

Pro gradu –tutkielma

**Kirjolohen (*Oncorhynchus mykiss*)
kasvun, eväindeksien muutosten ja kuolleisuuden
vertailu kiertovesi- ja läpivirtaussysteemeissä**

Riitta Myyrä



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Limnologia ja hydrobiologia

Heinäkuu 2008

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Limnologia ja hydrobiologia

MYYRÄ, RIITTA S.: Kirjolohen (*Oncorhynchus mykiss*) kasvun, eväindeksien muutosten ja kuolleisuuden vertailu kiertovesi- ja läpivirtaussysteemeissä

Pro gradu: 30 s.

Työn ohjaajat: FT Timo Mäkinen, DI Martti Naukkarinen, FT Juhani Pirhonen

Tarkastajat: FT Juhani Pirhonen, FT Jouni Vielma

Heinäkuu 2008

Hakusanat: kiertovesiviljely, läpivirtaussysteemi, kirjolohi, kasvu, eväindeksi, kuolleisuus

TIIVISTELMÄ

Kiertovesiviljely on tullut kalanviljelyssä ajankohtaiseksi viljelytekniikaksi sekä ympäristöllisistä että tuotannollisista syistä. Suomessa tekniikka on kuitenkin vielä melko uutta, erityisesti vuonna 1995, jolloin tämän työn kokeellinen osuus on tehty, ja oli aiheellista selvittää tekniikan etuja ja haittoja perinteiseen läpivirtaussysteemiin verrattuna. Tässä tutkimuksessa vertailtiin kirjolohen (*Oncorhynchus mykiss*) kasvua, eväindeksien muutoksia ja kuolleisuutta kiertovesisysteemeissä ja tavanomaisessa läpivirtaussysteemeissä käytännön poikastuotannon mittakaavassa. Kalojen kasvua seurattiin mittaamalla allaskohtaisten keskipainojen ja kokonaisbiomassojen muutosta sekä määrittämällä kasvunopeudet (SGR). Kalojen kasvussa (kiertovedessä keskipaino 8,61 g:sta 21,59 g:aan, allaskohtaisen kokonaisbiomassan kasvu 5 kg:sta keskimäärin 11,57 kg:aan ja läpivirtaussysteemeissä keskipaino 8,68 g:sta 21,62 g:aan, allaskohtaisen kokonaisbiomassan kasvu 5 kg:sta keskimäärin 11,48 kg:aan) viiden viikon aikana ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja systeemien välillä. Eväindekseissä, jotka määritettiin eväkohtaisesti, tapahtui negatiivisia muutoksia kokeen aikana molemmissa systeemeissä, mutta systeemien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. Myöskään kuolleisuudessa (kiertovedessä 1,87 % ja läpivirtaussysteemeissä 1,44 % yksilömäärästä), jossa altaiden välinen vaihtelu oli melko suurta, ei systeemien välillä havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa. Näin ollen molempien systeemien voitiin todeta olleen kirjolohen poikastuotannossa kalojen kasvun ja hyvinvoinnin kannalta samanarvoisessa asemassa.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Science

Department of Biological and Environmental Science

Limnology and hydrobiology

MYYRÄ, RIITTA S.: Growth, fin condition and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in recirculation and flow-through systems

Master of Science Thesis: 30 p.

Supervisors: PhD Timo Mäkinen, M.Sc. (Tech.) Martti Naukkarinen, PhD Juhani Pirhonen

Inspectors: PhD Juhani Pirhonen, PhD Jouni Vielma

July 2008

Key Words: recirculation, flow-through, rainbow trout, growth, fin condition, survival

ABSTRACT

Water recirculation in aquaculture is a method of current interest for both environmental and productional reasons. This technique is relatively new in Finland, especially in 1995, when the experimental part of this study was carried out, and it was relevant to compare the advantages and disadvantages of the recirculation technique to the traditional flow-through system. In this study I have compared the growth, changes in the fin condition and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in recirculation and flow-through systems in a productional scale juvenile fish farm. The growth was measured as changes in mean weights and total biomass. Also the specific growth rate (SGR) was calculated. There was no statistically significant difference in the growth (mean weight in recirculation from 8,61 g to 21,59 g with mean total biomass from 5 kg to 11,57 kg per tank and mean weight in flow-through from 8,68 g to 21,62 g with mean total biomass from 5 kg to 11,48 kg per tank) in these two systems during five weeks of the experiment. The fin condition, defined with an index for each fin, declined in both systems during the experiment, but there was no statistically significant difference between the systems. The survival rate (being in recirculation 98,13 % and in flow-through 98,56 % of the total number of individuals), with wide variation between the tanks, did not differ between the systems significantly either. Based to the results of this study it can be concluded that the growth and health of the fish were equal in recirculation and flow-through systems during the juvenile rainbow trout production.

Sisältö

1. JOHDANTO	5
2. TUTKIMUKSEN TAUSTA	6
2.1. Vedenlaatu kiertovesiviljelyssä.....	6
2.1.1. Vedenlaatuvaatimukset.....	6
2.1.2. Aineenvaihduntatuotteet ja niiden toksisuus.....	7
2.1.3. pH ja alkaliniteetti.....	8
2.2. Kiertovesiviljelyn osa-alueet ja toimintaperiaate.....	8
2.2.1. Yleistä.....	8
2.2.2. Nitrifikaatio.....	9
2.2.3. Denitrifikaatio.....	9
2.2.4. Ilmastus ja hapetus.....	10
2.2.5. Kiintoaineen poisto.....	10
2.2.6. Desinfiointi.....	10
2.3. Periaatteeltaan erilaiset biosuodattimet ja systeemit.....	11
2.3.1. Yleistä.....	11
2.3.2. Vesi-ilmatila-biosuodattimet.....	12
2.3.3. Uppobiosuodattimet.....	12
2.3.4. Muut biologiset puhdistussysteemit.....	13
2.4. Kiertovesiviljelyn toimivuus käytännön tuotantomenetelmänä.....	13
2.4.1. Kiertovesisysteemin edut ja tulevaisuus.....	13
2.4.2. Kiertovesisysteemin käytössä huomioitavat seikat ja ongelmat.....	14
3. AINEISTO JA MENETELMÄT	15
4. TULOKSET	21
4.1. Kalojen kasvu kiertovesi- ja läpivirtaussysteemeissä.....	21
4.2. Kalojen kunto.....	23
4.3. Kalojen kuolleisuus.....	24
5. TULOSTEN TARKASTELU	25
Kiitokset	28
Kirjallisuus	28

1. JOHDANTO

Maailmanlaajuisesti vesiviljelyllä on jo vuosikymmeniä ollut suuri merkitys ruoantuotannossa, mutta kalastettavien kalakantojen taantuessa ja toisaalta ruokaa kuluttavan väestömäärän kasvaessa tuotantomäärät ovat huimassa kasvussa. Maailman ruokakalan tuotanto oli vuonna 2000 noin 35,5 miljoonaa tonnia, mutta vuonna 2005 jo noin 47,8 miljoonaa tonnia (FAO 2007). Tuotannon luonne on myös muuttunut paikallisesta ruoantuotannosta jatkuvasti yhä kaupallisempaan suuntaan. Vesiviljelyn tuotantosysteemit ovat erittäin suurten haasteiden edessä, jotta tuotannon kasvu olisi mahdollista kestävän kehityksen periaatteiden mukaisesti.

Suomen vuotuinen ruokakalan tuotanto oli vuonna 2006 noin 12,9 miljoonaa kiloa. Pääasiallisin tuotantolaji on ollut kirjolohi. Tämän lisäksi tuotettiin kalanpoikasia sekä istutuksiin että jatkokasvatukseen noin 59 miljoonaa yksilöä. Tuotantoa on sekä rannikkoalueilla (noin 82 % ruokakalan tuotannosta) että sisävesissä (Anonyymi 2006). Kalanviljelyyn tarvittavaa vettä on Suomessa ollut käytettävissä riittävästi, mutta haasteet tuotantosysteemien kehittämiseksi ovat ajankohtaisia myös Suomessa. Ympäristön kuormituksen, energiakustannusten nousun ja tuotannon monipuolistamisen aiheuttamat paineet kansainvälisen kilpailun kiristyessä ovat antaneet aiheutta käyttä muualla maailmassa varsin yleisesti käytettyä kiertovesiviljelyä myös meillä Suomessa. Nykyisin Suomessa on muutama kaupallisen mittakaavan kiertovesilaitos, joissa tuotetaan nieriää, sampea sekä lohena ja taimena istukaspoikasia. Tämän lisäksi kiertovesisysteemi on käytössä useissa tutkimuslaitoksissa.

Kalanviljely kiertovesijärjestelmässä perustuu tekniikkaan, jolla kalan aineenvaihduntatuotteet, lähinnä ammoniakki, poistetaan vedestä biologisella puhdistusmenetelmällä niin, että samaa vettä voidaan käyttää yhä uudelleen. Samalla vedestä poistetaan kiintoainetta, sitä ilmastetaan, hapetetaan ja desinfioidaan. Vesi vaihtuu joko ainoastaan altaiden puhdistuksen yhteydessä tai sitä vaihdetaan syöttäen systeemiin jatkuvasti pieni määrä uutta vettä.

Toimivan kiertovesisysteemin edut ovat selvästi nähtävissä. Perinteisessä läpivirtaussysteemiin perustuvassa viljelyssä vesi käytetään vain kerran, joten veteen kertyvät ravinnepitoisuudet ovat vesimäärään nähden niin pieniä, ettei ole mahdollista taloudellisesti puhdistaa laitokselta poistuvaa vettä. Kiertovesiviljelyssä poistuva vesimäärä on puolestaan varsin pieni ja suhteellisen ravinnepitoinen, jolloin myös poistoveden puhdistaminen on toteutettavissa. Ympäristöön kohdistuvaa kuormitusta on näin mahdollista vähentää hyvin tuntuvasti. Erityisesti poikastuotannossa joudutaan viljelyvettä myös lämmittämään, joten energiakustannukset pienenevät merkittävästi, kun lämmitetty vesi voidaan käyttää moneen kertaan. Lämmityskustannusten näin pienentyessä laitoksen viljelyaikataulua voidaan laajentaa, jolloin yrityksen kilpailukyky paranee verrattaessa sitä erityisesti luonnonvesien lämpötiloihin ja tiukkaan kasvusaikatauluun sitoutuneeseen, mutta myös tavanomaista lämmitysjärjestelmää käyttävään yritykseen. Tämän lisäksi potentiaalisten tuotantolajien kirjo laajenee. Kiertovesiviljelyssä on kuitenkin kiinnitettävä erityistä huomiota systeemin laitteistojen ja biologisen järjestelmän toimivuuteen, tautitorjuntaan ja tuotannon kustannustehokkuuteen.

Uuden teknologian käyttöönottoon liittyy usein monia epävarmuustekijöitä. Kalankasvatuksessa olennaisia tekijöitä ovat kalojen hyvinvointi ja kasvu. Vuonna 1995, jolloin tämän työn kokeellinen osa on tehty, kiertovesiviljely oli Suomessa vielä uutta. Koepaikkana käytetty laitos oli Suomen ensimmäinen kiertovesisysteemiä kaupallisessa

tuotannossa käytävä laitos. Oli aiheellista selvittää uuden teknologian toimivuutta käytännön viljelymittakaavassa.

Tutkimusaiheeksi valittiin kalan kasvun, kunnon ja kuolleisuuden seuranta ja vertailu kiertovesi- ja tavanomaisessa läpivirtaussysteemissä. Viljelyssä käytettävän veden laatu on yksi niistä ympäristötekijöistä, joiden tiedetään vaikuttavan kalojen kasvuun. Kiertovesiviljelyssä erityistä huomiota vaativien ammoniakkin (Vosyliene & Kazlauskienė 2004), nitriitin (Kroupova ym. 2008) ja hiilidioksidin (Fivelstad ym. 1998) on havaittu vaikuttavan kasvua hidastavasti. Mahdolliset erot kalojen kasvussa muodostavatkin hyvän vertailupohjan arvioitaessa kiertovesiviljelyn toimivuutta kalankasvatuksessa verrattuna muutoin samankaltaiseen, tavanomaiseen läpivirtaussysteemiin.

Kalanviljelyoloissa kalojen evien kunnon muutokset voivat johtua useista eri syistä. Useimmissa tutkimuksissa muutosten on havaittu olevan sidoksissa kasvatustiheyteen, kalojen väliseen hierarkkiseen käyttäytymiseen (evien näytkiminen), mekaaniseen kulumiseen (altaan pohja ja reunat), ravinnon määrään, infektoihin ja veden laatuun. Nämä kaikki ovat myös osittain toisistaan riippuvia tekijöitä (Moutou ym. 1998, Ellis ym. 2002, Rasmussen ym. 2007). Tässä koeasetelmassa kyseiset tekijät olivat molemmissa systeemeissä veden laatua (ja mahdollista infektiota) lukuun ottamatta toisiaan vastaavat, joten veden laadun vaikutusta evien kunnon muutoksiin oli mahdollista arvioida.

Työ koostuu sisällöllisesti kahdesta osasta. Tutkimuksen taustaksi tarkastellaan yleisellä tasolla kiertovesiviljelyn toimintaperiaatteita ja siinä käytettäviä menetelmiä kirjallisuuden valossa. Aiheen laajuuden johdosta keskitytään käsittelemään pääasiassa lohikalojen viljelyä. Työn kokeellisessa osassa verrattiin kiertovesisysteemin toimivuutta tavanomaisen läpivirtaussysteemin toimintaan käytännön mittakaavan poikastuotannossa. Näitä kahta systeemiä verrattiin seuraamalla systeemeihin laitettavien kalojen kasvua (kokonaisbiomassan kasvu ja keskipainot), kuntoa (eväindeksi) ja kuolleisuutta.

2. TUTKIMUKSEN TAUSTA

2.1. Vedenlaatu kiertovesiviljelyssä

2.1.1. Vedenlaatuvaatimukset

Tärkeimmät perusvaatimukset kalanviljelyssä käytettävälle vedelle ovat riittävä happipitoisuus ja sopiva lämpötila. Tämän lisäksi on myös joukko muita vaatimuksia, jotka veden laadun on täytettävä, muun muassa sopiva pH ja alkaliniteetti, oikealla tasolla olevat aineenvaihduntatuotteiden, mineraalien ja metallien pitoisuudet sekä riittävän alhainen kiintoaineen määrä (Timmons & Ebeling 2007). Vaatimukset vaihtelevat kalalajeittain. Lohikalat ovat vedenlaadun suhteen melko vaativia (Taulukko 1), vaikkakin kirjallisuudessa esiintyvät raja-arvot poikkeavat toisistaan joskus melkoisesti. Toisaalta ilmoitettu raja-arvo ei aina ole ehdoton, sillä esimerkiksi liian alhaista happipitoisuutta voidaan käytännössä jonkin verran kompensoida lisäämällä veden virtausta.

Vettä kierrätettäessä on huomioitava erityisesti riittävän happipitoisuuden ylläpitäminen, ammoniakkin, nitriitin ja hiilidioksidin pitoisuudet, liiallisen kiintoaineen poisto, veden pH ja alkaliniteetti. Nämä kaikki ovat vedenlaatutekijöitä, jotka ovat tärkeitä sekä viljeltäville kaloille että biologisen puhdistussysteemin toiminnalle (Soderberg 1995, Timmons & Ebeling 2007).

Taulukko 1. Vedenlaatuvaatimuksia lohikalojen viljelylle (Billard 1986, Lawson 1995). Arvot mg/l.

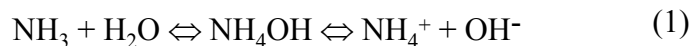
Liennut happi	> 70 % kyllästys, minimi 5
CO ₂	0-10
Alkaliniteetti (CaCO ₃)	10-400
pH	6,5 - 8
Kalsium (Ca)	4-160
Mangaani	0-0,01
Lyijy	< 0,02
Magnesium	< 15
Kokonaisrauta	0-0,15
- ferro-ionit	0
- ferri-ionit	0,5
Fosfori	0,01-3
Nitraatti	0-3,0*
Nitriitti	
- Ca > 50	< 0,2
- Ca < 50	< 0,1
Ammoniakki (NH ₃)	< 0,02
Typpi (% kyllästys)	< 102-105
Kiintoaine	< 25
BHK	< 10
KHK	< 30

*Nitraatin osalta ylärajaksi on esitetty myös jopa 400 mg/l (Timmons & Ebeling 2007).

2.1.2. Aineenvaihduntatuotteet ja niiden toksisuus

Kalan kaksi tärkeintä aineenvaihduntatuotetta ovat ammoniakki (NH₃), joka on kemiallisesti sitoutuneen typen (ensisijaisesti proteiinit ja nukleiinihapot) tärkein muuntumistuote luukaloilla, ja hiilidioksidi (CO₂), jota syntyy hengityksessä (Helle 1990). Sekä typen yhdisteet että hiilidioksidi ovat erityisesti kierto-vesiviljelyssä huomionarvoisia, koska niiden pitoisuus vedessä kasvaa kierrätysasteen kasvaessa ja koska ne ovat veden pH:sta riippuen kaloille toksisia jo suhteellisen pieninä pitoisuuksina (Petit 1990).

Ammoniakki on kaasu, joka liukenee veteen seuraavan tasapainoyhtälön (1) mukaisesti:



Ammoniakin suhteellinen esiintymismuoto (NH₃ / NH₄⁺) riippuu veden pH:sta, suolapitoisuudesta ja lämpötilasta. Kaloille selvästi toksisempi muoto on ei-ionisoitunut ammoniakki (NH₃), joka läpäisee solukalvon ja jonka pitoisuus vedessä kymmenkertaistuu veden pH-arvon kasvaessa yhdellä yksiköllä. Ionisoitunut NH₄⁺-muoto puolestaan on suhteellisesti vähemmän toksinen, mutta krooninen altistuminen on haitallista (Lawson 1995, Soderberg 1995, Timmons & Ebeling 2007). Ammoniakin on havaittu aiheuttavan muun muassa kidusvaurioita ja altistumista taudeille. Kidusvaurioista johtuen kalan hapen saanti heikkenee, minkä puolestaan on havaittu hidastavan kalan kasvunopeutta (Burrows 1964). Carballo ym. (1995) havaitsivat ammoniakin nostavan kalan stressitasoa, joka näkyi veren plasman kortisolipitoisuuden nousuna. Stressitason akuuttikin nousu riitti altistamaan kalat *Saprolegnia*-tartunnalle kontrolliryhmää selvästi herkemmin.

Veteen liuennut ammoniakki (ionisoitunut NH_4^+ -muoto) hapettuu nitrifikaatioprosessissa nitriitiksi (NO_2^-) ja tästä edelleen nitraatiksi (NO_3^-). Näistä nitriitti on kaloille toksinen yhdiste, sillä nitriitti heikentää veren hemoglobiinin hapensidontakykyä. Nitriitin toksisuutta vähentää merkittävästi veden kloridi(Cl^-)-konsentraatio. Tämä johtuu kidusepiteelin kloridisolujen kyvyttömyydestä erottaa nitriitti- ja kloridi-ioneja toisistaan, jolloin solut eivät absorboi nitriitti-ioneja yhtä paljon kloridi-ionien läsnä ollessa kuin ilman niitä (Perrone & Meade 1977). Nitraatti on nitrifikaatioprosessin lopputuote, jonka pitoisuudet tavanomaisissa kiertoovesisysteemeissä eivät ole yleensä kaloille haitallisia. Ohjearvo nitraatin pitoisuudelle vaihtelee paljon, sillä yläraja vaihtelee välillä 3-400 mg/l 96-tunnin LC-arvon ollessa yleensä yli 1000 mg/l. Systeemeissä, joissa joko vaihdettavan veden määrä on hyvin pieni tai vesimassan viipymä suuri, on tarpeen kontrolloida myös nitraatin pitoisuutta (Timmons & Ebeling 2007). Eräissä viimeaikaisissa tutkimuksissa on saatu tuloksia, joissa nitraatin on havaittu aiheuttavan muutoksia selkärankaisten endokriinisissa elintoiminnoissa, joten turvallinen raja-arvo saattaa tulevaisuudessa muuttua (Guillette & Edwards 2005). Tiukentuvat ympäristönsuojelumääräykset saattavat myös asettaa rajoituksia poistoveden nitraattipitoisuudelle (van Rijn 2007).

Hiilidioksidi on kaasu, jonka liukeneminen veteen riippuu veden pH:sta, alkaliniteetista ja veden karbonaattimuotoisen hiilen pitoisuudesta. Veden liian suuri hiilidioksidipitoisuus alentaa kalojen hengitystehokkuutta ja alhaisen happipitoisuuden sietokykyä. Liika hiilidioksidi estää normaalin kaasunvaihdon kiduksissa, jolloin veren plasman pH alenee ja hemoglobiinin hapenkuljetuskyky heikkenee. Tässä tilassa, hengityseräisessä asidoosissa, edes veden korkeasta happipitoisuudesta ei ole hyötyä (Timmons & Ebeling 2007).

2.1.3. pH ja alkaliniteetti

Veden happamuusastetta ilmaisee veden pH-arvo. Kalojen optimaalinen pH on yleensä välillä 6.5-8, mutta enimmäkseen pH:lla on merkitystä sen epäsuorien vaikutuksien takia. pH vaikuttaa useissa veden kemiallisissa tasapainosuhteissa, muun muassa ionisoituneen ja ei-ionisoituneen ammoniakkin ja nitriitin pitoisuuksissa. Lisäksi pH:lla on merkitystä tiettyjen yhdisteiden ja metallien toksisuudelle (Timmons & Ebeling 2007).

Alkaliniteetti kuvaa veden pH-puskurointikapasiteettia. Alkaliniteettia ilmaistaan CaCO_3 -ekvivalenttina (mg/l). Veden karbonaattikoostumus vaikuttaa pH:n muutosten voimakkuuteen ja sitä kautta kaikkiin pH-sidonnaisiin reaktioihin. Kiertoovesisysteemeissä on huomattava, että nitrifikaatioprosessi kuluttaa veden alkaliniteettia, joten ainakin suurissa kasvatustiheyksissä ja suuren viipymän systeemeissä on alkaliniteettia seurattava ja tarvittaessa nostettava. Tähän soveltuu hyvin esimerkiksi natriumbikarbonaatti (Lawson 1995, Timmons & Ebeling 2007).

2.2. Kiertovesiviljelyn osa-alueet ja toimintaperiaate

2.2.1. Yleistä

Kiertovesiviljely perustuu siihen, että viljelyssä käytettävä vesi puhdistetaan niin, että sitä voidaan käyttää yhä uudelleen. Aineenvaihduntatuotteista ammoniakki muunnetaan nitraatiksi (nitrifikaatio), tarvittaessa nitraatti poistetaan systeemistä vapaana typpikaasuna (denitrifikaatio) ja hiilidioksidi poistetaan ilmastuksen avulla ja pH:n ja alkaliniteetin oikeista tasoista huolehtimalla. Tämän lisäksi veden happipitoisuus on

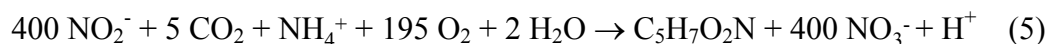
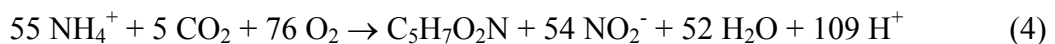
pidettävä riittävällä tasolla, kiintoaines on poistettava ja tautipatogeenit on eliminoitava desinfioidin avulla.

2.2.2. Nitrifikaatio

Nitrifikaatiolla tarkoitetaan ammoniumin hapettumista nitraatiksi seuraavissa yhtälöissä kuvattujen reaktioiden mukaisesti:



Kun mukaan otetaan nitrifioivan bakteerikasvuston muodostuminen (solujen hiili hiilidioksidista), saadaan nitrifikaation kokonaisreaktioiksi:

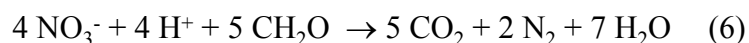


Yhtälön (4) mukaisessa reaktiossa hapetus tapahtuu pääasiassa *Nitrosomonas*-suvun ja yhtälön (5) mukaisen reaktion osalta *Nitrobacter*-suvun bakteerien toimesta (Haug & McCarty 1972). Molempien sukujen bakteerit ovat autotrofiaa ja aerobeja nitrifioimisen suhteen (Sharma & Ahlert 1977).

Nitrifikaation ensimmäisessä vaiheessa muodostuvat vety-ionit laskevat veden pH:ta, joten puskuroinnista on huolehdittava (Haug & McCarty 1972). Veden pH:lla on merkitystä paitsi kaloille, myös nitrifioiville bakteereille. Jos pH on korkea, on vedessä ei-ionisoitunutta ammoniakkia (yhtälö 1) ja jos pH on matala, on vedessä puolestaan ei-ionisoitunutta typpihapoketta (yhtälö 2 suluissa). Molempien ei-ionisoituneiden muotojen pitoisuuksien kasvun on havaittu merkittävästi haittaavan nitrifikaatiota, erityisesti *Nitrobacter*-suvun bakteereiden toimintaa. Tämä tarkoittaa sitä, että nitriittiä akkumuloituu veteen. Käytännön kalanviljelylle tällä on kuitenkin melko vähän merkitystä, sillä bakteereita haittaavat pitoisuudet ovat suurempia kuin suoraan kaloille ongelmia aiheuttavat (Anthonisen ym. 1976). Bakteerit myös mukautuvat varsin laajalle pH-alueelle (välillä 6-9), kunhan muutokset eivät ole nopeita. On kuitenkin syytä pitäytyä lähempänä tämän alueen alarajaa, jotta vältetään ammoniakkin pH-sidonnaisilta haitoilta kaloille (Timmons & Ebeling 2007).

2.2.3. Denitrifikaatio

Denitrifikaatiossa veden nitraatti pelkistyy anaerobisissa olosuhteissa vapaaksi typeksi seuraavassa yhtälössä kuvattuna reaktion mukaisesti:



Denitrifioivat mikro-organismit ovat lähinnä *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus* ja *Micrococcus*-sukuihin kuuluvia aerobisia bakteereita. Hapekkaisiin oloihin verrattuna denitrifikaation nitraatti-ionit korvaavat vapaan hapen näiden bakteerien aineenvaihdunnassa. Reaktio edellyttää myös hiilenlähdettä (Reeves 1972). Veden puhdistuksessa denitrifikaatio tapahtuu yleensä oloissa, joissa orgaanisen hiilen lähde ei ole (selkeytetty, puhdistettu vesi), jolloin ulkopuolinen hiilenlähde on lisättävä systeemiin ennen denitrifikaatiota. Systeemi voidaan joskus suunnitella ja rakentaa myös niin, että on mahdollista hyödyntää hiilenlähteenä systeemin sisäistä orgaanista hiiltä eli lietettä (van Rijn 2007). Yleisimmin tähän tarkoitukseen käytetään kuitenkin metanolia, jonka toimivuudesta on runsaasti kokemuksia, mutta myös esimerkiksi melassin, glukoosin ja etikan soveltuvuutta on tutkittu. Näistä erityisesti melassi on edullisuutensa vuoksi

kiinnostava vaihtoehto, mutta prosessin ammoniakkin ja vaahdon muodostus edellyttävät vielä lisätutkimuksia (Hamlin ym. 2008). Denitrifikaatioprosessi on mahdollista sijoittaa kalanviljelysystemiin niin, että nitraattia poistetaan joko koko ajan kiertävästä vedestä tai vain poistettavasta vedestä (van Rijn 2007).

2.2.4. Ilmastus ja hapetus

Kierrätettävän veden happipitoisuus laskee, koska sekä kalat että nitrifioivat bakteerit kuluttavat happea. Kiertovesisysteemiin ei saa muodostua anaerobisia kohtia (mahdollista hallittua denitrifikaatiota lukuun ottamatta), sillä niissä saattaa muodostua metaania tai vetysulfidia, jotka molemmat ovat kaloille ja bakteereille toksisia kaasuja (Lawson 1995). Happipitoisuuden ylläpitämiseksi vettä on tarpeen joko hapettaa (veteen syötetään puhdasta happea) tai ilmastaa (mahdollisimman suuri vesipinta saatetaan ilman kanssa tekemisiin) tai mahdollisesti molempia. Ilmastus on tarpeen myös typen ylikyllästykseen välttämiseksi ja hiilidioksidin poistamiseksi, joskin hiilidioksidin pitoisuutta säätelevät myös esimerkiksi pH ja alkaliniteetti (Petit 1990, Timmons & Ebeling 2007).

2.2.5. Kiintoaineen poisto

Kalankasvatuksessa syntyy kiintoainetta lähinnä kalojen ulosteista ja ylijäämärehusta. Kiertävästä vedestä tämä kiintoaine on poistettava, koska se aiheuttaa veden samentumista, biologisten puhdistussysteemien tukkeutumista, heterotrofisen bakteerimassan kasvua ja nitrifikaation hidastumista ja koska se hajotessaan tuottaa ammoniakkaa ja kuluttaa happea. Lisäksi kiintoaine on haitallista kalojen kiduksille ja kuljettaa mukanaan patogeeneja. Suurissa kiintoainekasautumissa voi lisäksi muodostua anaerobinen tila, jossa saattaa syntyä toksisia kaasuja. Tärkeää on huomioida, että kiintoaine poistetaan jo kasvatusaltaasta nopeasti ja tehokkaasti. Suositeltavin allasmalli on pyöreä allas, koska siinä kiintoaine poistuu virtauksen mukana, kunhan altaan halkaisijan ja vedenkorkeuden suhde on oikea. Vedestä kiintoainetta voidaan poistaa lähinnä laskeutuksen, mekaanisen suodatuksen, flotaation tai otsonoinnin avulla (Soderberg 1995, Chen ym. 2006, Timmons & Ebeling 2007).

2.2.6. Desinfiointi

Kierrätettävän veden desinfiointi on tarpeen, jotta välttyttäisiin tautibakteerien aiheuttamilta ongelmilta. Pintavettä käyttävissä kalanviljelylaitoksissa myös tuloveden desinfiointi saattaa tästä syystä olla perusteltua. Lisäksi mikäli desinfiointi on mahdollista tehdä myös ennen biologisia puhdistimia, voidaan puhdistimien bakteerikannan koostumusta ja toimivuutta parantaa (Lawson 1995). Kalanviljelyolosuhteissa käyttökelpoisia desinfiointimenetelmiä ovat lähinnä UV-säteilytys ja otsonointi (Timmons & Ebeling 2007).

Ultraviolettisäteilytyksen mikro-organismeja tappava ominaisuus perustuu siihen, että absorboituneet UV-säteet tuhoavat DNA-molekyylin rakenteen, jolloin mikro-organismien perintöaineksen kopioituminen ja solunjakautuminen estyvät. Kyseinen ominaisuus on UV-säteilyllä, jonka aallonpituus on välillä 250-270 nm, UV-laitteissa käytetään aallonpituutta 253.7 nm. Säteilytyksessä käytetään kvartsikuorisia elohopeahöyrylamppeja, jotka sijoitetaan mahdollisimman lähelle käsiteltävää vesipintaa tai upoksiin suojaputken sisällä. Menetelmän etuja ovat suhteellinen edullisuus, helppokäyttöisyys ja se, ettei UV-säteilytyksessä synny haitallisia sivutuotteita tai jäänteitä. Tietyin edellytyksin menetelmä on riittävä desinfiointimenetelmä, mutta koska

eri taudinaiheuttajien UV-säteilyn sieto vaihtelee hyvin paljon, ei käytännössä ole aina mahdollista säteilyttää vettä sillä intensiteetillä, joka joidenkin virusten tuhoamiseksi olisi tarpeen (Liltved ym. 2007). Tarvittavan UV-säteilyannoksen suuruudesta eri bakteerien tuhoamiseksi on myös saatu varsin ristiriitaisia tuloksia, esimerkiksi Sharrer ym. (2005) havaitsivat, että tarvittava UV-säteilyannos heterotrofisten bakteerien tuhoamiseen oli jopa 60-kertainen yleisesti vesiviljelyssä suositettuun annokseen (30 mW s/cm^2) nähden. Veden riittävä mekaaninen suodatus ennen UV-käsittelyä on edellytys menetelmän toimivuudelle, sillä kiintoainepartikkelit suojaavat tautipatogeenia UV-säteilyltä (Liltved & Cripps 1999).

Otsonointi on ollut vesiviljelyssä paljon käytetty desinfiointimenetelmä, koska sillä on erittäin hyvä ja nopea desinfiointiteho ja reaktiolla on haitaton lopputuote (happi). Makean veden otsonoinnissa haitallisia sivutuotteita ei juurikaan synny, mutta meriveden otsonoinnissa on huomioitava muun muassa kaloille haitallisten bromidi- ja kloridiyhdisteiden syntyminen (Liltved ym. 2007). Otsonaattoreiden avulla tuotettu otsonikaasu (O_3) saatetaan kosketuksiin veden kanssa, jonka jälkeen otsonin annetaan vaikuttaa vedessä tietty aika riippuen halutusta desinfiointitasosta. Lopuksi on huolehdittava, ettei otsonia jää veteen tai käsittelytilan ilmaan, koska otsoni on haitallinen sekä kaloille että ihmisille jo hyvinkin pieninä pitoisuuksina (Summerfelt & Hochheimer 1997). Otsonoinnin käyttö desinfiointimenetelmänä perustuu siihen, että veteen liuetessaan otsoni hapettaa nopeasti orgaanisen aineksen. Komanapalli & Lau (1996) havaitsivat, että otsonin toksisuus bakteereille perustuu pääasiassa solukalvomuutoksiin lipidien ja proteiinien osalla. Vasta pidempiaikainen otsonialtistus vaikutti myös solunsisäisiin rakenteisiin, proteiineihin ja DNA:han, tuhoten bakteerin elinkelpoisuuden. Desinfioinnissa kiertovesisysteemeissä veden orgaanisen aineksen korkea pitoisuus edellyttäisi käytännössä niin pitkiä reaktioaikoja, ettei jäännösotsonin poistaminen ole useinkaan mahdollista. Toisaalta jo varsinaista desinfiointipitoisuutta pienemmätkin pitoisuudet saattavat riittää tautipatogeenikantojen hillitsemiseen tasolle, joka vähentää kuolleisuutta ja kemiallisen tautikontrollin tarvetta selvästi (Bullock ym. 1997). Menetelmää voidaankin käyttää vedenlaadun parantamiseksi (nitriitin ja kiintoaineen pitoisuuksien väheneminen, veden kirkastuminen), jolloin ongelmia ylipäättään tulee vähemmän. Toisaalta nitriitin väheneminen otsonin ansiosta vähentää myös biosuodattimien nitriittiä poistavia bakteereja, jolloin mahdolliset katkokset otsonoinnissa aiheuttavat nopeasti kaloille haitallisen nitriittipitoisuuden muodostumisen (Summerfelt ym. 1997). Käytännön sovelluksissa on myös huomioitava, että otsonointi desinfiointimenetelmänä ei ole kovinkaan yksinkertainen ja on lisäksi suhteellisen kallis (Liltved ym. 2007).

2.3. Periaatteeltaan erilaiset biosuodattimet ja systeemit

2.3.1. Yleistä

Kalankasvatuksessa käytettävän veden (kiertovesi tai poistovesi) biologisessa puhdistuksessa käytetään monenlaisia systeemejä ja laitteistoja. Pääosin puhdistus perustuu nitrifikaatioon (ja denitrifikaatioon), mutta myös muiden mikrobien, levien ja kasvien käyttöön perustuvia systeemejä käytetään. Tässä keskitytään pääasiassa nitrifikaatioon perustuviin laitteistoihin, mutta lopuksi tarkastellaan lyhyesti myös muita systeemejä. Kalanviljelyssä käytettävän biologisen vedenpuhdistuksen suomenkielinen termistö ei ole vakiintunutta, joten laitteiden tai systeemien nimien jälkeen on suluissa vastaava termi englanniksi.

Nitrifikaatioon perustuvien biosuodattimien lähtökohtana on muodostaa ohut biofilmipinta nitrifioivista bakteereista. Kasvualustana voidaan käyttää lähes mitä tahansa materiaalia, josta saadaan rakennettua mahdollisimman suuri pinta mahdollisimman pieneen tilaan. Nitrifioivat bakteerit käyttävät biofilmin ympärillä liikkuvasta vedestä poistettavat ravinteet ja ottavat siitä myös tarvitsemansa hapen. Toimintaperiaatteiltaan nämä biosuodattimet voidaan jakaa vesi-ilmatila-biosuodattimiin (emerged/emergent) ja uppobiosuodattimiin (submerged) (Malone & Pfeiffer 2006).

2.3.2. Vesi-ilmatila-biosuodattimet

Biosuodattimet, joissa biofilmi on jatkuvasti kosteana, mutta ei kuitenkaan jatkuvasti upoksissa, ovat yleensä tyypiltään joko valutusbiosuodattimia (trickling filters) tai pyöriviä biosuodattimia (rotating biological contactors - RBC). Näissä biosuodattimissa biofilmi on veden lisäksi kosketuksissa myös ilman kanssa, jolloin hapen liukeneminen bakteerien käyttöön on tehokasta. Samalla vesi myös ilmastuu ja hiilidioksidia poistuu (Timmons & Ebeling 2007).

Valutusbiosuodattimissa vesi tulee suodattimeen yläkautta, yleensä kiinteiden tai pyörivien, reiällisten levitysputkien kautta. Näin vesi saadaan leviämään mahdollisimman tasaisesti suodatinmateriaalille, joka näin pysyy tasaisen kosteana. Suodattimen alaosassa tulee olla riittävä ilmatila. Korkeisiin suodatintorneihin voidaan lisäksi johtaa ilmaa sijoittamalla tuuletusaukkoja tornin alaosaan. Suodatinmateriaalina käytetään esimerkiksi karkeaa soraa tai muovikappaleita, joita on kaupallisesti tarjolla useita erilaisia. Kalkkikiven käyttö suodatinmateriaalina on myös yleistä, koska se toimii lisäksi puskurina nopeille pH:n vaihteluille. Vaikka tarkoituksena on saada rakennettua mahdollisimman suuri pinta-ala mahdollisimman pieneen tilavuuteen, on suodattimeen kuitenkin jäätävä riittävästi ilmapälejä, jotta veden virtaus olisi sujuvaa. Lisäksi liian tiheäksi rakennettu suodatin voi tukkeutua heterotrofisen bakteerimassan kasvaessa ja hienojakoisen orgaanisen aineksen kulkeutuessa veden mukana suodattimeen (Lawson 1995, Timmons & Ebeling 2007).

Pyörivissä biosuodattimissa kasvualustana on iso rumpu, joka muodostuu toisiinsa liitetyistä muovilevyistä. Rumpu on vesialtaassa, johon puhdistettava vesi johdetaan, ja se pyörii jatkuvasti akselinsa varassa niin, että noin puolet rummusta on veden peitossa ja puolet ilmassa. Akseli voi pyöriä mekaanisesti moottorin avulla tai mikäli rumpu rakennetaan kelluvaksi, sitä voidaan pyörittää ilman tai veden avulla (Timmons & Ebeling 2007).

2.3.3. Uppobiosuodattimet

Uppobiosuodattimissa suodatinmateriaali on jatkuvasti veden peitossa. Tällöin riittävästä hapen lisäyksestä on huolehdittava erikseen. Nykyisin käytössä olevissa, umpisäiliöisissä uppobiosuodattimissa bakteerien kasvualusta on pienijakoista, hyvän pinta-ala-tilavuussuhteen omaavaa materiaalia, joka on yleensä ainakin jonkin verran liikkeessä vesimassan mukana.

Kellupetityylisissä biosuodattimissa vesi joko johdetaan paineella alakautta umpisäiliöön tai yläkautta painovoimaisesti avoimeen säiliöön. Ensimmäisessä suodatintyyppissä (floating bead) on kelluvaa, mekaanisesti sekoitettavaa muoviraetta massana, jonka läpi vesi nousee pois. Tällainen biosuodatin toimii samalla myös veden selkeyttäjä ja kiintoaineen poistajana, koska muoviraemassa on sekä bakteerien kasvualusta että mekaaninen suodatin. Tämä toisaalta edellyttää, että suodatin puhdistetaan usein. Uusimmissa kaupallisissa malleissa puhdistusprosessi on automatisoitu.

Jälkimmäisessä suodatintyyppissä (downflow microbead) kasvualustamateriaalina on erittäin kevyt polystyreenirae, joka muodostaa hitaasti liikkuvan patjan, jonka läpi vesi valuu (Timmons & Ebeling 2007).

Leijupetityylisissä biosuodattimissa bakteerien kasvualusta on jatkuvassa liikkeessä vesimassan mukana. Materiaali voi olla esimerkiksi hiekkaa (fluidized-sand), jota pyöritetään paineella syötettävän tuloveden avulla, tai pieniä, onttoja muovisylintereitä (moving bed MBBR), joita pyöritetään ilmasuihkun avulla. Jälkimmäistä voidaan käyttää myös denitrikaatiobiosuodattimena, jos ilmasuihkun sijaan käytetään mekaanista sekoittajaa (Timmons & Ebeling 2007).

2.3.4. Muut biologiset puhdistussysteemit

Nitrifikaation yhteydessä kuvatus autotrofisen nitrifikaation lisäksi ammoniakkia voidaan poistaa myös esimerkiksi fotoautotrofisissa, heterotrofiseen bakteeristoon perustuvissa ja kalan- ja kasvinviljelyn yhdistävissä systeemeissä.

Fotoautotrofisen systeemi perustuu levien biosynteesiin ("greenwater systems"), jossa levät hyödyntävät vedessä olevan ammoniakin suoraan kasvuunsa. Systeemiä voidaan käyttää lähinnä joidenkin lämpimän veden lajien, esimerkiksi tilapian ja katkaravun, viljelyssä. Vuorokaudenajan ja leväpopulaation muutosten aiheuttama voimakas jaksottuminen esimerkiksi hapen ja ammoniakin pitoisuuksissa rajaa systeemin käyttömahdollisuuksia (Burford ym. 2003, Timmons & Ebeling 2007).

Heterotrofista bakteerikasvustoa hyödyntävässä systeemissä bakteerit muuntavat ammoniakin suoraan soluproteiinikasvuunsa. Tällöin tarvitaan lisäksi ulkopuolista hiilenlähdettä. Hiilidioksidin tuotanto on 75 % suurempi kuin nitrifikaatiossa. Systeemissä muodostuu erittäin runsas bakteerikasvusto, joka hankaloittaa systeemin hyödyntämistä. Toisaalta tätä systeemiä käyttämällä on mahdollista rakentaa tuotantosysteemejä, joissa vettä ei vaihdeta käytännössä lainkaan (Timmons & Ebeling 2007).

Kalan- ja kasvinviljely voidaan yhdistää yhdeksi systeemiksi (aquaponics), jossa on mahdollista tuottaa sekä kaloja että kasveja kaupallisessa mittakaavassa. Systeemin kalanviljelyssä käytetty vesi kiertää kasvinviljelylinjastoissa, joissa kasvit kasvavat vedessä kelluvilla alustoilla juuriston ollessa vedenpinnan alla. Vedestä kasvit käyttävät sekä ravinteet että hiilidioksidin kasvuunsa puhdistuen samalla veden. Nitraatti on tyyppinen muodoista optimaalisin kasvien käyttöön. Systeemissä saattaakin olla lisänä biosuodatin, mutta kasvien alustat saattavat oikein mitoitetuissa systeemeissä riittää biofilmialustoiksi, joissa tarvittavaa nitrifikaatiota tapahtuu. Systeemejä on käytössä lämpimän veden kalalajeilla (esimerkiksi tilapia) ja kasvina on useimmiten lehtivihanneksia (esimerkiksi yrtit ja lehtisalaatit). Systeemin käyttö vaatii monialaista osaamista ja melko suuria tuotantoaloja, mutta hyvin suunniteltuna mahdollistaa monipuolisen, käytännössä lähes ravinnepestövapaan tuotannon (Rakocy ym. 2007).

2.4. Kiertovesiviljelyn toimivuus käytännön tuotantomenetelmänä

2.4.1. Kiertovesisysteemin edut ja tulevaisuus

Edellä esitetyn mukaisesti nykyteknikoihin perustuvat kiertovesisysteemit antavat mahdollisuuden viljellä kalaa hyvin kontrolloidusti niin tuotannon kuin ympäristövaikutustenkin osalta. Kasvatus tapahtuu sisätiloissa suhteellisen pienessä tilassa, jolloin tuotanto on mahdollista sijoittaa lähelle kuluttajia ja on mahdollista ympäri vuoden. Veden laatua ja lämpötilaa on mahdollista kontrolloida tarkasti, jolloin tuotanto on

mahdollista rytmittää markkinoiden vaatimusten mukaisesti. Myös tuotettavien lajien määrä on jatkuvassa kasvussa. Viljelyyn käytettävän veden määrää on mahdollista pienentää jopa 99 % verrattuna läpivirtaussysteemeihin. Tuotannon laajuus ei ole myöskään sidoksissa tuotannon ravinnepestöihin, koska ne ovat kontrolloitavissa. Kiertovesiviljelyn avulla onkin mahdollista tuottaa turvallista lähiruokaa ympäristönsuojelullisesti kestäväällä tavalla (Timmons & Ebeling 2007).

Denitrifikaatio on menetelmä, jota ei toistaiseksi ole juurikaan käytetty kaupallisessa vesiviljelyssä. Viime vuosina kiinnostus on kuitenkin kasvanut, ja tulevaisuudessa menetelmän käytön uskotaankin lisääntyvän erityisesti sellaisissa kiertovesilaitoksissa, joissa eri syistä (esimerkiksi ravinnepestörajoitukset, merivesilaitokset, vedenlaadulle erityisen herkat kala- tai äyriäislajit) pyritään mahdollisimman suljettuun kiertoon, jolloin vedestä on poistettava myös nitraattia (van Rijn 2007). Viimeaikaisissa tutkimuksissa on lisäksi havaittu, että denitrifikaatiolla voi olla merkitystä myös fosforin poistamisessa (denitrifioivat heterotrofiset bakteerit sitovat myös fosforia), mikä mahdollistaisi yhä tehokkaamman ravinteiden poistamisen vesiviljelyn poistovesistä (Barak ym. 2003).

2.4.2. Kiertovesisysteemin käytössä huomioitavat seikat ja ongelmat

Kiertovesisysteemeissä käytettävä tekniikka koostuu useista toisistaan riippuvista, osittain monimutkaisista laitteistoista, joiden toimintaa on jatkuvasti seurattava ja valvottava. Systeemin yhden osa-alueen pettäessä koko systeemin toiminta on vaarassa. Toimivuuden kannalta on tärkeää, että laitteistot on suunniteltu ja mitoitettu oikein. Tuotanto sitoo pääomaa tavanomaista viljelyä enemmän, joten tuotannon suunnitteluun, jaksottamiseen ja taloudelliseen kannattavuuteen on kiinnitettävä erityistä huomiota (Timmons & Ebeling 2007).

Tautien ja loisten torjunnassa on kiertovettä käyttävissä systeemeissä oltava erityisen huolellinen. Torjuntaan ja hoitoon käytettävät kemikaalit (esimerkiksi formaliini, bentsalkonikloridi, kloramiini-T) ja lääkkeet vaikuttavat usein myös biosuodatinten bakteerien toimintaan. Käsittelyissä joudutaankin etsimään ratkaisu, joka soveltuu sekä kaloille että biosuodatinten bakteeristolle. Tarvittaessa kylvetykset voidaan järjestää esimerkiksi niin, että vesi kiertää kylvetyksen ajan biosuodatinten ohi, mutta tällöin on vaarana, että biosuodattimiin muodostuu bakteerien ja loisten esiintymiä, joista ne pääsevät leviämään jälleen kaloihin. Toinen käsittelymahdollisuus on, että kemikaalia käytetään koko kierrossa, mutta kylvetyksessä käytettävä pitoisuus on laimeampi ja aika pidempi kuin läpivirtaussysteemeissä. Joka tapauksessa samankin kemikaalin vaikutukset ovat eri systeemeissä erilaisia, joten ainoa mahdollisuus on kokeilemalla etsiä sopiva käytäntö. Ennaltaehkäisy (puhtaat kalakannat ja mäti, tarkka hygienia ja desinfiointi, rokotukset) onkin ensiarvoisen tärkeää (Noble & Summerfelt 1996).

Yksi ruokakalatuotannossa esiintyvistä ongelmista on kalaan muodostuvat sivumaut, joista erityisesti mudan maun ilmentyminen voi liittyä kiertovesiviljelyyn. Mudan makua aiheuttavista yhdisteistä yleisimpiä ovat geosmiini ja metyyli-isoborneoli, jotka imeytyvät kalojen verenkiertoon nopeasti ja sitoutuvat rasvakudokseen (Tucker 2000, Timmons & Ebeling 2007). Kyseisiä yhdisteitä muodostuu pintavesissä, biologisissa puhdistussysteemeissä ja putkistoissa lähinnä cyanobakteerien, aktinomykeettien ja sienten toimesta, joskin tähän liittyvät biologiset prosessit ovat vielä osittain huonosti tunnettuja (Jüttner & Watson 2007). Mikäli mudan makua esiintyy, perattavia kaloja on pidettävä raikkaassa, hyvin vaihtuvassa vedessä niin kauan, yleensä muutamia päiviä, että maku häviää. Runsasrasvaisten kalojen puhdistuminen voi kestää kauemminkin, erityisesti kylmässä (alle 10°C) vedessä (Tucker 2000, Timmons & Ebeling 2007).

Kalojen erittämät kemikaalit ovat osa kalayksilöiden välistä viestintää. Kiertovedessä näitä kemikaaleja akkumuloituu veteen, jolloin myös kemiallisten signaalien merkitys voi olla erilainen verrattuna tavalliseen läpivirtaussysteemiin. Kirjolohen tiedetään erottavan sisarusensa kemiallisten signaalien perusteella (Brown ym. 1993). Sisarusuhteella tiedetään olevan vaikutusta kalojen hierarkkiseen käyttäytymiseen, esimerkiksi Griffiths & Armstrong (2000) havaitsivat, että dominoivat lohenpoikaset (*Salmo salar*) olivat kiertovedessä läpivirtausta aggressiivisempia niitä alempiarvoisia poikasia kohtaan, jotka eivät olleet näille sukua, kuin alempiarvoisille sukulaisilleen. Aihetta on kuitenkin tutkittu, osin ristiriitaisinkin tuloksin, lähinnä luonnonkaloilla, eikä merkitystä kalanviljelyolosuhteissa vielä tiedetä.

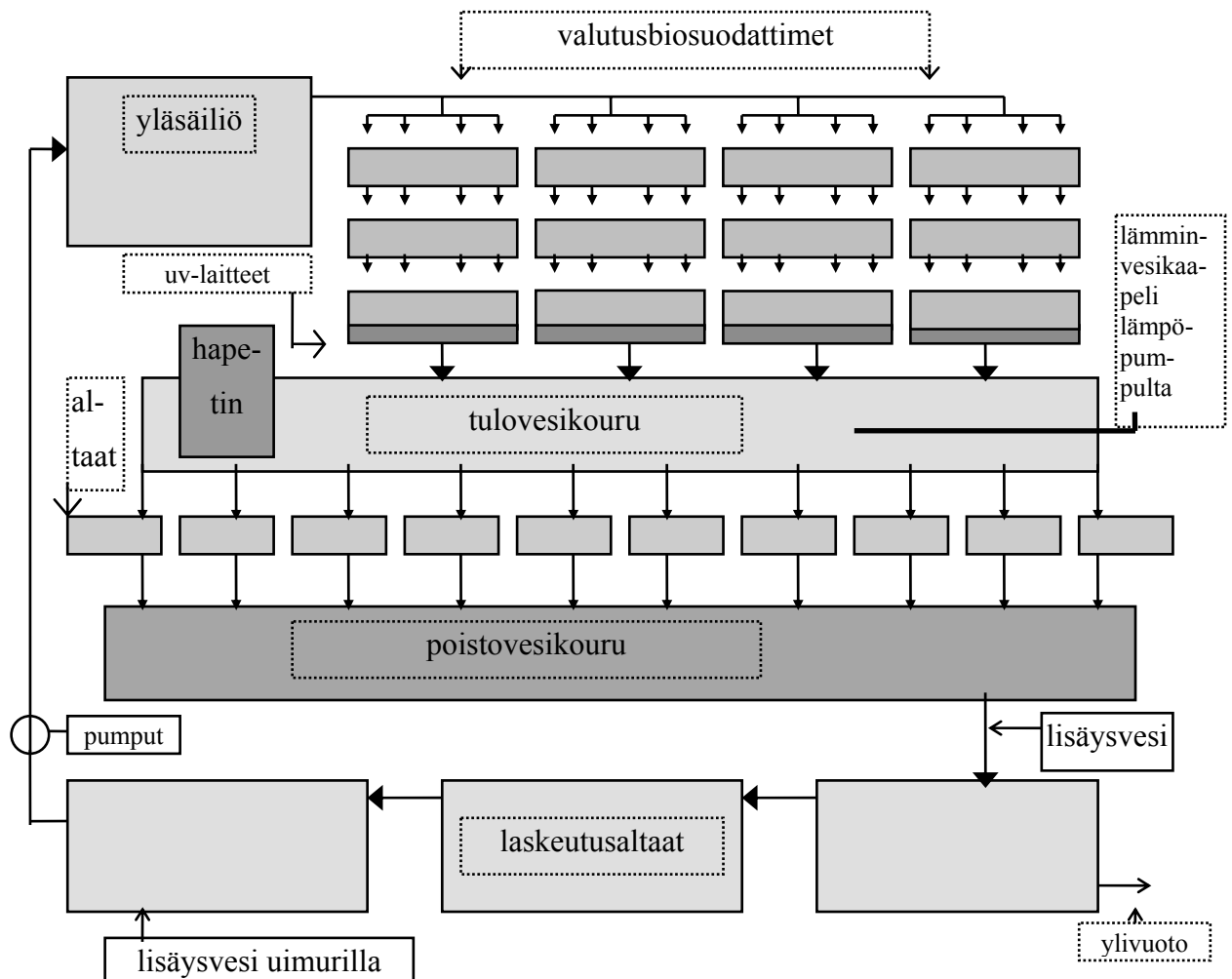
3. AINEISTO JA MENETELMÄT

Koe tehtiin loka-marraskuussa vuonna 1995 Myrskylän Hautomo Oy:n tiloissa. Myrskylän Hautomo Oy oli vuonna 1995 kirjolohen poikastuotantoon erikoistunut kalanviljelylaitos. Laitoksessa käytettävä vesi on pohjavettä, ja sitä saadaan lähteestä omalla paineellaan noin 20 l/s. Laitoksen ravinnepäästö-määriin perustuva tuotantolupa oli kyseisenä vuonna 9000 kg eli noin miljoona 0-vuotiasta poikasta vuodessa. Tuotantokapasiteetin kasvattaminen, energiansäästö ja tuotannon paremmat rytmitysmahdollisuudet olivat ensisijaisia syitä kierrätysjärjestelmien suunnittelulle ja käyttöönotolle. Laitokselle rakennettiin kahta erillistä kierrätysjärjestelmää, joista tämän kokeen yhteydessä käytettiin valutusbiosuodattimia (trickling filter) käyttävää järjestelmää. Järjestelmän rakentaminen toteutettiin puolalaisten Ryszard Kolmanin ja Andrzej Szczerbowskiin tekemän suunnitelman pohjalta.

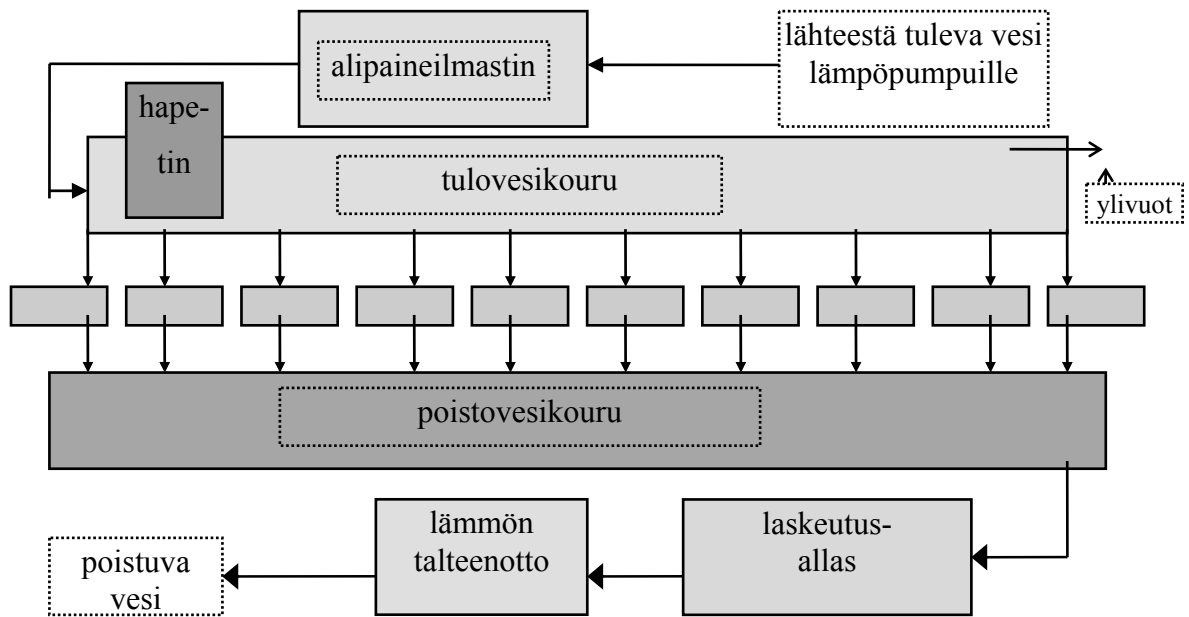
Käytetty biologinen puhdistusjärjestelmä koostui neljästä valutusbiosuodatintornista, kolmesta laskeutusaltaasta ja vesisäiliöstä, jotka sijaitsivat allashuoneesta erillään olevassa noin 10 m²:n huoneessa. Vesikourut ja -putkistot oli rakennettu seinän läpi. Altaista poistuva vesi tuli poistokourua pitkin ensimmäiseen laskeutusaltaaseen, josta se meni toisen laskeutusaltaan kautta kolmanteen, ja sieltä edelleen pumpuilla ylös vesisäiliöön. Laskeutusaltaat olivat lattiapinnasta alaspäin rakennettuja betonialtaita. Ensimmäisestä laskeutusaltaasta oli ylivuotoputki järjestelmästä poistuvaa vettä varten. Varsinaisten puhdistustornien yläpuolella olleesta lujitemuovisesta vesisäiliöstä vesi jaettiin putkia pitkin tornien ylimmäisiin laatikoihin. Kussakin tornissa oli päällekkäin kolme lujitemuovista laatikkoa (pinta-ala 1 m²/laatikko), joista kahdessa ylimmäisessä oli reikälevypohjat, joiden läpi vesi tuli alempaan laatikkoon. Laatikot oli täytetty kerroksittain kalkkikivellä ja karkealla sepelillä (kivikerroksen paksuus 10 cm/laatikko). Kunkin tornin alimmaisessa laatikossa oli peiliseinäinen säiliö, jonka pohjalla vesi eteni tasaisena mattona. Peiliseinäiset pinnat heijastivat säteilyä tehokkaammin vesimassaan. Jokaisessa säiliössä oli viisi UV-lamppua (teho á 30 W), joita käytettiin veden desinfiointiin. Säiliöistä poistuva vesi kerääntyi putkia pitkin tulovesikouruun, josta se edelleen jaettiin altaisiin. Ennen ensimmäistä allasta tulovesikourun vesi ilmastettiin alipaineilmastimen avulla. Tulovesikourun pohjalla oli lämmitysjärjestelmään yhdistetty kupariputki-lämmitin, jonka avulla järjestelmän vettä oli mahdollista lämmittää. Ylävesisäiliön tasolla oli lämpöpuhallin, joka myös vaikutti veden lämpötilaan ylläpitämällä suodatinhuoneen lämpötilaa korkeammalla kuin ulkolämpötila (talvisin). Järjestelmään tuleva uusi vesi tuli läpivirtaussysteemin tulovesikourusta letkua pitkin ensimmäiseen laskeutusaltaaseen. Tämän lisäksi viimeisessä laskeutusaltaassa oli uimurilla varustettu vesiletku, josta järjestelmään saatiin uutta vettä, mikäli sitä poistui liikaa esimerkiksi altaiden puhdistuksen yhteydessä. Tutkimuksen aikana järjestelmään tulevan

uuden veden määrä vaihteli välillä 3 – 4,2 l/min. Laskennallisesti tällaisella puhdistusjärjestelmällä voidaan tuottaa noin 15 kg kalaa allasta kohden eli yhteensä 150 kg. Tuotettava kalamäärä riippuu muun muassa käytettävän veden lämpötilasta, happipitoisuudesta ja viljeltävän kalan koosta. Kiertovesisysteemi käynnistettiin kaksi kuukautta ennen kokeen alkua. Jokaiseen altaaseen laitettiin 5 kg kalaa, joiden keskipaino oli 4 g. Kaloja ruokittiin normaalin kasvatusrytmin mukaisesti automaattiruokinnalla (jatkuvatoimiset hihna-automaatit), aloittaen noin 200 g:n vuorokausiannoksella. Kalat poistettiin altaista juuri ennen kokeen alkua. Tässä yhteydessä altaat puhdistettiin ja desinfioidtiin kuumalla vesihöyryllä.

Käytössä oli edelläkuvatuunlainen kiertoovesisysteemi (Kuva 1), jossa oli 10 pyöreää muoviallasta (Ø 1,5 m, vesitilavuus noin 350 l). Vertailuryhmällä oli vastaavanlainen, samoin 10 altaasta koostuva tavanomainen läpivirtaussysteemi (Kuva 2). Läpivirtaussysteemin tulovesikourun vesi oli kokonaan uutta vettä, jota lämmitettiin lämpöpumpuilla ja ilmastettiin alipaineilmastimen avulla. Tulovesikourusta oli ylivuotoputki poistokouruun, johon altaista poistuva vesi tuli. Poistokourusta vesi meni lämmönvaihtimen kautta suoraan ulos.



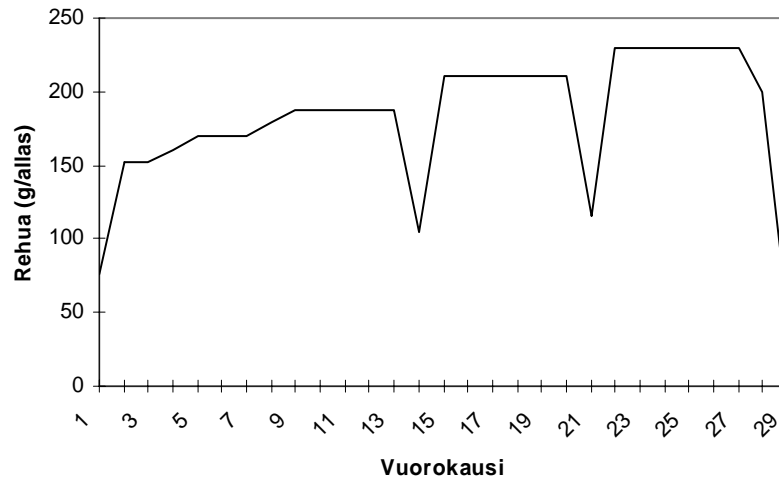
Kuva 1. Kokeen kiertoovesisysteemin rakenne kaaviona.



Kuva 2. Kokeen läpivirtaussysteemin rakenne kaaviona.

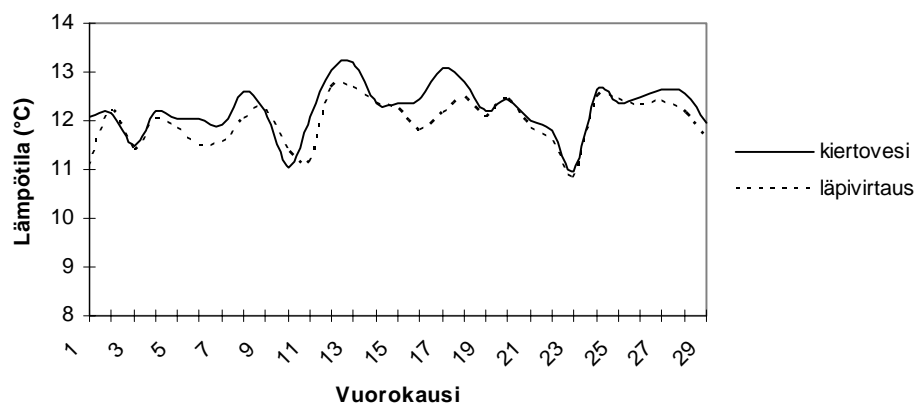
Kokeen alussa jokaiseen altaaseen laitettiin tasan 5 kg lajittelemattomia kirjolohen poikasia, joiden keskipaino oli kiertovesisysteemissä 8,61 g ja läpivirtaussysteemissä 8,68 g. Altaiden yksilömäärä vaihteli 511:sta 644:ään johtuen yksilöpainojen hajonnasta. Alkukeskipainojen mukainen kokonaisyksilömäärä oli kiertovesisysteemissä 5823 yksilöä ja läpivirtaussysteemissä 5780 yksilöä. Ennen koetta kaikki kalat olivat tavanomaisessa läpivirtaussysteemissä.

Kaloja kasvatettiin normaaliin kasvatusohjelmaan perustuen lukuun ottamatta kalojen lajittelua ja harvennusta. Ruokintaan käytettiin allaskohtaisia, jatkuvatoimisia automaatteja (12 tunnin kellolla varustettuja AGK-kihna-automaatteja), jotka täytettiin kaksi kertaa vuorokaudessa. Käytännössä ruokintaa oli tasaisesti noin 21 tuntia vuorokaudessa, taukoa aamuisin 3 tuntia. Kokeen ensimmäisen viikon puolivälissä rehumäärää lisättiin arvioidun kasvun mukaisesti, mutta muutoin syötettävä rehumäärä tarkastettiin arvioidun kasvuprosentin mukaiseksi kerran viikossa keskipainopunnitusten yhteydessä. Kasvuprosentin arviointi perustui laitoksen aiempiin kasvutuloksiin koeolosuhteita vastaavissa lämpötiloissa ja samankokoisilla kaloilla. Kaikki rehuannokset punnittiin gramman tarkkuudella astioihin, joista ne jaettiin automaatteihin. Käytetty rehu oli Vextra Start Mure 3 (Finnewos Oy) poikasrehua (proteiineja 53 %, rasvaa 18 %, muuntokelpoinen energiasisältö 21,7 MJ/kg, N 8,5 %, P 1,2 %). Punnituspäivien aamuina (punnitus kerran viikossa) rehua ei annettu stressin vähentämiseksi toista punnituskertaa lukuun ottamatta, jolloin automaattit täytettiin erehdyksessä. Kokeen aikana käytetyt rehumäärät nähdään kuvassa 3.

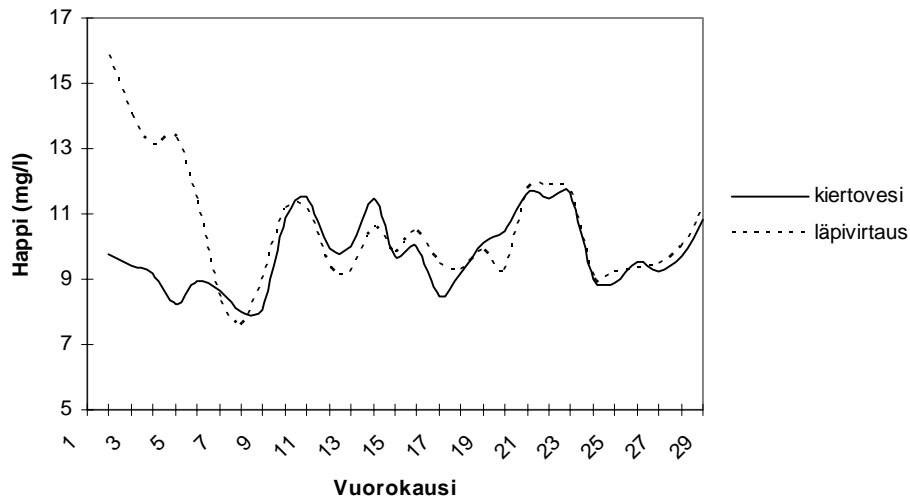


Kuva 3. Allaskohtaiset rehumäärät koejakson aikana. ”Notkahdukset” ovat olleet punnitusajankohtina, jolloin rehua annettiin vain kerran vuorokaudessa (toista punnituskertaa lukuun ottamatta).

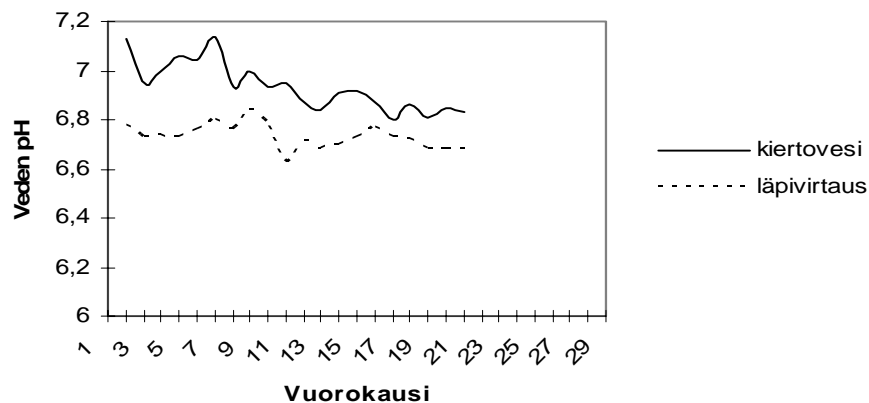
Kokeen aikana seurattiin päivittäin molempien systeemien veden lämpötilaa, happipitoisuutta ja pH:ta. Veden lämpötila mitattiin kaksi kertaa päivässä tulovesikouruista 0,1 °C:een tarkkuudella. Kokeenaikainen päiväasteiden lämpösomma oli kiertovesisysteemissä 355,25 °C ja läpivirtaussysteemissä 347,10 °C, joten kiertovesisysteemin keskilämpötila kokeen aikana oli 12,25 °C ja läpivirtaussysteemin 11,97 °C (Kuva 4). Happipitoisuus mitattiin happimittarilla (WTW Oxi 92, Wissenschaftlich Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Saksa) kaksi kertaa päivässä kahdesta satunnaisesti valitusta altaasta molemmissa systeemeissä. Koejakson aikana keskimääräinen veden happipitoisuus oli kiertovesisysteemissä 9,8 mg/l ja läpivirtaussysteemissä 10,6 mg/l (Kuva 5). pH-mittaukset tehtiin pH-mittarilla (WTW pH 90, Wissenschaftlich Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Saksa) 0,01 yksikön tarkkuudella yhdestä satunnaisesti valitusta altaasta molemmissa systeemeissä päivittäin. Kahdeksan viimeisen koepäivän pH-havainnot puuttuvat mittarin rikkoutumisen vuoksi. Keskimääräinen veden pH-arvo koejakson aikana oli kiertovesisysteemissä 6,93 ja läpivirtaussysteemissä 6,73 (Kuva 6).



Kuva 4. Veden lämpötila kiertovesi- ja läpivirtaussysteemeissä (°C). Päivittäinen arvo on kahden mittaustuloksen keskiarvo.



Kuva 5. Veden happipitoisuus kiertovesi- ja läpivirtaussysteemeissä (mg/l). Päivittäinen arvo on neljän mittaustuloksen keskiarvo.



Kuva 6. Veden pH-arvot kiertovesi- ja läpivirtaussysteemeissä. Kahdeksan viimeisen koepäivän arvot puuttuvat pH-mittarin rikkoutumisen vuoksi.

Kalat punnittiin kokeen alussa sekä altaaseen laitettuna kokonaisbiomassana (50 g:n tarkkuudella) että allaskohtaisina keskipainoina (0,1 g:n tarkkuudella). Allaskohtaiset keskipainopunnitukset tehtiin viikon välein. Punnituksen aiheuttaman stressin ja siitä mahdollisesti seuraavan heikomman kasvun arvioimiseksi molempiin systeemeihin jätettiin yksi allas, joista ei tehty välipunnituksia. Kokeen lopussa punnittiin jälleen keskipainojen lisäksi allaskohtaiset kokonaisbiomassat. Keskipainopunnitusten otoskoko oli 20 kalaa allasta kohden (n. 3,5 % kappalemäärästä) eli yhteensä 200 kalaa kummastakin systeemistä kokeen alussa ja lopussa ja 180 kalaa kummastakin systeemistä välipunnituksissa. Altaista nostettiin pienellä haavilla kaloja, joista otettiin satunnaisesti 20 punnitukseen. Punnittavat kalat nukutettiin MS-222 -nukutusaineella (annostus: 1 g / 10 l vettä, puskurointi ruokasoodalla), minkä jälkeen ne kuivattiin kevyesti ja punnittiin yksitellen.

Kalojen kasvusta laskettiin kasvunopeudet (SGR) seuraavan yhtälön mukaisesti:

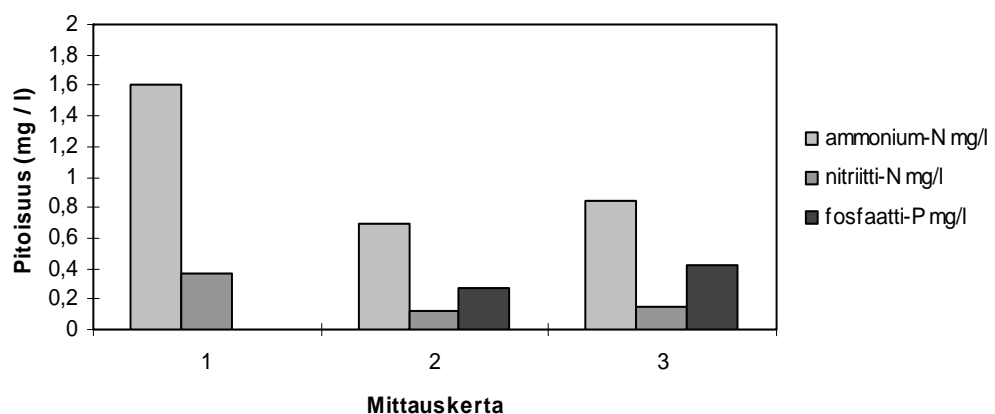
$$\text{SGR (\%)} = (\ln(W_{\text{loppu}}) - \ln(W_{\text{alku}})) / \Delta t \times 100 \quad (7),$$

missä W_{loppu} on massa kokeen lopussa (g), W_{alku} on massa kokeen alussa (g) ja Δt on kokeen kesto vuorokausina. Kasvunopeudet laskettiin allaskohtaisesti.

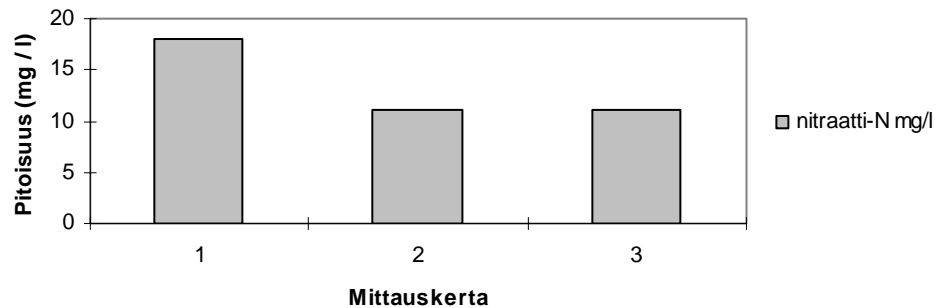
Kalojen kuntoa arvioitiin evien kuluneisuuden avulla määrittämällä ns. eväindeksi kokeen alussa ja lopussa (alussa 15 kalaa ja lopussa sekä kiertovesisysteemistä että läpivirtaussysteemistä molemmista 15 kalaa satunnaisesti systeemikohtaisesta kokonaiskalamäärästä (kokeen alussa ennen altaisiin jakamista ja kokeen lopussa altaiden tyhjennyksen jälkeen, jolloin eri altaiden kalat yhdistettiin systeeminsä sisällä)). Eväindeksi laadittiin viisiportaiseksi (4 = ehjä, terve evä; 3 = vähän kulunut; 2 = kulunut, verestävä; 1 = erittäin kulunut, huonokuntoinen; 0 = evä poiskulunut). Jokaisesta näytekalasta tarkastettiin molemmat rintaevät, molemmat vatsaevät, peräevä, selkäevä ja pyrstö. Jokaiselle kalalle tuli näin seitsemän eväkohtaista indeksilukua, joita verrattiin systeemeittäin alku- ja lopputilanteessa ja lopputilanteessa systeemien välillä. Tämän lisäksi kaloista lähetettiin näytteet tutkittaviksi Åbo Akademin parasitologian laitokselle ennen ja jälkeen kokeen. Kalojen kuntoa arvioitiin sekä makroskooppisten patologisten että histologisten (kidukset, munuaiset, sydän) muutosten perusteella.

Allaskohtainen kuolleisuus kirjattiin ylös päivittäin, ja kuolleet kerättiin pois. Kaikki altaat puhdistettiin päivittäin, mikä laski veden lämpötilaa hetkellisesti molemmissa systeemeissä. Puhdistuksessa käytettiin allaskohtaisia työvälineitä, jotka desinfioidiin kuumavesipesurin höyrystyksellä kerran kokeen aikana.

Kiertovesisysteemin vedenlaatua tarkkailtiin ottamalla vesinäytteitä ennen kokeen alkua, kokeen puolivälissä ja kokeen päätyttyä (Kuvat 7 ja 8). Vesinäytteistä analysoitiin tyyppiyhdisteet (ammonium-, nitriitti- ja nitraattityppi) sekä fosfaattifosfori. Veden fosfaattifosforin pitoisuudesta laskettu tuotannon hetkellinen ominaiskuormitus liuenneen fosforin osalta oli 0,6 g fosfaattifosforia tuotettua kalakiloa kohden. Laskennassa oletettiin, että yksittäisenä hetkenä (toinen vesinäytteenottokerta) systeemeissä oli fosforia noin kahden ruokintavuorokauden ajalta. Ominaiskuormitus laskettiin tästä rehumäärästä huomioiden ulosvirtaama ja rehuherroin. Vesinäyteanalyysit tehtiin Kymijoen vesiensuojeluyhdistys ry:n laboratoriossa Kouvolassa.



Kuva 7. Ammoniumtypen, nitriittitypen ja fosfaattifosforin pitoisuudet (mg/l) kiertovedessä ennen kokeen alkua (mittauskerta 1), kokeen puolivälissä (mittauskerta 2) ja kokeen päätyttyä (mittauskerta 3). Systeemiin virtaavan uuden veden määrä oli ensimmäisellä mittauskerralla 3,0 l/min ja toisella sekä kolmannella mittauskerralla 4,2 l/min. Ammoniumtypen haitallisen, ei-ionisoituneen muodon pitoisuus oli kokeen aikana valliinneiden pH- ja lämpötilaolojen perusteella hyvällä tasolla, laskennallisesti maksimissaan noin 0,004 mg/l.



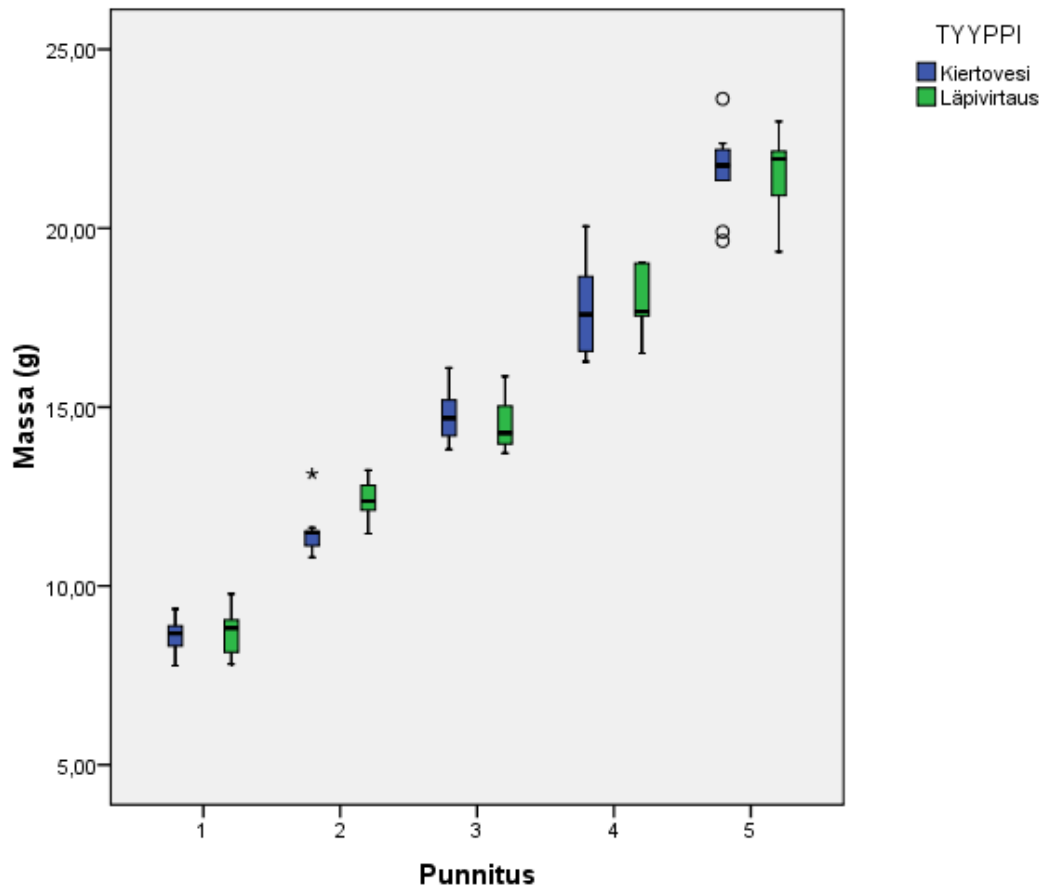
Kuva 8. Nitraattityypen pitoisuus (mg/l) kiertovedessä ennen kokeen alkua (mittauskerta 1), kokeen puolivälissä (mittauskerta 2) ja kokeen päätyttyä (mittauskerta 3). Systeemiin virtaavan uuden veden määrä oli ensimmäisellä mittauskerralla 3,0 l/min ja toisella sekä kolmannella mittauskerralla 4,2 l/min.

Kokeen tulokset käsiteltiin tilastollisesti SPSS-ohjelmalla (versio 16.0). Kirjolohtien kasvua, eväindeksien muutoksia ja kuolleisuutta kiertovesi- ja läpivirtaussysteemeissä tarkasteltiin ja vertailtiin varianssianalyysin (ANOVA) avulla.

4. TULOKSET

4.1. Kalojen kasvu kiertovesi- ja läpivirtaussysteemeissä

Kokeen aikana kalojen kasvua seurattiin ja vertailtiin allaskohtaisten keskipainopunnitusten avulla (Kuva 9). Ensimmäinen punnitus tehtiin kokeen aloituspäivänä 30.10.1995. Kalojen allaskohtaisissa keskipainoissa (kiertovedessä 8,61 g (SD 0,48, n=10), läpivirtaussysteemissä 8,68 g (SD 0,60, n=10)) ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa (ANOVA, $F_{2,19}=0,102$, $p=0,753$). Toinen punnitus eli ensimmäinen välipunnitus tehtiin 5.11.1995. Kalojen keskipainoissa (kiertovedessä 11,52 g (SD 0,67, n=9), läpivirtaussysteemissä 12,38 g (SD 0,58, n=9)) havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero (ANOVA, $F_{2,17}=8,525$, $p=0,010$). Kolmas punnitus eli toinen välipunnitus tehtiin 12.11.1995. Kalojen keskipainoissa (kiertovedessä 14,76 g (SD 0,71, n=9), läpivirtaussysteemissä 14,54 g (SD 0,69, n=9)) ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa (ANOVA, $F_{2,17}=0,452$, $p=0,511$). Neljäs punnitus eli kolmas välipunnitus tehtiin 19.11.1995. Kalojen keskipainoissa (kiertovedessä 17,67 g (SD 1,29, n=9), läpivirtaussysteemissä 18,07 g (SD 0,90, n=9)) ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa (ANOVA, $F_{2,17}=0,590$, $p=0,454$). Viimeinen punnitus tehtiin kokeen lopetuspäivänä 27.11.1995. Kalojen keskipainoissa (kiertovedessä 21,59 g (SD 1,15, n=10), läpivirtaussysteemissä 21,62 g (SD 1,03, n=10)) ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa (ANOVA, $F_{2,19}=0,005$, $p=0,943$).



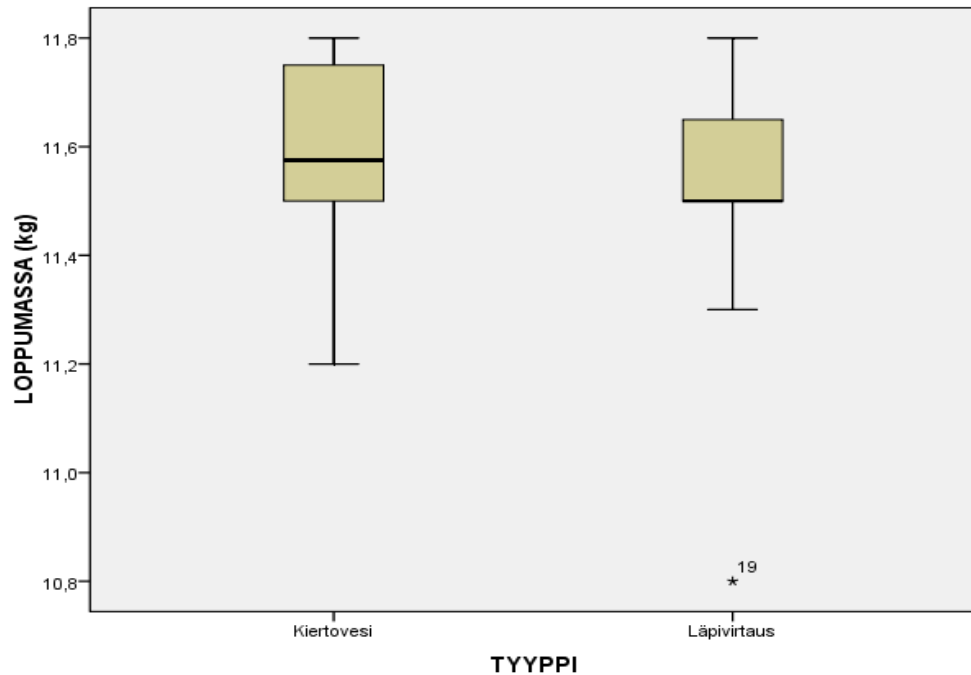
Kuva 9. Kokeenaikaiset kalojen allaskohtaiset keskipainot ja jakaumat. Mediaani (-), keskimmäiset 50 % havainnoista laatikon sisällä ja janat osoittavat laatikkoon nähden 1.5-kertaiselle lisäalueelle sijoittuvat havainnot. Tämän alueen ulkopuolelle sijoittuvat, jakaumasta poikkeavat havainnot on merkitty ympyrällä tai tähdellä. Punnitukset tehtiin viikon välein.

Kokeenaikaisessa kokonaiskasvussa (kiertovedessä 50,0 kg:sta 115,7 kg:aan ja läpivirtaussysteemissä 50,0 kg:sta 114,8 kg:aan) ei systeemien välillä havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa (ANOVA, $F_{2,19}=0,758$, $p=0,395$). Allaskohtaiset loppumassat vaihtelivat 10,8 kg:sta 11,8 kg:aan (Kuva 10).

Altaissa, joissa ei tehty välipunnituksia ollenkaan, allaskohtaiset loppumassat olivat kiertovedessä 11,2 kg ja läpivirtaussysteemissä 11,8 kg. Näistä kiertoveden altaan loppumassa oli systeemin sisällä pienin ja läpivirtaussysteemin suurin.

Allaskohtaisten loppumassojen perusteella lasketut kasvunopeudet (SGR) olivat kiertovedessä 3,28 %/vrk (SD=0,213, n=10) ja läpivirtaussysteemissä 3,26 %/vrk (SD=0,362, n=10). Systeemien välillä kasvunopeudessa ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa (ANOVA, $F_{2,19}=0,029$, $p=0,866$).

Kokeen aikana rehua kului 5280 g allasta kohden. Allaskohtaisten loppumassojen perusteella lasketut rehukertoimet olivat kiertovesisysteemissä 0,80 (SD=0,022, n=10) ja läpivirtaussysteemissä 0,82 (SD=0,037, n=10).



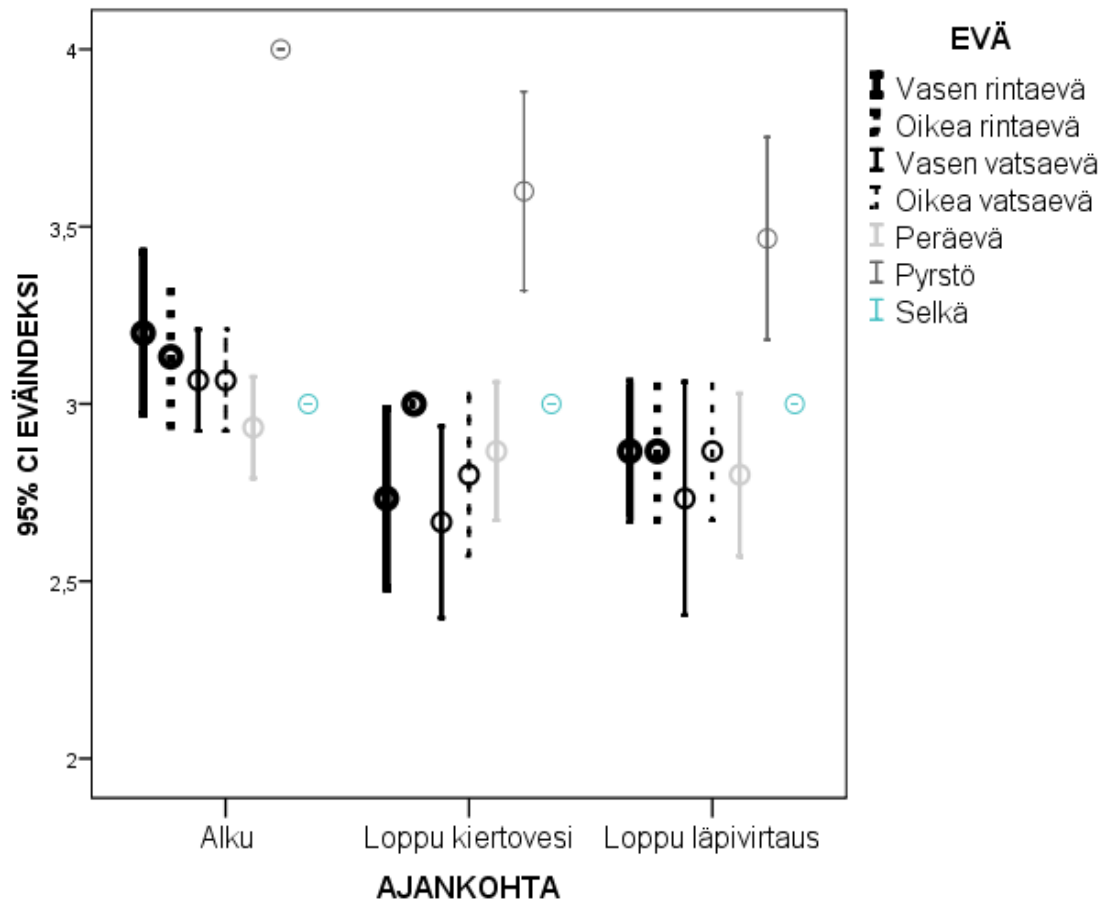
Kuva 10. Allaskohtaiset massat ja jakaumat kokeen lopussa molemmissa systeemeissä. Mediaani (-), keskimmäiset 50 % havainnoista laatikon sisällä ja janat osoittavat laatikkoon nähden 1.5-kertaiselle lisäalueelle sijoittuvat havainnot. Tämän alueen ulkopuolelle sijoittuvat, jakaumasta poikkeavat havainnot on merkitty ympyrällä tai tähdellä. Kokeen pienin loppumassa oli läpivirtaussysteemeissä (kokeen allasnumero 19) ja poikkeaa jakaumasta selvästi. Kiertovedessä allaskohtaisten loppumassojen keskiarvo oli 11,57 kg ja läpivirtaussysteemeissä 11,48 kg.

4.2. Kalojen kunto

Kalojen kunnan muutosta alku- ja lopputilanteen välillä tarkasteltiin eväindeksien muutoksilla. Alkutilanteeseen verrattuna evien kunto heikkeni molemmissa systeemeissä jonkin verran kokeen aikana. Kokonaisuutena (kaikki evät huomioitu) eväindeksien negatiiviset muutokset alku- ja lopputilanteen välillä (Kuva 11) olivat tilastollisesti erittäin merkitseviä sekä kiertovesisysteemeissä (ANOVA, $F_{2,209}=16,110$, $p=0,000$) että läpivirtaussysteemeissä (ANOVA, $F_{2,209}=17,847$, $p=0,000$). Sen sijaan lopputilanteen eväindekseissä systeemien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa (ANOVA, $F_{2,209}=0,022$, $p=0,881$).

Tarkasteltaessa eväindeksien muutoksia evittäin (Taulukko 2) nähdään, että tilastollisesti merkitseviä negatiivisia muutoksia alkutilanteeseen verrattuna on enemmän kiertovedessä kuin läpivirtaussysteemeissä. Vasemman rintaevän osalta negatiivinen muutos on ollut kiertovedessä selvempi kuin läpivirtaussysteemeissä, ja molempien vatsaevien osalta tilastollisesti merkitsevä negatiivinen muutos on tapahtunut ainoastaan kiertovedessä. Pyrstön osalta negatiivinen muutos on ollut selvempi puolestaan läpivirtaussysteemeissä. Kuitenkaan yhdessäkään tapauksessa ei systeemien välillä ole tilastollisesti merkitsevää eroa.

Kaloista ennen ja jälkeen otetuissa ja tutkituissa näytteissä ei havaittu patologisia muutoksia makroskooppisesti eikä histologisesti (kiduksissa, munuaisissa ja sydämessä).



Kuva 11. Kirjolohtien eväindeksien eväkohtaiset keskiarvot ja niiden vaihteluväli 95 %:n luottamusvälillä (95 % CI) kokeen alussa ja lopussa (n=15 jokaisessa). Selkäevien eväindekseissä ei tapahtunut muutoksia alkutilanteeseen nähden kummassakaan systeemissä. Eväindeksi 4 = ehjä, terve evä; 3 = vähän kulunut; 2 = kulunut, verestävä; 1 = erittäin kulunut, huonokuntoinen; 0 = evä poiskulunut.

4.3. Kalojen kuolleisuus

Kalojen kuolleisuus oli kiertovesisysteemissä noin 1,87 % yksilömäärästä (109 kpl) ja läpivirtaussysteemissä noin 1,44 % yksilömäärästä (83 kpl). Altaiden välillä kuolleisuus vaihteli melko paljon ollen kiertovedessä välillä 0,34 - 4,63 % (SD=1,51, n=10) ja läpivirtaussysteemissä välillä 0,47 - 2,90 % (SD=0,91, n=10) yksilömäärästä. Kuolleisuudessa systeemien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa (ANOVA, $F_{2,19}=0,466$, $p=0,504$).

Taulukko 2. Kirjolohtien eväkohtaisten indeksien tilastollisen vertailun (ANOVA) tulokset. Tilastollinen merkitsevyys ilmaistu *::llä merkitsevyystason mukaisesti (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ ja *** = $p < 0,001$). Merkitsevä muutos tarkoittaa evien kunnan huononemista. Vertailussa käytetty eväindeksejä alku = kokeen alussa, kierto = kokeen lopussa kiertovedessä ja läpi = kokeen lopussa läpivirtaussysteemissä.

Evä	Vertailu	F	Merkitsevyys
Vasen rintaevä	alku - kierto	8,575	0,007**
	alku - läpi	5,645	0,025*
	kierto - läpi	0,800	0,379
Oikea rintaevä	alku - kierto	2,154	0,153
	alku - läpi	4,308	0,470
	kierto - läpi	2,154	0,153
Vasen vatsaevä	alku - kierto	7,875	0,009**
	alku - läpi	3,977	0,056
	kierto - läpi	0,113	0,739
Oikea vatsaevä	alku - kierto	4,480	0,043*
	alku - läpi	3,150	0,087
	kierto - läpi	0,226	0,638
Peräevä	alku - kierto	0,350	0,559
	alku - läpi	1,120	0,299
	kierto - läpi	0,226	0,638
Pyrstö	alku - kierto	9,333	0,005**
	alku - läpi	16,00	0,000***
	kierto - läpi	0,509	0,481
Selkäevä	alku - kierto	0	∞
	alku - läpi	0	∞
	kierto - läpi	0	∞

5. TULOSTEN TARKASTELU

Tutkimuksessa kalojen kasvussa ei havaittu olevan tilastollisesti merkitseviä eroja systeemien välillä toista punnituskertaa eli ensimmäistä välipunnituskertaa lukuun ottamatta, jolloin allaskohtainen keskipaino oli kiertovedessä pienempi kuin läpivirtaussysteemissä. Molempien systeemien kalat olivat ennen koetta tavanomaisessa läpivirtaussysteemissä, joten on mahdollista, että kokeen alussa kiertovesisysteemin kaloilla oli muuttuneesta veden laadusta johtuen sopeutumisvaihe, jonka jälkeen niiden kasvu kuitenkin nopeasti lisääntyi ja tasaantui samalle tasolle kuin läpivirtaussysteemissä. Käytännön mittakaavaan tehty koeasetelma asetti rajoituksia esimerkiksi yksilöllisten rehumäärien käyttämiselle, minkä mahdollista vaikutusta kasvuun on vaikea arvioida. Kuitenkin nimenomaan tuloksen sovellettavuus mahdollisimman hyvin suoraan käytäntöön oli yksi kokeen lähtökohdista. Toisaalta lopputulos olisi voinut olla erilainen myös siinä tapauksessa, että koe olisi aloitettu vasta edellä mainitun, mahdollisen sopeutumisvaiheen jälkeen. Otokoko (20 kalaa/allas) oli arvioitu kyseisen kalaparven keskipainohajonnan (keskipaino 5,13 g, SD=1,51, n=160) perusteella kuusi viikkoa ennen kokeen alkua. Hajonnan lisääntymistä kalojen kasvaessa on kuitenkin ollut vaikea määrällisesti arvioida, joten suurempi otokoko olisi saattanut olla tarpeen. Toisaalta toistojen määrä (10 allasta/käsittely) on tässä kokeessa ollut melko suuri, mikä pienentää luotettavaan tulokseen tarvittavaa allaskohtaista otosta selvästi (Ruohonen 1998). Kokeenaikainen

rehukerroin oli hyvällä tasolla, ja havaittu kasvu vastasi hyvin laitoksen normaalituotannossa käytettyä laskennallista tuotanto-odotusta. Kokeenaikaiset kasvunopeudet (SGR %) eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi toisistaan systeemien välillä. Havaitut kasvunopeudet (3,28 %/vrk kiertovedessä ja 3,26 %/vrk läpivirtaussysteemissä) vastaavat kutakuinkin Austrengin ym. (1987) laajaan tutkimusaineistoon pohjautuvaa estimoitua kirjolohen kasvunopeutta, joka 10-20 g:n kaloille 12 °C lämpötilassa oli 3,5 %/vrk.

Eväindeksien muutoksissa ei kokonaisuutena havaittu systeemien välisiä tilastollisesti merkitseviä eroja. Molempien systeemien eväindekseissä tapahtui kuitenkin kokeen aikana tilastollisesti merkitsevä negatiivinen muutos sekä kiertovedessä että läpivirtaussysteemissä alkutilanteeseen verrattuna. Kiertovedessä muutokset olivat läpivirtaussysteemiä selvempiä vasemman rintaevän osalta, oikean rintaevän osalta muutokset eivät olleet tilastollisesti merkitseviä kummassakaan systeemissä. Vatsaevien osalta tilastollisesti merkitseviä eroja oli ainoastaan kiertovedessä. Pyrstössä tapahtuneet muutokset sen sijaan olivat selvempiä läpivirtaussysteemissä kuin kiertovedessä. Eväkohtaisessa tarkastelussakaan ei kuitenkaan havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa systeemien välillä. Todennäköisin syy muutoksille on hierarkkisesta käyttäytymisestä johtuva näykkiminen, mutta myös altistuminen tautibakteereille (ks. jäljempänä) on mahdollinen syy. Erityisesti kiertovedessä havaitut selvemmat muutokset voivat olla bakteerin aiheuttamia. Hierarkkisen käyttäytymisen osalta on kirjolohella havaittu (Rasmussen ym. 2007), että rintaevien kuluminen (heidänkin tutkimuksessaan vain vasemman rintaevän kuluminen oli tilastollisesti merkitsevää) voi olla riippuvaista ruokintatiheydestä niin, että tiheimmin ruokituilla kaloilla on enemmän evävaurioita kuin kerran päivässä ruokituilla. Rintaevät sijaitsevat lähellä suuta, jolloin ne ovat helpoimmin alttiita vaurioille ruokinnan yhteydessä tapahtuvan näykkimisen johdosta. Tässä kokeessa käytetty jatkuvatoiminen automaattiruokinta on osaltaan voinut aiheuttaa mahdollisia aggressiota synnyttäviä tilanteita varsin tiheästi, vaikkakin kalaparven liikkeitä ovat tällaisella ruokinnalla ylipäättään varsin hillittyjä eikä kertaruokinnan yhteydessä nähtävää ”ryntäystä” ole. Pyrstön ja erityisesti selkäevän osalta on havaittu (Moutou ym. 1998), että vauriot lisääntyvät ruokinnan ollessa vähäistä, jolloin hierarkkinen käytös lisääntyy. Tämän kokeen aikana ruokinta oli laskettu vastaamaan kulutusta eikä selkäevien eväindekseissä tapahtunut muutoksia lainkaan. Pyrstön osalta sen sijaan muutokset olivat alkutilanteeseen nähden tilastollisesti merkitseviä ja läpivirtaussysteemissä kiertovettä selvempiä. Toisaalta pyrstönkään osalta muutokset eivät olleet vielä vakavia; lopputilanteen pyrstön eväindeksien keskiarvo oli kiertovedessä 3,60 ja läpivirtaussysteemissä 3,47.

Kuolleisuudessa ei systeemien välillä ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. Kiertovedessä allaskohtainen kuolleisuus oli enimmillään 4,63 % yksilömäärästä, ja niissä kahdessa altaassa, joissa oli eniten kuolleita (26 ja 23 kpl), oli kuolleissa havaittavissa joitakin *Flavobacterium columnare* -bakteerin aiheuttamia oireita. Laitoksen normaalituotannossa kokeen tekoaikaan oli ajoittain sairastumisia ja kuolleisuutta *F. columnare* -bakteerin johdosta, joten kokeessa käytetyt kalat ovat saattaneet olla bakteerin kantajia. Kuolleisuutta tarkasteltaessa on lisäksi huomioitava, että merkittävä osa kuolleista oli hyvin pieniä yksilöitä, joita lajittelemattomissa kaloissa on (kiertovedessä 13,8 % ja läpivirtaussysteemissä 9,6 % kuolleista oli tällaisia). Normaalikasvatuksessa tällaiset yksilöt poistetaan ensimmäisen lajittelun yhteydessä, sillä kasvun pysähtyttyä ne joka tapauksessa lopulta kuolevat.

Kokonaisuudessaan tulokset ovat pääosin samankaltaisia kuin muissakin, myöhemmissä tutkimuksissa on havaittu. Tomoda ym. 2005 havaitsivat, että punahammasahvenen (*Pagrus major*) poikasten kasvussa ja eloonjäämisessä kiertovesi- ja läpivirtaussysteemeissä oli joko ei yhtään eroa tai eroa oli kiertovesisysteemin hyväksi. Kirjolohella tehdyssä kokeessa (Brazil & Silverstein 2005) havaittiin kiertovedessä 7 % suurempi kasvu kuin läpivirtaussysteemeissä. Tämän lisäksi kalan seerumin kemiallisessa koostumuksessa ei havaittu juurikaan eroja kortisolipitoisuutta lukuun ottamatta, joka oli kiertovedessä suurempi. Tutkimuksessa ei kuitenkaan pohdittu syitä kiertovedessä havaitulle suuremmalle kasvulle tai kortisolipitoisuuksien eroille. Turskan on sen sijaan havaittu olevan herkkä kiertovesisysteemin vedenlaadulle; vaikutukset näkyivät niin kasvussa, kunnossa kuin kuolleisuudessa, joskin tässä tutkimuksessa kiertovesisysteemin seurannassa oli joitakin puutteita (Björnsson & Ólafsdóttir 2006).

Kalojen toistuvan käsittelyn (mekaaninen käsittely, nukutus) tiedetään vaikuttavan kalojen kasvuun hidastavasti (Hoskonen & Pirhonen 2006). Tässä kokeessa niissä altaissa, joissa ei tehty välipunnituksia, oli kiertoveden osalta systeemin pienin loppumassa ja läpivirtaussysteemin osalta suurin loppumassa. Välipunnitusten ja niihin sisältyvien käsittelyjen ja nukutuksen vaikutusta kasvuun ei näin ollen voida tämän kokeen perusteella arvioida. Toisaalta on kuitenkin huomattava, että kyseisellä otoskoolla (20 kalaa allasta kohden) käsittelyn mahdollinen vaikutus kohdistuu melko pienelle osalle kunkin altaan kaloja eikä välttämättä erottuisikaan allaskohtaisessa tarkastelussa. Kokeen aikana ei kuitenkaan tehty myöskään normaaliin kasvatusrutiiniin kuuluvaa lajittelua, altaiden kalamäärien harvennusta ja mahdollista rokottamista, joilla myös olisi voinut olla käsittelystä johtuvaa vaikutusta kasvuun, vaikka nämäkään toimenpiteet eivät kohdistu samoihin kaloihin kovin usein tarkasteltaessa yksittäisen kalan koko kasvatuskautta.

Veden laatu kiertovesisysteemeissä pysyi riittävän hyvänä. Ammoniumtyypen haitallisen, ei-ionisoituneen muodon, nitriitin ja nitraatin pitoisuudet olivat kokeenaikaisissa pH- ja lämpötilaoloissa kaloille esitettyjä raja-arvoja pienempiä lukuun ottamatta nitriitin pitoisuutta aivan kokeen alussa. Tilanne korjaantui, kun veden vaihtoa systeemiin lisättiin. Veden vaihdon lisäys oli tarpeen myös päivittäisessä altaiden puhdistuksessa ja lietteen poistossa poistuneen veden korvaamiseksi. Ammoniumtyypen, nitriitin ja nitraatin pitoisuudet olivat myös toisiinsa nähden sellaisessa suhteessa, jonka voidaan katsoa kertovan systeemin sopivasta kuormittamisesta ja biosuodattimien riittävän hyvästä toimivuudesta.

Kiertovesiviljelyn taloudellinen kannattavuus on riippuvainen tuotannon paikallisista tekijöistä, kuten viljelyyn käytettävän veden laadusta, tuotantoon tarvittavista lämpötiloista, lainsäädännön asettamista vaatimuksista ravinnepäästöjen suhteen, markkinoille sopivasta kalalajista, kalan koosta, tuotannon ajankohdasta ja energian hinnasta. Tässä tutkimuksessa tuotantotapaa ei vertailtu laskennallisesti taloudellisen kannattavuuden osalta, mutta kyseessä olevaa systeemiä voidaan kuitenkin verrata poikastuotannon tavanomaiseen, lämmitystä käyttävään läpivirtaussysteemiin karkeasti osa-alueittain (investointi, työmäärä, käyttökustannukset). Investointina kyseinen kiertovesisysteemi oli lämpöpumpusta ja lämmönvaihtimista koostuvalla lämmitysjärjestelmällä varustettua tavanomaista systeemiä edullisempi. Työmäärältään kiertovesisysteemi oli jonkin verran työläämpi, koska kivisuodattimet tukkeutuivat heterotrofisen bakteerikasvuston vuoksi melko usein. Toisaalta myös tavanomaisen systeemin lämmönvaihtimet tukkeutuivat vaatien puhdistusta, joten molempien systeemien osalta tehokkaampi kiintoaineen poisto (rumpusuodatin) olisi ollut tarpeen.

Käyttökustannusten osalta kiertovesisysteemi oli selvästi edullisempi, joskin rakennuksen tehokkaampi eristäminen talviaikaan olisi tuonut säästöä vieläkin enemmän.

Tämän kokeen tarkoituksena oli vertailla kalojen kasvua ja hyvinvointia kiertovesi- ja läpivirtaussysteemeissä nimenomaan käytännön poikastuotannon mittakaavassa. Tämä asetti tiettyjä rajoituksia koeasetelmalle eikä tuloksia voida kaikilta osin yleistää koskemaan kirjolohen potentiaalista kasvua eri tuotantosysteemeissä. Kokeen, joka tehtiin Suomen oloissa ensimmäisessä ja kokeen teko aikaan vastavalmistuneessa kiertovesisysteemissä, tulokset antavat kuitenkin riittävästi tietoa pohjaksi sille, että voidaan sanoa molempien systeemien olleen kirjolohen poikastuotannossa kalojen kasvun ja hyvinvoinnin kannalta samanarvoisessa asemassa.

KIITOKSET

Haluan lämpimästi kiittää työni ohjaajia FT Timo Mäkistä, DI Martti Naukkarista ja FT Juhani Pirhosta avusta ja kannustavasta ohjauksesta työni eri vaiheissa. Martti Naukkarista haluan lisäksi kiittää kokeen puitteiden tarjoamisesta ja avusta käytännön järjestelyissä. Myrskylän Hautomo Oy:n työntekijöitä Tarmo Heikkilää ja Keijo Kantanevaa haluan kiittää avusta kokeen käytännön työvaiheissa. Åbo Akademin parasitologian laitoksen dosentti Göran Bylundille ja Lars Lönnströmille kiitos kalojen patologisista tutkimuksista. Esitän kiitokseni myös emeritusprofessori Tapani Valtoselle kannustuksesta käytännön kalatalouden pariin ja lehtori Timo Marjomäelle kannustavasta tuesta työni kaikissa vaiheissa. Haluan kiittää myös Samia tuesta ja ymmärtämisestä sekä Hannesta ja Ainoa kärsivällisyydestä työni loppuun saattamisen aikana.

KIRJALLISUUS

- Anonyymi 2006. Riista- ja kalatalous – Tilastoja 4/2007. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos, Helsinki, 29 s.
- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S. & Srinath, E.G. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 48: 835-852.
- Austreng, E., Storebakken, T. & Åsgård, T. 1987. Growth rate estimates for cultured Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture* 60:157-160.
- Barak, Y., Cytryn, E., Gelfand, I., Krom, M. & van Rijn, J. 2003. Phosphorus removal in a marine prototype, recirculating aquaculture system. *Aquaculture* 220:313-326.
- Billard, R. 1986. Culture of salmonids in fresh water. Teoksessa: Barnabé, G. (toim.), *Aquaculture*, vol. 2, Ellis Horwood, Midsomer Norton, 549-592.
- Björnsson, B. & Ólafsdóttir, S.R. 2006. Effects of water quality and stocking density on growth performance of juvenile cod (*Gadus morhua* L.). *ICES J. Mar. Sci.* 63:326-334.
- Brazil, B. & Silverstein, J. 2005. Growth and physiological characteristics of rainbow trout reared in different culture environments. USDA Agricultural Research Service. Meeting Abstract, vol.12. (verkko-osoite: http://www.ars.usda.gov/research/publications/Publications.htm?seq_no_115=190497 - luettu 09.06.2008)
- Brown, G.E., Brown, J.A. & Crosbie, A.M. 1993. Phenotype matching in juvenile rainbow trout. *Anim. Behav.* 46:1223-1225.
- Bullock, G.L., Summerfelt, S.T., Noble, A.C., Weber, A.L., Durant, M.D. & Hankins, J.A. 1997. Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system I. Effects on bacterial gill disease and heterotrophic bacteria. *Aquaculture* 158:43-55.

- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H. & Pearson, D.C. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture* 219:393-411.
- Burrows, R.E. 1964: Effects of accumulated excretory products on hatchery-reared salmonids. U.S. Fish and Wildlife Service Research Report 66, 12 s.
- Carballo, M., Muñoz, M.J., Cuellar, M. & Tarazona, J.V. 1995. Effects of waterborne copper, cyanide, ammonia and nitrite on stress parameters and changes in susceptibility to saprolegniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2108-2112.
- Chen, S., Ling, J. & Blancheton, J-P. 2006. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquacult. Eng.* 34:179-197.
- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M. & Gadd, D. 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J. Fish Biol.* 61:493-531.
- FAO 2007. The state of world fisheries and aquaculture 2006. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome, 162 s.
- Fivelstad, S., Haavik, H., Løvik, G. & Olsen, A.B. 1998. Sublethal effects and safe levels of carbon dioxide in seawater for Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.): ion regulation and growth. *Aquaculture* 160:305-316.
- Griffiths, S.W. & Armstrong, J.D. 2000. Differential responses of kin and nonkin salmon to patterns of water flow: does recirculation influence aggression? *Anim. Behav.* 59:1019-1023.
- Guillette, L.J., Jr. & Edwards, T.M. 2005. Is nitrate an ecologically relevant endocrine disruptor in vertebrates? *Integr. Comp. Biol.* 45:19-27.
- Hamlin, H.J., Michaels, J.T., Beaulaton, C.M., Graham, W.F., Dutt, W., Steinbach, P., Losordo, T.M., Schrader, K.K. & Main, K.L. 2008. Comparing denitrification rates and carbon sources in commercial scale upflow denitrification biological filters in aquaculture. *Aquacult. Eng.* 38:79-92.
- Haug, R.T. & McCarty, P.L. 1972. Nitrification with submerged filters. *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 44:2086-2102.
- Helle, K.B. 1990. Fysiologi. Teoksessa: Poppe, T.T. (toim.), *Fiskehelse: sykdommer, behandling, forebygging*, Aqua Books, John Grieg Forlag AS, Stavanger, 63-82.
- Hoskonen, P. & Pirhonen, J. 2006. Effects of repeated handling, with or without anaesthesia, on feed intake and growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult. Res.* 37:409-415.
- Jüttner, F. & Watson, S.B. 2007. Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4395-4406.
- Komanapalli, I.R. & Lau, B.H.S. 1996. Ozone-induced damage of *Escherichia coli* K-12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:610-614.
- Kroupova, H., Machova, J., Piackova, V., Blahova, J., Dobsikova, R., Novotny, L. & Svoboda, Z. 2008. Effects of subchronic nitrite exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (painossa).
- Lawson, T.B. 1995. *Fundamentals of aquacultural engineering*. Chapman & Hall, New York, 355 s.
- Liltved, H. & Cripps, S.J. 1999. Removal of particle-associated bacteria by prefiltration and ultraviolet irradiation. *Aquacult. Res.* 30:445-450.

- Liltved, H., Summerfelt, S.T., Timmons, M.B. & Ebeling, J.B. 2007. Ozonation and UV-irradiation. Teoksessa: Timmons, M.B. & Ebeling, J.M., *Recirculating aquaculture*, Cayuga Aqua Ventures, NRAC Publication No. 01-007, Ithaca, New York , 439-482.
- Malone, R.F. & Pfeiffer, T.J. 2006. Rating fixed film nitrifying biofilters used in recirculating aquaculture systems. *Aquacult. Eng.* 34:389-402.
- Moutou, K.A., McCarthy, I.D. & Houlihan, D.F. 1998. The effect of ration level and social rank on the development of fin damage in juvenile rainbow trout. *J. Fish Biol.* 52:756-770.
- Noble, A.C. & Summerfelt, S.T. 1996. Diseases encountered in rainbow trout cultured in recirculating systems. *Annu. Rev. Fish Dis.* 6:65-92.
- Perrone, S.J. & Meade, T.L. 1977. Protective effect of chloride on nitrite toxicity to coho salmon, (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 486-492.
- Petit, J. 1990. Water supply, treatment, and recycling in aquaculture. Teoksessa: Barnabé, G. (toim.), *Aquaculture*, vol. 1, Ellis Horwood, Midsomer Norton, 63-196.
- Rakocy, J.E., Timmons, M.B. & Ebeling, J.M. 2007. Aquaponics: Integrating fish and plant culture. Teoksessa: Timmons, M.B. & Ebeling, J.M., *Recirculating aquaculture*, Cayuga Aqua Ventures, NRAC Publication No. 01-007, Ithaca, New York , 767-822.
- Rasmussen, R.S., Larsen, F.H. & Jensen, S. 2007. Fin condition and growth among rainbow trout reared at different sizes, densities and feeding frequencies in high-temperature re-circulated water. *Aquacult. Int.* 15:97-107.
- Reeves, T.G. 1972. Nitrogen removal: a literature review. *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 44:1895-1908.
- Ruohonen, K. 1998. Individual measurements and nested designs in aquaculture experiments: a simulation study. *Aquaculture* 165:149-157.
- Sharma, B. & Ahlert, R.C. 1977. Nitrification and nitrogen removal. *Water Res.* 11:897-925.
- Sharrer, M.J., Summerfelt, S.T., Bullock, G.L., Gleason, L.E. & Taeuber, J. 2005. Inactivation of bacteria using ultraviolet irradiation in a recirculating salmonid culture system. *Aquacult. Eng.* 33:135-149.
- Soderberg, R.W. 1995. *Flowing water fish culture*. Lewis Publishers, CRC Press, Florida, 147 s.
- Summerfelt, S.T., Hankins, J.A., Weber, A.L. & Durant, M.D. 1997. Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system II. Effects on microscreen filtration and water quality. *Aquaculture* 158:57-67.
- Summerfelt, S.T. & Hochheimer, J.N. 1997. Review of ozone processes and applications as an oxidizing agent in aquaculture. *The Progressive Fish-Culturist* 59:94-105.
- Timmons, M.B. & Ebeling, J.M. 2007. *Recirculating aquaculture*. Cayuga Aqua Ventures, NRAC Publication No. 01-007, Ithaca, New York, 975 s.
- Tomoda, T., Fushimi, H. & Kurokura, H. 2005. Performance of a closed recirculation system for larviculture of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish. Sci.* 71:1179-1181.
- Tucker, C.S. 2000. Off-flavor problems in aquaculture. *Rev. Fish. Sci.* 8:45-88.
- Van Rijn, J. 2007. Denitrification. Teoksessa: Timmons, M.B. & Ebeling, J.M., *Recirculating aquaculture*, Cayuga Aqua Ventures, NRAC Publication No. 01-007, Ithaca, New York, 369-396.
- Vosylieniė, M.Z. & Kazlauskienė, N. 2004. Comparative studies of sublethal effects of ammonia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of its development. *Acta Zool. Lit.* 14:13-18.