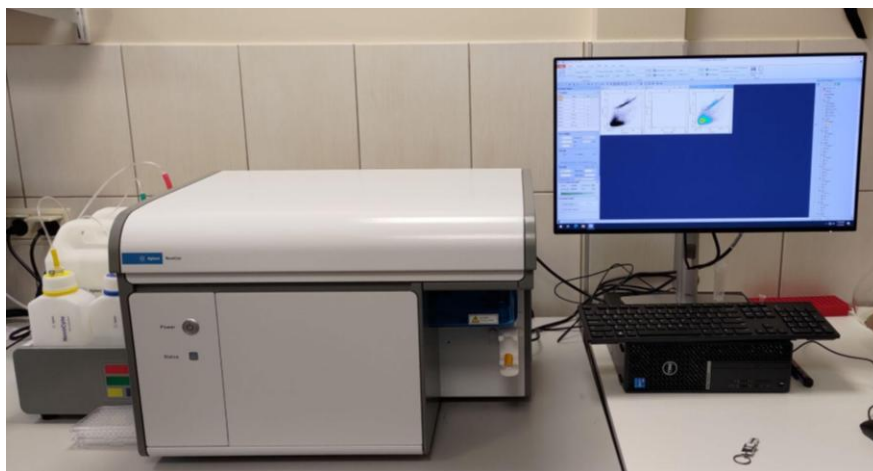
Attiecīgi, 2024. gadā tika izmantota Ziemeļvalstu Ministru padomes fonda projekta "Reliable e-DNA-based detection of planktonic biodiversity and invasive species – standardisation of minimum sample volume (BioStandard)" radītā iespēja testēt metodi arī Latvijas ūdeņos. Kopumā testēšanā piedalījās pētnieki no 10 valstīm, un tika ievākti paraugi no 13 vietām Baltijas jūrā, Ziemeļjūrā un Atlantijas okeāna ziemeļrietumos (*Silvever u.c., 2025*). Projekta mērķis bija noskaidrot un standartizēt minimālo parauga tilpumu, kas nepieciešams DNS analīzēm, lai noteiktu statistiski ticamu fitoplanktona un mikrozooplanktona sugu daudzveidību. Parādīt, ka DNS metodes ir iekļaujamās jūras monitoringā un ir salīdzināmas ar citām tradicionālām metodēm, un ir pielietojamas potenciāli toksisko un invazīvo sugu monitoringā.

2025. gada projekta nodevuma publikācijā (*Silvever u.c., 2025*) tika apkopoti pirmie projekta BioStandard rezultāti, kuros dažādās Baltijas un Ziemeļjūras vietās tika salīdzināta DNS metabarkodēšana ar tradicionālo mikroskopijas metodi. Ziņojuma secinājumi parādīja, ka DNS metodes ir daudzsoļošas un savstarpēji papildina tradicionālos monitoringa paņēmienus, taču nepieciešama tālāka protokolu standartizācija un rezultātu salīdzināmības uzlabošana.

Šajā ziņojumā uzmanība tiek pievērsta tieši LHEI iegūtajiem rezultātiem Rīgas līcī, kur DNS un mikroskopijas metodes tika salīdzinātas detalizētāk. Analīze ļauj izvērtēt abu metožu priekšrocības un ierobežojumus vietējā kontekstā un papildina BioStandard projekta kopsavilkumu ar padziļinātāku izpēti.

2. Materiāli un metodes

2.1. Plūsmas citometra metodes



1.Attēls. Plūsmas citometrs Agilent NovoCyte

2025.gada aprīlī tika iegādāts un uzstādīts Agilent NovoCyte 2060R sērijas plūsmas citometrs (*1.Attēls*), kas spēj uztvert daļiņas izmēros no 0,2 līdz 50 μm . Parauga caurulītes diametrs ir 50 μm , taču fitoplanktona šūnu un detrīta izmēri mēdz būt lielāki, tāpēc, lai izvairītos no plūsmas citometra sistēmas nosprostošanās, pirms parauga analīzes nepieciešams veikt filtrēšanu, lai atdalītu lielākās daļiņas.

NovoCyte Advanteon ir 3 lāzeri (lietotājs var izvēlēties konfigurāciju, izmantojot 405 nm, 488 nm, 561 nm un 640 nm viļņa garuma lāzerus). Mums ir komplektācija ar 488nm un 640nm lāzeriem.

Katram fluorescences kanālam NovoCyte citometrā atbilst atsevišķs detektors, kas uztver konkrēta spektra emisiju. Šāda detektoru sistēma nodrošina ļoti plašu signālu diapazonu un augstu jutību, ļaujot vienlaikus precīzi izmērīt gan vājus, gan ļoti spilgtus signālus. Advanteon konfigurācijā ir aptuveni 21 fluorescences kanāls, kas ļauj uztvert lielu daļiņu daudzveidību. Papildus fluorescences kanāliem instruments mēra arī priekšējās un sānu gaismas izkliedes signālus (FSC un SSC), šie detektori ļauj analizēt šūnu izmēru un granularitāti.

Instruments paraugus ievada caur paraugu zondi (SIP – *sample injection probe*) no mēģenes un analīzei izmanto 1,5 ml mikrocentrifūgas mēģenes (Eppendorf tipa). Katrs paraugs pēc mērīšanas tiek automātiski izskalots (gan zondes iekšpusē, gan ārpusē) ar mazgāšanas šķīdumu, lai novērstu paraugu pārnesei. Šī sistēma spēj nodrošināt <0,1% paraugu pārnesei starp paraugiem.

NovoCyte citometrs izmanto precīzu šļirces sūkņa tipa parauga padevi, kas nodrošina tiešu tilpuma uzskaiti – katra parauga apjoms tiek precīzi nomērīts. Instruments var uztvert un

apstrādāt parauga tilpumus no 5 µl līdz 5 ml – iespējams analizēt gan ļoti nelielus paraugus, gan pilnas 5 ml mēģenes.

Agilent NovoCyte platforma veidota kā modulāra un paplašināma. Sistēmu iespējams pielāgot un uzlabot arī pēc sākotnējās uzstādīšanas – piemēram, jau esošajam instrumentam var pievienot papildu lāzerus vai fluorescences detektorus (kanālus), palielinot nosakāmo parametru skaitu. Bez lāzeriem paplašināma ir arī optiskā detektoru sistēma, var nomainīt filtrus un instruments automātiski atpazīs ievietoto filtru spektrālos parametrus. Tas nozīmē, ka lietotājs var pielāgot vai papildināt fluorescenci kanālu spektrālo iestatījumu (piemēram, nomainot 530/30 nm filtru pret 525/45 nm utt.). NovoCyte sistēma var augt līdz zinātnisko eksperimentu prasībām, neprasot pilnīgi jauna citometra iegādi.

2.2. Vides DNS noteikšanas metodes

Vides DNS analīzēm paredzētie paraugi tika ievākti ar plastmasas cauruli no integrētā 0-10m ūdens slāņa Rīgas līcī (121.st.) 2024. gada 16. aprīlī monitoringa reisa laikā. DNS analīzēm tika ņemti četri dažāda tilpuma ūdens paraugi: 1000 ml, 500 ml, 200 ml un 20 ml, filtrēti caur membrānas filtriem (0,4 µm poru izmērs) un iegūtie filtri sasaldēti līdz DNS ekstrakcijai. DNS tika ekstrahēts laboratorijā, kā mērķa molekulāro marķieri izmantojot 18S rRNA gēna reģionu, kas ir plaši pielietots eikariotu (fitoplanktona un mikrozooplanktona) metabarkodēšanā. PCR amplifikācijas produkti tika sekvencēti un iegūtās sekvences analizētas, izmantojot starptautiskās references datubāzes PR2 (Protist Ribosomal Reference database), SILVA rRNA un NCBI GenBank. Taksonu identifikācija balstījās uz vislabāko atbilstību (<0.99) datubāzēs esošajiem DNS “barcode” fragmentiem. Katram taksonam tika reģistrēts sekvencēšanas nolasījumu (“reads”) skaits, kas izmantots kā relatīvās sastopamības rādītājs.

Paralēli DNS analīzēm tika ievākts un analizēts fitoplanktona un mikrozooplanktona paraugs, izmantojot invertēto mikroskopu atbilstoši HELCOM vadlīnijām ([HELCOM, 2024](#)).

DNS rezultātu analīzē tika iekļauti tikai tie taksoni, kuru sekvences nolasījumu (“reads”) skaits vismaz vienā no paraugiem bija ≥ 5 . Šis filtrēšanas solis tika izmantots, lai samazinātu iespējamo metodoloģisko troksni un izvairītos no sugu izmantošanas, kas balstās uz ļoti nelielu nolasījumu skaitu.

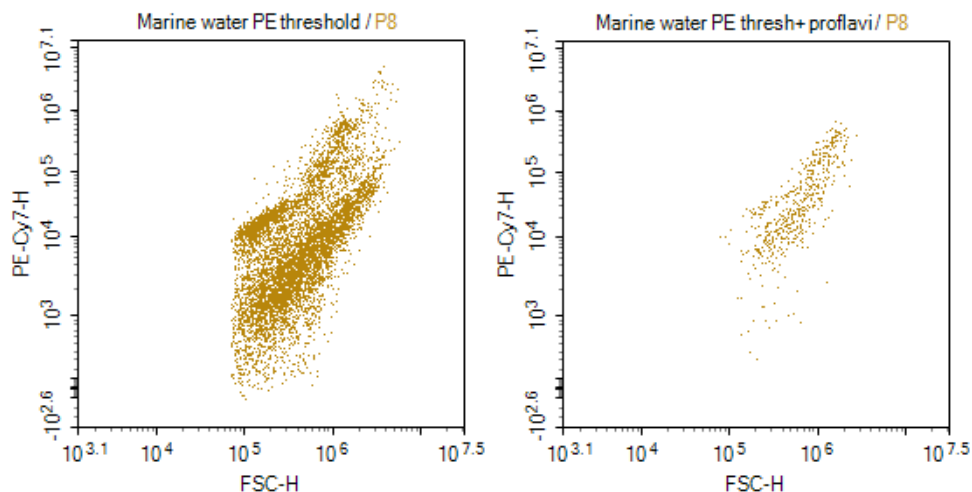
3. Rezultāti un diskusija

3.1. Plūsmas citometra metodes aprobācija un analīžu rezultāti

Kopš citometra uzstādīšanas 16.aprīlī ir izanalizēti kopumā 205 paraugi - 11 aprīļa paraugi, 48 maija paraugi, 58 augusta paraugi un 88 novembra paraugi. Pēc katras paraugu sērijas izanalizēšanas uz plūsmas citometra tika veikta rezultātu izvērtēšana un izstrādāti uzlabojumi tālākai paraugu ievākšanai un analīzei. Tāpat tika apzināti veidi, kā uzglabāt paraugus no ievākšanas brīža līdz analizēšanai. Pagaidām paraugu fiksēšanai tiek izmantots glutāraldehīds (Vaulot, 1989), kas tiek izmantots arī paraugiem, kas tiek analizēti ar epifluorescences mikroskopiju. Taču kā labāks veids paraugu uzglabāšanai tiek minēta saldēšanas metode šķidrajā slāpekļī, šādā veidā šūnas labāk saglabājas, bet, fiksējot ar glutāraldehīdu, tās var tikt bojātas, tāpēc katram eksperimentam ir jāpiemeklē labākais uzglabāšanas veids, lai iegūtu labāko rezultātu.

Pārskata periodā paralēli tika veikta datu ieguve gan ar plūsmas citometru, gan ar epifluorescences mikroskopiju (101A, 119, 121, 142, 162.stacijā), lai varētu atrast kopsakarības un vēsturiskos datus pielīdzināt jaunajai metodei.

3.1.1. Metodes pielāgošana - parauga iekrāsošana ar proflavīnu



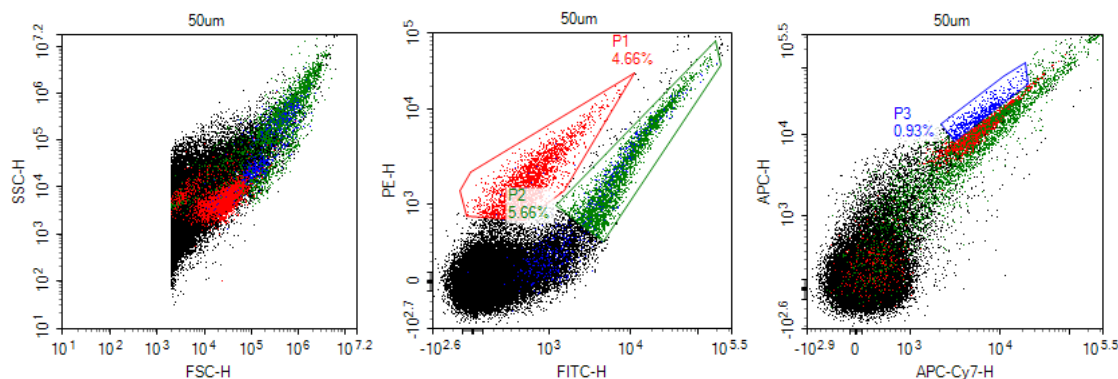
2.Attēls. Izdalīta *Syneccoccus* grupa (jūras ūdens fiksēts ar glutāraldehīdu un glutāraldehīds+proflavīns)

Tā kā *Syneccoccus* vēsturiski tika analizēts epifluorescences mikroskopijā, iekrāsojot šūnas ar proflavīnu, tad arī plūsmas citometrā izmēģinājām, kā proflavīns ietekmē *Syneccoccus* šūnu uzskaiti. Jau vizuāli var novērot, ka atšķirība starp abiem mērījumiem ir ievērojama (2.Attēls).

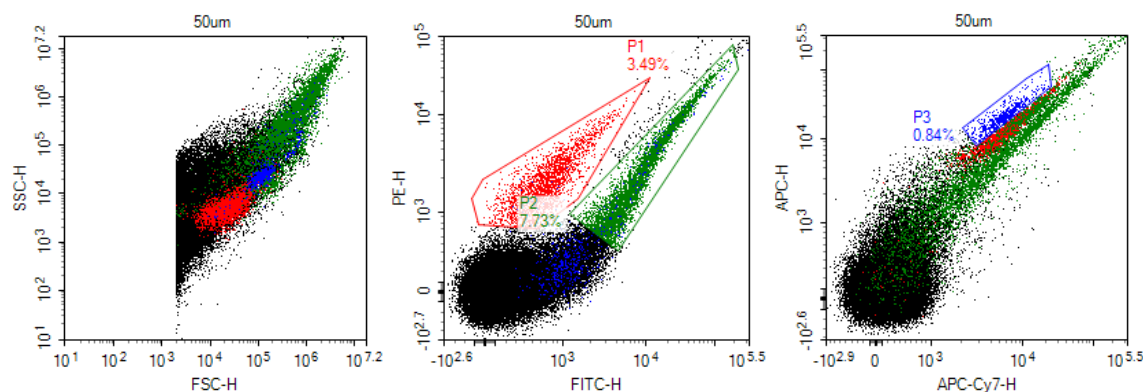
Plūsmas citometrā lielāks uzskaitīto šūnu skaits tika novērots pie nekrāsota parauga, iekrāsošana ar proflavīnu traucē lāzeram uztvert šūnas, jo paraugs iekrāsojas izteikti dzeltenā krāsā. Tādēļ, vienojoties ar citometrijas ekspertiem, tika nolemts tālākai pikoplanktona analīzei citometrā neizmantot proflavīnu.

3.1.2. Paraugu analīze – aprīļa paraugi kā piemērs

Abās paraugošanas stacijās (119 un 101A) ir vērojama līdzīga tendence un datu vizualizācija izskatās gandrīz vienādi (3.un 4. Attēls), bet atšķiras kopējais uztverto daļiņu skaits, jo 101A.stacijā ir lielāka ietekme saldūdens ieplūdei no Daugavas.



3.Attēls. 2025.gada aprīļa reisa 119.stacijas datu vizualizācija



4.Attēls. 2025.gada aprīļa reisa 101A.stacijas datu vizualizācija

Fitoplanktona un pikoplanktona taksonus ļauj atšķirt punktu izkliede un autofluorescences signāli no fotosintēzes pigmentiem. Hlorofils *a* izstaro sarkanu fluorescenci (konstatēta PerCP vai APC kanālos), savukārt zilaļģu pigments fikoeritrīns izstaro oranžu fluorescenci (konstatēta PE kanālā). Pārbaudot šos fluorescences kanālus, tika identificētas trīs fitoplanktona apakšpopulācijas:

- *Synechococcus* – identificēts pēc spēcīgas oranžas (PE) fluorescences un spēcīgas sarkanas hlorofila fluorescences. Šīs zilaļģes (~1 µm) satur fikoeritrīnu, tāpēc tās spilgti fluorescē gan PE, gan hlorofila kanālos. Tām ir arī mērena izkliede (lielāka nekā baktērijām, mazāka nekā aļģēm). 3. un 4. Attēlā attēlota kā P3 grupa.
- *Prochlorococcus* – identificēti tikai pēc hlorofila (sarkanās) fluorescences, ar nelielu vai bez PE signāla. Šie ir izmēros mazākie fotosintēzējošie prokarioti (~0,5–0,7 µm) un tiem trūkst fikoeritrīna, tāpēc tie parādās kā sarkanas fluorescējošas daļiņas bez oranžas fluorescences. 3. un 4. Attēlā attēlota kā P1 grupa.
- Pikoeukarioti – identificēti pēc augstas sarkanās (hlorofila) fluorescences un lielāka izmēra (augsts FSC), bet bez PE fluorescences (tiem trūkst fikoeritrīna). Tās ir mazas eikariotu aļģes (2–5 µm), piemēram, prasinoḡiti. Dato tās parādās kā daļiņas ar visaugstāko FSC/SSC, un hlorofila fluorescenci ir vēl spilgtāka nekā *Synechococcus* uz vienu šūnu. Tās neizstaro oranžu PE fluorescenci. 3. un 4. Attēlā attēlota kā P3 grupa.

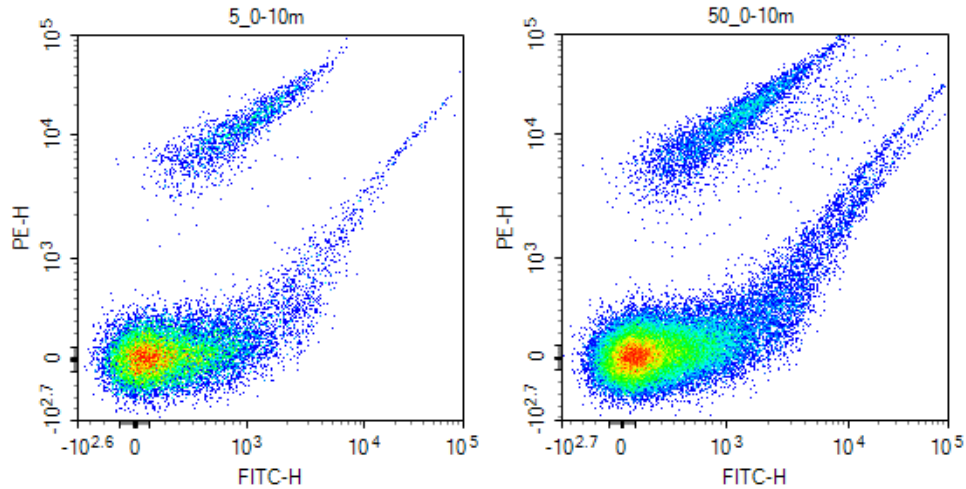
Apskatot pirmos iegūtos plūsmas citometra rezultātus no 2025.gada aprīļa monitoringa reisa, tika izdarīts secinājums, ka fitoplanktona šūnu skaits ir tik liels, ka tas traucē mērķa grupas – pikoplanktona – analīzi, tāpēc tika pieņemts lēmums turpmāk paraugus filtrēt ar 50 un 5 µm sietiem, lai atdalītu lielāka izmēra fitoplanktona šūnas un iegūtu precīzāku informāciju par pikoplanktona struktūru, tāpēc sākot ar maija mēnesi katram paraugam ir 2 mērījumi.

1.Tabula. Epifluorescences mikroskopijas un plūsmas citometrijas salīdzinājums (Salmi et al. (2021) publikācijas kopsavilkums)

Raksturlielums \ Metode	Epifluorescences mikroskopija	Plūsmas citometrija
Šūnu skaita noteikšana	Laba, bet lēna	Laba, ātra (~10× ātrāka)
Šūnu lieluma noteikšana	Tendence pārvērtēt izmērus (fluorescences izkliede)	Tendence nepietiekami vai neprecīzi novērtēt (FSC atkarīgs no formas un refraktivitātes)
Biomasa aprēķins	Vidēji ~15× lielāks nekā citometrijā	Nesakrīt ar mikroskopiju, zema precizitāte
Kolonijas/daudzšūnu struktūras	Redzamas un atpazīstamas	Bieži interpretē kā vienu lielu "daļiņu"
Trokšņi/fons	Mazāki	Liels fona troksnis citogrammās
Priekšrocības	Precīza vizualizācija, iespēja noteikt šūnu morfoloģiju	Ļoti ātra skaitīšana, automatizēta analīze
Trūkumi	Lēna, darbietilpīga	Nevienmērīgs FSC signāls, refraktivitātes problēmas, koloniju sajaukšanās

Kopējais uztverto daļiņu skaits 119.stacijā 100 µm paraugā ir 53000, pārrēķinot uz ml, sanāk 530 000 šūnas. Skaitliski aprēķinot P1 (4,66%) un P3 (0,93%) grupas no kopējā daļiņu skaita, rezultātā sanāk, ka P1=24698 šūnas/ml, savukārt P3=4929 šūnas/ml, kopējam pikoplanktona šūnu skaitam sasniedzot 29627 šūnas/ml, kas ir mazāks rādītājs nekā epifluorescences metodē iegūtās 56938 šūnas/ml. Arī *Salmi et al. (2021)* norāda uz atšķirībām abu metožu salīdzināšanā (1.Tabula). Abas metodes ir piemērotas pikoplanktona daudzuma noteikšanai, bet nav piemērotas precīzai biomasas aprēķināšanai, jo šūnu lielumu noteikšana ir neprecīza un atšķirīga abās metodēs. Epifluorescences mikroskopija un plūsmas citometrija dod līdzīgus pikofitoplanktona daudzuma novērtējumus, taču šūnu lieluma noteikšana būtiski atšķiras, tāpēc biomasas aprēķini nav savstarpēji salīdzināmi. Mikroskopija labāk vizualizē šūnas, bet citometrija ir daudz ātrāka un automātiskāka, tomēr jutīgāka pret optiskiem un tehniskiem traucējumiem.

3.1.3. Salīdzinājums filtrēšanas sietiem



5.Attēls. 121.stacijas paraugu salīdzinājums 5 un 50 µm filtru izmantošanai

Plūsmas citometrā tika analizēti divi ar glutaraldehīdu fiksēti jūras ūdens paraugi, kas filtrēti caur dažādiem sieta izmēriem (5 un 50 µm). Ar 5 µm filtrētais paraugs saturēja 17 020 daļiņas, savukārt ar 50 µm filtrētais paraugs saturēja 42 004 daļiņas (kopējais noteikto daļiņu skaits). Daudz lielāks šūnu skaits 50 µm paraugā liecina, ka filtrēšana uz smalkāka filtra (5 µm) noņēma ievērojamu daļu daļiņu/šūnu. 5.Attēlā ir vērojama arī vizuāla atšķirība - 50 µm filtrātam saskaitītās šūnas ir izvietojušās daudz blīvāk.

2.Tabula. 121.stacijas šūnu grupu sadalījums un šūnu skaits 0-10m slānī

Paraugs (121_10_11_20 25)	Kopējais šūnu skaits	Heterotrofās baktērijas (%)	Prochlorococcus (%)	Synechococcus (%)	Pikoeikarioti (%)
5 µm filtrs	17,02	14,444 (≈85%)	504 (≈3%)	1,931 (≈11%)	141 (≈0.8%)
50 µm filtrs	42,004	30,831 (≈73%)	3,914 (≈9%)	5,335 (≈13%)	1,924 (≈4.6%)

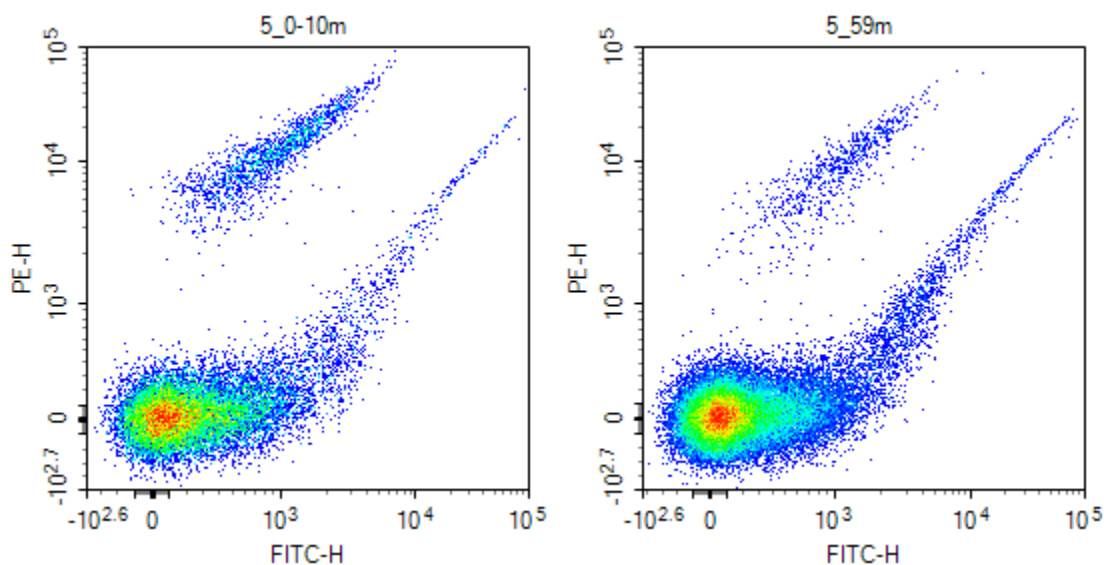
Apskatot kopējo šūnu skaita sadalījumu pa apakšgrupām, ir novērojams, ka, filtrējot paraugu caur 5 µm filtru, arī mazākā izmēra šūnas *Prochlorococcus* un *Synechococcus* zaudē lielu daļu no skaita. (2.Tabula). *Prochlorococcus* un *Synechococcus* ir aptuveni 1 µm izmērā, kam būtu jāiziet cauri 5

μm sietam. Iespējams, ka šūnas, kas ir izmēros no 5 līdz 50 μm aizsprosto smalkā sieta poras un daļa sīko šūnu netiek cauri. Turpmāk jāpadomā par vēl vienu soli filtrēšanas procesā (piemēram, 25 μm), kas iespējams samazinātu mazo šūnu aizķeršanos uz filtra.

Lai plūsmas citometru būtu iespējams pielietot fitoplanktona pētījumos, būtu nepieciešams veikt arī mikroskopēšanu tai paraugu daļai, kas tiek nofiltrēta nost ar 50 mikrometru sietu, un cik liela daļa no mazāka izmēra šūnām paliek ārpus parauga. Kā arī aprēķināt, cik liela daļa no fitoplanktona populācijas, kuras izmēri ir mazāki par 50 μm , paliek uz filtra.

3.1.4. Dziļuma ietekmes mērījumi

Datu apstrādes atvieglošanai, lai būtu vieglāk atdalīt pikoplanktona un fitoplanktona apakšgrupas, dāņu pikoplanktona eksperte ieteica salīdzināt virsējo ūdens slāni ar dziļāko (mūsu gadījumā 0-10m un 59m). Šāds salīdzinājums palīdz izprast šūnu grupu atrašanās vietu grafikos, jo fotiskajā zonā 0-10m jābūt daudz vairāk fitoplanktona šūnām nekā 59m dziļumā. Savukārt heterotrofā pikoplanktona populācija ir lielāka dziļākajā ūdens slānī.

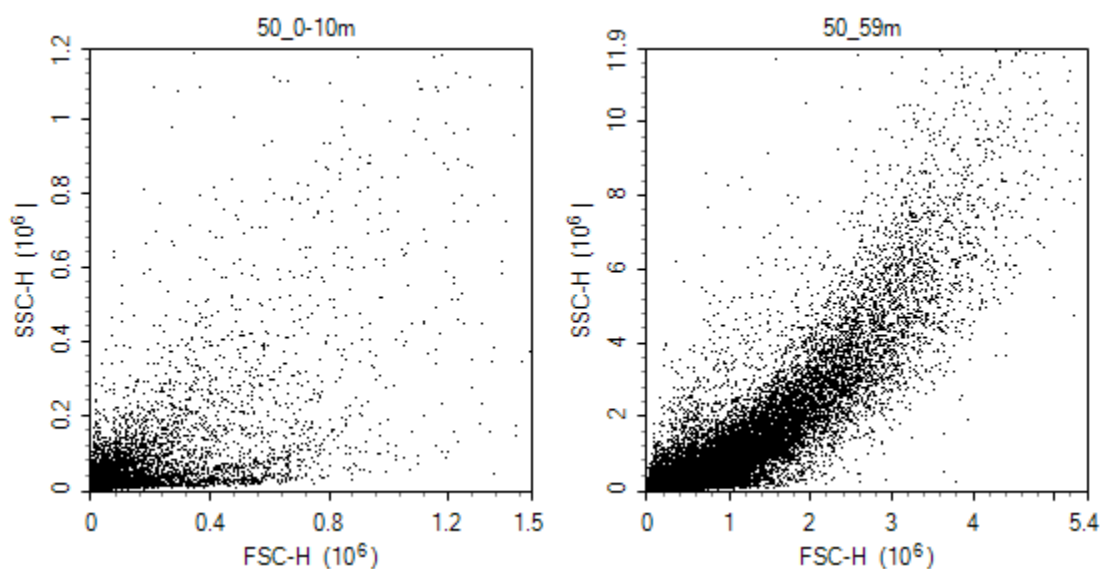


6.Attēls. Jūras ūdens paraugi 121.stacijā 0-10m slānī un 59 m dziļumā (filtrēti caur 5 μm sietu)

Abi paraugi tika iepriekš filtrēti caur 50 un 5 μm sietu un analizēti ar plūsmas citometru. Virsmas integrētajā paraugā (0–10 m) bija 17 020 daļiņas/šūnas, savukārt 59 m atsevišķajā paraugā bija 36 132 daļiņas. Abos gadījumos tika analizēti 100 μl jūras ūdens. Tas norāda, ka 59 m dziļumā ir aptuveni divreiz lielāka šūnu koncentrācija salīdzinājumā ar virsmu (7.Attēls). Abos paraugos dominēja heterofās baktērijas ($\approx 86\%$ 0–10 m dziļumā un $\approx 93\%$ 59 m dziļumā). Fotosintētiskā pikoplanktona daudzums ievērojami atšķiras atkarībā no dziļuma: uz virsmas bija lielāka

Synechococcus proporcija, savukārt *Prochlorococcus* bija izplatītāki 59 m dziļumā. Pikoeukarioti bija neliela sastāvdaļa abos paraugos.

Rezultāti parāda planktona šūnu sadalījuma atšķirības dažādos dziļumos. Virsmas slānī ir daudzveidīgāka kopa, *Synechococcus* un mazas eikariotu aļģes, kam raksturīgi lielāki izkliedes signāli un spēcīga oranžā fluorescence. 59 m dziļumā kopiena mainās, kurā dominē *Prochlorococcus* un baktērijas – mazākas šūnas, kas pielāgojušās vājam apgaismojumam, kā rezultātā samazinās kopējā izkliede, palielinās hlorofila fluorescence uz vienu šūnu, bet ir ļoti mazs fikoeritrīna signāls. Šīs atšķirības norāda uz izmaiņām gan planktona daudzumā, gan fizioloģiskajā stāvoklī dziļākajos slāņos: piemēram, palielinās zemākam apgaismojumam pielāgots *Prochlorococcus* (ar augstāku hlorofila saturu) daudzums un samazinās citu mikroskopisko aļģu daudzums, virzoties no virsmas uz dziļumu. Tāda pati tendence vērojama arī paraugos, kas filtrēti caur 50 μm sietu, 59m šūnu koncentrācija ir izteikti lielāka kā 0-10m slānī (7.Attēls).

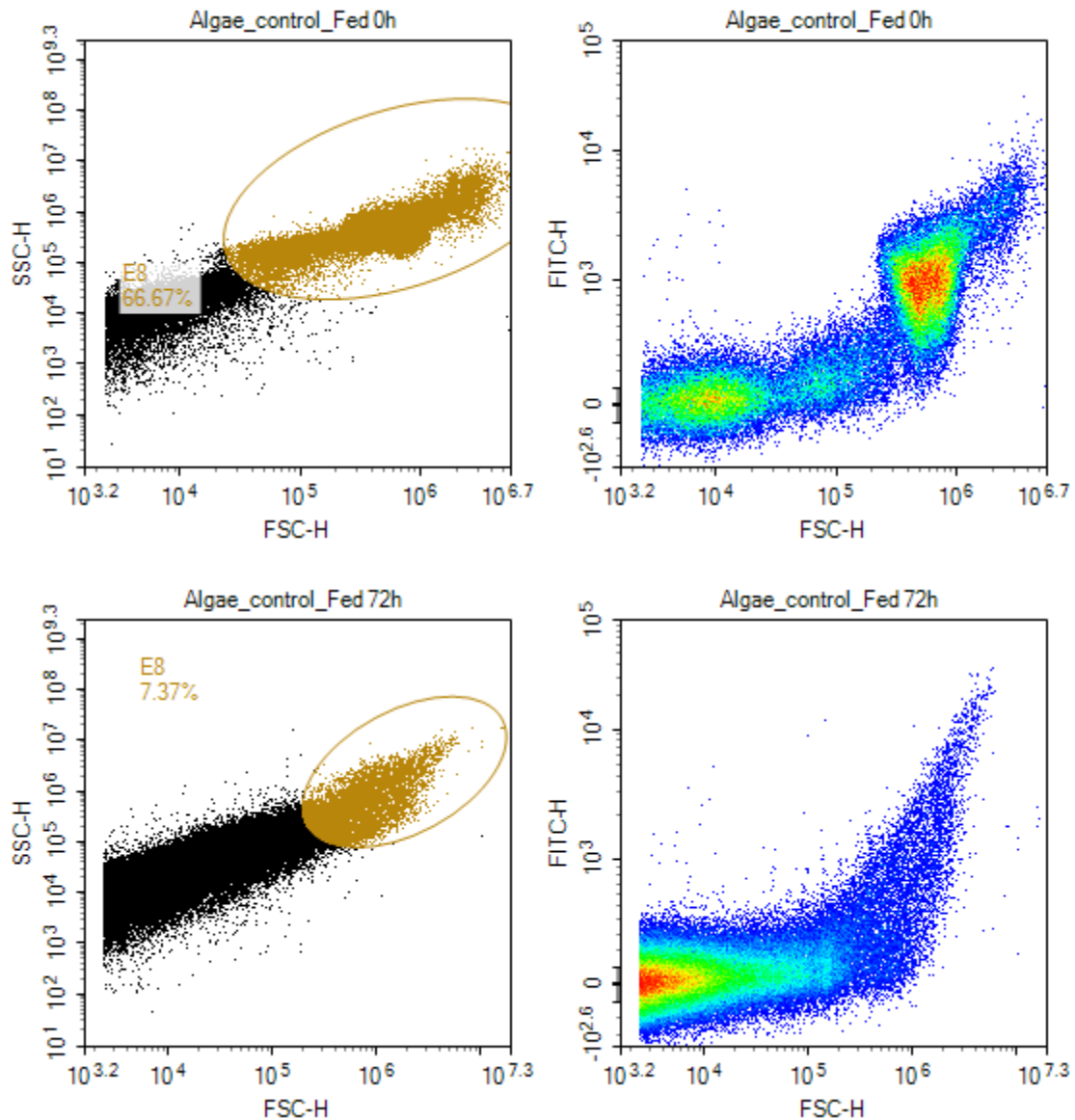


7.Attēls. Šūnu koncentrācijas salīdzinājums 0-10m slānī un 59m dziļumā (filtrēts 50 μm)

Veicot salīdzinājumu 0-10m un 59m dziļumā, ir redzams, ka ir nepieciešams turpināt pikoplanktona sabiedrības izpēti arī visā ūdens stabā, lai labāk izprastu organismu sadalījumu un dzīvošanas apstākļus. Būtu vērtīgi paskatīties gan integrētos paraugus, gan atsevišķu dziļumu paraugus (1m, 5m, 10m). Paraugu ievākšanu varētu veikt paralēli ķīmijas parametru paraugu ievākšanai ar batometriem, tāpēc katram dziļuma slānim būtu klāt arī ķīmijas dati. Plūsmas citometrā ir iespēja noteikt arī fitoplanktonu, taču precīzākam rezultātam ir nepieciešams šūnas iekrāsot ar krāsvielu. Šādā veidā varētu pārbaudīt, vai fitoplanktona produktivitāte dziļāk par 10 metriem būtiski samazinās.

3.1.5. Eksperiments ar aļģu kultūrām

Plūsmas citometrija ir ļoti noderīgs rīks eksperimentos ar aļģu kultūrām, jo tā piedāvā ātru, kvantitatīvu un daudzdimensionālu analīzi šūnu līmenī. Iespējams sekot aļģu populācijas izmaiņām laikā, piemēram, pirms un pēc zooplanktona pievienošanas.

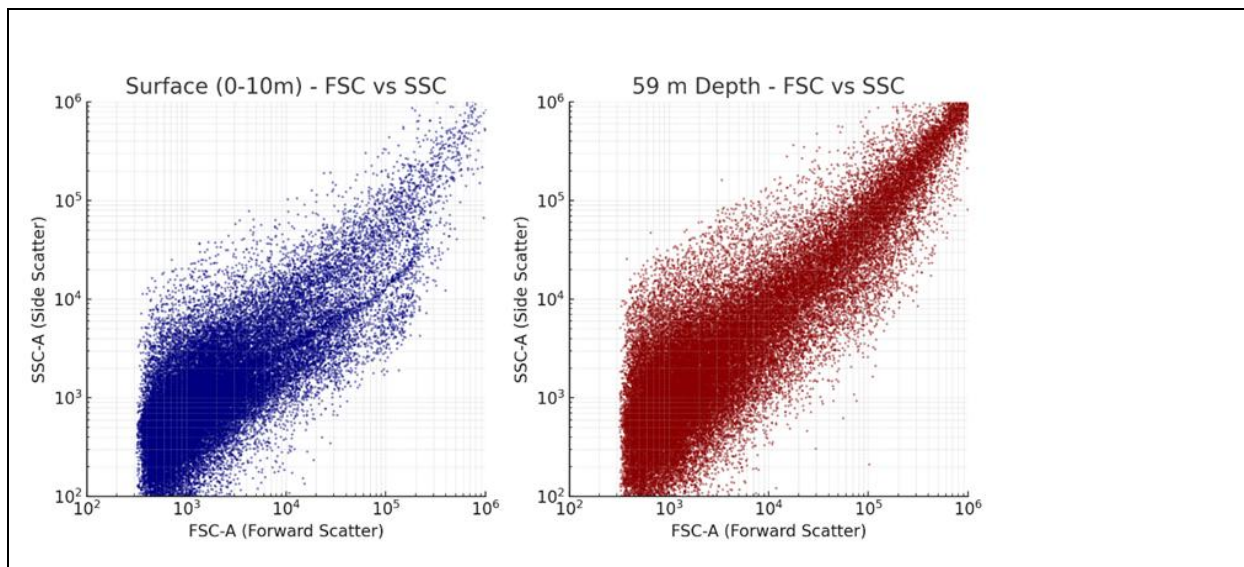


8.Attēls. Aļģu kultūras eksperiments (0h-kontrole , 72h-pēc eksperimenta)

Pirms citometra iegādes aļģu uzskaitē tika veikta ar mikroskopu, kas ir laikietilpīgs process. Tiek analizēts paraugs pirms eksperimenta un pēc 72 stundu zooplanktona iedarbības. Pirms eksperimenta paraugs saturēja 66,67% fitoplanktona šūnu, un pēc 72 stundām šūnu proporcija samazinājās uz 7,37% (8.Attēls).

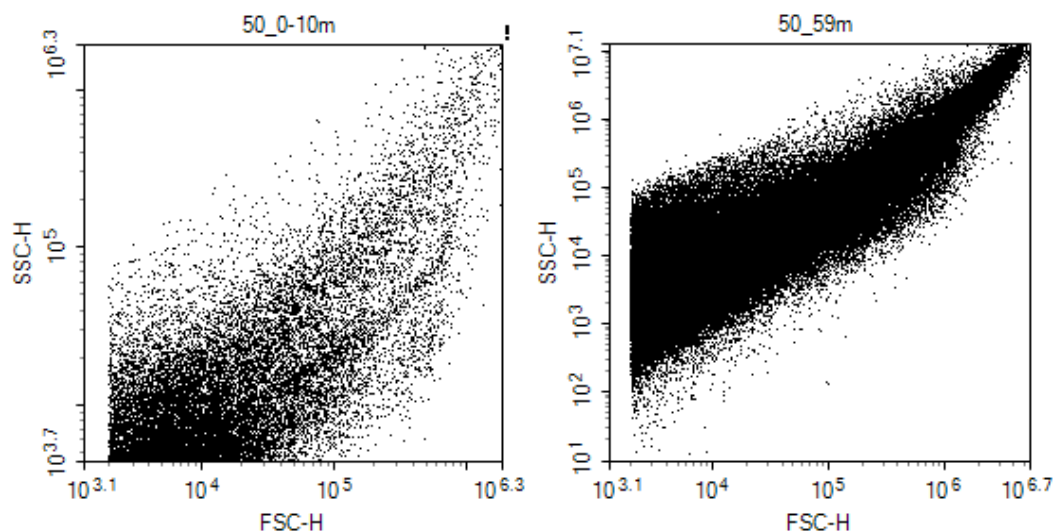
Turpmāk plūsmas citometru varētu izmantot arī ekotoksikoloģijas pētījumos, lai noteiktu fitoplanktona šūnu reakciju uz dažādām vielām, noteikt, cik liela ir šūnu mirstība.

3.1.6. Datu failu analīze ar citām datu apstrādes programmām



9.Attēls. Python datu apstrādes programmas ģenerētais attēls no NovoExpress izdotā .fcs formātā

Plūsmas citometra ģenerētais datu faila formāts ir savienojams ar citām datu apstrādes programmām. Šis fails (.fcs) tika pievienots Python programmai ([9.Attēls](#)). Savukārt [10.Attēlā](#) ir vērojama tā pati datu kopa, bet attēli veidoti NovoExpress programmatūrā. Arī citas programmas ir spējīgas pieņemt datu formātu, ko izdod citometrs, un datu apstrādi var veikt arī pierastākās datu apstrādes programmās kā R vai Python.



10. Attēls. *Plūsmas citometrā veidotie attēli, salīdzināšanai ar Python attēliem*

3.2. DNS analīžu rezultāti

Mikroskopijas un DNS analīžu rezultāti parādīja, ka neatkarīgi no izmantotā tilpuma (20 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml) noteiktais kopējo taksonu skaits bija līdzīgs, variējot no 59 līdz 68 (3. Tabula). DNS analīzēs konstatēto taksonu kopskaits (59–68) bija salīdzināms ar mikroskopijas rezultātiem (67 taksoni). Kaut arī abu metožu kopējais noteikto taksonu skaits bija līdzīgs, atsevišķu grupu īpatsvars atšķīrās. DNS datus fitoplanktona taksonu skaits bija nedaudz mazāks (41–46) nekā mikroskopijā (56), savukārt mikrozooplanktona daudzveidība DNS paraugos bija ievērojami lielāka (18–22 taksoni) nekā mikroskopijā (11). Šo atšķirību varētu skaidrot ar metožu specifiku: mikroskopā ir labāk atpazīst lielākas un morfoloģiski raksturīgas šūnas, savukārt DNS metode ir jutīgāka pret mazizmēra un trauklām formām, ieskaitot mikrozooplanktonu. Turklāt DNS analīzēs noteikšana nav atkarīga no šūnas integritātes vai vizuālajām pazīmēm, tāpēc iespējams konstatēti arī ūdens vidē esošus brīvus DNS fragmentus no organismiem, kas mikroskopiski nav novērojami. Savukārt mikroskopijas rezultāti vairāk atspoguļo aktīvās un morfoloģiski labi saglabājušās šūnas. Fiksācijas laikā mikrozooplanktona šūnas bieži deformējas vai zaudē raksturīgās pazīmes, kas apgrūtina to noteikšanu līdz sugai vai pat augstākam taksonomiskajam līmenim. Tādēļ DNS metode šajā gadījumā papildina mikroskopiju, sniedzot plašāku priekšstatu par kopējo bioloģisko daudzveidību.

3.Tabula. DNS un mikroskopējas rezultātu salīdzinājums Rīgas līcī 2024. gada 16. aprīlī

Metode/tilpums	Fitoplanktons	Mikrozooplanktons	Kopējais taksonu skaits	PEG_BVOL2025 taksoni	Rīgas līča taksoni (Hållfors, 2004)
DNS 1000ml	46	22	68	26	32
DNS 500ml	42	21	63	24	29
DNS 200ml	41	20	61	24	28
DNS 20ml	41	18	59	25	27
Mikroskopija	56	11	67	56	49

legūtie abu metožu rezultāti (fitoplanktona taksoni) tika salīdzināti ar Baltijas jūras HELCOM fitoplanktona sugu tilpuma datu bāzi PEG_BVOL2025, kas tiek regulāri atjaunota, pievienojot mikroskopijas paraugos konstatētās jaunās sugas, un ar Hållfors (2004) publicēto Checklist of Baltic Sea Phytoplankton Species. Hållfors fitoplanktona sugu datu bāze joprojām tiek izmantota kā pamatatsauce Baltijas jūras fitoplanktona sugu salīdzinājumos, jo tā ietver arī ekoloģiskās un ģeogrāfiskās sugu raksturojuma norādes, tostarp sugu sastopamību Rīgas līcī (GR).

Salīdzinot ar Hållfors (2024) Rīgas līcī reģistrētajiem taksoniem, DNS rezultātos bija atrodamas 27–32 ģintis, kas ir aptuveni 40–50% no kopējā noteikto taksonu skaita. Savukārt mikroskopijas rezultāti uzrādīja ievērojami augstāku pārklājumu — 49 taksonus (ap 73%). Līdzīga tendence novērojama arī salīdzinājumā ar PEG_BVOL2025 datubāzi, kur DNS rezultātos pārklājums bija 24–26 taksoni (aptuveni 35–40% no kopējā skaita), bet mikroskopijā – 56 taksoni (ap 84%). Tas norāda, ka mikroskopijas metode uzrāda lielāku sakritību ar reģionālajām un oficiālajām, regulāri atjaunotajām, datubāzēm, savukārt DNS metode sniedz papildinformāciju par mazāk zināmām vai datubāzēs vēl nepārstāvētām ģintīm. Un atšķirības lielākoties skaidrojamas ar DNS noteikšanas atkarību no starptautiskajām gēnu bankām, kurās vēl nav pilnīgi pārstāvētas visas Baltijas jūras un, jo īpaši Rīgas līča fitoplanktona sugas. Kas varētu liecināt par to, ka liela daļa DNS noteikto taksonu sakrīt gan ar HELCOM PEG_BVOL2025, gan Hållfors (2004) Rīgas līča sugām, kas norāda uz labu metožu savstarpējo papildināmību, un DNS rezultātu spēju atspoguļot reģionāli raksturīgās fitoplanktona sabiedrības tendences.

Lai labāk izprastu metožu atšķirības, tika veikta atsevišķa analīze, kurā iekļauti tikai biežāk sastopamie taksoni (≥ 30 nolasījumi DNS datos vai ≥ 30 šūnas litrā mikroskopijas paraugos), kas raksturo pavasara fitoplanktona kopienu Rīgas līcī.

4.Tabula. DNS un mikroskopijas metožu salīdzinājums pēc noteiktajiem taksoniem
Rīgas līcī (≥30 nolasījumi/šūnas)

Metode	Taksonu skaits sugas līmenī	Taksonu skaits ģints līmenī	Piemēri
DND	46	35	<i>Bathycoccus prasinos</i> , <i>Paraphysomona</i> , <i>Fragilariopsis cylindrus</i> , <i>Thalassiosira concaviuscula</i>
Mikroskopija	20	32	<i>Pauliella taeniata</i> , <i>Skeletonema marinoi</i> , <i>Thalassiosira baltica</i> , <i>Woronichinia compacta</i> , <i>Aphanocapsa</i> , <i>Chaetoceros ceratosporus</i> , <i>Peridiniella catenata</i>
Kopīgie taksoni abās metodēs	1	19	<i>Mesodinium rubrum</i>

Tā kā analīzē netika iekļauti visu konstatēto taksonu, bet tikai ≥30 nolasījumi/šūnas, tad vairākas ģintis, kas DNS datus tika identificētas, kā biežāk sastopamas (piemēram, *Teleaulax*, *Pyramimonas*, *Navicula*, *Karlodinium*), mikroskopijas paraugos tika noteiktas ar ļoti zemu šūnu skaitu un tāpēc neiekļuva biežāk novēroto sarakstā. Līdzīga situācija novērojama arī starp augstākiem taksonomiskajiem līmeņiem, piemēram, DNS datus noteiktās *Dinophyceae* un *Karlodinium veneficum* atbilst mikroskopijā novērotajai *Gymnodiniales* kārtai, savukārt DNS noteiktā *Navicula* iekļaujas mikroskopiski konstatētajā *Pennales* grupā, jo mikroskopijā nav iespējams saskatīt visas nepieciešamās morfoloģiskās pazīmes, lai noteiktu līdz sugas līmenim.

DNS analīzē dominēja sīka izmēra šūnas, tādas kā zaļalģes *Bathycoccus prasinos*, kuras izmēri ir no 1 līdz 2 μm un tradicionālajā mikroskopijas metodē nav iespējams noteikt. Tādējādi DNS un mikroskopijas datu atšķirības šajā gadījumā vairāk atspoguļo metožu jutības un kvantifikācijas robežas, nevis pilnīgi atšķirīgu planktona sastāvu. DNS metode labāk atklāj klātesošo taksonu kopējo spektru, savukārt mikroskopija precīzāk raksturo to īpatsvaru un biomasu.

Savukārt mikroskopijas rezultātos dominēja pavasarim raksturīgās kramalģes (*Pauliella taeniata*, *Skeletonema marinoi*, *Thalassiosira baltica*) un kolonijveida cianobaktērijas (*Woronichinia compacta*, *Aphanocapsa*), kas DNS datus netika konstatētas, jo izmantotais molekulārais marķieris (18S rRNA) neaptver prokariotu grupas. Tas nozīmē, ka zilaļģes jeb cianobaktērijas DNS analīzē nav iekļautas, jo tās pieder prokariotiem, savukārt šajā pētījumā izmantotais marķieris bija paredzēts tikai eikariotu (fitoplanktona un mikrozooplanktona) noteikšanai.

DNS un mikroskopijas datu salīdzinājums parādīja arī gadījumus, kad DNS identificētās sugas neatbilda mikroskopiski novērotajām, bet bija ekoloģiski un morfoloģiski radniecīgas. Piemēram, DNS analīzēs konstatētās kramalģes *Fragilariopsis cylindrus* un *Thalassiosira concaviuscula* ir ģenētiski līdzīgas mikroskopā noteiktajām *Pauliella taeniata* un *Thalassiosira baltica*, kas ir

raksturīgas Rīgas līča pavasara sugas. Šī atšķirība norāda uz datubāzu nepilnīgu reģionālo pārklājumu.

Analizējot rezultātus ģints līmenī, abu metožu sakritība būtiski palielinās ([4. Tabula](#)). Kopīgi abās metodēs tika konstatētas vairākas pavasarim raksturīgas ģintis – *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, *Strombidium*, *Mesodinium* un *Diaphanoeca*, kas ir tipiski sastopamas Rīgas līcī šajā sezonā. DNS metode papildus identificēja vairākas ģintis, kuras mikroskopiski paraugos tika konstatētas ar zemu šūnu skaitu, piemēram, *Teleaulax*, *Pyramimonas* un *Karlodinium*. Ģints līmenī abu metožu sakritība sasniedza aptuveni 59 %, kas liecina, ka abas metodes kopumā atspoguļo līdzīgu planktona sabiedrības struktūru.

4. Secinājumi

Lai paraugu analīze sniegtu precīzākos rezultātus, ir nepieciešams izprast, kādi filtri jāpielieto, lai izceltu pētāmo organismu grupu. Kā arī jāpielāgo plūsmas ātrums un skaitāmo objektu izmērs. Mums ir nepieciešama plūsmas citometra ekspertu konsultācija, lai būtu droši, ka datu ieguve ir pareiza. Janvārī paredzēta salīdzināšanās ar dāņu ekspertu Maria Lund Paulsen, veicot viena un tā paša parauga analīzi uz katram sava citometra. Mērķis būs saprast, vai mūsu dati, kas iegūti no dažādu firmu plūsmas citometriem, ir salīdzināmi. Šobrīd no plūsmas citometra datiem spējam iegūt šūnu skaitu un nodalīt atsevišķas šūnu grupas, bet ir nepieciešams apgūt, kā noteikt šūnu tilpumu, lai aprēķinātu biomasu. Lai plūsmas citometra dati būtu salīdzināmi ar vēsturiskajiem datiem, jo, pielietojot mikroskopēšanu, uzreiz tiek iegūti dati gan par šūnu skaitu, gan izmēru.

Kopumā var secināt, ka plūsmas citometra iegāde ir nesusi lielu pienesumu turpmāko pētījumu veikšanā un ideju ģenerēšanā, jo tas padara paraugu apstrādi daudz ātrāku un efektīvāku. Kā arī dod iespēju veikt apjomīgākus pētījumus ar vairāk paraugošanas punktiem. Šobrīd plūsmas citometra izmantošanā koncentrējamies uz sīkākajiem ūdens organismiem, jo instruments ļauj mērīt fitoplanktona šūnas izmēros līdz 50 µm, bet liela daļa ir arī lielāka izmēra šūnas. Datu iegūšanu ar plūsmas citometru var veikt arī cilvēks, kas nav tieši saistīts ar šo organismu taksonomisko noteikšanu, bet ir ar labām bioinformātikas zināšanām un spēj veikt apjomīgu literatūras avotu un datu analīzi.

Kopumā DNS un mikroskopijas rezultāti savstarpēji papildina viens otru: DNS metode sniedz plašāku priekšstatu par taksonu daudzveidību, savukārt mikroskopija nodrošina precīzāku sugu identificēšanu un biomasas novērtējumu, kas kopā ļauj pilnīgāk raksturot Rīgas līča planktona sabiedrības pavasara sezonā. Kopējie projekta rezultāti apliecināja, ka eDNA metode ir piemērojama jūras vides bioloģiskās daudzveidības monitoringā, ja tiek ievēroti vienoti paraugu ņemšanas, filtrēšanas un analīzes standarti. Rezultāti arī parādīja, ka, neatkarīgi no izmantotā tilpuma (20–1000 ml), DNS analīzēs noteiktais kopējais taksonu skaits bija līdzīgs ar mikroskopijas

rezultātiem, tomēr atšķirās noteikto grupu struktūra. DNS metode konstatēja vairāk mikrozooplanktona un sīka šūnu izmēra vicaiņu taksonus, savukārt mikroskopijā dominēja kramalģes un kolonijveida cianobaktērijas. Kopīgais taksonu skaits ģints līmenī starp abām metodēm sasniedza aptuveni 59 %, kas norāda uz to savstarpējo papildināmību.

DNS metode nodrošināja plašāku taksonu spektra atklāšanu, iekļaujot mazizmēra un trauslas sugas, kuras bieži mikroskopā nevar noteikt. Savukārt mikroskopijas metode ļāva detalizēti identificēt lielākas šūnas un novērtēt biomasu, kas DNS datu interpretācijā nav iespējams. DNS rezultāti parādīja lielāku sakritību ar ģenētiski tuvām, bet datubāzēs nepilnīgi pārstāvētām sugām, kas liecina par nepieciešamību papildināt Baltijas jūras reģionālās DNS references bibliotēkas ar lokāli sastopamām sugām.

Rīgas līča gadījumā DNS un mikroskopijas datu salīdzinājums parādīja, ka, lai gan abu metožu taksonu saraksti pilnībā nesakrīt, to sniegtā informācija ir savstarpēji papildinoša. DNS pieeja precīzāk atspoguļo kopējo bioloģisko daudzveidību, savukārt mikroskopija – taksonu relatīvo daudzumu un ekoloģisko nozīmi. Tādējādi abas metodes kopā nodrošina visaptverošāku planktona sabiedrību raksturojumu.

DNS metabarkodēšanas metodes priekšrocība ir ievērojami īsāks paraugu apstrādes un taksonu noteikšanas laiks salīdzinājumā ar tradicionālo mikroskopiju. DNS ekstrakcijas un sekvencēšanas posms prasa aptuveni 1–2 dienas, savukārt bioinformātikas analīze var tikt veikta dažu stundu laikā pēc datu saņemšanas. Salīdzinājumam mikroskopiskā parauga apstrāde un saskaitīšana var aizņemt vairākas stundas līdz pat vairākām dienām atkarībā no parauga sarežģītības un šūnu blīvuma. Tādējādi DNS metode būtiski samazina cilvēkresursu noslodzi un ļauj analizēt lielāku paraugu skaitu īsākā laikā. Tomēr tās plašāka ieviešana jūras vides monitoringā šobrīd ir ierobežota ar salīdzinoši augstām analīžu izmaksām, kas galvenokārt saistītas ar sekvencēšanas un bioinformātikas datu apstrādes posmiem. Tomēr sagaidāms, ka līdz ar tehnoloģiju attīstību un analīžu automatizāciju šo pakalpojumu izmaksas samazināsies, padarot DNS metodes ekonomiski salīdzināmas ar tradicionālajām mikroskopijas pieejām.

5. Rekomendācijas jūras vides monitoringam un turpmākai metožu attīstībai

Veicot literatūras avotu analīzi, tiek veikti plūsmas citometra metodes uzlabojumi, lai datu ieguve būtu precīzāka, tāpēc 2026.gada paraugošanas sērijās tiks ieviests jauns solis, ik pēc pāris paraugiem cauri sistēmai tiks izlaists cauri Milli-Q ūdens, lai pārbaudītu to, vai daļiņas no iepriekšējā parauga nepaliek plūsmas citometra sistēmā (*Paulsen, 2016*).

2026.gadā ir plānots pastiprināti pievērsties paraugu fiksēšanas metodēm, mēģināt ievākt gan fiksētus, gan nefiksētus paraugus un pielietot uzglabāšanu saldējot. Saldēšana der, ja mērķa grupa ir pikoplanktons, jo fitoplanktona šūnas saldējot plīst. Literatūras avotos tiek izmantota arī metode fiksējot ar glutāraldehīdu un pēc tam saldējot šķidrajā slāpekļī -80°C. Ir plānots veikt eksperimentu, kā mainās šūnu saglabāšanās paraugos, ja lieto tikai glutāraldehīdu un ja lieto maisījumu glutāraldehīdu kopā ar Pluronic68 (tā ir virsmaktīva viela, aizsargā šūnas pret mehāniskiem bojājumiem). Salīdzināt Pluronic68 efektu arī nefiksētos paraugos, lai iegūtu maksimāli efektīvāko risinājumu pikoplanktona šūnu saglabāšanai no ūdens ievākšanas brīža līdz analīzei uz plūsmas citometra. Literatūrā ir atrodami dažādu fiksēšanas metožu salīdzinājumi ([Marie, 2014](#)), taču metodi nepieciešams pielāgot specifiski iesāļiem ūdeņiem, kas ir Rīgas līča atšķirība.

Pamatojoties uz BioStandard projekta rezultātiem un padziļināto LHEI fitoplanktona un mikrozooplanktona pavasara sukcesijas datu analīzi, DNS metabarkodēšanas metodes ir perspektīvas un piemērojamas jūras vides bioloģiskās daudzveidības novērtējumā. Lai nodrošinātu datu salīdzināmību un metožu integrāciju esošajā Baltijas jūras monitoringa sistēmā, ieteicams:

1. Integrēt DNS metabarkodēšanas pieeju kā papildinošu metodi fitoplanktona un mikrozooplanktona monitoringā, sākotnēji ieviešot to pilotprojekta veidā Rīgas līcī un citos Baltijas jūras reģionos ar līdzīgu ekoloģisko raksturu. Tas ļautu salīdzināt abu metožu datus ilgtermiņā un novērtēt to pielietojamību bioloģiskās daudzveidības novērtēšanā.
2. Paplašināt reģionālās DNS references datubāzes ar Baltijas jūras un Rīgas līča sugām, lai uzlabotu taksonu noteikšanas precizitāti un reģionālo pielāgojamību.
3. Turpināt metodiskos pētījumus, izmantojot vairākus molekulāros marķierus (piemēram, 18S, 23S, 16S rRNA), lai nodrošinātu abu organismu grupu — eikariotu un prokariotu (tostarp cianobaktēriju) — aptveršanu, nodrošinot pilnīgāku planktona sukcesijas raksturojumu.
4. Standartizēt DNS paraugu ņemšanas un apstrādes procedūras, filtrācijas materiālus, DNS ekstrakcijas un bioinformātikas soļus, balstoties uz BioStandard projekta vadlīnijām, lai veicinātu datu atkārtojamību un starptautisku salīdzināmību.
5. Izstrādāt vienotu pieeju DNS datu interpretācijai, tostarp noteikt minimālo nolasījumu ("reads") sliekšni retu sugu izslēgšanai, relatīvās sastopamības aprēķināšanas principus un rezultātu vizualizācijas formātus, kas būtu piemērojami monitoringā.
6. Veikt sezonālos salīdzinājumus starp metodēm, lai novērtētu, kā mainās fitoplanktona un mikrozooplanktona sastāvs dažādos gadalaikos un kā DNS dati korelē ar biomasas un dominējošo sugu izmaiņām.

7. Izvērtēt DNS metodes ieviešanas iespējas nacionālajā jūras monitoringa programmā kā papildinošu rīku tradicionālajai mikroskopijai, īpaši ņemot vērā tās potenciālu agrīnai invazīvo un toksisko sugu noteikšanai.

LITERATŪRA

Deiner K., Bik HM, Mächler E, Seymour M, Lacoursière-Roussel A, Altermatt F, Creer S, Bista I, Lodge DM, de Vere N, Pfrender M E, Bernatchez L (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26(21), 5872–5895, DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.14350>

Flombaum, P., Gallegos, J.L., Gordillo, R.A., Rincón, J., Zabala, L.L., Jiao, N., et al. 2013. Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 9824-9829.

HAAS, L. W. (1982). Improved epifluorescence microscopic technique for observing planktonic micro-organisms. *Ann. Inst. Oceanogr., Paris*, 58, 261-266.

Hällfors G, (2004) Checklist of Baltic Sea phytoplankton species (including some heterotrophic protistan groups).
<https://www.phycotech.com/Portals/0/PDFs/Checklist%20of%20Baltic%20Sea%20Phytoplankton%20Species.pdf>

Hobbie, J. E., Daley, R. J., & Jasper, S. (1977). Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and environmental microbiology*, 33(5), 1225-1228.

HELCOM (2024), HELCOM Guidelines on monitoring of phytoplankton species composition, abundance and biomass. Retrieved from: <https://helcom.fi/wp-content/uploads/2024/09/Guidelines-for-monitoring-of-phytoplankton-species-composition-abundance-and-biomass.pdf>

Kuliński K, Rehder G, Asmala E, Bartosova A, Carstensen J, Gustafsson B, Hall POJ, Humborg C, Jilbert T, Jürgens K, Meier HEM, Müller-Karulis B, Naumann M, Olesen JE, Savchuk O, Schramm A, Slomp CP, Sofiev M, Sobek A, Szymczycha B, Undeman E (2022) Biogeochemical functioning of the Baltic Sea. *Earth Syst. Dynam.*, 13, 633–685, DOI: <https://doi.org/10.5194/esd-13-633-2022>

Marie, D., Rigaut-Jalabert, F., & Vaulot, D. (2014). An improved protocol for flow cytometry analysis of phytoplankton cultures and natural samples. *Cytometry Part A*, 85(11), 962-968.

Paulsen ML, Doré H, Garczarek L, Seuthe L, Müller O, Sandaa R-A, Bratbak G and Larsen A (2016) *Synechococcus* in the Atlantic Gateway to the Arctic Ocean. *Front. Mar. Sci.* 3:191. doi: 10.3389/fmars.2016.00191

Salmi P., Mäki A., Mikkonen A., Pupponen V-M., Vuorio K. & Tiiola M. 2021: Comparison of epifluorescence microscopy and flow cytometry in counting freshwater picophytoplankton. *Boreal Env. Res.* 26: 17–27.

Sildever S, Edvardsen B, Egge E, Engesmo A, Harðardóttir S, Jacobsen Á, Jakobsen H, Jurgensone I, Karlson B, Kremp A, Laamanen T, Lehtinen S, Majaneva M, Meissner K, Mertens K, Nagai S, Olsen EL, Probert I, Pärt K, Rünk N, Sassenhagen I, Suikkanen S, Terre-Terrillon A, Torstensson A, Vuorio K (2025). Reliable environmental DNA detection of planktonic biodiversity: Minimum sample volume for DNA metabarcoding. *TemaNord* 2025:509. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, DOI: <https://doi.org/10.6027/temanord2025-509>

Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. (2018). *Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring*. Oxford University Press.

Vaulot D, Courties C, Partensky F. A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. *Cytometry*. 1989 Sep;10(5):629-35. doi: 10.1002/cyto.990100519. PMID: 2505987.