

Pro gradu -tutkielma

**pH-puskuroinnin vaikutus kiertovesikasvatetun
kirjolohen (*Oncorhynchus mykiss*) sopeutumiseen
kylmään läpivirtausveteen**

Essi Luoma



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Akvaattiset tieteet

20.09.2020

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Akvaattiset tieteet

Essi Luoma: pH-puskuroinnin vaikutus kiertovesikasvatetun kirjolohen (*Oncorhynchus mykiss*) sopeutumiseen kylmään läpivirtausveteen.
Pro gradu -tutkielma: 56 s.
Työn ohjaajat: Dos. Anssi Karvonen, FT Juha Koskela, Dos. Juhani Pirhonen
Tarkastajat: Dos. Juhani Pirhonen, FT Jukka Syrjänen
Syyskuu 2020

Hakusanat: Fysiologia, kylkiuinti, stressi, suolistorasva, uimarakko

Kalankasvatuksessa kalojen siirrot eri kasvatustilojen välillä ovat tavanomaisia toimenpiteitä. Siirrettäessä kaloja lämpimästä kiertovedestä kylmään läpivirtausveteen vedenlaatu voi kuitenkin muuttua kalojen kannalta epäsuotuisaksi ja aiheuttaa niille häiriöitä elimistön tasapainotilojen säätelyssä. Osalla kaloista häiriöt ilmenevät ongelmina uintitasapainon säätelyssä. Uintitasapainon häiriöihin saattaa myös altistaa uimarakon kehityshäiriöt ja kalojen korkeampi rasvapitoisuus. Tässä tutkimuksessa selvitettiin voidaanko ns. "kylkiuivien" kalojen määrää vähentää lisäämällä allasveteen siirron yhteydessä vedenlaatua vakauttavia puskurikemikaaleja. Samalla selvitettiin myös esiintyykö kylkiuivilla kaloilla enemmän uimarakon poikkeamia ja onko niillä korkeampi rasvapitoisuus kuin normaalisti uivilla kaloilla. Kirjolohia siirrettiin lämpimästä (14 °C) kiertovedestä kylmään (2 °C) läpivirtausveteen neljäksi päiväksi, jonka aikana käsittelyaltaisiin lisättiin puskurikemikaaleja. Puskurikäsittelyryhmässä kylkiuivia kaloja oli 25,4% kaloista, kun kontrolliryhmässä näitä oli 46,7% kaloista. Kylkiuivista kaloista 56,8% oli poikkeava uimarakko, kun normaalisti uivista kaloista näin oli 35,1% kaloista. Uimarakoltaan poikkeavilla kaloilla havaittiin olevan enemmän rasvaa ruumiinontelossa kuin kaloilla, joilla uimarakko oli normaali. Puskurikemikaalien lisäys on tulosten perusteella toimiva keino vähentää kylkiuivien kalojen määrää siirron yhteydessä. Tärkeä havainto on myös uimarakon poikkeamien uintitasapainon häiriöille altistava vaikutus.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Aquatic Science

Essi Luoma: Effects of pH-buffering on cold adaptation of RAS-cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) transferred to flow-through system

Master of Science -Thesis: 56 p.

Supervisors: Dos. Anssi Karvonen, FT Juha Koskela, Dos. Juhani Pirhonen

Inspectors: Dos. Juhani Pirhonen, FT Jukka Syrjänen

Syyskuu 2020

Keywords: Osmoregulation, physiology sideswimming, stress, swimbladder

Transfers of fish are necessary procedures in recirculating aquaculture systems (RAS). However these transfers can lead to changes in the water quality, which can potentially compromise fish health. Failure in fish's self-regulation processes can manifest as buoyancy problem, like so-called "side-swimming". Swimbladder abnormalities and high tissue fattiness may also exacerbate buoyancy issues. Adding buffering chemicals during transfers could potentially be beneficial for fish acclimation by stabilizing water quality. This study aims to find out if buffering tank water could decrease number of side-swimmers after transfer. The other aim was to study if side-swimmers have more swimbladder abnormalities and if they are more fatty than normally swimming fish. The fish were transferred from (14 °C) warm RAS-water to cold (2°C) flow-through water. In the buffered group occurrence of side-swimmers was 25,4%, while in the control group it was 48,7%. Of these side-swimmers 56,8% had abnormal swimbladder, while occurrence among normally swimming fish was 35,1%. No difference in amount of fat was noticed between side-swimmers and normal fish. However fish with abnormal swimbladder had more visceral fat than fish with normal swimbladder. Based on these results water buffering can help fish to adapt to a new environment. Other interesting observation was also the connection of swimbladder abnormalities to buoyancy issues.

SISÄLTÖ

1. JOHDANTO.....	1
2. TUTKIMUKSEN TAUSTA	4
2.1 Kiertovesiviljely eli Recirculating Aquaculture Systems (RAS)	4
2.2 Kalasiirrot	7
2.3 Tasapainonsäätely ja kylkiuinti	8
2.4 Rasvapitoisuus ja rasvahappokoostumus	10
2.5 Uimarakko.....	11
2.6 Stressi	12
2.7 Lämpötila ja kylmäaltistus.....	13
2.8 Kidusten toiminta ja osmoregulaatio	14
2.8.1 Veden puskuriominaisuuksien vaikutus osmoregulaatioon	16
2.8.2 pH:n ja metallien vaikutus osmoregulaatioon	17
3. AINEISTO JA MENETELMÄT.....	19
3.1 Kalojen käsittely.....	19
3.2. Koeasetelma	20
3.1. Vedenlaatu kokeiden aikana.....	22
3.4. Kalojen tutkiminen	24
3.4 Aineiston käsittely ja tilastolliset menetelmät.....	26
4. TULOKSET.....	28
4.1 Puskurikäsitteilyn vaikutus	28
4.2 Uimarakon poikkeamat.....	28
4.3 Rasvamittauksen tulokset	30
4.3.1 Puskurikäsitteilyryhmä	30
4.3.2. Kontrolliryhmä.....	31

4.3.3 Koko aineisto	33
4.3.4 Rasvaisuuden yhteys mitattuihin muuttujiin.....	35
4.3.5 Rasvaisuusmuuttujien yhteys toisiinsa	38
4.4 Muiden muuttujien vertailu	39
4.4.1 Puskurikäsitteilyryhmä	39
4.4.2 Kontrolliryhmä.....	40
4.4.3 Koko aineisto	41
5. TULOSTEN TARKASTELU	44
6. PÄÄTELMÄT.....	49
KIITOKSET	50
KIRJALLISUUS.....	51

1. JOHDANTO

Vesiviljely on maailmanlaajuisesti kasvava ruuantuotannon muoto (FAO 2018). Vuonna 2018 jo lähes puolet maailmalla kulutetuista kaloista ja muista merenelävistä, kuten äyriäisistä ja simpukoista oli vesiviljelyllä tuotettuja (FAO 2018). Vesiviljelyn tarvetta ovat lisänneet väestön kasvu sekä valtamerien kaupallisesti tärkeiden kalakantojen ehtyminen (FAO 2018). Vaihtolämpöisinä eläiminä kaloilla on korkea rehu-hyötysuhde, jonka takia kalankasvatus on ekologisesti varsin tehokas tapa tuottaa eläinproteiinia verrattuna esimerkiksi siipi- ja lihakarjan tuotantoon (FAO 2018, Timmons ym. 2018). Kalanviljely, kuten muukin teollinen toiminta, aiheuttaa vesistöjä rehevöittäviä typpi- ja fosforipäästöjä. Kalanviljelyn ravinnepäästöjen ympäristövaikutuksia on kuitenkin pystytty viime vuosikymmeninä vähentämään rehujen koostumuksen kehittämällä ja ruokinnan optimoinnilla sekä myös kalojen rehu-hyötysuhdetta parantavalla valintajalostuksella (Rasmunsen ym. 2000, Kause ym. 2016).

Suomessa ja muissa Pohjoismaissa tärkeimpiä kaupallisesti viljeltäviä kalalajeja ovat lohikalat kuten, kirjolohi (*Oncorhynchus mykiss*), siika (*Coregonus lavaretus*), nieriä (*Salvelinus alpinus*) ja etenkin Norjassa lohi (*Salmo salar*). Suomessa näistä kaupallisesti tärkein laji on kirjolohi, jota kasvatettiin vuonna 2018 ruuaksi noin 13,2 miljoonaa kg, ja sen jälkeen siika, jota vuonna 2018 viljeltiin 0,8 miljoonaa kg (Forsman ym. 2019). Pääosa tuotannon volyymistä on meillä keskittynyt rannikkoseudulle ja merialueille (Anonyymi A). Merellä ja muissa luonnonvesissä kalojenkasvatukseen liittyviä haasteita ovat muun muassa kalojen kasvun kannalta epäsuotuisat veden lämpötilan ja vedenlaadun vaihtelut, joihin ilmastonmuutos todennäköisesti lisää jatkossa epävarmuutta (Lorenzen 2008). Yli 20 °C asteen lämpötilat voivat esimerkiksi kirjolohella johtaa kasvun heikkenemiseen ja lisätä kalojen kuolleisuutta (Timmons ym. 2018).

Ilmastonmuutos pidentää kasvukautta ja lisää vuotuista sadantaa, mikä tehostaa ravinteiden huuhtoutumista valuma-alueilta (Glibert ym. 2014). Muutokset meriympäristössä voivat johtaa leväkukintojen runsastumiseen rannikkoseudulla (Lorenzen 2008, Glibert ym. 2014). Syanobakteerit eli sinilevät sekä muut levät voivat erittää kaloille haitallisia toksineja, ja verkkoaltaiden pinnalla kasvaessaan ne voivat heikentää veden vaihtuvuutta altaan sisällä (Glibert ym. 2014).

Kalojen kiertovesiviljely eli RAS-kasvatus (recirculating aquaculture system) on moderni vaihtoehto perinteiselle kalankasvatukselle. Suurimpina etuina kiertovesijärjestelmässä on mahdollisuus ylläpitää kalojen kasvun kannalta optimaalista veden laatua sekä säästää huomattavasti vettä verrattuna läpivirtausjärjestelmään, jossa vesi poistuu virrattuaan kerran kala-altaiden läpi (Liu ym. 2016, Timmons ym. 2018). Ravinnevirtojen kontrollointi on myös helpompaa kiertovesikasvatuksessa vähäisemmän vedenkäytön ansiosta, jonka vuoksi rehevöittäviä ympäristövaikutuksia pystytään minimoimaan. Kiertovesiviljelyllä voidaan kattaa koko kasvatussykli tai vain osa prosessista. Norjassa kiertovesijärjestelmää käytetään jo paljon merikasvatukseen siirtyvien smolttien kasvatukseen (Dalsgaard ym. 2013). Teuraskokoisia kaloja kasvatetaan kiertovedessä myös enenevässä määrin. Suomessakin toimii muutama ruokakalaa viljelevä RAS-laitos, joissa tuotetaan ainakin siikaa, kirjolohta ja sampea (*Acipenser sturio*). RAS-laitosten ruokakalantuotanto oli vuonna 2018 yhteensä noin 0,6 miljoonaa kg (Forsman ym. 2019). Haasteena ruokakalojen kiertovesikasvatuksessa on kaloihin kehittyvä mutainen sivumaku, mikä on seurausta veden mikro-organismien aineenvaihduntatuotteiden kertymisestä kaloihin (Houle ym. 2011, Timmons ym. 2018). Tehokkain tapa päästä eroon makuhaitoista on paastottaa ja raikastaa kaloja vaihtuvassa vedessä. Raikastus voidaan toteuttaa lisäämällä kiertoveden vaihtuvuutta tai siirtämällä kalat läpivirtausveteen (Timmons ym. 2018, Lindholm-Lehto ym. 2019).

Sisämaan vesiviljelyssä käytettävä vesi on useimmiten luonnonvesistöstä otettua raakavettä, jota ei läpivirtauslaitoksilla yleensä käsitellä erikseen lämmityksellä tai

pH:ta vakauttavalla kemiallisella käsittelyllä. Suomessa luonnonvesien puskurikyky on yleensä heikko johtuen veden matalasta alkaliteetista ja pehmeystä. Alkaliteetti kertoo veden kyvystä neutraloida happoja, ja matala alkaliteetti tekee vedestä herkemman pH:n laskulle (Hjeltnes ym. 2012, Timmons ym. 2018). Veden kovuuteen vaikuttaa magnesium- ja kalsiumionien määrä, joita pehmeässä vedessä esiintyy vain vähän. Kovuus yhdessä alkaliteetin kanssa vaikuttavat veden puskuriominaisuuksiin eli kykyyn vastustaa pH:n muutosta.

Kalankasvatukseen kuuluu olennaisena osana kalojen siirrot esimerkiksi suurempiin altaisiin tai poikaslaitokselta jatkokasvatukseen. Kalojen sopeutumisaika uuteen ympäristöön on useimmiten lyhyt siirtojen yhteydessä, mikä voi altistaa kalat osmoregulatoriselle shokille ja stressille (Donaldson ym. 2008). Ympäristön muuttuessa kala pyrkii säilyttämään elimistönsä tasapainotilan fysiologisella säätelyllä, mikä voi kuitenkin häiriintyä mikäli veden lämpötila, pH tai ionikoostumus muuttuvat kalan kannalta epäsuotuisiksi. Fysiologisen säätelyn häiriintyminen heikentää kalojen terveydentilaa ja voi pahimmillaan johtaa kuolleisuuteen (Donaldson ym. 2008, Timmons ym. 2018).

Erityisesti talvikaudella lämpimästä kiertovedestä kylmään läpivirtausveteen tehtyjen kalasiirtojen on havaittu vaikuttavan haitallisesti kalojen terveydentilaan. Kiertoveden lämpötila kirjolohille on yleensä 14 – 16 °C-astetta, kun puolestaan luonnonvettä olevan läpivirtausveden lämpötila voi talvikaudella laskea pariasteiseksi. Siirtojen yhteydessä lämpötilanmuutos voi olla hyvinkin nopea, jolloin kalat eivät välttämättä ehdi sopeutumaan muutokseen ja alkavat oireilemaan. Vaihtolämpöisinä eläiminä kalojen aineenvaihdunnan taso laskee kylmässä, mikä saattaa samalla heikentää kalan aktiivisia sopeutumismuutoksia ympäristön muutokseen (Donaldson ym. 2008). Lämpötilan laskun lisäksi läpivirtausveden matalampi alkaliteetti ja pH voivat aiheuttaa kaloille ongelmia kidusten ioninvaihdossa. Matala pH myös lisää vedessä esiintyvien metalli-ionien haitallisuutta kaloille sekä niiden biosaatavuutta luonnonvesissä (Dietrich ja Schlatter 1989, Timmons ym. 2018).

Haasteet siirron aikaisessa sopeutumisessa voivat ilmetä muun muassa tasapainonsäätelyn ja uinnin vaikeuksina (Donaldson ym, 2008). Ongelmat tasapainonsäätelyssä voivat olla seurasta vakavasta osmoregulatorisesta häiriötilasta, myrkytyksestä tai stressistä, mutta siihen voi mahdollisesti myös altistaa uimarakon kehityshäiriöt, joita on tavattu ns. kylkiuinti-ilmiön yhteydessä (Poppen ym. 1997, Good ym. 2014). Kylkiuivilta kaloilta on myös havaittu löytyvän paksummin rasvaa vatsapuolella, jolla voi olla mahdollisesti yhteys kylkiuinti-ilmiöön (Good ym 2014).

Kiertovesiviljelyssä kalasiirrot ovat joka tapauksessa välttämättömiä toimenpiteitä, ja siksi tulisikin löytää ratkaisuja kalojen siirron aikaisiin haasteisiin. Yksi mahdollinen keino edesauttaa kalojen sopeutumista kylmään läpivirtausveteen voisi olla allasveden kovuutta ja alkaliteettia lisäävä puskurikäsittely. Hypoteesina tässä pro gradu -tutkimuksessa onkin että läpivirtausveden puskurikäsittely vähentäisi kylkiuimarien määrää. Tutkimuksessa käytettävät puskurikemikaalit olivat Microdol ja sooda, joita järviveden lisättiin 1:1 suhteessa, niin että järveden pH saatiin vastaamaan kiertoveden pH:ta lähtötilanteessa. Hypoteesina oli myös, että kylkiuivilta kaloilta löytyisi enemmän uimarakon poikkeamia ja niillä olisi korkeampi lihasrasvapitoisuus ja ruumiinontelon rasvaisuudesta kertova suolistorasvaindeksi. Kylkiuivat kalat voivat myös olla kooltaan pienempiä ja niiden perkuusaantoprosentti voi olla heikompi kuin normaalisti uivilla kaloilla.

2. TUTKIMUKSEN TAUSTA

2.1 Kiertovesiviljely eli Recirculating Aquaculture Systems (RAS)

Kalojen kierto-vesiviljelyssä eli RAS - (recirculating aquaculture systems) kasvatuksessa kala-altaiden ravinteita sisältävä poistovesi kierrätetään

vedenkäsittelylaitteiston läpi takaisin altaisiin. Optimaalisen vedenlaadun ylläpitämiseksi koko järjestelmän vesi käy laitteiston läpi vähintään kahdesti tunnissa. Koska vettä poistuu kuitenkin jonkin verran ravinteiden ja kiintoaineksen poiston yhteydessä, täytyy poistovesi korvata uudella vedellä. Uuden tuloveden tarve riippuu pääasiassa käytettävissä olevasta vedenkäsittelytekniikasta ja kalojen ruokinnan määrästä (Timmons ym. 2018). Useimmiten järjestelmän käyttövesi on luonnonvesistä peräisin olevaa raakavettä, joka puhdistetaan kiertovesijärjestelmässä ennen altaisiin laskemista. Uuden tuloveden tarve on kuitenkin kiertovesilaitoksilla jopa 90 - 99% vähäisempi kuin läpivirtauslaitoksilla. Kiertovesiviljelyssä vähäinen tuloveden määrä sekä veden kierrätys vähentävät myös riskiä kalataudeille ja veden saastumiselle verrattuna avoimiin laitoksiin, kuten läpivirtaus- ja avomerikasvatukseen, joissa kalojen kasvuympäristön vedenlaatuun vaikuttaminen on rajallista tai mahdotonta (Timmons ym. 2018).

Kiertovesiviljelyssä poistoveden kierrätysprosessi koostuu yksinkertaistettuna kiintoaineen poistosta, nitrifikaatiosta, kaasujen vaihdosta, pH:n säädöstä ja desinfioinnista. Kiintoaineiden poistossa päästään eroon kalojen ulosteista ja syömättömästä rehusta. Korkeat kiintoainepitoisuudet voivat häiritä järjestelmän toimintatehoa lisäämällä biologista hapenkulutusta, ja lisäksi heikentää kalojen hyvinvointia vaurioittamalla esimerkiksi kiduksia (Timmons ym. 2018). Nitrifikaatiossa biosuodattimella kasvavat nitrifikaatiobakteerit hapettavat kalojen erittämää haitallista ammoniakkia (NH_3), ensin nitriitiksi (NO_2^-) ja siitä edelleen kaloille vaarattomampaan muotoon nitraatiksi (NO_3^-) (Timmons ym. 2018). Happea on kiertovesiviljelyssä aina tarpeen lisätä veteen, jotta kalojen kasvua pystytään maksimoimaan korkeillakin kalatiheyksillä (Timmons ym. 2018). Hapen lisäyksen yhteydessä myös osa veteen liuenneesta hiilidioksidista poistuu, kun kaasut asettuvat ilma-nesterajapinnassa kaasujen osapaine-eron mukaisesti (Timmons ym. 2018). pH-puskuroinnilla vähennetään kalojen ja bakteerien tuottaman hiilidioksidin happamoittavia vaikutuksia vedessä sekä edesautetaan

kalojen normaalia ammoniakkin eritystä (Wright ja Wood 1985, Timmons ym. 2018). Ilman puskuroitua vedenlaadun vaihtelulla voi olla negatiivisia vaikutuksia biosuodattimen toiminnalle ja kalojen hyvinvoinnille. Uusi tulovesi ja kierrätetty allasvesi voidaan desinfioida taudinaiheuttajia tuhoavalla ultraviolettisäteilyn aallonpituuksia emittoivilla UV-lampuilla tai hapettavalla otsonilla (O₃) ennen kala-altaisiin johtamista (Timmons ym. 2018).

Poistoveden vähäisyys ja mahdollisuus poistovedestä konsentroidun lietteen keräykseen helpottavat kiertovesiviljelyn aiheuttamien ravinnepäästöjen ja ympäristökuormituksen hallintaa verrattuna perinteisiin kalankasvatusmenetelmiin, joissa ravinnevirtoja on vaikeampi kontrolloida. Konsentroitua ravinnepitoista lietettä voidaan myös käyttää helpommin hyväksi esimerkiksi lannoitteen muodossa. Tiukkojen ympäristösäännösten takia kalankasvatuksen lupahakemusprosessit ovat nykyisellään Suomessa useimmiten pitkäkestoisia, ja uusia laitoslupia myönnetään niukasti. Kiertovesiviljelyn vähäisemmästä ympäristökuormituksesta saattaa tulevaisuudessa olla etua uusien kasvattamolupien saamisessa. (Dalsgaard ym. 2013) Vähäinen veden tarve myös mahdollistaa kiertovesilaitoksen perustamisen alueille, jossa vedenkäyttö on tarkoin säännösteltyä tai perinteinen kalanviljely on sijainnin ja sopivien vesistöjen puutteen vuoksi mahdotonta (Blidariu ja Grozea ym. 2011). Kiertovesilaitos on myös näin ollen helpompi perustaa kysynnän pohjalta, jolloin etäisyys asiakkaisiin on lyhyt ja kuljetuksen aiheuttama hiilijalanjälki pienempi.

Toisin kuin perinteisillä vesiviljelymuodoilla, kiertovesiviljelyllä pystytään myös vastaamaan tuoreen kalan kysyntään ympärivuotisesti. Kiertovedessä kalojen kasvukautta voidaan ylläpitää jatkuvasti, eikä talvikausi aiheuta juurikaan muutoksia kalojen kasvuympäristössä (Timmons ym. 2018). Luonnonvesiä käyttävillä laitoksilla vuodenaikojen vaihtelu sen sijaan jaksottaa tuotannon vuosikiertoa. Talvikaudella kalojen hidastuneen aineenvaihdunnan seurauksena niiden rehunkulutus vähenee ja kasvu hidastuu. Ruokakalan perkuu onkin sen

vuoksi usein järkevää ajoittaa syksylle ja talvelle, kun kesä on ensin käytetty kalabiomassan kasvattamiseen.

Alkuvaiheen mittavat laiteinvestoinnit ja järjestelmän korkeat operointikustannukset tekevät kuitenkin kiertovesilaitoksen taloudellisen kannattavuuden saavuttamisesta haasteellista (Dalsgaard ym. 2013). Kiertovesilaitteiston ylläpito vaatii huomattavasti enemmän energiaa kuin perinteiset vesiviljelymenetelmät, mikä myös kasvattaa kalojen hiilijalanjälkeä verrattuna esimerkiksi läpivirtauslaitoksella kasvatettuihin kaloihin (Liu ym. 2016). Kiertovesiviljelystä voidaan kuitenkin mahdollisesti saada lisähyötyä yhdistämällä kalanviljelyn poistovesien ravinnevirrat ruokavihannesten kasvattamiseen, esimerkiksi sellaisenaan lannoitteen muodossa tai Aquaponics-järjestelmässä (Dalsgaard ym. 2013, Timmons ym. 2018). Uusimpia lähestymistapoja kiertovesiviljelyn poistovesien hyödyntämiselle on mikrolevien viljely (Stevčić ym. 2019). Mikrolevät muuttavat ravinteita biomassan kasvatukseen ja tuottavat niistä proteiineja, hiilihydraateja, rasvahappoja ja vitamiineja. Mahdollisia tapoja hyödyntää mikroleviä ovat muun muassa käyttö eläinrehuksi, biopohjaisten polttoaineiden raaka-aineeksi ja jopa käyttö ihmisravinnoksi ja terveystuotteina (Stevčić ym. 2019).

2.2 Kalasiirrot

Kalasiirrot ovat välttämättömiä toimenpiteitä kalankasvatuksessa. Erityisesti ruokakalojen kiertovesikasvatuksessa kaloja on tärkeää ennen perkausta siirtää raikastumaan läpivirtausveteen (Tucker 2000, Lindholm-Lehto ym. 2019). Epäonnistuneen raikastuksen tuloksena makuhaitat lopputuotteissa voivat johtaa merkittäviin tappioihin kuluttajakilpailussa (Houle ym. 2011, Timmons ym. 2018). Kalojen raikastus voi tapauskohtaisesti kestää joistakin päivistä muutamiin viikkoihin riippuen kalojen rasvapitoisuudesta ja veden lämpötilasta (Tucker 2000, Lindholm-Lehto ym. 2019).

Makuvirhettä aiheuttavat yhdisteiden poistuminen kalasta kidusten ja ihon kautta on nopeinta korkealla veden vaihtuvuudella (Tucker 2000). Yhdisteiden poistuminen kaloista hidastuu kylmässä vedessä, jonka vuoksi raikastusajat voivat olla pitkiä erityisesti talvisin (Lindholm-Lehto ym. 2019). Suuri ja äkillinen lasku lämpötilassa voi myös aiheuttaa kaloille sopeutumisvaikeuksia ja stressiä, jonka seurauksena kalojen osmoregulaatio voi häiriintyä ja terveydentila heikentyä (Tucker 2000, Donaldson ym. 2008). Asteittainen vedenvaihto kiertovedestä läpivirtausveteen ei kuitenkaan ole vedenkäsittelykustannusten takia järkevää, vaikka sillä mahdollisesti helpotettaisiinkin kalojen sopeutumista lämpötilanmuutokseen. Asteittainen siirtymä myös pidentäisi raikastumiseen tarvittavaa aikaa (Lindholm-Lehto ym. 2019).

Jatkokasvatettavien kalojen kasvatuksessa kalasiirrot ovat myös välttämättömiä toimenpiteitä. Kalanpoikasia siirretään kiertovedestä yleensä läpivirtausjärjestelmään odottamaan lopullista siirtoa jatkokasvatukseen. Myös tietyissä kalatautitapauksissa kaloja voi olla hyödyllistä siirtää karanteeniin läpivirtausveteen. Färsaarilla läpivirtauskaranteenia on käytetty IPN (Infectious pancreatic necrosis)-viruksen hoidossa, koska sen on uskottu nopeuttavan viruksen poistumista kaloista ja samalla estävän lisätartunnat kiertovesijärjestelmässä (Hjeltnes ym. 2012). Jotkut toimenpiteet, kuten rokotukset voivat myös olla käytännöllisempiä suorittaa siirtämällä poikaset ensin läpivirtausjärjestelmään (Hjeltnes ym. 2012). Kaloja ei ole välttämätöntä fyysisesti siirtää altaasta toiseen, mikäli kiertoveteen kytketty allas on irrotettavissa kiertovesijärjestelmästä ja tulovesi vaihdettavissa raakavedeksi. Tällöin vältetään ylimääräiseltä kalojen käsittelyltä.

2.3 Tasapainonsäätely ja kylkiuinti

Tasapaino- ja syvyyssäätelyllä kala pyrkii säilyttämään etenemisensä kannalta energiatehokkaan asennon vesipatsaassa (Macaylay ym. 2020). Tasapainonsäätelyn häiriintyessä kala ei kykene enää säilyttämään normaalia

asentoaan uudessaan. Keskushermosto säätelee kalan liikkeitä, jolloin hermostoon vaikuttava häiriötila, kuten myrkytys tai nopea ympäristönmuutos, voi alentaa kalan kykyä säädellä uintiaan. Kasvatetuilla Atlantin lohilla esiintyneitä uintihäiriöitä käsiteltiin Poppen ym. (1997) tutkimuksessa, jossa epätavallisesti kyljellään uivista kaloista käytettiin nimitystä kylkiuimari (side-swimmer). Kylkiuinti-ilmiötä kalanviljelyssä ei toistaiseksi ole kirjallisuudessa käsitelty kovinkaan kattavasti. Koordinoimaton uinti, kuten kylkiuinti, on useissa tutkimuksissa kuitenkin mainittu oireena häiriintyneestä tilasta (Hillaby ja Randall 1979, Donaldson ym. 2008). Uintihäiriöille altistavia rakenteellisia tekijöitä kaloilla ovat mahdollisesti uimarakon kehityshäiriöt, suuri määrä ruumiinontelon rasvaa ja korkea lihasrasvapitoisuus (Poppe ym. 1997, Good ym. 2014). Goodin ym. (2014) tutkimuksessa havaittiin kylkiuivilla kaloilla rasvaa vatsapuolella runsaammin kuin terveillä kaloilla. Se, miten runsas lihasrasva altistaa kylkiuinnille on kuitenkin epäselvää. Mahdollisesti korkeampi rasvapitoisuus voi olla seurausta kalojen ruokinnassa käytetystä korkearasvaisesta rehusta tai kalojen heikentyneestä uintikyvystä (Jobling ym. 1998). Runsaat ruumiinontelon rasva saattaa painaa kalan sisäelimiä ja siten estää uimarakon normaalia täyttymistä, josta voi seurata ongelmia etenkin kalojen stressaantuessa (Kolbeinshavn ja Wallace 1985).

Kiertovesijärjestelmässä uintihäiriöille voi altistaa veden korkea kierrätysaste, mikä lisää haitallisten yhdisteiden kuten nitraatin (NO_3^-) ja metallien kertymistä allasveteen. Nitraatti- tai metallipitoisuuden kasvu voi altistaa kalan myrkytysoireille ja siten johtaa koordinaatiokyvyn heikkenemiseen (Davidson ym. 2011, 2014, Good ym. 2014). Kylkiuimari-ongelmalla voi kalojen heikentyneen terveydentilan ohella olla taloudellisia vaikutuksia kalankasvattajalle. Goodin ym. (2014) tutkimuksessa kylkiuimarien havaittiin olevan pienikokoisempia ja niiden fileesaannot olivat heikompia (Poppe ym. 1997, Good ym. 2014). Epätavallisesti uivat kalat ovat lisäksi tuotantoeläinhyvinvoinnin näkökulmasta ongelma laitoksella.

2.4 Rasvapitoisuus ja rasvahappokoostumus

Ruokinnalla ja rehun koostumuksella pyritään kalanviljelyssä maksimoimaan kasvua ja vaikuttamaan kalojen rasvahappokoostumukseen. Kirjolohien ruokinnassa käytetty rehu eroaa kalojen luontaisesta ravinnosta, jonka vuoksi kasvatettujen kalojen rasvahappokoostumus voi poiketa villeistä lajitovereista (Suzuki ym. 1986). Elimistön rasvahapot vaikuttavat solukalvojen toimintaan ja koko elimistön toimintojen säätelyyn, esimerkiksi kalan pyrkiessä sopeutumaan lämpötilanmuutokseen (Jobling 1994). Kylmään sopeutumisen tiedetään muuttavan kirjolohilla kidusten, maksan ja munuaisten solukalvojen fosfolipidikoostumusta (Hazel 1979, Hazel ja Carpenter 1985, Jobling 1994). Kylmässä vedessä tyydyttyneiden rasvahappojen määrä vähenee ja monitydyttymättömien rasvahappojen osuus kasvaa (Hazel 1979, Hazel ja Carpenter 1985, Jobling 1994). Solukalvojen toimintaan vaikuttavalla lipidikoostumuksen muutoksella on merkitystä etenkin kidusten toiminnalle kylmässä vedessä (Hazel ja Carpenter 1985). Lipidikoostumuksella tiedetään myös olevan vaikutusta ainakin merielämään sopeutuneiden kalojen syvyys säätelyyn, sillä vettä kevyempänä aineena rasva lisää kalojen nostetta vesiympäristössä (Phleger ym. 1998).

Rehun ravintosisältö vaikuttaa kaloilla, rasvahappokoostumuksen lisäksi, myös rasvan sijoittumiseen elimistössä (Jobling ym. 1998). Joblingin ym. (1998) tutkimuksessa havaittiin korkearasvaisella (27,5%) rehulla ruokituilla kaloilla suurempia määriä ruumiinontelon rasvaa, verrattuna kaloihin jota oli ruokittu matalarasvaisella (12,6%) rehulla. Eri rehuilla ruokittujen kalojen koossa ja kasvussa ei muutoin kuitenkaan ollut havaittavissa eroja. Kiertovesiviljelyssä käytettävissä kaupallisissa rehuissa voi olla jopa 30% rasvapitoisuus, jonka seurauksena rasvaa voi kertyä kalojen ruumiinonteloon (Jobling ym. 1998).

2.5 Uimarakko

Uimarakon täyttöasteen avulla kalat säätelevät uintisyvyyttään vesipatsaassa (Macaulay ym. 2020). Lohikalojen uimarakko on normaalisti yksiosainen ja yhteydessä ruuansulatuskanavaan ohuella tiehyellä (Fänge 1966). Avorakkoisina kaloina lohikalat säätelevät uimarakkonsa täyttöastetta haukkaamalla ilmaa pinnalta (Macaulay ym. 2020). Uimarakko kehittyy kaloilla jo aikaisessa yksilönkehityksenvaiheessa, jolloin uimarakossa ei vielä ole ilmaa (Tait 1960). Vasta aloitettuaan vapaan uimisen ruskuaispussin hävittyä, kalanpoikanen täyttää uimarakkonsa haukkaamalla ilmaa veden pinnalta (Tait 1960, Blaxter ym. 1988). Kalankasvatuksessa liian suuret alkuvaiheen poikastiheydet voivat haitata uimarakon ensimmäistä täyttöä (Tait 1960).

Kalan fysiologiset vasteet kasvuympäristön muutokseen todennäköisesti vaikuttavat myös uimarakon toiminnan säätelyyn. Esimerkiksi kaasujen ylikylläisyys (> 100%) allasvedessä voi aiheuttaa kaloille uimarakon liialliseen täyttymiseen johtavaa kuplatautia (Timmons ym. 2018). Uimarakon toiminta voi myös häiriintyä äkillisen stressin seurauksena (Kolbeinshavn ja Wallace 1985). Niin kutsutussa uimarakon stressioireyhtymässä kalan uimarakko paisuu liiaksi stressihormonien vaikutuksesta (Kolbeinshavn ja Wallace 1985, Poppe ym. 1997). Oireyhtymä etenee yleensä vaiheittain pahemmaksi (Kolbeinshavn ja Wallace 1985). Lopulta laajentunut uimarakko painaa suolistoa niin, ettei kala pysty enää säätelemään tasapainoaan. Stressitekijän poistaminen oireiden alkuvaiheessa yleensä korjaa tilanteen, mikäli oireet eivät ole edenneet äärimmäiseen vaiheeseen, josta usein seuraa kalan kuolema (Kolbeinshavn ja Wallace 1985).

Uimarakon kehityshäiriöstä johtuva poikkeava rakenne voi mahdollisesti korostaa oireita tai olla jopa syynä syvyyssäätelyn ja uinnin vaikeuksiin. Epätavallisesti uivilta Atlantin lohilta havaittiin Poppen ym (1997) tutkimuksessa uimarakon lyhentymiä. Goodin ym. (2014) tutkimuksessa vastaavasti havaittiin uimarakon poikkeamia lähes kaikilla kylkiuivilla kirjolohilla, ja jopa osalla terveiltäkin

vaikuttaneista kaloista. Yksiselitteisiä syitä uimarakon epämuodostumien syntyyn ei ole tiedossa. Todennäköisesti kehitykseen vaikuttaa perimä, poikasvaiheen ravitseminen, yksilön fysiologiset ominaisuudet ja kasvuympäristöön liittyvät tekijät (Poppe ym. 1997). Uimarakon epämuodostumien syntyä on jonkin verran tutkittu muilla kalalajeilla. Leino ym. (1990) esimerkiksi saivat keinotekoisesti aikaan kehityshäiriötä paksupäämutun (*Pimephales promelas*) poikasten uimarakoille altistamalla kaloja alhaiselle pH:lle (pH 5,5) ja alumiinille (30 µg/l).

2.6 Stressi

Kalanviljelyssä kaloille voi aiheutua tarpeetonta stressiä vääränlaisista toimintatavoista, kuten liian korkeista kalatiheyksistä tai vedenlaadun säätelyyn liittyvistä ongelmista. Vaikeammin vältettäviä stressiä aiheuttavia toimenpiteitä ovat välttämättömät kalojen käsittelyt ja siirrot (Barton ja Iwama. 1991, Donaldson ym. 2008). Stressi voidaan määritellä fysiologisten vasteiden sarjana, joilla eliö pyrkii säilyttämään elimistönsä tasapainotilan tai selviämään hengissä kohdattuaan terveyttä uhkaavan häiriötekijän (Jobling 1994, Schreck ym. 2001). Stressireaktio voidaan jakaa primääriseen, sekundääriseen ja tertiääriseen reaktioon (Barton ja Iwama 1991, Jobling 1994). Primäärinen seuraus stressistä on elimistön katekolamiinien erityksen lisääntyminen, joka laukaisee stressihormoni kortisolin erityksen. Sekundäärisenä vasteena kalan aineenvaihdunta, fysiologinen säätely ja immunologia muuttuvat katekolamiinien ja kortisolin vaikutuksesta. Tertiäärisiä seurauksia ovat kokonaisvaltaiset fysiologiset ja käyttäytymisen muutokset (Donaldson ym. 2000, Shreck 2001). Krooninen stressi heikentää kalojen kykyä säädellä elimistön tasapainotilaa ja ylläpitää selviytymisen kannalta keskeisiä elimistön toimintoja, jonka seurauksena stressi itsessään voi lisätä kalojen kuolleisuutta ilman erillistä taudinaiheuttajaa (Schreck 1982, Kolbeinshavn ja Wallace. 1985, Timmons ym. 2018).

2.7 Lämpötila ja kylmäaltistus

Lämpötila kontrolloi aineenvaihduntaa vaihtolämpöisillä eläimillä, kuten kaloilla. Kylmässä vedessä kalan hapenkulutus vähenee ja aineenvaihdunta hidastuu (Black ym. 1991). Lämpötilansietokyvyn rajat ovat riippuvaisia lämpötilasta, jossa kala on tottunut aiemmin elämään. Kirjolohilla kasvun kannalta optimaalinen lämpötila kiertovedessä on noin 14 – 16 °C astetta (Timmons ym. 2018). Lämpötilan lasku tai nousu totutusta aiheuttaa muutoksia kalan fysiologiassa, käyttäytymisessä, ja voi vaikuttaa kalan terveydentilaan (Donaldson ym. 2008). Yleisesti ottaen kalat pystyvät paremmin sopeutumaan lämpötilan nousuun kuin laskuun, koska monet sopeutumisreaktiot ovat riippuvaisia aineenvaihdunnan tasosta (Jobling 1994). Sopeutumiseen vaikuttavat myös lämpötilan muutoksen nopeus ja suuruus (Jobling 1994).

Kylmäshokista puhutaan, kun kala on tottunut tasaiseen lämpötilaan ja altistuu äkilliselle lämpötilan laskulle (Donaldson ym. 2008). Nopea muutos aiheuttaa kaloille stressireaktion. Kylmäshokin seurauksiin vaikuttavat altistuksen kesto, lämpötilan laskun suuruus ja kalan sopeutumiskyky muuttuvaan lämpötilaan (Donaldson ym. 2008). Äärimmäinen seuraus rajasta lämpötilan laskusta voi olla kalalle jopa kuolema. Saundersin ym. (1975) tutkimuksessa suolaiseen veteen sopeutettuja lohikaloja siirrettiin alkusyksystä sisäaltaista merelle talvehtimisaltaisiin. Kalojen kuolleisuus lisääntyi talven aikana meriveden lämpötilan laskettua alle 4 °C asteeseen. Kalojen kuolleisuus oli tutkimuksen aikana korkeinta lämpötilan ollessa matalimmillaan -0,7 – -0,8 °C.

Lämpötila vaikuttaa myös kidusten solukalvojen toimintaan, kun kidusepiteelillä tapahtuva energiaa kuluttava ioninvaihto vähenee merkittävästi kylmässä vedessä (Hickman ym. 1964, Black ym. 1991, Gonzales ym. 2000, Donaldson ym. 2008). Passiivinen aineiden kulku kiduksilla pysyy kuitenkin ennallaan. Pitkäaikainen altistus kylmälle vedelle voi johtaa ionitasapainon järkkymiseen, jos aktiivinen ioninotto ei pysty tasapainottamaan passiivista eritystä. Kalan tottuminen

kylmään voi kuitenkin palauttaa aktiivisen ioninvaihdon normaaliksi (Hickman ym. 1964).

Kylmältistus voi vaikuttaa kalan keskushermostoon, ja sen seurauksena uinnin koordinaatiokyky voi heikentyä (Friedlander ym. 1976, Szabo ym. 2008). Lämpötilan lasku voi lisäksi alentaa kalojen immuunipuolustusta (Le Morvan ym. 1998). Kylmässä vedessä kalat voivat olla alttiimpia infektioille, koska immuunivasteiden muodostumiseen vaikuttaa merkittävästi yleinen aineenvaihdunnan taso (Le Morvan ym. 1998). Kalojen kyky sietää haitallisia yhdisteitä, kuten raskasmetalleja myös heikkenee kylmässä (Roch ja Maly 1979).

2.8 Kidusten toiminta ja osmoregulaatio

Kalojen kiduksilla on keskeinen rooli elimistön tasapainotilojen ylläpidossa (Cameron ym. 1978). Kiduksilla tapahtuu pääosa kaasujenvaihdosta ja ionitasapainon säätelystä (Cameron ym. 1978, Randall ym. 1982). Kala säätelee kiduksille virtaavan veden määrää ventilaatiolla ja uintinopeudella, jonka se pystyy suhteuttamaan vedessä vallitsevaan happipitoisuuteen kemo- ja mekanoreseptorien sensoristen viestin avulla (Burlison ja Wilson 1993).

Kidukset koostuvat kiduskaarista, joista lähtevät filamentit jakautuvat edelleen tuhansiksi pieniksi kiduslamelleiksi mahdollistaen samalla laajan diffuusiopinta-alan (Evans ym. 1999). Kalalajien välillä on suuria eroja kidusten pinta-aloissa, ja erityisesti lohikaloilla on kokoonsa nähden suuri kiduspinta-ala (Hughes 1966). Kidusten lamelleilla on ohut, yhden solukerroksen paksuinen pintaepiteeli, jonka alla on tiheä verisuoniverkosto. Tämän rakenteen ansiosta diffuusioetäisyys veren ja ympäristön välillä on lyhyt (Evans ym. 1999). Pintaepiteeli on muodostunut pääasiassa kolmen tyyppisistä soluista, peittosoluista, kloridisoluista ja apusoluista, joiden lisäksi filamenttien reunoilla on limaa erittäviä soluja (Evans ym. 1999). Kloridisolut sijaitsevat peittosolujen lomassa ja ovat liittyneet toisiinsa syvillä ns. tiukkaliitoksilla. Kloridisoluissa on runsaasti ATP:tä tuottavia

mitokondrioita sekä Na/K-ATPaasi-entsyymiä solukalvon rakenteissa (Evans ym. 1999). Merikaloilla, sekä suolaiseen että makeaan veteen sopeutuneilla, euryhaliineilla lohikaloilla esiintyy kloridisolujen yhteydessä apusoluja, joiden merkitys kidusten toiminnan kannalta ei tosin ole täysin selvä (Evans ym. 1999).

Solujen sisäiset pitoisuudet natriumia ja kloridia ovat makean veden kaloilla korkeampia kuin pitoisuudet ympäristössä. Siksi yhdisteet pyrkivät jatkuvasti ulos kalan elimistöstä kohti ympäristön pienempää pitoisuusgradienttia, jolloin kalan täytyy pystyä ottaa menettämänsä natriumi ja kloridi takaisin ympäristöstä säilyttääkseen ionitasapainonsa. Kala käyttää ionivaihdossa hyväksi elimistönsä aineenvaihduntatuotteina, H^+ , HCO_3^- ja NH_4^+ -ioneja vaihtamalla ne ioninvaihdoksi kutsutulla mekanismilla itselleen tarpeellisiin ioneihin. Natriumioninvaihto tapahtuu solukalvon Na^+ -ionikanavassa pitoisuusgradientin vastaisesti solukalvon protonipumppuentsyymien avulla. Ionivaihdossa vetyioni H^+ poistuu ja natriumioni otetaan vastaan. Samanlainen mekanismi toimii Cl^- ioninvaihdossa. Cl^- vaihdetaan HCO_3^- -ioniin Cl^- -kanavassa. Solukalvon varauspotentiaali pysyy samana, kun negatiivisten tai positiivisten ionien määrä ei muutu solun sisällä.

Cl^- ja Na^+ -ionivaihdolla kala säätelee myös happo-emästasapainoa, kun aineenvaihduntatuotteista päästään eroon ioninvaihdon yhteydessä. Kaasujenvaihdossa happi siirtyy kiduksilla verenkiertoon ja hiilidioksidi poistuu veteen. Hapenkulutuksen tuotteena syntyvän hiilidioksidin erityis kuduksilla on myös tärkeää happo-emästasapainon säätelyssä, koska hiilidioksidi muodostaa veressä hiilihappoa, joka voi happamoittaa kalan elimistöä, mikäli kala ei kykene sitä riittävästi poistamaan (Randall ym. 1982). Toinen aineenvaihduntatuote, josta kalan on tärkeää päästä eroon, on ammoniakki, jota syntyy kalojen aminohappokatabolian tuotteena. Ammoniakkia esiintyy kalan veressä ionimuodossa ammoniumina NH_4^+ (98%) ja ammoniakkina NH_3 (2%) (Hjeltnes ym. 2012). Liiallisina pitoisuuksina veressä se aiheuttaa alkaloosia (Hjeltnes ym. 2012). Kidukset ovat läpäisevämpiä varauksettomalle ammoniakille, joten NH_3

poistuu kiduksilta diffuusiolla kohti ympäristön pienempää pitoisuutta (Evans ym. 1999). Ammoniumia kala voi erittää Na/K-ATPaasilla vaihtamalla NH_4^+ -ionin kalium K^+ -ioniin.

2.8.1 Veden puskuriominaisuuksien vaikutus osmoregulaatioon

Vesiviljelyssä monia kalojen osmoregulaatioon ja kaasujen vaihtoon liittyviä haasteita voidaan ratkaista riittävällä ilmastuksella sekä veden puskurikykyä lisäävien kemikaaleilla, kuten kalsiumkloridin (CaCl) ja natriumbikarbonaatin (Na_2CO_3) lisäyksellä (Randall ym. 1982). Alkaliteetin yksikkönä käytetään yleensä titrattavien emästen määrää vedessä (mg/ml) kalsiumkarbonaatti (CaCO_3) ekvivalenttina. Kaloille turvallisen alkaliteetin alaraja on 20 mg/l ja ylärajana voidaan pitää 100 - 150 mg/l (Hjeltnes ym. 2012, Timmons ym. 2018). Riittävä alkaliteetti tekee vedenlaadusta vakaamman ja estää pH:n vaihtelua. Heikko alkaliteetti vedessä haittaa kalan ammoniakkin eritystä ja heikentää ioninvaihtoa erityisesti natriumin osalta (Wright ja Wood 1985). Alkaliteettia on monesti tarpeen säätää kierto-vesiviljelyssä, jotta veden laadusta saadaan vakaata. Alkaliteettiin vaikutetaan yleensä karbonaatti (CO_3^{2-})- ja bikarbonaatti (HCO_3^-)-ioneilla, joita voidaan lisätä veteen esimerkiksi helposti soodan (Na_2CO_3) muodossa (Hjeltnes ym. 2012). Soodan lisäyksen on tutkimuksissa todettu myös lieventävän kaloilla hyperkapniasta eli veren liialliseen hiilidioksidipitoisuudesta johtuvaa happamoitumista lisäämällä veren bikarbonaatti (HCO_3^-) -ionikonsentraatiota (Perry ym. 1981).

Osalla alkaliteettia nostavilla kemikaaleilla, kuten kalsiummagnesiumkarbonaatilla ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) eli dolomiitilla, voidaan lisätä myös veden kovuutta (Hjeltnes ym. 2012). Kovuuden yksikkönä käytetään usein veden kalsiumkarbonaattipitoisuutta ((CaCO_3) mg/l), jonka turvallinen pitoisuus kiertovedessä kaloille on 20 - 300 mg /l (Timmons ym. 2018). Alkaliteetti ja kovuus muodostavat yhdessä veden puskuriominaisuuden eli kyvyn vastustaa pH:n muutosta. Kalojen erittämä hiilidioksidi voi happamoittaa altaiden vettä,

mikäli allasveden puskuriokyky on matala ja ilmastus ei ole riittävän tehokasta (Hjeltnes ym. 2012). Kovuus vähentää joidenkin metallien, kuten Kadmiumin biosaatavuutta vesiympäristöstä ja siten vähentää kalojen altistusta haitallisille vaikutuksille (Davies ym. 1993).

Altistus erityisen pehmeälle (< 20 mg/l (CaCO_3) vedelle muuttaa kalan kidusten toimintaa ja häiritsee normaalia ioninvaihtoa (McDonald ja Rogano 1986). Stressihormonien vaikutuksesta kloridisolujen määrä kidusepiteelillä lisääntyy, jolla kala pyrkii tehostamaan ioninvaihtoaan (Perry ym. 1989). Diffuusion heikentyminen kaasujen osalta voi pahimmillaan aiheuttaa hypoksiaa eli hapenpuutosta (Greco ym. 1996). Veden pehmeys lisäksi vähentää ammoniakkin erityistä kiduksilta, jonka seurauksena elimistön ammoniakkipitoisuus voi nousta haitalliseksi (Yesaki ja Iwama 1992, Iwama 1997). Krooninen altistus matala-alkaliteetiselle ja pehmeälle vedelle lisää kalojen stressiä ja voi aiheuttaa kuolleisuutta (Yesaki ja Iwama 1992, Iwama 1997). Riittävä kalsiumionikonsentraatio allasvedessä suojaa kaloja happamuuden vaikutuksilta, sillä kalsium vähentää kidusepiteelin läpäisevyyttä H^+ -ioneille (Randall ym. 1982). Myös metalli-ionien läpäisevyys kiduksilla vähenee kalsiumin vaikutuksesta. Kalsiumin ja magnesiumin lisäyksen on havaittu vähentävän veteen liuenneiden metallien, kuten kuparin (Cu) ja kadmiumin (Cd), toksisuutta kaloille (Timmons ym. 2018).

2.8.2 pH:n ja metallien vaikutus osmoregulaatioon

Veden vetyionikonsentraatiolla eli pH:lla on lukuisia vaikutuksia vesiympäristössä. Vesiviljelyssä optimaalinen veden pH kirjolohelle on 6,5 – 8,5 ja vaarallisen alhainen pH 4,2 – 5,0 (Hjeltnes ym. 2012, Timmons ym. 2018). Happamuuden ja alkaliteetin kontrollointi on kiertovesiviljelyssä tärkeimpiä kalojen hyvinvointiin vaikuttavia toimenpiteitä (Hjeltnes ym. 2012). pH:n romahduksesta voi aiheutua kaloille kaasujenvaihdon heikkenemistä, ionivaihdon ja osmoregulaation häiriöitä sekä happo-emästasapainon järkkymistä (Jobling

1994). Elimistön häiriötilan vakavuuteen vaikuttavat pH:n muutoksen suuruus ja veden ionikoostumus, erityisesti kalsiumin ja haitallisten ionien osalta. Kiertovesiviljelyssä happamuuden muutos voi vaikuttaa myös välillisesti kalojen hyvinvointiin. Biosuodattimen toiminnan kannalta optimaalinen veden pH on 7 – 9, ja sitä matalampi pH voi johtaa nitrifikaation häiriintymiseen ja sitä kautta ammoniakkityypipitoisuuden kasvuun allasvedessä (Timmons ym. 2018).

Tyypillisesti akuutti altistus pH:n romahdukselle lisää limaneritystä kiduksilla, joka saattaa vaikeuttaa kaasujen vaihtoa kidusepiteelillä lisäämällä diffuusioetäisyyttä veren ja ympäristön välillä (Jobling 1994). Hapen sitoutuminen veren hemoglobiiniin vähenee pH:n laskiessa, mikä voi heikentää hapenkuljetusta kalan elimistössä (Pelster ym. 1998, Jobling 1994). Veden happamuus myös lisää kloridisolujen määrää kiduksilla vastaavasti kuin heikko alkaliteetti (Jobling 1994). Natrium (Na^+) - ja kloridi (Cl^-) -ionien passiivinen poistuminen kiduksilta lisääntyy ja niiden aktiivinen ioninvaihto heikkenee (Randall ym. 1982, Audet ym. 1988). Ioninvaihto heikkenee myös merkittävästi kalsium-ionien (Ca^{2+}) osalta. Kala ei myöskään pysty erittämään kiduksillaan vetyioneja (H^+) ympäristöön, jossa on jo valmiiksi korkea vetyionikonsentraatio, mikä entisestään lisää elimistön happamoitumista (Jobling 1994). Happamuuden aiheuttamat muutokset kalan elimistössä voivat johtaa muun muassa uintikyvyn heikkenemiseen (Ye ja Randall 1991). Pienikin lasku ympäristön pH:ssa voi riittää happamoittamaan kalan elimistöä (Jobling 1994).

Allasveden pH:n kasvu, kuten myös stressi, lisäävät ammoniakin (NH_3) eritystä kiduksilla, jonka seurauksena allasveden ammoniakkipitoisuus voi kasvaa haitalliseksi (Jobling 1994, Hjeltnes ym. 2012). Turvallisen NH_3 -pitoisuuden yläraja lohikaloille on 0,0125 mg/l (Timmons ym. 2018) Allasveden korkea ammoniakkipitoisuus estää ammoniakin normaalin diffuusion kiduksilla, jolloin sen määrä veressä voi kasvaa kalalle myrkylliseksi (Hjeltnes ym. 2012). Akuutti ammoniakkimyrkytys vaurioittaa kalan keskushermostoa, heikentää osmoregulaatiota ja voi aiheuttaa fyysisiä vaurioita kidus- ja sisäelinkudoksissa

(Hjeltnes ym. 2012). Krooninen altistus lievästikin kohonneille ammoniakkipitoisuuksille aiheuttaa kaloilla muun muassa vastustuskyvyn alenemista ja kasvun heikkenemistä (Hjeltnes ym. 2012)

Happamuuden tiedetään lisäävän metallien liukenemista luonnonvesissä, jonka lisäksi se myös lisää niiden myrkyllisyyttä kaloille (Reid ja McDonald 1988, Timmons ym. 2018). Altistus metalli-ioneille, kuten kadmiumille (Cd), kuparille (Cu) ja alumiinille (Al^{2+}) vaikuttaa kalojen fysiologiaan monin tavoin (Jobling 1994). Tunnetuimmat vaikutukset liittyvät osmoregulaation ja ionivaihdon häiriintymiseen. Metallionit voivat vaurioittaa ja tuhota kidusten kudoksia, ja siten heikentää kaasunvaihtoa, happo-emästasyyden säätelyä sekä aineenvaihduntatuotteiden poistoa (Jobling 1994). Kadmium-altistuksen on tutkittu aiheuttavan kirjolohilla hypokalsemiaa eli kalsiumionien puutosta, jolla voi olla letaali vaikutus kroonisena altistuksena (Roch ja Maly 1979). Oireina kadmiummyrkytyksessä ovat muun muassa syöksähtelevä uinti, passiivisuus sekä tasapainohäiriöt (Roch ja Maly. 1979). Altistus kuparille ja alumiinille puolestaan heikentää kidusten ioninvaihtoa erityisesti natriumin (Na^+) ja kloridin (Cl^-)osalta (Reid ja McDonald 1988).

3. AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Kalojen käsittely

Tutkimuksessa käytettiin Luonnonvarakeskuksen Laukaan vesiviljelylaitoksen koko ikänsä kiertovedessä kasvaneita kirjolohia, joita oli yhteensä 121 kappaletta. Kaloja ruokittiin ennen kokeiden alkua kaupallisella Rasioaqua Oy:n Circuit Red - kalanrehulla valmistajan ruokintataulukon mukaisesti, 7/9 mm kokoisella rehupelletillä. Ravintosisällöltään rehussa on 31% raakarasvaa ja raakavalkuaista

41% (Raisioaqua Oy 2019). Ennen kokeiden alkua kalat olivat vuorokauden paastolla, eikä kaloja myöskään ruokittu kokeiden aikana.

Tutkimuksessa oli käytössä kuusi allasta, joista kolme oli kontrollialtaita ja toiset kolme käsittelyaltaita. Altaiden tilavuus oli 400 l ja jokaisessa oli kaloja 19 – 21 kappaletta. Kokeet suoritettiin porrastetusti allaspareittain niin, että kerrallaan yksi allas oli käsittelyallas ja toinen kontrolliallas. Porrastuksesta johtuen viimeisen allasparin kalat söivät rehua viikon kauemmin kuin ensimmäisen allasparin kalat. Koejakson kesto allasparia kohden oli neljä vuorokautta, jonka päätteeksi kalat lopetettiin napakalla iskulla päähän. Lopetuksen yhteydessä kalat jaoteltiin kylkiuviin ja normaalisti uiviin kaloihin seuraamalla kaloja ensin altaissa ja valikoimalla lopetettavat kalat uintitavan perusteella. Koekalojen pituus oli mittaushetkellä keskimäärin $413 \pm \text{SD } 30$ mm ja paino keskimäärin $1213 \pm \text{SD } 300$ g.

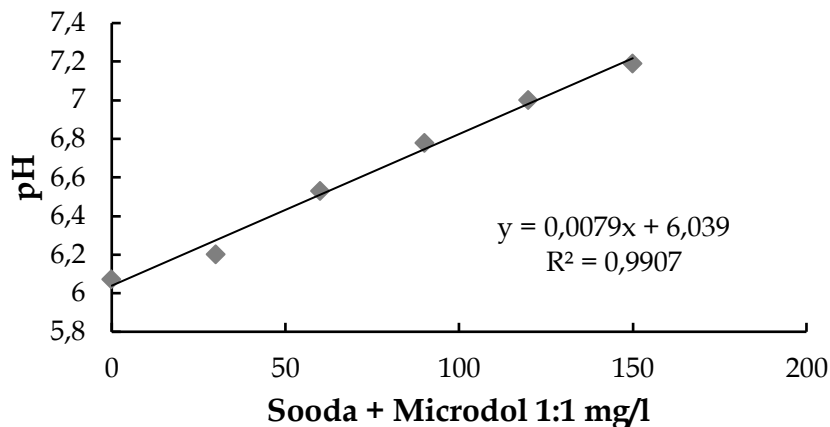
3.2. Koeasetelma

Tutkimus suoritettiin Luonnonvarakeskuksen vesiviljelyn tutkimuslaitoksella Laukaassa 28.11. – 9.12.2019. Koejärjestely ei ylittänyt koe-eläinlautakunnan mukaan eläinkoemääritelmän rajaa, jonka vuoksi hankelupaa ei erikseen tarvittu. Allasparien vesitys irrotettiin kiertovesijärjestelmästä ja tulovesi vaihdettiin kylmäksi järvivedeksi, jonka seurauksena allasveden lämpötila laski nopeasti kokeiden alussa. Käsittelyaltaiden veteen syötettiin koejakson aikana 1:1 suhteessa puskurikykyä ja pH:ta nostavia kemikaaleja, Solvay Bicar Tec:n tuottamaa -natriumbikarbonaattia (Na_2CO_3) ja Norwegian Talc AS:n tuottamaa Microdol-jauhetta ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$). Kontrollialtaille vesi oli koko koejakson aikana käsittelemätöntä järvivettä.

Ennen kokeiden alkua kiertoveden pH mitattiin Scanin pH-anturilla (Scan Messtechnik GmbH pH lyser type: E-514-2-075, Wien, Austria), jotta käsittelyaltaisiin voitiin säätää vastaava pH puskurikemikaaleilla. Sopiva annostus määritettiin laskemalla järvivettä tiedetty tilavuus ämpäriin, johon lisättiin viisi

kertaa tarkoin punnittu annos puskurikemikaaliseen Kiertoveden koetta ennen mitattu pH oli 7,46 ja järviveden 6,07. Kuvaajasta saadun suoran yhtälöstä laskettiin puskurikemikaalipitoisuus (180 mg/l), jolla järviveden pH saataisiin nousemaan 7,46:n (Kuva 1). Sooda- ja Microdol-pitoisuuden vaikutuksesta järviveden pH-arvoon tehtiin kuvaaja Excel-tilukko-ohjelmalla (Kuva 1), josta saatiin laskukaava kokeen aikana tarvittavaan kemikaalimäärään (Taulukko 1).

Kokeessa käytetty puskuriliuos tehtiin erilliseen 500 l säiliöön. Säiliöön laskettiin ensin 500 l järvivettä, johon soodaa ja Microdolia lisättiin 1:1 suhteessa. Kuvan 1 yhtälön avulla laskettiin allasveden pH:n ylläpitämiseen tarvittava puskurikemikaalipitoisuus (Taulukko 1). Puskuriliuosta ilmastettiin koko kokeen ajan ilmastuslaitteella (SECOH SHANGHAI MEC LTD.), jotta kemikaalit sekoittuisivat ja niiden pitoisuus säiliössä pysyisi tasaisena.



Kuva 1. Järviveden pH:n muutos puskurikemikaalien lisäyksen jälkeen.

Taulukko 1. Soodan ja Microdolin annostus kylmän veden virtaamille 3 l/min ja 5 l/min ja menekki vuorokauden aikana, jolla ylläpidetään pH:n tasoa halutunlaisena.

Kylmän veden virtaus (l/min)	Kylmän veden virtaus (l/vrk)	Säiliön tilavuus (l)	Lisäys sooda+ Microd. (g)	Liuoksen pumppaus (ml/min)	Liuoksen pumppaus (l/vrk)	Pumpattu sooda+Microd. (g/vrk)	Sooda+ microd. Pitoisuus (mg/l)	Laskennallinen pH
3	4320	500	5400	50	72	777,6	180	7,46
5	7200	500	5400	83,3	120	1296	180	7,46

Uusi tulovesi johdettiin altaisiin järvivesisäiliöstä, jonka hanoihin oli kiinnitetty letkut jokaista kokeen allasta kohden. Tuloveden virtaamaksi säädettiin aluksi 3 l/min, joka nostettiin 5 l/min:ssa lämpötilan lasketua altaissa järviveden lämpötilaan. Käsittelyaltaisiin kiinnitettiin vesityksen vaihdon yhteydessä letkut puskuriliuossäiliöstä, josta liuosta syötettiin letkupumpulla (Watson Marlow Pumps N module standard Nema 4x IP66). Laitteeseen säädettiin alkuun pumppaustehoksi 50 ml/minuutissa (Taulukko 1). Pumppauksen tarkkuus vielä varmistettiin punnitsemalla pumpun minuutissa päästämä vesimäärä kahdesti, jonka tulos oli riittävän tarkka (51,6 ml/min ja 49,6 ml/min). Puskuriliuoksen syöttöä ei kuitenkaan nostettu virtaamaa lisättäessä, koska alkaliteetin ja pH:n riittävä taso saavutettiin jo 50 ml/min annostuksella.

Ensimmäisen allasparin kokeet aloitettiin 28.11.2019, toisen allasparin 29.11.2019. Viimeisen allasparin kokeet aloitettiin 5.12.2019. Kokeet aloitettiin jokaiselle allasparille aina samaan kellon aikaan, noin kello 10.00 aamulla. Lämpötilan laskua kokeen alussa seurattiin Digital professional series YSI proODO -mittarilla ja S:can-antureilla. Koejakson aikana kalojen kuntoa seurattiin ja kuolleet poistettiin välittömästi ja siirrettiin kylmiöön odottamaan tutkimista.

Vesinäytteitä otettiin kokeiden aloituspäivänä kahden tunnin välein, yhteensä neljä kertaa. Vesinäytteistä mitattiin pH ja alkaliteetti laboratoriossa TitraLab AT 1000 Series -alkaliteettimittarilla. Samat mittaukset tehtiin myös raakavetenä käytetylle järvivedelle. Tämän lisäksi jokaisesta kontrolli- ja käsittelyaltaasta kerättiin päivittäin 200 ml vettä koostevesinäytepulloon, niin että koejakson päätteeksi kuudessa pullossa oli 800 ml yhdestä altaasta kerättyä vettä. Koostenäytteistä määritettiin myöhemmin kokeiden aikainen veden ionikoostumusta kalsiumin, natriumin ja magnesiumin osalta (Taulukko 2).

3.1. Vedenlaatu kokeiden aikana

Kokeessa käytetty raakavesi oli peräisin Peurunkajärvestä, 4 metrin syvyydestä. Koejakson aikana järvesi oli lämpötilaltaan 1,6 – 2,0 °C, ja sen alkaliteetti oli

keskimäärin 12 mg/l (\pm SD 0,3 mg/l) ja pH keskimäärin 6,9 (\pm SD 0,1). Ennen vesityksen vaihtoa kiertoveden lämpötila oli altaissa kokeiden aloittamishetkellä 12,5 - 16,3 °C. Kiertoveden pH oli keskimäärin 7,4 (\pm SD 0,1) ja alkaliteetti keskimäärin 44,8 mg/l (\pm SD 7,7 mg/l) (Taulukko 2). Kiertoveden lämpötila vaihteli hieman allasparien kokeiden aikana ja oli korkeammillaan ensimmäisen allasparien kokeen alussa. Vesityksen vaihdon jälkeen lämpötila laski altaissa kuuden tunnin kuluessa järviveden lämpötilaan.

Allasveden lämpötila, alkaliteetti ja pH mitattiin neljä kertaa kokeen aloituspäivänä ja kerran jokaisena koepäivänä. Kontrollialtaissa pH:n ja alkaliteetin keskiarvot olivat matalampia, kuin puskurikäsitellyissä altaissa tai lähtötilanteessa kiertovedessä. Magnesiumin ja kalsiumin pitoisuuksista laskettu kovuus vaihteli käsitellessä järvivedessä 10,1 - 10,8 mg/l (CaCO_3), puskuroidussa järvivedessä 38,9 - 77,3 mg/l (CaCO_3) ja kiertovedessä 11,5 - 12,4 mg/l (CaCO_3). Vesi, jonka kovuus on < 75 mg/l (CaCO_3), luokitellaan pehmeäksi (Taulukko 3). Natriumin pitoisuudet kiertovedessä olivat korkeita, koska sen puskuroidussa käytettiin ainoastaan soodaa, joka ei sisällä magnesiumia tai kalsiumia (Timmons ym. 2018)

Taulukko 2. Kontrollialtaiden, käsittelyaltaiden sekä kiertoveden pH:n ja alkaliteetin keskiarvoja ja keskihajontoja kokeen aikana tehdyistä vedenlaadun mittauksista.

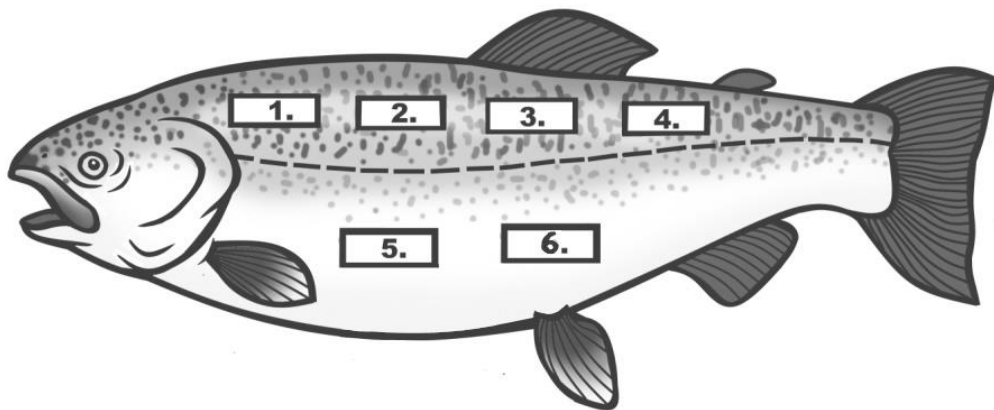
	Käsittelyryhmä	Kontrolliryhmä	Kiertovesi
pH	7,5 \pm 0,2	6,6 \pm 0,1	7,4 \pm 0,1
Alkaliteetti (mg/l)	51,3 \pm 10,9	13,3 \pm 1,7	44,8 \pm 7,7

Taulukko 3. Altaiden magnesium-, kalsium- ja natriumionipitoisuuksia käsittelyryhmien altaiden keskiarvoina ja keskihajontoina.

	Käsittelyryhmä	Kontrolliryhmä	Kiertovesi
Mg (mg/l)	6,0 \pm 2,1	0,7 \pm 0,04	1,8 \pm 0,04
Ca (mg/l)	12,8 \pm 3,9	3,0 \pm 0,1	1,9 \pm 0,2
Na (mg/l)	166,8 \pm 52,3	24,2 \pm 5,9	795,8 \pm 9,3

3.4. Kalojen tutkiminen

Kunkin allasparin kalat tutkittiin välittömästi lopetuksen jälkeen. Ensimmäisenä kaloista mitattiin paino gramman tarkkuudella ja pituus millimetrin tarkkuudella. Mittauksen jälkeen kalasta määritettiin rasvapitoisuus Distell fish fatmeter 692, Scotland, UK -mittarilla kuudesta eri kohdasta vasemmasta kyljestä, neljä mittauspistettä kylkiviivan yläpuolelta ja kaksi kylkiviivan alapuolelta (Kuva 2). Mittarin asetuksista käytettiin laitteen TROUT 2-asetusta, jota käytetään myös Luonnonvarakeskuksen JALO-valintajalostusohjelman kalamittauksissa. Distell-mittarin toiminta perustuu laitteen lähettämiin mikroaaltoihin, jotka reagoivat näytteen vesipitoisuuteen, jonka mittari muuttaa rasvapitoisuudeksi käyttämällä hyväksi vesi -ja rasvapitoisuuden käänteistä suhdetta (Anonyymi B).

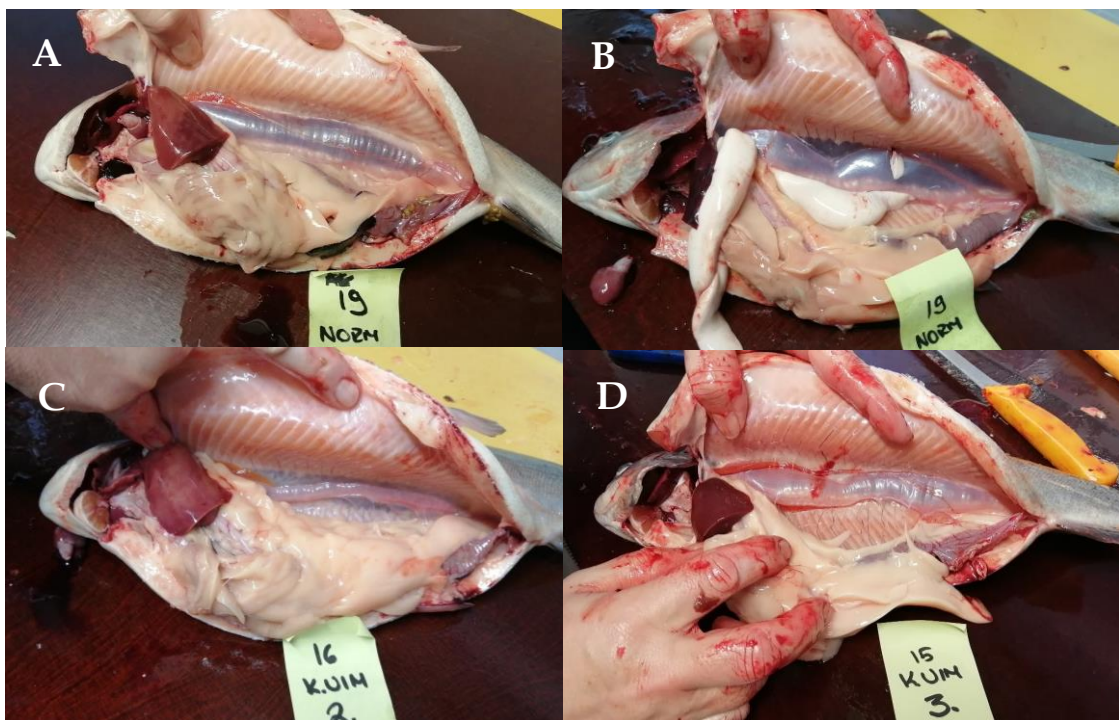


Kuva 2. Distell-rasvamittauksen mittauspisteet 1.-6. merkittynä numeroilla piirrettyyn kalan kuvaan.

Kalat avattiin perkausveitsellä uimarakkoa varoen. Uimarakko kuvattiin ja sukupuoli määritettiin avauksen yhteydessä. Sisäelimet pussitettiin nimettyihin pakastepusseihin ja pakastettiin myöhempää tutkimista varten. Kalasta otettiin perkauksen jälkeen perkauspaino, jonka jälkeen vielä kala fileoitiin ja vasemman kyljen filee punnittiin. Mittaustulokset tallentuivat digitaalisesti RUFECO-DL2-

kenttätietokoneelle, josta ne siirrettiin myöhemmin pöytätietokoneelle Excel-
taulukoksi. Paperiselle tutkimuslomakkeelle kirjattiin lisäksi kalan tietojen
yhteydessä arvio, onko uimarakko normaali vai poikkeava. Kuvat uimarakoista
tallennettiin tietokoneelle, mistä ne käytiin vielä kertaalleen läpi ja rakenne
määritettiin (Kuva 3).

Kuva 3. Aineiston kaloilta kuvattuja uimarakkoja. Kalan A uimarakko on
normaali. Kalan B uimarakko on mutkittileva. Kalan C on uimarakko kaventunut.
Kalan D uimarakko on yhtäaikaaisesti sekä mutkittileva että kaventunut.



Uimarakon poikkeavuuksien toteaminen perustui näönvaraiseen arvioon
rakenteesta. Normaaliksi luokitellut uimarakot olivat täyttyneet tasaisesti ja
sijaitivat tasaisesti selkärankaa vasten ruumiinontelossa (Kuva 3). Poikkeavaksi
uimarakoiksi oli luokiteltu muun muassa selkeästi mutkan tekevät
uimarakot ja kaventuneet sekä niiden yhdistelmätyypit ja myös erityisen
paisuneet tai kuroutuneet uimarakot (Kuva 3) Poikkeamista yleisimpiä vikoja
olivat mutkaisuus ja kaventumat, (Kuva 3). Mutkaisia uimarakkoja havaittiin 35
kalalta ja kaventuneita 17 kalalta. Erilaisia poikkeamia esiintyi myös samassa

kalassa, ts. kalan uimarakko saattoi olla yhtäaikaisesti sekä mutkainen että kaventunut. Muita poikkeamia olivat kaksiosaiseksi kuroutuneet uimarakot (2 kpl) ja erityisen paisuneet uimarakot. Joukossa oli myös yksi selkeästi lyhentynyt uimarakko.

Kalojen mittauksen yhteydessä säilötyt ja pakastetut sisäelimet sulatettiin myöhemmin yliopiston laboratoriossa. Rasvakudos kaavittiin sormin suoliston ympäriltä mahdollisimman tarkasti taarattuun astiaan ja erotetun rasvakudoksen massa punnittiin kahden desimaalin tarkkuudella.

3.4 Aineiston käsittely ja tilastolliset menetelmät

Muuttujina aineistossa olivat kalan uintitapa (kylkiuinti tai normaali uintitapa), sukupuoli, pituus, paino, kokonaisrasvapitoisuus, selkä- ja vatsapuolen rasvapitoisuus, perkuupaino, fileepaino, suolistorasvan määrä sekä uimarakon rakenne (poikkeava tai normaali). Sukupuoli kuitenkin jätettiin huomioimatta analyyseissa johtuen sukupuolijakauman naaraspainotteisuudesta. Kokeiden aikana kuolleet kalat (yhteensä 4 kpl) lisättiin tilastoanalyyseissä kylkiuimarien ryhmään. Kuolema on oletettavasti äärimmäinen seuraus siirron aiheuttamasta häiriötilasta ja siten rinnastettavissa kylkiuinti-ilmiöön.

Selkäpuolen rasvaprosentti laskettiin keskiarvona neljästä kylkiviivan yläpuolelta tehdystä Distell-mittauksesta. Vatsapuolen rasvaprosentti laskettiin vastaavasti keskiarvona kahdesta kylkiviivan alapuolelta tehdystä Distell-mittauksesta. Kokonaisrasvaprosentti laskettiin keskiarvona kaikista mitatuista kohdista. Muita mitatuista muuttujista laskettuja muuttujia olivat kuntokerroin, perkuu- ja fileesaantoprosentit sekä suolistorasvaindeksi. Kalan ruumiin muodosta ja kunnosta kertova Fultonin (1904) kuntokerroin (K) laskettiin kaavalla $K = \frac{10^5 W}{L^3}$, jossa L on kalan pituus millimetreinä ja W kalan paino grammoina. Perkuusaantoprosentti laskettiin jakamalla kalan perattu paino kokonaispainolla ja kertomalla sadalla. Fileesaanto laskettiin kertomalla yhden fileen paino kahdella

ja jakamalla se kalan kokonaispainolla, kerrottuna sadalla. Suolirasvaindeksi laskettiin jakamalla kaavitun suolistorasvan paino kalan kokonaispainolla ja kertomalla sadalla. Tilastollista tarkastelua varten prosenttiluvut, kuten edellä mainituille Distell-rasvamittauksen tuloksille, perkuu- ja fileesaantoprosenteille sekä suolistorasvaindeksille tehtiin arcsin-muunnos kaavalla $x = \text{ArcSin}(\sqrt{P}) \cdot 180/\pi$.

Aineisto analysoitiin IBM SPSS statistics 26 - ja R x64 3.6.2. - tilastoanalyysiohjelmilla. Tilastollisen merkitsevyyden raja-arvona käytettiin p-arvoa 0,050. R-ohjelmalla käytettyjä ohjelmakirjastoja olivat survival, lme4, coxme, effects, car, lmerTest. Testinä käytettiin generalized linear mixed model -sekamallia (GLMM), jossa selitettävänä muuttujana oli uintitapa (kylkiuimari/normaali), ja selittävinä muuttujina käsittely (puskurikäsittely/kontrolli) sekä uimarakko (poikkeava/normaali). Satunnaismuuttujana testissä oli allas. Testien tulokset raportoitiin khiin neliön testisuureella X^2 .

SPSS-ohjelmalla suoritettiin aineiston muu analysointi. Aineiston normaalijakautuneisuus testattiin Kolmogorov-Smirnov-testillä ja varianssien yhtäsuuruudet Levenen testillä. Kaksisuuntaisella varianssianalyysillä (2-suunt. ANOVA) testattiin eroja muuttujien keskiarvoissa kylkiuivien ja normaalisti uivien kalojen sekä uimarakoltaan poikkeavien ja uimarakoltaan normaalien kalojen välillä. Satunnaismuuttujana testeissä oli lisäksi allas. Kovarianssianalyysillä (ANCOVA) testattiin eroja rasvaisuusmuuttujien keskiarvoissa kylkiuivien ja normaalisti uivien kalojen sekä uimarakoltaan poikkeavien ja uimarakoltaan normaalien kalojen välillä. Kovarianssianalyysissä satunnaismuuttujana oli myös allas ja lisäksi niissä käytettiin kalan pituutta kovariaattina.

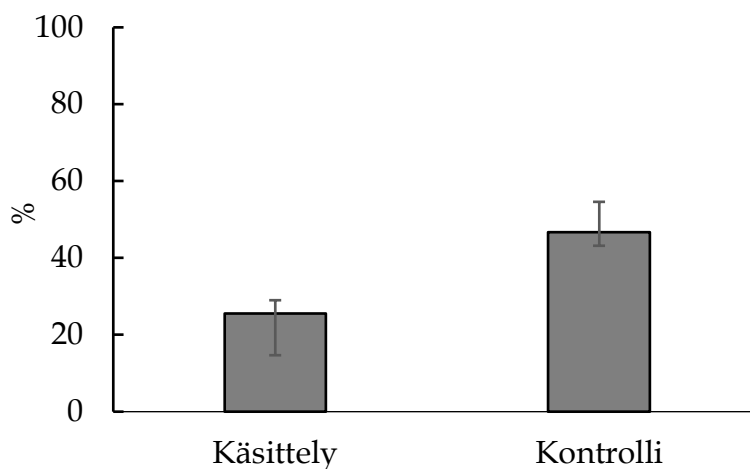
Rasvaisuusmuuttujien yhteyttä muihin mitattuihin muuttujiin sekä toisiinsa selvitetiin hajontakaavioiden avulla, joihin sovitettiin regressiosuora, josta saatiin

mallin selitysaste (R^2) Selitysaste kertoo kuinka suuri osa muuttujan havainnoista selittyy toisella muuttujalla.

4. TULOKSET

4.1 Puskurikäsitteilyn vaikutus

Puskurikäsitteilyllä havaittiin tilastollisesti merkitsevä, kylkiuintia vähentävä vaikutus (GLMM, $\chi^2 = 3,8819$, $df = 1$, $p = 0,0488$). Aineiston kaloista kylkiuivia oli yhteensä 44/121. Puskurikäsitteilyryhmän kaloista 15/59 (25,4%) oli kylkiuivia ja kontrolliryhmässä 29/62 eli(48,7%): kylkiuivia kaloja oli siis lähes kaksinkertainen määrä kontrolliryhmässä verrattuna puskurikäsitteilyryhmään (Kuva 4).

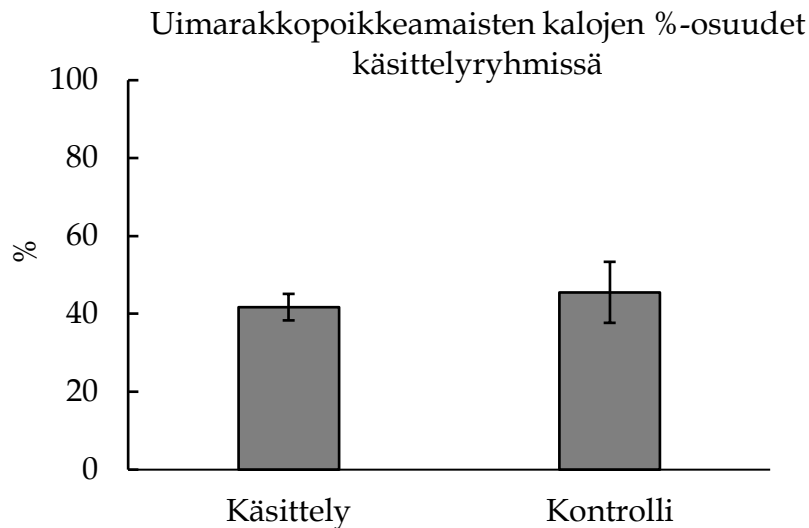


Kuva 4. Kylkiuivien kalojen prosenttiosuudet puskurikäsitteily- ja kontrolliryhmien allaskeskiarvoina ja keskihajontoina

4.2 Uimarakon poikkeamat

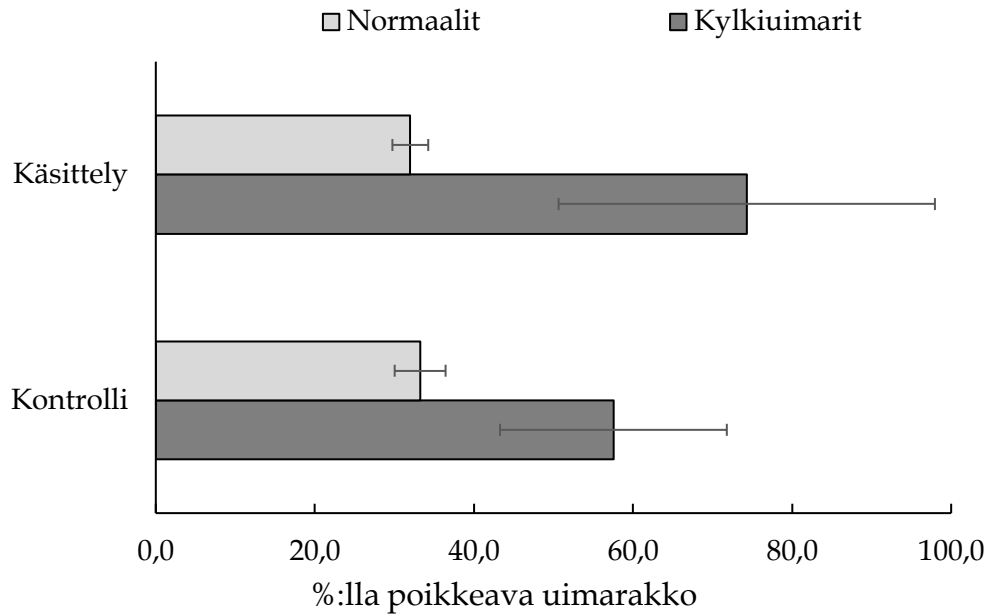
Uimarakon poikkeamilla havaittiin olevan tilastollisesti merkitsevä, kylkiuintia lisäävä vaikutus (GLMM, $\chi^2 = 3,8942$, $df = 1$, $p = 0,0484$). Aineiston kaloista 69/121 kalalla (57,0%) oli normaaliksi luokiteltava uimarakko, ja 52/121 kalalla (43,0%) oli

poikkeavaksi luokiteltava uimarakko (Kuva 3). Uimarakon poikkeamia esiintyi lähes saman verran molemmissa käsittelyryhmissä (Kuva 5).



Kuva 5. Uimarakkopoikkeamaisten kalojen prosenttiosuudet käsittely- ja kontrolliryhmässä allaskohtaisina keskiarvoina ja keskihajontoina.

Vaikka uimarakon poikkeamia esiintyi sekä kylkiuimareilla että normaalisti uivilla kaloilla, selvästi suuremmalla osalla kylkiuimareista oli poikkeava uimarakko (Kuva 6). Koko aineiston kylkiuivista kaloista 25/44 yksilöllä (56,8%), oli poikkeavaksi luokiteltava uimarakko, kun taas normaalisti uivista kaloista 27/77 yksilöllä (35,1%) oli poikkeava uimarakko.



Kuva 6. Uimarakkopoikkeamaisten kalojen osuudet kylkiuivista ja normaalisti uivista kaloista käsittely ja kontrolliryhmien allaskohtaisina keskiarvoina ja keskihajontoina.

4.3 Rasvamittauksen tulokset

4.3.1 Puskurikäsittelyryhmä

Puskurikäsittelyryhmässä kylkiuivien ja normaalisti uivien kalojen rasvaisuusmuuttujien vertailussa ei ollut merkitseviä eroja (Taulukko 4). Käsittelyryhmän uimarakoltaan poikkeavien ja uimarakoltaan normaalien kalojen välisessä vertailussa ei myöskään ollut merkitseviä eroja rasvaisuusmuuttujissa (Taulukko 5).

Taulukko 4. Puskurikäsitteilyryhmän kylkiuivien (n = 15) ja normaalisti uivien (n = 44) kalojen selkäpuolen lihasrasvaprosentin, vatsapuolen lihasrasvaprosentin, kokonaislihasrasvaprosentin, suolistorasvaindeksin ja suolistorasvan määrän keskiarvot ja keskihajonnat sekä kovarianssianalyysi ANCOVA:n tulokset esitettynä F-testisuureella, vapausasteilla (df) ja merkitsevyysarvolla.

Muuttuja	KÄSITTELY		ANCOVA		
	Uintityyli		F	df	p
	Kylkiuinti	Normaali			
Selkäpuolen lihasrasva-%	9,0 ± 2,4	8,8 ± 1,9	0,278	1	0,6
Vatsapuolen lihasrasva-%	13,6 ± 2,7	12,8 ± 2,8	0,185	1	0,669
Kokonaislihasrasva-%	10,5 ± 2,4	10,1 ± 2,0	0,279	1	0,600
Suolistorasvaindeksi	3,8 ± 1,3	4,2 ± 1,6	0,458	1	0,502
Suolistorasva (g)	46,3 ± 20,7	54,3 ± 26,5	0,260	1	0,612

Taulukko 5. Käsitteilyryhmän poikkeavuimarakkoisten (n = 24) ja normaalisti uivien (n = 35) kalojen selkäpuolen lihasrasvaprosentin, vatsapuolen lihasrasvaprosentin, kokonaislihasrasvaprosentin, suolistorasvaindeksin ja suolistorasvan määrän keskiarvot ja keskihajonnat sekä kovarianssianalyysi ANCOVA:n tulokset esitettynä F-testisuureella, vapausasteilla (df) ja merkitsevyysarvolla.

Muuttuja	KÄSITTELY		ANCOVA		
	uimarakko		F	df	p
	Poikkeava	Normaali			
Selkäpuolen lihasrasva-%	8,7 ± 2,1	9,0 ± 2,0	0,049	1	0,826
Vatsapuolen lihasrasva-%	13,2 ± 2,7	12,9 ± 2,8	0,584	1	0,448
Kokonaislihasrasva-%	10,2 ± 2,0	10,3 ± 2,2	0,043	1	0,837
Suolistorasvaindeksi	4,5 ± 1,8	3,8 ± 1,2	3,556	1	0,065
Suolistorasva (g)	53,7 ± 25,6	51,4 ± 25,3	2,508	1	0,119

4.3.2. Kontrolliryhmä

Kontrolliryhmässä kylkiuivien ja normaalisti uivien kalojen välillä ei ollut merkitseviä eroja mitatuissa rasvaisuusmuuttujissa ja suolistorasvan määrässä (Taulukko 6). Kontrolliryhmän uimarakkopoikkeamaisten kalojen ja normaaliuimarakkoisten kalojen välillä sen sijaan oli merkitsevä ero

suolistorasvaindeksissä, joka oli poikkeavauimarakkoisilla kaloilla keskimäärin 0,6 prosenttiyksikköä korkeampi kuin uimarakoltaan normaaleilla kaloilla (Taulukko 7). Suolistorasvaa uimarakoltaan poikkeavilla kaloilla oli myös keskimäärin 5,9 g enemmän, mutta ero ei kuitenkaan ollut merkitsevää.

Taulukko 6. Kontrolliryhmän kylkiuivien (n = 29) ja normaalisti uivien (n = 33) kalojen selkäpuolen lihasrasvaprosentin, vatsapuolen lihasrasvaprosentin, kokonaislihasrasvaprosentin, suolistorasvaindeksin ja suolistorasvan määrän keskiarvot ja keskihajonnat sekä kovarianssianalyysi ANCOVA:n tulokset esitettynä F-testisuureella, vapausasteilla (df) ja merkitsevyysarvolla.

Muuttuja	KONTROLLI		F	ANCOVA	
	Uintityyli			df	p
	Kylkiuinti	Normaali			
Selkäpuolen lihasrasva-%	9,1 ± 2,4	9,4 ± 2,3	0,036	1	0,847
Vatsapuolen lihasrasva-%	14,7 ± 4,5	14,0 ± 4,5	0,761	1	0,387
Kokonaislihasrasva-%	11,0 ± 2,7	10,9 ± 2,7	0,253	1	0,617
Suolistorasvaindeksi	3,7 ± 1,6	3,6 ± 1,3	0,120	1	0,731
Suolistorasva (g)	44,2 ± 28,0	43,1 ± 19,4	0,235	1	0,630

Taulukko 7. Kontrolliryhmän poikkeavauimarakkoisten (n = 28) ja normaaliuimarakkoisten (n = 34) kalojen selkäpuolen lihasrasvaprosentin, vatsapuolen lihasrasvaprosentin, kokonaislihasrasvaprosentin, suolistorasvaindeksin ja suolistorasvan määrän keskiarvot ja keskihajonnat sekä kovarianssianalyysi ANCOVA:n tulokset esitettynä F-testisuureella, vapausasteilla (df) ja merkitsevyysarvolla. Merkitsevät havainnot merkitty taulukkoon *-merkillä.

Muuttuja	KONTROLLI		F	ANCOVA	
	Uimarakko			df	p
	Poikkeava	Normaali			
Selkäpuolen lihasrasva-%	9,3 ± 2,6	9,3 ± 2,1	0,523	1	0,472
Vatsapuolen lihasrasva-%	115,1 ± 5,4	13,8 ± 3,5	1,882	1	0,176
Kokonaislihasrasva-%	11,2 ± 3,2	10,8 ± 2,2	1,557	1	0,217
Suolistorasvaindeksi	4,0 ± 1,4	3,4 ± 1,4	4,030	1	0,050*
Suolistorasva (g)	46,9 ± 24,3	41,0 ± 23,0	2,916	1	0,093

4.3.3 Koko aineisto

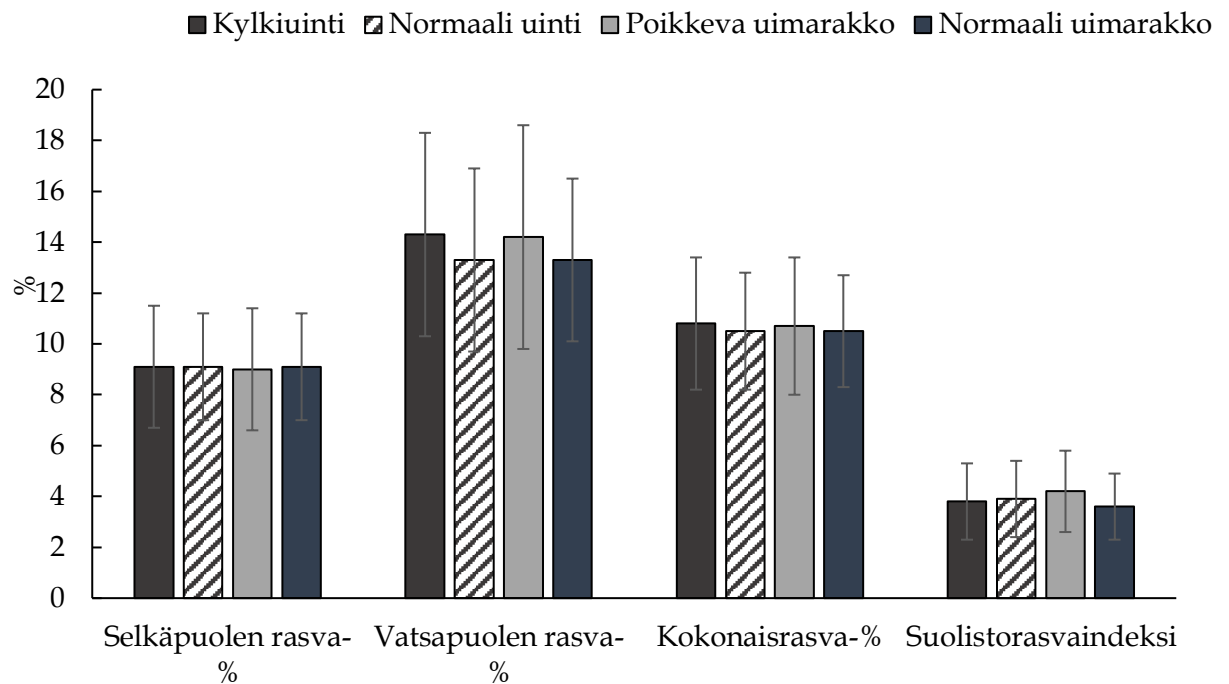
Koko aineiston kylkiuivien ja normaalisti uivien kalojen vertailussa ei havaittu merkitseviä eroja rasvaisuusmuuttujissa tai suolistorasvan määrässä (Taulukko 8). Vaihtelu rasvaisuusmuuttujissa vertailuryhmien välillä oli verrattain vähäistä (Kuva 7, Kuva 8) Aineiston kaikkien uimarakoltaan poikkeavien ja uimarakoltaan normaalien kalojen vertailussa merkitseviä eroja havaittiin suolistorasvaindeksistä ja suolistorasvan määrässä, jotka olivat poikkeavauimarakkoisilla kaloilla suurempia kuin uimarakoltaan normaaleilla kaloilla (Taulukko 9, Kuva 7, Kuva 8). Vertailuryhmien rasvaisuusmuuttujien keskiarvoista ja keskihajonnoista tehtyjä pylväsdiagrammeja tarkasteltaessa erot ryhmien välillä eivät ole kovin suuria (Kuva 7, Kuva 8).

Taulukko 8. Koko aineiston kylkiuivien (n = 44) ja normaalisti uivien (n = 77) kalojen selkäpuolen lihasrasvaprosentin, vatsapuolen lihasrasvaprosentin, kokonaislihasrasvaprosentin, suolistorasvaindeksin ja suolistorasvan määrän keskiarvot ja keskihajonnat sekä kovarianssianalyysi ANCOVA:n tulokset esitettynä F-testisuureella, vapausasteilla (df) ja merkitsevyysarvolla.

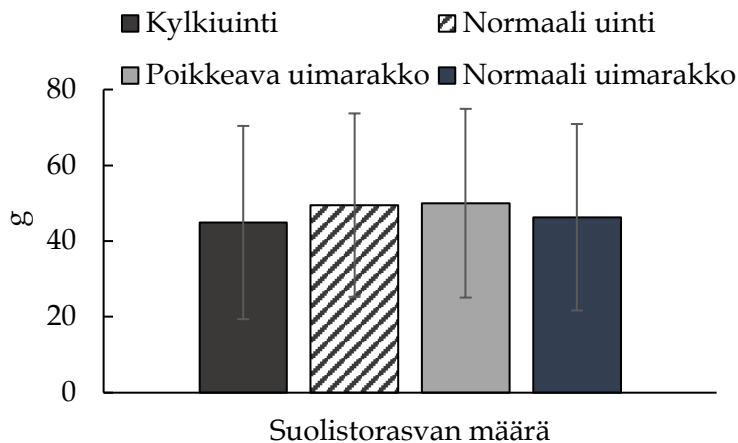
Muuttuja	KOKO AINEISTO		F	ANCOVA	
	Uintityyli			df	p
	Kylkiuinti	Normaali			
Selkäpuolen lihasrasva-%	9,1 ± 2,4	9,1 ± 2,1	0,330	1	0,567
Vatsapuolen lihasrasva-%	14,3 ± 4,0	13,3 ± 3,6	1,099	1	0,297
Kokonaislihasrasva-%	10,8 ± 2,6	10,5 ± 2,3	0,876	1	0,510
Suolistorasvaindeksi	3,8 ± 1,5	3,9 ± 1,5	0,092	1	0,767
Suolistorasva (g)	44,9 ± 25,5	49,5 ± 24,2	0,015	1	0,902

Taulukko 9. Koko aineiston poikkeavuimarakkoisten (n = 55) ja uimarakoltaan normaalien (n = 69) kalojen selkäpuolen lihasrasvaprosentin, vatsapuolen lihasrasvaprosentin, kokonaislihasrasvaprosentin, suolistorasvaindeksin ja suolistorasvan määrän keskiarvot ja keskihajonnat sekä kovarianssianalyysi ANCOVA:n tulokset esitettynä F-testisuureella, vapausasteilla (df) ja merkitsevyyssarvolla. Merkitsevät havainnot merkitty taulukkoon *-merkillä.

Muuttuja	KOKO AINEISTO		F	ANCOVA	
	Poikkeava	Normaali		df	p
Selkäpuolen lihasrasva-%	9,0 ± 2,4	9,1 ± 2,1	0,199	1	0,656
Vatsapuolen lihasrasva-%	14,2 ± 4,4	13,3 ± 3,2	2,706	1	0,103
Kokonaislihasrasva-%	10,7 ± 2,7	10,5 ± 2,2	1,299	1	0,257
Suolistorasvaindeksi	4,2 ± 1,6	3,6 ± 1,3	7,599	1	0,007*
Suolistorasva (g)	50,0 ± 24,9	46,3 ± 24,6	5,235	1	0,024*



Kuva 7. Koko aineiston kylkiuivien, normaalisti uivien, uimarakoltaan poikkeavien ja uimarakoltaan normaalien kalojen rasvaisuusmuuttujien keskiarvot ja keskihajonnat esitettynä pylväsdiagrammina.



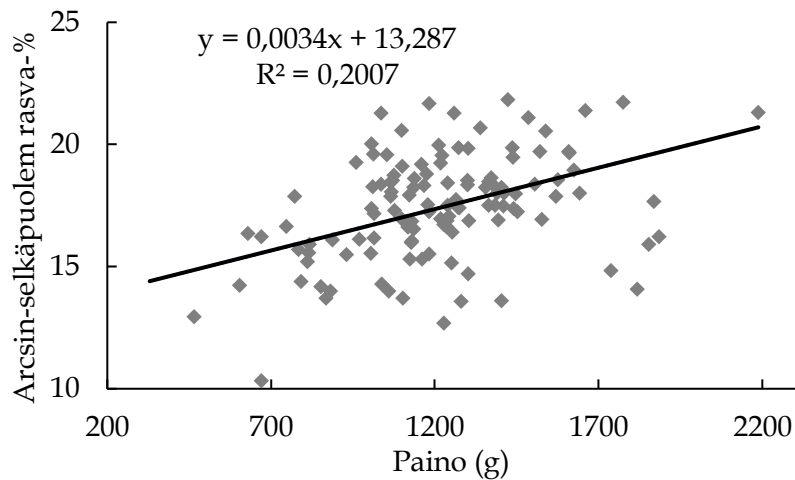
Kuva 8. Koko aineiston kylkiuivien, normaalisti uivien, uimarakoltaan poikkeavien ja uimarakoltaan normaali kalojen suolistorasvan määrän keskiarvot ja keskihajonnat esitettynä pylväsdiagrammina.

4.3.4 Rasvaisuuden yhteys mitattuihin muuttujiin

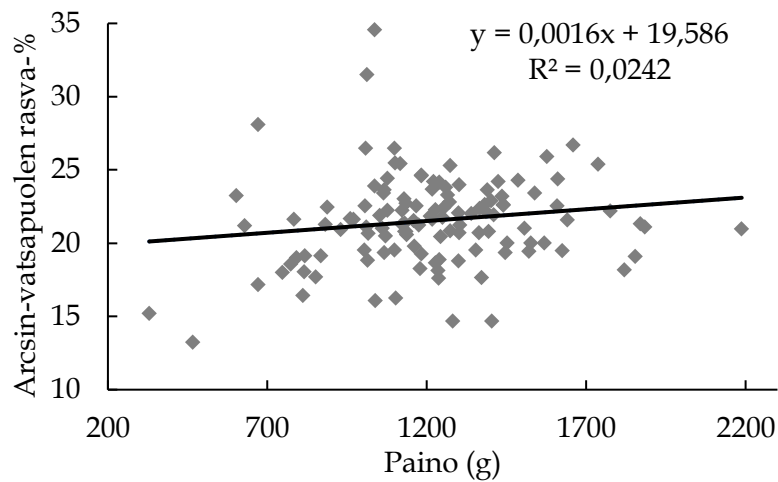
Koko aineiston kalojen ($n = 121$) rasvaisuusmuuttujien ja muiden kalasta mitattujen muuttujien väliset selitysasteet olivat heikkoja (Taulukko 10). Kalan lihasten rasvaisuus oli heikosti selitettävissä esimerkiksi kalan painolla. Korkein selitysaste oli suolistorasvan määrällä ja kalan painolla, jonka mukaan 41% kalan suolistorasvan määrästä on selitettävissä kalan painolla (Taulukko 10, Kuva 12). Kalan suolistorasvaindeksistä kuitenkin vain 5% oli selitettävissä kalan painolla. Kalan ei siis selitä kalan lihasten rasvaisuutta tai ruumiinontelon rasvaisuutta kovin hyvin (Taulukko 10).

Taulukko 10. Koko aineiston kalojen rasvaisuusmuuttujien ja muiden muuttujien väliset selitysasteet. Korkein selitysaste oli suolistorasvan määrän ja kalan painon välillä.

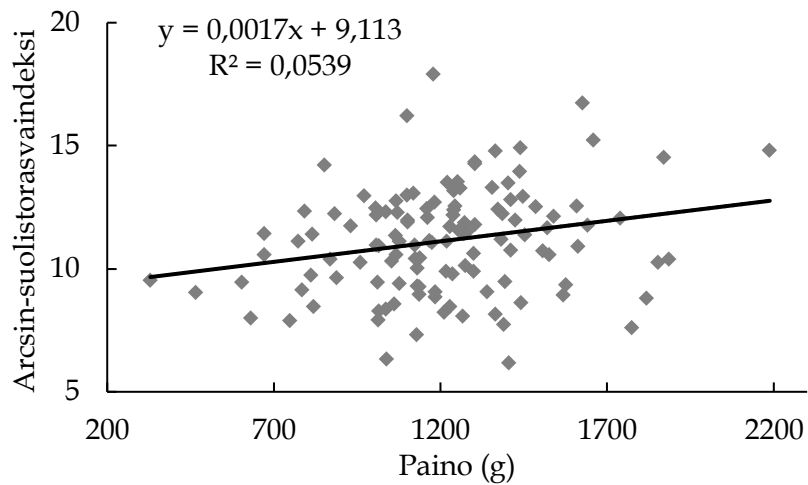
	Muuttujien selitysasteet						
	Pituus	Paino	Kuntokerroin	Perkuupaino	Perkuusaanto-%	Fileepaino	Fileesaanto-%
Selkäpuolen rasva-%	0,21	0,20	0,03	0,21	0,03	0,24	0,07
Vatsapuolen rasva-%	0,04	0,02	0,00	0,03	0,00	0,04	0,05
Kokonaisrasva-%	0,14	0,12	0,02	0,13	0,02	0,15	0,08
Suolistorasva-%	0,02	0,05	0,04	0,04	0,15	0,06	0,00
Suolistorasva (g)	0,27	0,41	0,14	0,37	0,28	0,40	0,00



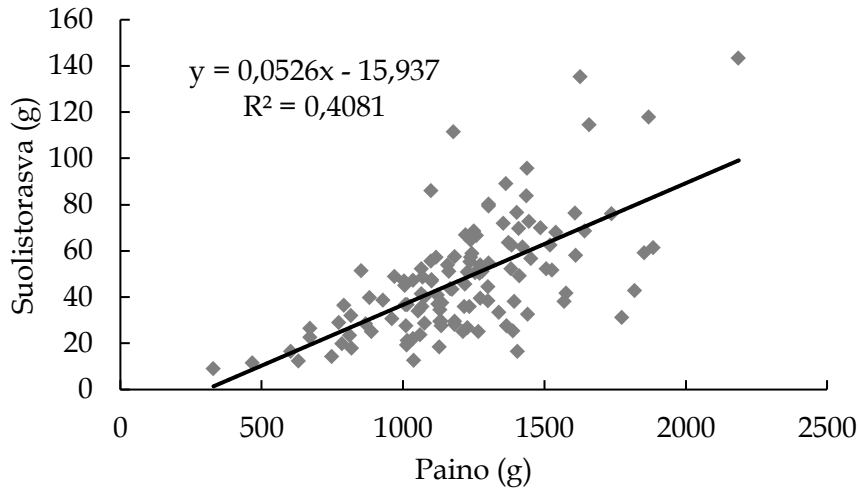
Kuva 9. Hajontakaavio koko aineiston arcsin-muunnetun selkäpuolen rasvaprosentin suhteesta kalan painoon. Selitysasteen (R^2) mukaan 20% kalan selkäpuolen lihasrasvaprosentissa selittyy kalan painolla.



Kuva 10. Hajontakaavio koko aineiston arcsin-muunnetun vatsapuolen rasvaprosentin suhteesta kalan painoon. Selitysasteen (R^2) mukaan 2% kalan selkäpuolen lihasrasvaprosentissa selittyy kalan painolla.



Kuva 11. Hajontakaavio koko aineiston kalojen arcsin-muunnetun suolistorasvaindeksin suhteesta kalan painoon. Hajontakaavioon sovitetun suoran selityksasteen (R^2) mukaan 5% kalan suolistorasvaindeksistä selittyy kalan painolla.



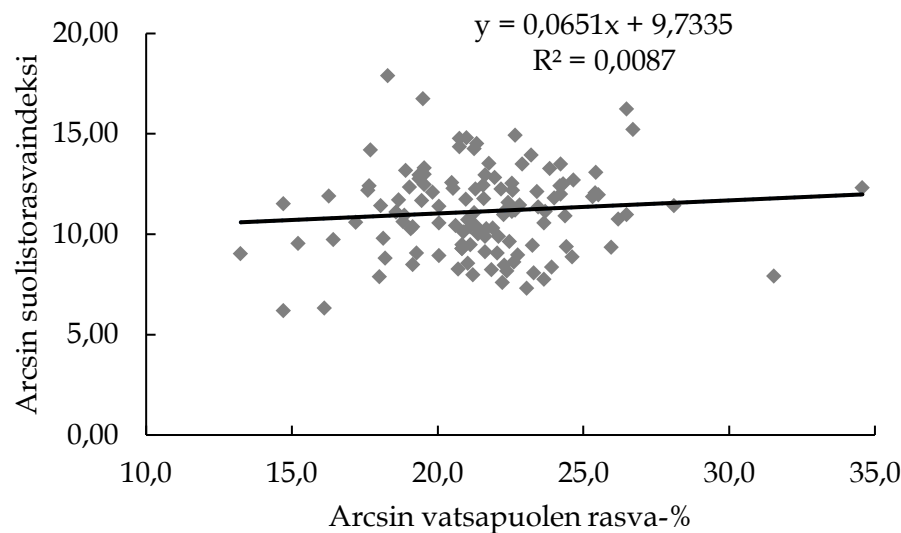
Kuva 12. Hajontakaavio koko aineiston kalojen ($n = 121$) suolistorasvan määrästä suhteesta kalan painoon. Hajontakaavioon sovitetun suoran selityksasteen (R^2) mukaan 41% suolistorasvan määrästä selittyy kalan painolla.

4.3.5 Rasvaisuusmuuttujien yhteys toisiinsa

Rasvaisuusmuuttujat selittivät huonosti toisiaan, lukuun otamatta vatsapuolen ja selkäpuolen lihasrasvaprosenttien suhdetta kokonaislihasrasvaprosenttiin, joka on keskiarvo selkä- ja vatsapuolen mittauksista (Taulukko 11). Selkä- ja vatsapuolen lihasrasvaprosentit selittivät kuitenkin toisiaan melko huonosti, vain 36% havainnoista oli selitettävissä toisillaan. Vatsapuolen rasvaisuus selitti myös huonosti ruumiinontelon rasvaisuutta (Taulukko 11, Kuva 14).

Taulukko 11. Koko aineiston kalojen (n = 121) rasvaisuusmuuttujien selitysasteet suhteessa toisiinsa.

	Selitysasteet				
	Selkäpuol.rasva-%	Vatsapuol. rasva-%	Suol.rasvaindeksi	Suolistorasva (g)	Kok. rasva-%
Selkäpuol. rasva-%	-	0,36	0,06	0,15	0,84
Vatsapuol. rasva-%	0,36	-	0,01	0,01	0,76
Suolistorasvaindeksi	0,06	0,01	-	0,75	0,39
Suolistorasva (g)	0,15	0,01	0,7471	-	0,09



Kuva 14. Hajontakaavio koko aineiston kalojen arcsin-muunnetun suolistorasvaindeksin suhteesta arcsin-muunnettuun, vatsapuolen lihasrasvaprosenttiin. Hajontakaavioon sovitetun suoran selitysasteen (R^2) mukaan 0,9% suolistorasvaindeksistä on selitettävissä kalan vatsapuolen lihasrasvaprosentilla.

4.4 Muiden muuttujien vertailu

4.4.1 Puskurikäsitteilyryhmä

Käsitteilyryhmän kylkiuivien ja normaalisti uivien kalojen vertailussa ainoa merkitsevä ero havaittiin perkuusaantoprosentissa, joka oli kylkiuivilla kaloilla keskimäärin 1,5 prosenttiyksikköä korkeampi kuin normaalisti uivilla kaloilla (Taulukko 12). Perkuupaino ei tästä huolimatta ollut kylkiuivilla kaloilla suurempi kuin normaalisti uivilla kaloilla. Käsitteilyryhmän uimarakkopoiikkeamaisten ja normaaliuimarakkoisten kalojen vertailussa havaittiin merkitsevä ero kalojen perkuupainossa ja fileepainossa (Taulukko 13). Perkuupainon keskiarvo oli poikkeavauimarakkoisilla kaloilla 141,1 g pienempi ja fileepainon 56,1 g pienempi kuin normaaliuimarakkoisilla kaloilla (Taulukko 13). Kalan koko painossa ei kuitenkaan ollut merkitsevää eroa vertailuryhmien välillä

Taulukko 12. Puskurikäsitteilyryhmän kylkiuivien (n = 15) ja normaalisti uivien (n = 44) kalojen pituuden, painon, kuntokertoimen, perkuupainon, perkuusaantoprosentin, fileepainon ja fileesaantoprosentin keskiarvot ja keskihajonnat sekä kaksisuuntaisen varianssianalyysi ANOVAN tulokset esitettynä F-testisuureella, vapausasteilla (df) ja merkitsevyysarvolla. Merkitsevät havainnot on merkitty *-merkillä.

KÄSITTELY					
Muuttuja	Uintityyli		2-suunt. ANOVA		
	Kylkiuinti	Normaali	F	df	p
Pituus (mm)	408,7 ± 30,6	419,6 ± 32,3	2,280	1	0,137
Paino (g)	1174,3 ± 279,3	1289,8 ± 332,7	2,180	1	0,146
Kuntokerroin	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,2	0,071	1	0,791
Perkuupaino (g)	1018,1 ± 238,0	1097,5 ± 270,7	1,641	1	0,206
Perkuusaanto-%	86,8 ± 1,8 *	85,3 ± 2,1 *	8,736	1	0,005*
Fileepaino (g)	371,8 ± 91,0	402,1 ± 99,9	1,836	1	0,181
Fileesaanto-%	63,3 ± 2,4	62,5 ± 2,6	0,538	1	0,467

Taulukko 13. Puskurikäsitteilyryhmän uimarakoltaan poikkeavien (n = 24) ja uimarakoltaan normaalien (n = 35) kalojen pituuden, painon, kuntokertoimen, perkuupainon, perkuusaantoprosentin, fileepainon ja fileesaantoprosentin

keskiarvot ja keskihajonnat sekä kaksisuuntaisen varianssianalyysi ANOVAN tulokset esitettynä F-testisuureella, vapausasteilla (df) ja merkitsevyysarvolla. Merkitsevät havainnot on merkitty *-merkillä.

KÄSITTELY					
Muuttuja	Uimarakko		2-suunt. ANOVA		
	Poikkeava	Normaali	F	df	p
Pituus (mm)	408,1 ± 26,3	422,8 ± 34,4	3,343	1	0,073
Paino (g)	1164,0 ± 275,7	1326,6 ± 337,7	3,807	1	0,056
Kuntokerroin	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,2	0,454	1	0,503
Perkuupaino (g)	993,6 ± 224,3	1134,7 ± 275,2	4,336	1	0,042*
Perkuusaanto-%	85,7 ± 2,6	85,8 ± 1,7	0,003	1	0,954
Fileepaino (g)	361,1 ± 85,7	417,2 ± 100,2	5,031	1	0,029*
Fileesaanto-%	62,1 ± 3,0	63,1 ± 2,3	2,334	1	0,133

4.4.2 Kontrolliryhmä

Kontrolliryhmän kylkiuivien ja normaalisti uivien kalojen vertailussa ei havaittu merkitseviä eroja mitattujen muuttujien välillä (Taulukko 14). Eikä myöskään kontrolliryhmän poikkeavauimarakkoisten ja normaaliuimarakkoisten kalojen vertailussa (Taulukko 15).

Taulukko 14. Kontrolliryhmän kylkiuivien (n = 29) ja normaalisti uivien (n = 33) kalojen pituuden, painon, kuntokertoimen, perkuupainon, perkuusaantoprosentin, fileepainon ja fileesaantoprosentin keskiarvot ja keskihajonnat sekä kaksisuuntaisen varianssianalyysi ANOVAN tulokset esitettynä F-testisuureella, vapausasteilla (df) ja merkitsevyysarvolla.

KONTROLI					
Muuttuja	Uintityyli		2-suunt. ANOVA		
	Kylkiuinti	Normaali	F	df	p
Pituus (mm)	408,0 ± 33,2	412,3 ± 21,9	0,261	1	0,612
Paino (g)	1139,6 ± 334,5	1192,2 ± 204,7	0,511	1	0,478
Kuntokerroin	1,6 ± 0,3	1,7 ± 0,3	1,499	1	0,226
Perkuupaino (g)	981,8 ± 279,3	1021,8 ± 172,6	0,506	1	0,480
Perkuusaanto-%	86,5 ± 2,2	86,0 ± 1,6	0,966	1	0,330
Fileepaino (g)	358,7 ± 109,3	374,8 ± 67,8	0,491	1	0,487
Fileesaanto-%	62,5 ± 3,0	62,8 ± 2,7	0,402	1	0,529

Taulukko 15. Kontrolliryhmän uimarakoltaan poikkeavien (n = 28) ja uimarakoltaan normaalien (n = 34) kalojen pituuden, painon, kuntokertoimen, perkuupainon, perkuusaantoprosentin, fileepainon ja fileesaantoprosentin keskiarvot ja keskihajonnat sekä kaksisuuntaisen varianssianalyysi ANOVAN tulokset esitettynä F-testisuureella, vapausasteilla (df) ja merkitsevyysarvolla.

KONTROLLI					
Muuttuja	Uimarakko		2-suunt. ANOVA		
	Poikkeava	Normaali	F	df	p
Pituus (mm)	406,3 ± 23,5	413,6 ± 30,5	0,816	1	0,370
Paino (g)	1129,4 ± 258,7	1199,1 ± 282,5	0,814	1	0,371
Kuntokerroin	1,7 ± 0,3	1,7 ± 0,2	0,023	1	0,880
Perkuupaino (g)	968,9 ± 211,5	1034,2 ± 239,6	1,107	1	0,297
Perkuusaanto-%	86,0 ± 2,0	86,4 ± 1,9	0,943	1	0,336
Fileepaino (g)	353,3 ± 85,2	378,7 ± 92,1	1,193	1	0,279
Fileesaanto-%	62,3 ± 2,5	63,0 ± 3,1	2,241	1	0,140

4.4.3 Koko aineisto

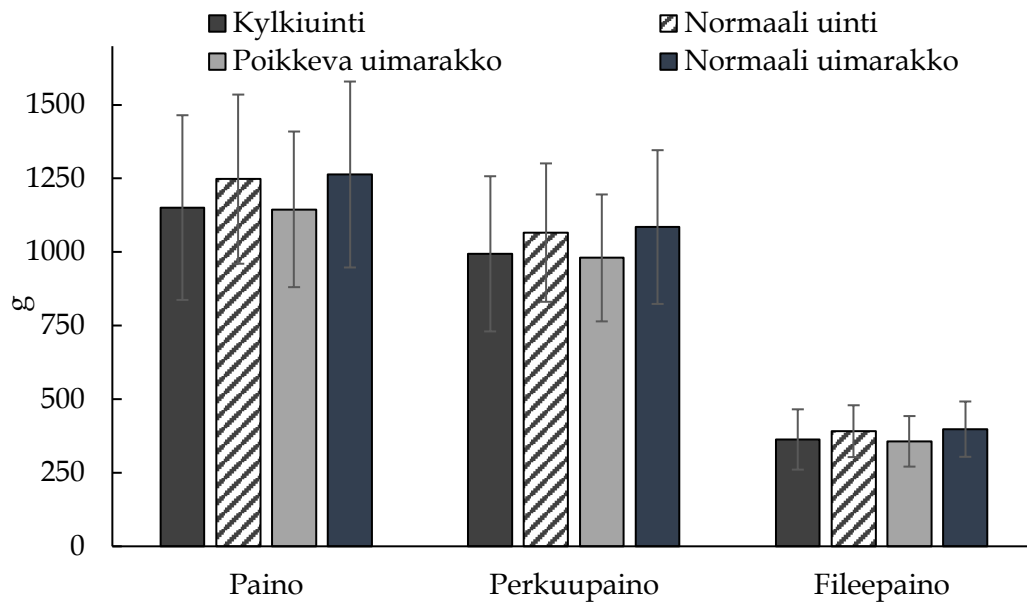
Koko aineiston kylkiuivien ja normaalisti uivien kalojen vertailussa havaittiin merkitsevä ero ainoastaan perkuusaantoprosentissa, joka oli korkeampi kylkiuivilla kaloilla (Taulukko 16) Koko aineiston uimarakkopoikkeamaisten ja normaaliuimarakkoisten kalojen vertailussa merkitseviä eroja havaittiin kalojen painossa, perkuupainossa ja fileepainossa (Taulukko 17). Uimarakoltaan poikkeavilla kaloilla painon keskiarvo oli 96,6 g pienempi, perkuupaino 104,9 g pienempi ja fileepaino 41,4 g pienempi kuin normaaliuimarakkoisilla kaloilla (Taulukko 17). Kuvasta 15 voidaan hyvin havaita, että sekä kylkiuivat että uimarakoltaan poikkeavat kalat olivat keskimäärin painoltaan pienempiä kuin normaalisti uivat tai uimarakoltaan normaalit kalat, vaikka merkitseviä eroja olikin vain uimarakon mukaan jaetussa aineistossa. Pituudessa ei sen sijaan ole havaittavissa yhtä selkeitä eroja kuin vertailuryhmien painoissa (Kuva 16)

Taulukko 16. Koko aineiston kylkiuivien (n = 44) ja normaalisti uivien (n = 77) kalojen pituuden, painon, kuntokertoimen, perkuupainon, perkuusaantoprosentin, fileepainon ja fileesaantoprosentin keskiarvot ja keskihajonnat sekä kaksisuuntaisen varianssianalyysi ANOVAN tulokset esitettynä F-testisuureella, vapausasteilla (df) ja merkitsevyysarvolla. Merkitsevät havainnot on merkitty *-merkillä.

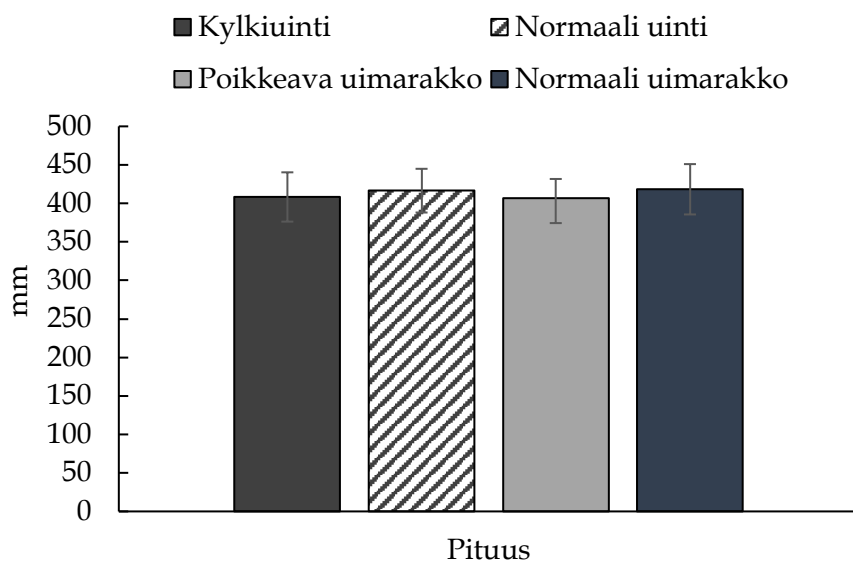
KOKO AINEISTO					
Muuttuja	Uintityyli		2-suunt. ANOVA		
	Kylkiuinti	Normaali	F	df	p
Pituus (mm)	408,3 ± 32,0	416,5 ± 28,4	2,363	1	0,127
Paino (g)	1151,4 ± 313,9	1248,0 ± 287,5	2,684	1	0,104
Kuntokerroin	1,6 ± 0,3	1,7 ± 0,2	1,121	1	0,292
Perkuupaino (g)	994,2 ± 263,7	1066,3 ± 235,2	2,162	1	0,144
Perkuusaanto-%	86,6 ± 2,1	85,6 ± 1,9	8,868	1	0,004*
Fileepaino (g)	363,2 ± 102,5	391,4 ± 88,1	2,285	1	0,134
Fileesaanto-%	62,8 ± 2,8	62,6 ± 2,7	0,310	1	0,861

Taulukko 17. Koko aineiston uimarakoltaan poikkeavien (n = 52) ja uimarakoltaan normaalien (n = 69) kalojen pituuden, painon, kuntokertoimen, perkuupainon, perkuusaantoprosentin, fileepainon ja fileesaantoprosentin keskiarvot ja keskihajonnat sekä kaksisuuntaisen varianssianalyysi ANOVAN tulokset esitettynä F-testisuureella, vapausasteilla (df) ja merkitsevyysarvolla. Merkitsevät havainnot on merkitty *-merkillä.

KOKO AINEISTO					
Muuttuja	Uimarakko		2-suunt. ANOVA		
	Poikkeava	Normaali	F	df	p
Pituus (mm)	407,1 ± 24,6	418,3 ± 32,7	3,906	1	0,051
Paino (g)	1151,4 ± 313,9	1248,0 ± 287,5	4,329	1	0,040*
Kuntokerroin	1,7 ± 0,3	1,7 ± 0,2	0,072	1	0,789
Perkuupaino (g)	980,3 ± 215,7	1085,2 ± 261,3	5,155	1	0,025*
Perkuusaanto-%	85,9 ± 2,3	86,1 ± 1,8	0,442	1	0,507
Fileepaino (g)	356,9 ± 84,6 *	398,3 ± 97,6 *	5,765	1	0,018*
Fileesaanto-%	62,2 ± 2,7	63,1 ± 2,7	4,585	1	0,034*



Kuva 15. Koko aineiston kylkiuivien, normaalisti uivien, uimarakoltaan poikkeavien ja uimarakoltaan normaaliien kalojen painon, perkuupainon ja fileepainon keskiarvot ja keskihajonnat.



Kuva 16. Koko aineiston kylkiuivien, normaalisti uivien, uimarakoltaan poikkeavien ja uimarakoltaan normaaliien kalojen pituuden keskiarvot ja keskihajonnat

5. TULOSTEN TARKASTELU

Vesiviljelyssä kalojen siirrot ja vedenlaadun vaihtelu aiheuttavat stressiä kaloille (Hjeltnes ym. 2012). Kaikki tässä tutkimuksessa käytetyt kalat olivat ennen kokeiden alkua olleet terveitä ja normaalisti uivia, mutta jo kokeiden aloitusta seuraavana päivänä kaloilla oli havaittavissa uintivaikeuksia, ja kontrollialtaista löytyi myös kuolleita yksilöitä. Uintitasapainon häiriöiden ilmeneminen kaloilla vaihteli yksilöiden välillä. Osa kaloista makasi lähes liikkumatta kyljellään altaan pohjalla, kun osa vain kääntyi toisinaan kyljelleen, jatkaen muutoin normaalisti uintiaan. Lämpötilan lasku ja vedenlaadun muutos olivat nopeita kokeen alussa. Lämmin kiertovesi vaihtui kuuden tunnin sisällä pariasteiseksi järvisedeksi ja samalla veden alkaliteetti laski kontrollialtaissa alle kirjolohelle kiertovedessä suositellun raja-arvon (20 mg/l) (Timmons ym. 2018), (Taulukko 2). Kaloille luontaista lämpötilaan sopeutumista ei ehdi tapahtumaan muutamien tuntien aikana, jonka vuoksi kalat ovat voineet altistua kylmäshokille ja äkillisestä kasvuympäristön muutoksesta aiheutuneelle stressille (Donaldson ym. 2008). Kylmäshokin ohella altistus matala-alkaliteettiselle vedelle lisää kaloilla ioninvaihdon häiriöitä ja stressiä (Yesaki ja Iwama 1992, Iwama 1997, Hjeltnes ym. 2012). Stressi, riippumatta aiheuttajasta, heikentää kaloilla selviytymisen kannalta tärkeitä elintoimintoja, joka voi altistaa ne terveydentilan heikkenemiselle, kuten uintitasapainon säätelyn häiriintymiseen (Jobling 1994, Donaldson ym. 2008).

Kokeiden aikana kontrollialtaiden pH pysyi alkaliteetin laskusta huolimatta keskimäärin kirjolohelle turvallisen pH:n rajoissa, mutta laski kuitenkin selvästi lähtötilanteesta kiertovedessä (Taulukko 2). Jo 0,5 asteen lasku pH:ssa voi kuitenkin aiheuttaa kaloille ongelmia happo-emästasapainon ja elimistön ionitasapainotilojen säätelyssä (Ye ja Randall 1991, Timmons ym. 2018). Magnesium-pitoisuudet olivat kontrollialtaissa hieman matalampia kuin kiertovedessä (Taulukko 3). Kalsium-pitoisuudet sen sijaan eivät olleet

kontrollialtaissa merkittävän paljon matalampia verrattuna lähtötilanteeseen (Taulukko 3).

Eläinsuojelullisesta näkökulmasta kalojen terveydentilaa kalanviljelyssä tulisi pyrkiä parantamaan esimerkiksi vähentämällä toimintatavoista ja käsittelystä kaloille aiheutuvia haittoja. Kalojen sopeutuminen uuteen ympäristöön on yksi välttämätön elinkaaren vaihe viljellyille kaloille, jonka vuoksi kalojen sopeutumista tulisi pystyä helpottamaan ja siten vähentämään siirroista kalojen hyvinvoinnille aiheutuvia haittoja. Veden lämmittäminen, ja sitä kautta lämpötilaeron pienentäminen, kokeen kaltaisen talviaikaisen siirron yhteydessä ei usein ole kaupallisessa kalanviljelyssä taloudellisesti järkevä ratkaisu, mutta veden alkaliteettiin ja puskurikykyyn sen sijaan pystytään vaikuttamaan suhteellisen helposti.

Päähypoteesina tässä tutkimuksessa oli, että allasveden puskuroinnilla voitaisiin vähentää kylkiuivien kalojen määrää siirron yhteydessä. Hypoteesi sai vahvistusta tuloksista. Puskuroinnin vaikutus kalojen uintityyliin oli tilastollisesti merkitsevä ja tuloksista huomataan, että puskurikäsitellyllä pystyttiin lähes puolittamaan kylkiuivien kalojen määrä käsittelyryhmässä verrattuna kontrolliryhmään (Kuva 4). Puskurikäsitellyissä altaissa myös vältyttiin kokonaan kalakuolemilta, kun taas kaikista kontrollialtaista löytyi kokeen aikana vähintään yksi kuollut kala.

Toisena hypoteesina tutkimuksessa oli, että uimarakon poikkeamia esiintyisi enemmän kylkiuivilla kaloilla, kuten Poppe ym. (1997) ja Good ym. (2014) olivat aiemmissä tutkimuksissaan havainneet. Uimarakon poikkeamien vaikutus kalan uintityyliin oli tilastollisesti merkitsevä, jonka perusteella poikkeamat ovat altistava syy kalojen uintitasapainon häiriöihin. Uimarakon poikkeamia havaittiin tässä tutkimuksessa selkeästi enemmän kylkiuivilla kaloilla kuin normaalisti uivilla. 56,8% kylkiuivista kaloista havaittiin jokin uimarakon poikkeama, kun taas normaalisti uivista kaloista vain 35,1% oli poikkeava uimarakko. Uimarakoltaan poikkeavia kaloja esiintyi kontrolli- ja käsittelyryhmissä lähes saman verran, jonka

perusteella ei liene syytä olettaa käsittelyn vaikuttaneen poikkeamien muodostumiseen koejakson aikana (Kuva 5).

Uimarakon poikkeamia aiemmin tutkineen Poppen ym. (1997) tutkimuksessa tarkasteltiin 11 poikkeavasti uivaa kalaa, joista 9 eli 81,8% havaittiin jokin uimarakon poikkeama. Goodin ym. (2014) tutkimuksessa yhteensä 96 kalasta koostuvan aineiston, 48 kylkiuimarista 47 yksilöllä (97,9%), eli yhtä lukuun ottamatta kaikilla, oli poikkeava uimarakko. Saman aineiston 48 normaalisti uivasta kalasta 17 yksilöllä, eli 35,4% oli poikkeava uimarakko (Good ym. 2014). Uimarakoltaan poikkeavien kalojen osuudet kylkiuimareista olivat heidän tutkimuksissaan huomattavasti korkeampia kuin tässä tutkimuksessa. Kuitenkin normaalisti uivien kalojen uimarakkopoikkeamien prosenttiosuudet olivat samaa luokkaa Goodin ym. (2014) tutkimuksessa kuin tässäkin. Goodin ym. (2014) tutkimuksessa uimarakon poikkeamat olivat myös hyvin saman tyyppisiä kuin tässäkin tutkimuksessa oli havaittu, mm. mutkittavia ja epätasaisesti ruumiinonteloon kiinnittyneitä. Erona tähän tutkimukseen Poppen ym. (1997) ja Goodin ym (2014) tutkimuksissa kylkiuintia tutkittiin siirron sijasta kalojen normaalissa kasvuympäristössä. Tässä tutkimuksessa veden laadun muutos siirron yhteydessä on voinut vaikuttaa negatiivisesti myös uimarakoltaan normaalien kalojen terveydentilaan, jolloin muutkin altistavat tekijät kuin uimarakon poikkeamat ovat voineet olla kylkiuinnin taustalla. Uimarakon poikkeamat eivät olleet ennen kokeiden alkua vaikuttaneet kalojen tasapainonsäätelyyn, mutta mitä ilmeisimmin ne altistavat kalan tasapainon säätelyn häiriöille, jos kalan elintoiminnot häiriintyvät stressin tai ympäristön muutoksen seurauksena.

Kaikki uimarakon poikkeamat eivät olleet selkeästi luokiteltavissa rakenteellisiksi. Osalla kaloista uimarakko oli rakenteellisen poikkeaman, kuten mutkan tai kurouman sijaan epätavallisen paisunut, joka voisi viitata tyyppilliseen uimarakon stressioireyhtymään (Kolbeinshavn ja Wallace 1985).

Yhtenä hypoteesina tutkimuksessa oli myös, että kylkiuivat kalat olisivat kooltaan pienempiä kuin normaalisti uivat kalat, kuten Good ym. (2014) olivat tutkimuksessaan havainneet. Merkitseviä eroja kylkiuivien ja normaalisti uivien kalojen koossa ei kuitenkaan havaittu, vaikka keskimäärin kylkiuivilla kaloilla olikin hieman pienempi paino (Taulukko 12, Taulukko 16, Kuva 15). Mielenkiintoisena havaintona kylkiuivilla kaloilla kuitenkin havaittiin keskimäärin pienemmästä koosta huolimatta parempi perkuusaantoprosentti kuin normaalisti uivilla kaloilla (Taulukko 12, Taulukko 16). Havainto viittaisi kylkiuivilla kaloilla olevan enemmän lihasmassaa ruhosaan kuin normaalisti uivilla kaloilla. Mahdollisesti suhteellisesti suurempi ruhomassa voi siis olla altistava tekijä uintihäiriöille. Goodin ym. (2014) tutkimuksessa päinvastoin havaittiin kylkiuivilta kaloilla olevan heikompi fileesaantoprosentti kuin normaalisti uivilla kaloilla.

Sen sijaan koko aineiston uimarakoltaan poikkeavien ja uimarakoltaan normaalien kalojen vertailussa löytyi enemmän merkitseviä eroja. Uimarakoltaan poikkeavat kalat olivat pienempiä painoltaan ja sen myötä myös perkuupainoltaan ja fileepainoltaan (Taulukko 17, Kuva 15). Uimarakoltaan poikkeavien kalojen pienempi paino saattaa viitata niiden heikompaan kasvuun verrattuna normaaliuimarakkoisiin kaloihin (Taulukko 17). Uimarakon poikkeamat voivat mahdollisesti heikentää kalan kykyä uida, jonka vuoksi se saattaa saada vähemmän ravintoa kuin uimarakoltaan normaalit allastoverinsa. Fileesaantoprosentti oli myös heikompi poikkeavauimarakkoisilla kaloilla kuin uimarakoltaan normaaleilla yksilöillä (Taulukko 17). Kuten edellisessä kappaleessa mainittiin Goodin ym. (2014) tutkimuksessa kylkiuivilta kaloilta oli havaittu pienempi fileesaantoprosentti. Näistä Goodin ym. (2014) tutkimuksen kylkiuimareista lähes kaikilla oli poikkeava uimarakko, joten havainto osuu yhteen tämän tuloksen kanssa.

Rasvaisuusmuuttujien vertailussa eroja löytyi vain vähän vertailuryhmien välillä. Yhtenä hypoteesina tutkimuksessa oli myös, että kylkiuivilta kaloilla olisi

enemmän ruumiinontelon rasvaa ja niillä olisi myös korkeampi lihasrasvaprosentti. Hypoteesi ei kuitenkaan saanut tukea tuloksista. Kylkiuivien ja normaalisti uivien kalojen vertailussa ei havaittu eroja rasvaisuusmuuttujien välillä (Taulukko 4, Taulukko 6, Taulukko 8) Vaihtelu Distell-rasvamittauksen tuloksissa oli muutoinkin suhteellisen vähäistä kaikkien kalojen vertailussa (Kuva 7). Suolirasvan määrässä ei myöskään ollut suuria eroja (Kuva 8).

Ainoat merkitsevät erot rasvaisuusmuuttujissa havaittiin uimarakoltaan poikkeavien ja uimarakoltaan normaalien kalojen vertailussa. Uimarakoltaan poikkeavilla kaloilla oli keskimäärin suurempi suolistorasvaindeksi ja myös massallisesti enemmän suolistorasvaa (Taulukko 9, Kuva 7, Kuva 8). Rungas ruumiinontelon rasva saattaa mahdollisesti estää uimarakon normaalia täyttymistä tai kalan kasvaessa häiritä uimarakon normaalia kehitystä. On myös mahdollista, että uimarakon poikkeamat voivat jollain tapaa heikentää kalan uintitehokkuutta ja kala saattaa tällöin käyttää ravinnosta saamaansa energiaa enemmän rasvakudoksen muodostamiseen kuin lihaskudoksen kasvattamiseen.

Joblingin ym. (1998) tutkimuksessa havaittiin korkearasvaisten kalanrehujen vaikuttavan lisäävästi kalan ruumiinontelon rasvaisuuteen ja lihasrasvapitoisuuteen. Tässä tutkimuksessa käytetyt kalat olivat ennen kokeita syöneet yli 30% rasvapitoisuuden sisältävää rehua, joka on siis voinut olla syynä osalla kaloista suolistorasvan kertymiseen. Joblingin ym (1998) tutkimuksessa korkearasvaisella rehulla ruokituilla kaloilla ruhon lihasrasvaprosentti oli keskimäärin $12,4\% \pm \text{SD } 1,0\%$ ja matalarasvarehulla ruokituilla kaloilla $9,3\% \pm \text{SD } 0,7\%$. Suolistorasvaindeksi oli korkearasvaisella rehulla ruokituilla kaloilla $11,7 \pm \text{SD } 2,0$ ja matalarasvarehulla ruokituilla $9,1 \pm \text{SD } 0,7$. Kalojen suolistorasvaindeksit ja lihasrasvaprosentit olivat kuitenkin tässä tutkimuksessa huomattavasti pienempiä kuin Joblingin ym. (1998) tutkimuksessa. Kalojen keskimääräinen kokonaislihasrasvaprosentti oli alle 12% ja suolistorasvaindeksi oli keskimäärin alle 5,0 (Taulukko 8, Taulukko 9). Joblingin ym. (1998) tutkimuksessa kalojen lihas- ja suolistonäytteet olivat kuivattu ennen rasvapitoisuuden määrittämistä

siihen tarkoitettulla laitteistolla, toisin kuin tässä tutkimuksessa, jossa rasvapitoisuus määritettiin Distell-mittarilla ja punnitsemalla kaavittu suolistorasva. Joblingin ym. (1998) tutkimuksessa kalat olivat keskimäärin myös huomattavasti pienempiä, noin 350 g painoisia, kun tässä tutkimuksessa kalat olivat keskimäärin hieman yli kilon painoisia, joka on voinut vaikuttaa tulosten vertailukelpoisuuteen.

Kalojen rasvaisuus ei ollut selkeästi yhteydessä kalan kokoon. Lihasten tai ruumiinontelon rasvaisuus ei selittänyt kalan painolla tai pituudella (Taulukko 10). Rasvaisuusmuuttujilla ei myöskään ollut juurikaan yhteyttä toisiinsa. Lihasten korkeampi rasvapitoisuus ei esimerkiksi ollut yhteydessä kalan korkeampaan ruumiinontelon rasvaisuuteen, kuten olisi ehkä voinut kuvitella (Taulukko 11). Selkä- ja vatsapuolen lihasrasvaisuudet selittivät myös heikosti toisiaan (Taulukko 11)

Yhteenvedona tuloksista voidaan todeta, että puskuroinnilla pystyttiin vähentämään kylkiuivien kalojen määrää siirron yhteydessä. Uimarakon poikkeamilla havaittiin olevan altistava vaikutus uintitasapainon häiriöille. Kylkiuivien jaa normaalisti uivien kalojen vertailussa ei havaittu eroja kalojen koossa tai rasvaisuudessa, sen sijaan uimarakoltaan poikkeavat kalat olivat keskimäärin pienempiä painoltaan ja niillä oli korkeampi suolistorasvaindeksi kuin uimarakoltaan normaaleilla kaloilla.

6. PÄÄTELMÄT

Veden puskurikyvyn lisääminen kemikaaleilla on helppo keino muuttaa veden alkaliteettia ja ionikoostumusta kalojen kannalta suotuisammaksi kalasiirtojen yhteydessä. On toisaalta vaikea sanoa kuinka merkittävää taloudellista hyötyä puskurikäsittelyllä saataisiin kaupallisessa kalanviljelyssä, sillä tilastoja

kalasiirtojen aiheuttamista ongelmista ja kuolleisuudesta ei ole saatavilla. Joka tapauksessa kalojen hyvinvoinnin parantaminen, esimerkiksi vähentämällä toimintatavoista aiheutuvaa stressiä tulisi kuulua vastuulliseen kalankasvatukseen, ja siitä näkökulmasta puskurointi vaikuttaisi olevan soveltamisen arvoinen menetelmä. Mielenkiintoinen ja varmasti tärkeä lisätutkimuksen kohde ovat kalojen uimarakkopikkeamat, joita tämän tutkimuksen kaloilla esiintyi merkittäväällä osalla. Uimarakon kehityshäiriöihin johtavia syitä ei ole juurikaan selvitetty. Nämä syyt kehityshäiriöiden taustalla voivat mahdollisesti olla geneettisiä tai liittyä jollain tapaa kasvuolosuhteisiin kiertovedessä ja kalojen ravitsemukseen. Uimarakon poikkeamat voivat uintitasapainonhäiriöiden lisäksi vaikuttaa negatiivisesti kalan kasvuun, mikäli poikkeavauimarakkoiset kalat jäävät syystä tai toisesta kooltaan keskimäärin pienemmiksi kuin normaalit yksilöt. Kiertovesiviljelyyn liittyvien haasteiden selvittäminen on tärkeää alan kehityksen kannalta. Suomen kokonaiskalanviljelyn tuotannosta kiertovesiviljelyn osuus on toistaiseksi pieni, mutta lähitulevaisuudessa uusien laitosten määrä todennäköisesti tulee kasvamaan, joten uutta tietoa tarvitaan varmasti tulevaisuudessa.

KIITOKSET

Suuret kiitokset taloudellisesta tuesta Luonnonvarakeskukselle ja Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitokselle, joka järjesti työsopimukseni. Kiitos myös Laukaan vesiviljelylaitoksen henkilökunnalle, joka osallistui kalojen käsittelyyn ja opasti vesinäytteiden analysoinnissa. Kiitos myös ohjaajilleni, kommenteista ja opastuksesta. Kiitos opiskelijatoverilleni Tero Sieväselle, joka auttoi minua R -ohjelman parissa, koska ilman apua en varmasti olisi olemattomilla taidoillani selvinnyt aineiston analysoinnista.

KIRJALLISUUS

- Anonyymi A. Luonnonvarakeskus, Tilastoja vesiviljelystä, saatavilla: <https://stat.luke.fi/vesiviljely>
- Anonyymi B. Distell.com, Fish fatmeter FAQ, saatavilla: <https://www.distell.com/faq/fish-fatmeter-faqs/>
- Audet C., & Wood C. M. 1988. Do rainbow trout (*Salmo gairdneri*) acclimate to low pH? *Can. J. Fish. Aquat.* 45: 1399 – 1405. doi:10.1139/f88-163
- Barton B. & Iwama G. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.* 1: 3 – 26. doi:10.1016/0959-8030(91)90019-g
- Black M., Millsap D. & McCarthy J. 1991. Effects of acute temperature change on respiration and toxicant uptake by rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Physiol. Zoo.* 64: 145 – 168. doi:10.1086/physzool.64.1.30158517
- Blaxter J. 1988. Pattern and Variety in Development. Julkaisussa The Physiology of Developing Fish. Dunstaffnage Marine Research Laboratory Oban, Scotland. s. 1 – 58. doi:10.1016/s1546-5098(08)60198-3
- Blidariu F. & Grozea A. 2011. Increasing the economical efficiency and sustainability of indoor fish farming by means of aquaponics. *Rev. Anim. Sci. Biotech.* 44.
- Boyd C., Tucker C. & Somridhivej B. 2016. Alkalinity and hardness: critical but elusive concepts in aquaculture. *J. World Aquacult. Soc.* 47: 6 – 41. doi:10.1111/jwas.12241
- Burleson M. & Milsom W. 1993. Sensory receptors in the first gill arch of rainbow trout. *Respir. Physiol.* 1: 97 – 110. doi:10.1016/0034-5687(93)90071-h
- Cameron J. 1978. Regulation of blood pH in teleost fish. *Respir. Physiol.* 33: 129 – 144. doi:10.1016/0034-5687(78)90092-0
- Dalsgaard J., Lund I., Thorarinsdottir R., Drengstig A., Arvonen K. & Pedersen P. 2013. Farming different species in RAS in Nordic countries: Current status and future perspectives. *Aquacult. Eng.* 53: 2 – 13. doi:10.1016/j.aquaeng.2012.11.008

- Davies P., Gorman W., Carlson C. & Brinkman S. 1993. Effect of hardness on bioavailability and toxicity of cadmium to rainbow trout. *Chem. Spec. Bioavailab.* 5: 67 – 77. doi:10.1080/09542299.1993.11083205
- Davidson J., Good C., Welsh C. & Summerfelt S. 2011. Abnormal swimming behaviour and increased deformities in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* cultured in low exchange water recirculating aquaculture systems. *Aquacult. Eng.* 45: 109 – 117.
- Davidson J., Good C., Welsh C. & Summerfelt S. 2014. Comparing the effects of high vs. low nitrate on the health, performance, and welfare of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* within water recirculating aquaculture systems. *Aquacult. Eng.* 59: 30 – 40.
- Dietrich D. & Schlatter C. 1989. Aluminium toxicity to rainbow trout at low pH. *Aquat. Toxicol.* 15: 197 – 212. doi:10.1016/0166-445x(89)
- Donaldson M., Cooke S., Patterson D. & Macdonald, J. 2008. Cold shock and fish. *J. Fish Biol.* 73: 1491 – 1530. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.02061.x
- Evans D., Piermarini P. & Potts W. 1999. Ionic Transport in the fish gill epithelium. Department of Zoology, University of Florida, Gainesville, Department of Biological Sciences, University of Lancaster, Lancaster, UK.
- Fänge R. 1966. Physiology of the swimbladder. *Physiol. Rev.* 46: 299 – 322. doi:10.1152/physrev.1966.46.2.299
- Forsman L., Kärnä M., Moilanen P., Rahikainen M., Söderkultalahti P. & Takolander A. 2019. Ruoka- ja luonnonvaratilastojen e-vuosikirja 2019 kala ja riistatilastot. Helsinki, Suomi. 81 – 103. Saatavilla: https://stat.luke.fi/sites/default/files/luke-luobio_86_2019_u.pdf
- Friedlander J., Kotchabhakdi N. & Prosser C. 1976. Effects of cold and heat on behavior and cerebellar function in goldfish. *J. Comp. Physiol.* 112: 19–45.
- Fulton T. 1904. The rate of growth of fishes. Fisheries Board of Scotland, Annual Report 22: 141 – 241
- Glibert P., Icarus Allen J., Artioli Y., Beusen A., Bouwman L., Harle J. & Holt J. 2014. Vulnerability of coastal ecosystems to changes in harmful algal bloom distribution in response to climate change: projections based on model analysis. *Global Change Biol.* 20: 3845 – 3858. doi:10.1111/gcb.12662
- Gonzalez R. & McDonald D. 2000. Ionoregulatory responses to temperature change in two species of freshwater fish. *Fish Physiol. Biochem.* 22: 311–317. doi:10.1023/a:1007837214327
- Good C., Davidson J., Kinman C., Kenney P., Baeverfjord G. & Summerfelt S. 2014. Observations on side-swimming rainbow trout in water recirculation aquaculture systems. *J. Aquat. Anim. Health.* 26: 219 – 224. doi:10.1080/08997659.2014.938870

- Greco A., Fenwick J., & Perry S. 1996. The effects of soft-water acclimation on gill structure in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Cell Tissue Res.* 285: 75 – 82. doi:10.1007/s004410050622
- Hazel J. & Carpenter R. 1985. Rapid changes in the phospholipid composition of gill membranes during thermal acclimation of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Comp.Physiol.* 155: 597 – 602. doi:10.1007/bf00694450
- Hazel J. 1979. Influence of thermal acclimation on membrane lipid composition of rainbow trout liver. *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* 236: 91 – 101. doi:10.1152/ajpregu.1979.236.1.r91
- Hickman Jr C., McNabb R., Nelson J., Breemen E. & Comfort D. 1964. Effect of cold acclimation on electrolyte distribution in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Can. J. Zoo.* 42: 577 – 597. doi:10.1139/z64-050
- Hillaby B. & Randall D. 1979. Acute ammonia toxicity and ammonia excretion in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Can* 36: 621 – 629. doi:10.1139/f79-090
- Hjeltnes B, Baeverfjord G., Erikson U., Mortensen S., Rosten T. & Østergård P. 2012. Risk Assessment of Recirculation Systems in Salmonid Hatcheries. Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM), Doc. no. 09/808-Final
- Houle S., Schrader K., Le François N., Comeau Y., Kharoune M., Summerfelt S. & Vandenberg G. 2011. Geosmin causes off-flavour in arctic charr (*Salvelinus Alpinus*) in recirculating aquaculture systems. *Aquacult. Res.* 42: 360 – 365. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02630.x
- Hughes G. 1996. The Dimensions of Fish Gills in Relation to Their Function. *J. Exp. Biol.* 45: 177 – 195.
- Iwama G., McGeer J., Wright P., Wilkie M. & Wood C. 1997. Divalent cations enhance ammonia excretion in Lahontan cutthroat trout in highly alkaline water. *J. Fish Biol.* 50: 1061 – 1073. doi:10.1111/j.1095-8649.1997.tb01630.x
- Jobling M. 1994. Fish Bioenergetics. *Fish and fisheries series 13*, Chapman & Hall, UK, London
- Jobling M., Koskela J. & Savolainen R. 1998. Influence of dietary fat level and increased adiposity on growth and fat deposition in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29: 601 – 607. doi:10.1046/j.1365-2109.1998.00251.x
- Kause A., Kiessling A., Marti S., Houlihan D. & Ruohonen K. 2016. Genetic improvement of feed conversion ratio via indirect selection against lipid deposition in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Br. J. of Nutr.* 116: 1656 – 1665. doi:10.1017/s0007114516003603
- Kolarevic J., Baeverfjord G., Takle H., Ytteborg E., Reiten B., Nergård S. & Terjesen B. 2014. Performance and welfare of Atlantic salmon smolt reared in

- recirculating or flow through aquaculture systems. *J. Aquacult.* 32: 15 – 25. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.03.033
- Kolbeinshavn A. & Wallace J. 1985. Observations on swim bladder stress syndrome in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*), induced by inadequate water depth. *J. Aquacult.* 46: 259 – 261. doi:10.1016/0044-8486(85)90210-8
- Le Morvan C., Troutaud D. & Deschaux P. 1998. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *J. Exp. Biol.* 201: 165 – 168.
- Leino R., McCormick J. & Jensen K. 1990. Multiple effects of acid and aluminum on brood stock and progeny of fathead minnows, with emphasis on histopathology. *Can. J. Zool.* 68: 234 – 244. doi:10.1139/z90-035
- Lindholm-Lehto P., Vielma J., Pakkanen H. & Ale'n R. 2019. Depuration of geosmin- and 2-methylisoborneol-induced offflavors in recirculating aquaculture system (RAS) farmed European whitefish *Coregonus lavaretus*. *J Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03910-7>
- Liu Y., Rosten, T., Henriksen, K., Hognes, E., Summerfelt, S. & Vinci, B. 2016. Comparative economic performance and carbon footprint of two farming models for producing Atlantic salmon (*Salmo salar*): Land-based closed containment system in freshwater and open net pen in seawater. *Aquacult. Eng.* 71_ 1 – 12. doi:10.1016/j.aquaeng.2016.01.001
- Lorentzen T. 2008. Modeling climate change and the effect on the norwegian salmon farming industry. *Nat. Resour. Model.* 21: 416 – 435. doi:10.1111/j.1939-7445.2008.00018.x
- Macaulay G., Wright D., Oppedal F. & Dempster, T. (2020). Buoyancy matters: Establishing the maximum neutral buoyancy depth of Atlantic salmon. *J. aquacult.* 519. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.734925
- Perry S. 1981. Carbon dioxide excretion and acid-base regulation in the freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri*): involvement of the branchial epithelium and red blood cell. University of British Columbia Library, Vancouver. Saatavilla: https://open.library.ubc.ca/terms_of_use.
- Phleger C. 1998. Buoyancy in Marine Fishes: Direct and Indirect Role of Lipids. *Am. Zool.* 38: 321 – 330. doi:10.1093/icb/38.2.321
- Poppe T., Hellberg H., Griffiths D. & Meldal H. 1997. Swimbladder abnormality in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 30: 73 – 76.
- Raisioaqua Oy. 2019. Kiertovesirehutilukko. Saatavilla: https://www.raisioaqua.com/documents/140384/150631/Circuit_Kirjolohti_FI_SVE_2019+200619.pdf/38fd6f01-1f8a-5af1-5336-05e485a5caa9 (Luettu 21.10.2019)

- Randall D., Perry S., & Heming, T. 1982. Gas transfer and acid/base regulation in salmonids. *Comp. Biochem. Physiol.* 73: 93 - 103. doi:10.1016/0305-0491(82)90203-6
- Rasmussen, R. & Ostenfeld, T. 2000. Effect of growth rate on quality traits and feed utilisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Aquacult.* 184: 327-337. doi:10.1016/s0044-8486(99)00324-5
- Reid S. & McDonald D. 1988. Effects of cadmium, copper, and low pH on ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 244 - 253. doi:10.1139/f88-029
- Roch M. & Maly E. 1979. Relationship of cadmium-induced hypocalcemia with mortality in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the influence of temperature on toxicity. *J. Fish. Res. Can.* 36: 1297 - 1303. doi:10.1139/f79-187
- Saunders R., Muise B. & Henderson E. 1975. Mortality of salmonids cultured at low temperature in sea water. *J. Aquacult.* 5: 243 - 252. doi:10.1016/0044-8486(75)90002-2
- Schreck C., Contreras-Sanchez W. & Fitzpatrick M. 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *J. Aquacult.* 197: 3 - 24. doi:10.1016/s0044-8486(01)00580-4
- Setälä J., Vielma J., Koskela J., Honkanen A., Saarni K., Jokelainen T., Suvanto M. & Kankainen M. 2007. Ahvenanmaan kestävän kalankasvatuksen kehittämisvaihtoehtoja, *Kala- ja riistaraportteja nro 412*
- Stevčić Č. Pulkkinen K. & Pirhonen, J. 2019. Screening of microalgae and LED grow light spectra for effective removal of dissolved nutrients from cold-water recirculating aquaculture system (RAS) wastewater. *Alg. Res.* 44. doi:10.1016/j.algal.2019.101681
- Suzuki H., Okazaki K., Hayakawa S., Wada S., & Tamura S. 1986. Influence of commercial dietary fatty acids on polyunsaturated fatty acids of cultured freshwater fish and comparison with those of wild fish of the same species *Am. Zool.*, 38: 321 - 330.
- Szabo T., Brookings T., Preuss T. & Faber D. 2008. Effects of temperature Acclimation on a central neural circuit and its behavioral output. *J. Neurophysiol.* 100: 2997-3008. doi:10.1152/jn.91033.2008
- Timmons M., Guerdal T. & Vinci B. 2018. Recirculating Aquaculture 4rd edition. Ithaca Publishing Company LLC, US
- Tucker C. 2000. Off-Flavor Problems in Aquaculture. *Rev. Fish. Sci.* 8: 45 - 88. doi:10.1080/10641260091129170
- Wright P. & Wood C. 1985. An analysis of branchial ammonia excretion in the freshwater rainbow trout: Effects of environmental pH change and sodium uptake blockade. *J. Exp. Biol.* 114 : 329 - 353.

- Yesaki T. & Iwama G. 1992. Survival, acid-base regulation, ion regulation, and ammonia excretion in rainbow trout in highly alkaline hard water. *Physiol. Zoo.* 65: 763 – 787.
- Ye X. & Randall D. 1991. The effect of water pH on swimming performance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). *Fish Physiol. Biochem.* 9: 15 – 21. doi:10.1007/bf01987607