

KALA- JA RIISTARAPORTTEJA nro 321

Kati Manninen (toim.)

**Kalojen valkopilkkutaudin hoito
Tuloksia malakiitin vaihtoehtojen testaustyöstä**

Helsinki 2004

Kati Manninen (toim.)

Kalojen valkopilkkutaudin hoito. Tuloksia malakiitin vaihtoehtojen testaustyöstä

Vesiviljelyn tulosityksikkö

Kalojen terveydenhoidossa tärkeän ja tehokkaan kemikaalin, malakiittivihreän käyttö kiellettiin Suomessa syksyllä 2002. Kun tieto kieltopäätöksestä alkoi varmistua, käynnistettiin alan piirissä hankkeita sellaisten tuotantomenetelmien ja hoitoaineiden löytämiseksi, joiden avulla aiemmin malakiitilla hoidetut ongelmat voitaisiin pitää kurissa taloudellisesti mielekkäällä tavalla.

Mädin ja emokalojen vesihomeen torjunnan lisäksi malakiittivihreä oli teholtaan, käytettävyydeltään ja hinnaltaan paras hoitoaine torjuttaessa valkopilkkutautia. Kyseinen sairaus on monilla laitoksilla hankala ongelma lohikalojen poikastuotannossa. Taudin aiheuttamien tappioiden vuotuinen arvo koko maassa on pahimmillaan useita miljoonia euroja.

Tähän raporttiin on koottu tulokset kokeista, joissa on testattu mahdollisten malakiitin korvaavien hoitoaineiden tehoa ja käyttötapaa sekä kudოსvaurioiden aiheuttamisriskiä. Korvaavilla aineilla oli mahdollista jossain määrin hillitä taudin leviämistä, mutta niiden käytön ajoituksessa, tiheydessä ja turvallisuudessa on vielä avoimia kysymyksiä.

Valkopilkkutauti, kylvetysaineet, kalaterveys, kalanviljely, histologia, Desirox, kloramiini, formaliini, vetyperoksidi

Kala- ja riistaraportteja 321

951-776-455-3

1238-3325

71 s.

suomi

Julkinen

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos

Vesiviljelyn tulosityksikkö

PL 6

Vilppulantie 415

00721 Helsinki

41360 Valkola

Puh. 0205 751 510 Faksi 0205 751 519

Puh. 0205 7511 Faksi 0205 751 201

Sisällys

VALKOPIILKKUTAUDIN HOITO; KYLVETYSKOKEET KESÄLLÄ 2001.....	1
Mika Rahkonen, Päivi Rintamäki-Kinnunen, Anna-Liisa Mannermaa-Keränen, Lotta-Riina Suomalainen, Perttu Koski, Riitta Rahkonen, Erja Konttinen, Risto Kannel, Kaija Jämsä, Yrjö Lankinen & Tellervo Valtonen	
VALKOPIILKKUTAUDIN TORJUNTA: KYLVETYSKOKEET KESÄLLÄ 2002	25
Päivi Rintamäki-Kinnunen, Mika Rahkonen, Anna-Liisa Mannermaa-Keränen, Pasi Anttila, Erja Konttinen, Risto Kannel, Anu Halttunen, Veli-Matti Haukka, Yrjö Lankinen, Merja Partanen, Vesa Rahikkala, Matti Salonen & E. Tellervo Valtonen	
RAPORTTI KIDUSNÄYTTEIDEN HISTOLOGISISTA TUTKIMUKSISTA	61
Perttu Koski	

Esipuhe

Euroopan Unionin lainsäädännössä ja hallinnossa on riskien hallinnasta tullut entistä keskeisempi ohjausvoima. Elintarvikkeiden alkutuotannossa turvallisuudella on poikkeuksellisen paljon ulottuvuuksia. Itse elintarvikkeen on oltava käyttäjälleen turvallinen. Sen lisäksi tuotteen valmistusprosessin ja siinä käytettävien kemikaalien on oltava turvallisia tuotettaville kasveille tai eläimille, tuotannosta vastaaville ihmisille sekä ympäröivälle luonnolle. Elintarviketuotantoa on tässä katsannossa myös viljeltyjen kalojen istuttaminen luontoon, koska istutetut kalat voivat päätyä ihmisravinnoksi.

Tiukan varovaisuusperiaatteen seurauksena on tultu tilanteeseen, jossa sekä kasvi- että eläintuotannon parissa on alettu kantaa huolta käytettävissä olevien lääkeaineiden ja kemikaalien valikoiman supistumisesta. Hankalina seurauksina on mainittu mm. hoidon tehon heikkeneminen sekä kasvava riski vastustuskykyisten bakteerikantojen muodostumiseen.

Kalanviljelyssä eniten päänvaivaa on aiheuttanut yleisesti käytetyn hoitokemikaalin, malakiittivihreän, käytön kieltäminen syksyllä 2002. Kyseistä ainetta pidettiin tehokkaimpana hoitona mädin vesihomeen sekä kalojen valkopilkkutaudin hoidossa. Hyvän tehon lisäksi malakiittivihreä oli hinnaltaan edullinen ja värjäävyyden ansiosta sitä voitiin melko hallitusti käyttää myös suurissa ja hankalasti mitattavissa vesitilavuuksissa ja virtaamissa.

Kun malakiittivihreän käytön kieltäminen alkoi näyttää ilmeiseltä, käynnistettiin alan piirissä hankkeita sellaisten tuotantomenetelmien ja hoitoaineiden löytämiseksi, joiden avulla aiemmin malakiitilla hoidetut ongelmat voitaisiin pitää kurissa taloudellisesti mielekkäällä tavalla.

Mädin ja emokalojen vesihomeen torjunnan keinoista on tehty ja julkaistu useita selvityksiä mm. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen sarjoissa. Valkopilkkutaudin hoidon osalta tietoa on ollut vähemmän. Tämän niteen tarkoituksena on osaltaan paikata tietovajetta.

Unto Eskelinen
vesiviljelyjohtaja

Valkopilkkutaudin hoito; kylvetyskokeet kesällä 2001

Mika Rahkonen¹, Päivi Rintamäki-Kinnunen², Anna-Liisa Mannermaa-Keränen³, Lotta-Riina Suomalainen², Perttu Koski⁴, Riitta Rahkonen³, Erja Konttinen³, Risto Kannel³, Kaija Jämsä⁵, Yrjö Lankinen⁶ & Tellervo Valtonen¹

¹ Jyväskylän yliopisto, bio- ja ympäristötieteiden laitos, PL 35, 40014 Jyväskylän yliopisto

² Oulun yliopisto, biologian laitos, PL 3000, 90014 Oulun yliopisto

³ Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos, PL 6, 00721 Helsinki ja Kainuun kalantutkimus ja vesiviljely, Manamansalontie 90, 88300 Paltamo

⁴ Eläinlääkintä- ja elintarviketutkimuslaitos, Oulun alueyksikkö, PL 517, 90101 Oulu

⁵ Fortum Service Oy, Montan kalanviljelylaitos, Pyhäkoskentie 10, 91430 Leppiniemi

⁶ Savon Taimen Oy, Äijäniementie 7, 77700 Rautalampi

Tiivistelmä ja johtopäätökset

Malakiittivihreälle on vaihtoehtoja, mutta ne eivät ole yhtä tehokkaita kuin malakiittivihreä *Ichthyophthirius multifiliis* -loisen torjunnassa. Kesällä 2001 kolmella kalanviljelylaitoksella suoritettiin kylvetyskokeita betoni- ja lasikuitualtaissa. Koekaloja olivat lohet ja kirjolohet. Kloramiini-T:n, kaliumpermanganaatin, Per Aquan ja natriumperkarbonaatin tehoa verrattiin malakiitti-formaliiniin. Kaloja kylvetettiin noin joka toinen päivä kuusi kertaa. Montassa loistilanne ei ollut ongelma koko kesänä, eikä käytettyjen aineiden välillä ollut eroja. Syyksi arvioitiin alhainen loisaltistus tulovedessä, altaiden hyvät virtausolot ja säännöllinen puhtaanapito. Kainuussa kaloja kylvetettiin pidempään, 7-10 kertaa. Pidempi kylvetyssarja osoitti, että loiset vähenivät kolmen neljän viikon kuluttua niiden ilmestymisestä. Tyyrinvirralla Per Aqua-formaliinihoito esti loisia lisääntymästä liiaksi koejakson aikana, joten kaloja ei tarvinnut enää kylvettää maa-altaissa, jonne kalat siirrettiin kuuden kylvetyksen jälkeen. Johtopäätökset kokeista: Mikäli kalat saadaan selviämään korvaavien aineiden avulla noin kolme viikkoa infektiosta, pysyy tilanne hallinnassa, koska tänä aikana immunologiset puolustusjärjestelmät ehtivät aktivoitua ja torjua loisia. Ennaltaehkäisy on entistä tärkeämpää. Loistilanteen tarkkailu mikroskoopilla veden lämmitessä (pienien loisten havaitseminen) ja tulovedenottoaikaan loistilanteen huomioiminen on tärkeää. Kylvetyksen riittävän aikainen aloitus sekä kylvetystiheys ovat laitoskohtaisesti suunniteltavia tekijöitä. Altaiden virtaamaan, virtausoloihin ja viipymään kannattaa kiinnittää entistä enemmän huomiota.

1. Johdanto

Valkopilkkutautia aiheuttaa *Ichthyophthirius multifiliis* -loinen ja sitä esiintyy sekä luonnon- että viljelyillä kaloilla. Loinen voi aiheuttaa suurta kuolleisuutta hoitamattomana varsinkin 0- ja 1-vuotiaille mutta myös aikuisille kaloille (Elser 1955, Johnson 1961, Valtonen & Keränen 1981, Majeed ym. 1984, Wurtsbaugh & Tapia 1988, Traxler ym. 1998). Suomessa valkopilkkutauti havaittiin ensimmäisen kerran Laukaassa 1973 ja 1975 ja jälkimmäisenä vuotena myöskin Ahvenanmaalla (Valtonen & Keränen 1981). Vuonna 1978 Montan kalanviljelylaitoksella kuoli yli puolet yhden maalammikon 1-vuotiaista lohista valkopilkkutautiin (Valtonen & Keränen 1981). Tauti puhkeaa meillä yleensä heinä-elokuussa, kun vedet ovat lämmenneet riittävästi (Valtonen & Keränen 1981, Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997). Loisella on vain yksi isäntä, ja loisen elinkierto on monivaiheinen (Matthews 1994, Dickerson & Dave 1995). Aikuinen, lisääntymiskykyinen loinen pudottautuu kalan pinnalta altaan pohjalle, jossa se alkaa jakautua tuottaen noin 200-800 uutta, pientä parveiluvaiheen loista. Kun jakautuminen on tapahtunut, aktiiviset parveiluvaiheen loiset vapautuvat altaisiin. Parveilijat tarttuvat kalaan, kaivautuvat ihon uloimman kerroksen alle ja alkavat kasvaa. Kun loinen on kasvanut halkaisijaltaan n. 0,5-1 mm kokoon, se pudottautuu pohjalle jakautumaan. Elinkierron nopeus riippuu veden lämpötilasta. Yli 20°C:een lämpötilassa se on vajaa viikko. Loinen voi kulkeutua altaaseen joko tuloveden tai luonnonkalojen mukana. Yläpuoliset luonnonkalat, erityisesti särkikalat toimivat loisen reservinä (Valtonen & Koskivaara 1994).

Kemikaalihuuhtelukylvyillä pyritään vaikuttamaan vapaana uiviin parveiluvaiheen loisiin. Valkopilkkutauti-infektion torjunnassa ja hoidossa on kokeiltu monia eri kemikaaleja, mm. malakiittivihreää yksin ja yhdessä suolan tai formaliinin kanssa, formaliinia, kloramiini-T:tä ja kaliumpermanganaattia (Johnson 1961, Ljunberg 1963, Cross & Hursey 1973, Prost & Studnicka 1972, Schachte 1974, Straus & Griffin 2002). Malakiittivihreällä on torjuttu valkopilkkutautia ja lisäksi vesihomeinfektioita Suomessa yli 20 vuoden ajan. Malakiittivihreän tiedetään olevan potentiaalisesti mutageeninen ja karsinogeeninen aine, ja se aiheuttaa epämuodostumia kirjolohelle (Keyl & Werth 1959, Meyer & Jorgenson 1983). Sen käyttö on ollut kielletty tuotantoeläimille 1.1.1998 lähtien Euroopan Yhteisön alueella. Suomessa malakiittivihreän käyttö on kuitenkin poikkeuksellisesti ollut sallittua Lääkelaitoksen myöntämällä määräaikaisella erityisluvalla aluksi 1.1.2000 saakka, sitten lupaa jatkettiin 1.8.2001 saakka ja vielä kerran 30.9.2001 saakka, jotta kokeet korvaavilla aineilla ehtisivät valmistua. Malakiittivihreän käyttökielto astui Suomessa voimaan 1.10.2001. Kesällä 2000 Savon Taimen Oy:n Tyyrinvirran laitoksella Rautalammilla kokeiltiin useiden sallittujen kemikaalien eri pitoisuuksia ja mitattiin aineiden kykyä torjua loista. Kontrolleina toimivat perinteinen malakiittivihreä-formaliiniseos ja hoitamattomat kalat. Yksikään korvaava aine ei ollut teholtaan malakiittivihreä-formaliiniseoksen veroinen. Kesän 2000 kokeiden tulokset antoivat kuitenkin ne viitteet, joiden perusteella kesällä 2001 jatkettiin kokeita. Kesän 2001 kokeet tehtiin tuotantomittakaavassa kolmella eri kalanviljelylaitoksella. Kokeiden hajauttamisella eri laitoksiin pyrittiin selvittämään eroja niin olosuhteiden, loisten kuin kemikaalien välillä. Koepaikat, -kalat ja kylvetyksaineet esitetään taulukossa 1. Pyrimme esimerkiksi selvittämään voidaanko veden lämmitessä infektion alussa pitää loisten lisääntyminen hallinnassa myös korvaavilla aineilla.

2. Materiaali ja Menetelmät

Kokeet tehtiin Fortum Service Oy:n Montan kalanviljelylaitoksella Muhoksella, Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen (RKTL) Kainuun kalantutkimus ja vesiviljely-yksikössä Paltamossa ja Savon Taimen Oy:n Tyyrinvirran laitoksella Rautalammillä (jatkossa kutsumme laitoksia nimillä Montta, Kainuu ja Tyyrinvirta) (Taulukko 1).

	Montta	Kainuu	Tyyrinvirta
Kalalaji	Lohi 1+	Lohi 1+	Kirjolohi 0+
Tiheys	220/m ³	120/m ³	1000/m ³
Kaliumpermanganaatti 4 ppm	X		
Kloramiini-T 16 ppm	X		
Kloramiini-T 14 ppm		X	
Per Aqua* 40 ppm		X	
Per Aqua 20 ppm + formaliini 100 ppm			X
Natriumperkarbonaatti 100 ppm			X
Malakiittivihreä 2 g/l formaliinia → 200 ppm			X
Malakiittivihreä 3,7 g/l formaliinia → 25 ppm	X	X	

Taulukko 1. Koepaikat, kalat ja kokeisiin valitut kylvetysaineet kesällä 2001.

* peretikkahapon, etikkahapon ja vetyperoksidin seos

Kylvetyskertojen määrä kokeissa oli kuusi, paitsi Kainuussa 7-10. Näytteitä otettiin vähintään kolme kertaa (15 kalaa/allas), ennen kylvetysten aloitusta, kolmen kylvyn jälkeen ja kuuden kylvyn jälkeen. Kainuussa tutkittiin lisäksi pienempiä näyte-eriä (4-11 kalaa/allas) kylvetysten välillä ja jatkoseurannan aikana. Näytteet otettiin pyyhkäisemällä kalan iholta limaa preparointiveitsellä objektilasille n. 40 % toisen kyljen pinta-alasta. Näytteestä laskettiin kaikki *I. multifiliis* -loiset 40–50-kertaisella suurennoksella. Kainuussa ja Montassa kylvetettiin joka toinen päivä kolme kertaa viikossa. Tyyrinvirralla tehtiin kaksi koetta, joissa kylvetysrytmi oli tiiviimpi. Hoitokylvetys suoritettiin kahtena peräkkäisenä päivänä, jonka jälkeen pidettiin välipäivä, ja jälleen kylvetettiin kahtena päivänä jne. Kainuun pidemmän kylvetyssarjan tarkoituksena oli seurata loismäärien ja kuolleisuuden kehitystä pitemmällä aikajaksolla. Koealtaista poistettiin ja laskettiin kuolleet kalat päivittäin.

Kokeissa käytetyillä aineilla tiedetään olevan loisten lisäksi vaikutuksia kaloihin. Osalla aineista ero loisiin tehoavan ja kaloille tappavan pitoisuuden välillä on melko pieni. Useat käytetyistä kemikaaleista ärsyttävät kalojen kiduksia, joten vaikutuksia kaloihin seurattiin kidusten mikroskooppisilla (histologisilla) tutkimuksilla. Histologisia tutkimuksia tehtiin Montan ja Kainuun laitoksilla. Näytteitä otettiin sekä ennen kylvetysten aloittamista että kokeen päätyttyä.

2.1. Montta

Montan kalanviljelylaitos sijaitsee Oulujoen varrella Muhoksella n. 40 km jokisuusta. Laitos ottaa vetensä Oulujoesta voimalaitoksen yläpuolelta kuuden metrin syvyydestä.

Koe suoritettiin yhdeksässä 50 m²:n betonialtaassa. Vesitilavuus altaissa oli n. 50 m³ ja virtaama n. 11 l/s. Altaat puhdistettiin harjaamalla joka toinen viikko. Koekaloina olivat 1-vuotiaat lohet, jotka olivat keskipainoltaan 40 g. Kalat siirrettiin koealtaisiin toukokuun lopulla ja niitä oli yhdessä altaassa n. 11 000. Kokeiltavia aineita olivat kaliumpermanganaatti (4 ppm) ja kloramiini (16 ppm) ja kontrollina malakiittivihreä-formaliiniseos (3,7 g malakiittia/l formaliinia, josta otettiin 25 ppm eli 1:40 000) (Taulukko 1). Kustakin käsittelystä oli kolme toistoa.

Kylvetys tapahtui katkaisemalla vesitys, laskemalla veden syvyyttä 30 cm:iin ja levittämällä kemikaali tasaisesti altaaseen. Kemikaalien lisäämisen jälkeen veden annettiin nousta altaaseen ja allas täytettiin määräkorkeuteensa. Kemikaalipitoisuus laimeni altaan täytyessä ja veden vaihtuessa. Kylvetysveden viipymä altaassa oli n. kaksi tuntia. Malakiitti-formaliini annettiin tuloveden mukana huuhtelukylpynä.

2.2 Kainuu

Kainuun kalanviljelylaitos sijaitsee Oulujärven pohjoispuolella Paltamossa. Laitos ottaa vetensä Kivesjärvestä 2,5 ja 7 m:n syvyydestä ja laskee poistovedet Oulujärveen. Kokeet suoritettiin samoin kuin Montassa yhdeksässä 50 m²:n pinnoitetussa betonialtaassa. Altaiden vesitilavuus oli 50 m³ ja virtaama vaihteli 8-10 l/s. Kalat siirrettiin ulos koealtaisiin heinäkuun alkupuolella. Kalatiheys oli n. 6000 yksilöä/allas 1-vuotiaita lohja (keskipaino 12,1 g). Kokeessa käytetyt kemikaalit ja pitoisuudet olivat kloramiini (14 ppm), Per Aqua (40 ppm) ja kontrollina malakiittivihreä-formaliini (3,7 g malakiittia/l formaliinia, josta otettiin 25 ppm) (Taulukko 1). Kullakin käsittelyllä oli kolme toistoa.

Kylvetystä varten vedenpintaa laskettiin n. 30 cm:iin. Kloramiinin ja Per Aquan levityksen jälkeen altaan vedenkierto suljettiin 5 minuutiksi. Malakiittivihreä-formaliini annettiin huuhtelukylpynä. Kylvetysaine vaikutti altaassa n. kahden tunnin ajan laimentuen samalla.

2.3 Tyyrinvirta

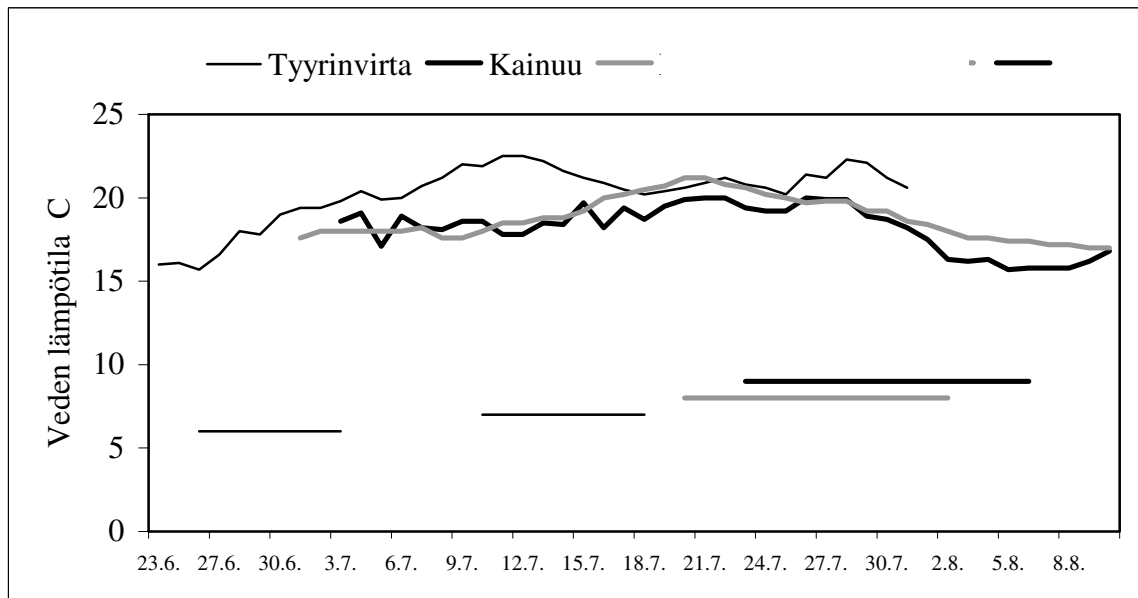
Tyyrinvirran kalanviljelylaitos sijaitsee Rautalammilla ja ottaa vetensä Koskelovedestä. Pintavesi tulee laitokselle syöttökanavaa pitkin. Tyyrinvirralla tehtiin kaksi erillistä koetta neljässä lasikuitualtaassa. Kolme altaista oli kooltaan 26 m² ja yksi 52 m². Virtaamat vaihtelivat 13,8-16,6 l/s. Koekaloina olivat 0-vuotiaat kirjolohet, joita oli pienessä altaassa n. 25 000 ja suuressa 50 000 yksilöä. Ensimmäisessä kokeessa kalojen keskipaino oli 5,5 g ja toisessa kokeessa 1,3 g. Keskipainojen ero johtuu eri aikaan tapahtuneesta kuoriutumisesta. Koealtaisiin tuotiin uudet kalat 5.7. toista koetta varten. Nämä kalat eivät olleet saaneet valkopilkkutautia. Koealtaita puhdistettiin ensimmäisen kokeen aikana kerran. Kokeiden välillä altaita ei pesty, minkä toivottiin nopeuttavan uusien kalojen infektoitumista. Kokeen kahdessa pienessä altaassa oli ns. korvaava käsittely ja isossa sekä yhdessä pienessä altaassa kaloja hoidettiin malakiittivihreä-formaliinilla. Käytetyt aineet ja pitoisuudet olivat ensimmäisessä kokeessa natriumperkarbonaatti (100 ppm, 30 min) ja toisessa kokeessa Per Aqua-formaliiniseos (20 ppm Per Aquaa ja 100 ppm formaliinia, 10 min) (Taulukko 1). Molemmissa kokeissa kontrollina oli malakiittivihreä-formaliiniseos (2 g malakiittia/l formaliinia, josta otettiin 200 ppm eli 1:5000), joka annettiin huuhtelukylpynä. Kokeen päätyttyä hoidetut kalat siirrettiin maa-altaisiin ja hoidon tehoa seurattiin edelleen ottamalla näytteitä kolmen viikon ajan.

2.4 Tilastokäsittely

Koealtaiden eri käsittelyjen paikat satunnaistettiin, jotta eri käsittelyiden koeyksiköt olisivat toisistaan riippumattomia. Kainuun kokeessa altaat oli ryhmitelty kolmen ryhmiiin eri puolelle laitosta ja satunnaistaminen käsittelyihin suoritettiin ryhmien sisällä. Loismäärät kaloissa eivät noudattaneet normaalijakaumaa missään kokeessa, joten tilastollisessa tarkastelussa käytettiin Mann-Whitney U ja Kruskal-Wallisin ei-parametrisiä analyyseja. Kuvissa aineistoja esitetään keskiarvojen avulla.

3. Tulokset

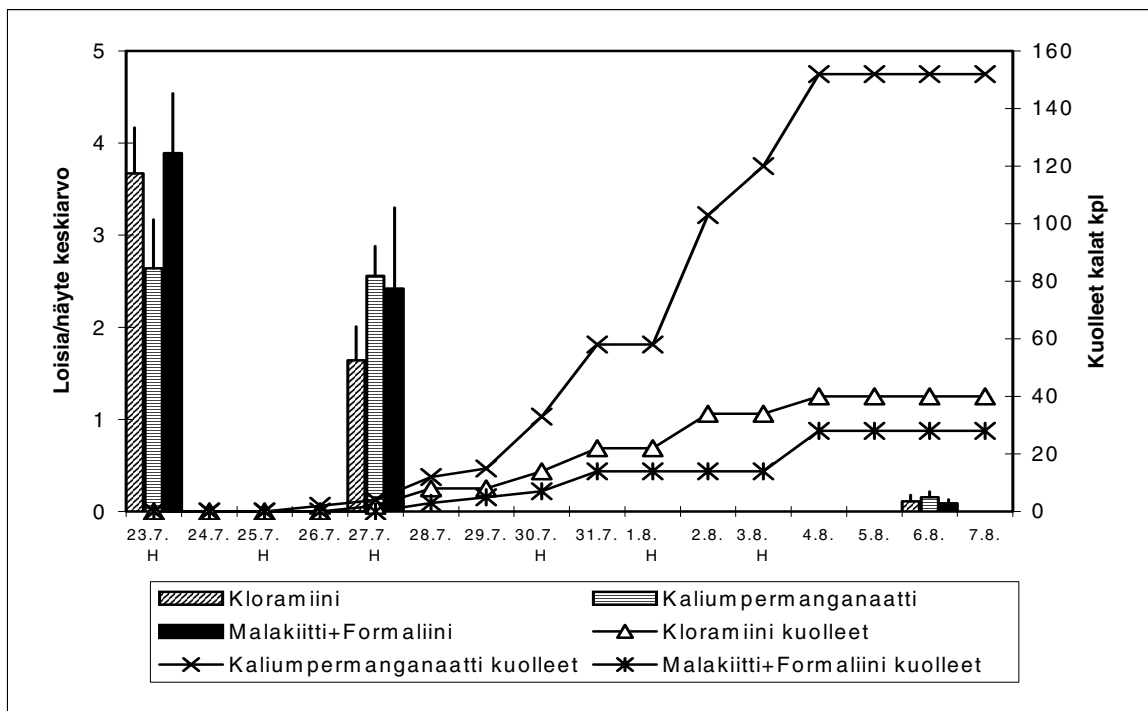
Veden lämpötila tehtyjen kokeiden aikana kolmella laitoksella on esitetty kuvassa 1. Kaikissa kokeissa lämpötila oli vähintään 16 °C. Korkein lämpötila, 22,5 °C todettiin Tyyrinvirralla toisen kokeen aikana.



Kuva 1. Veden lämpötila Tyyrinvirran, Montan ja Kainuun kalanviljelylaitoksella sekä tehtyjen kylvetyskokeiden ajankohdat (suora viiva).

3.1 Montta

Montassa loismäärä oli alhainen kokeen alussa 23.7. Käsittelyt eivät poikenneet tilastollisesti toisistaan, keskiarvo oli 2,6-3,9 loista/näyte. Kolmen kylvetyksen jälkeen 27.7. otetussa näytteessä erot käsittelyiden välillä olivat tilastollisesti merkitseviä ($\chi^2 = 9,219$, $df = 2$, $p = 0,010$). Kloramiinikäsittelyssä loisten keskiarvo oli vähentynyt 1,6 loiseen/näyte. Malakiitti-formaliini- ja kaliumpermanganaattikäsittelyissä oli n. 2,5 loista/näyte. Loppunäytteessä tilastollisia eroja ei enää ollut. Kloramiini- ja malakiitti-formaliinikäsittelyssä oli 0,1 loista/näyte ja kaliumpermanganaatilla 0,2 loista/näyte (Kuva 2). Kahden viikon koejakson aikana loiset vähenivät kaikilla käsittelyillä.



Kuva 2. Montan kokeen *I. multifiliis* -loismäärien keskiarvot ja keskivirheet. Kumulatiivinen kuolleisuus on esitetty viivakuvaajan avulla. H = hoitokylvetys.

Kuolleisuus oli korkeinta kaliumpermanganaattikäsittelyssä, n. 0,5 % (152 kalaa), mikä vahvisti myös kylvetyksen yhteydessä tapahtuneet havainnot heikkokuntoisten kalojen kuolemista. Kloramiinilla ja malakiitti-formaliinilla käsitellyissä koealtaista kuoli vain n. 0,1 % kaloista (28-40 yksilöä).

Kidusten histologisissa tutkimuksissa havaittiin ennen kylvetyksiä otetuissa näytteissä vähäistä pintasolukon paksuntumista, joka väheni kokeen loppuun mennessä. Eroja eri kylvetyksaineiden välillä ei todettu.

3.2 Kainuu

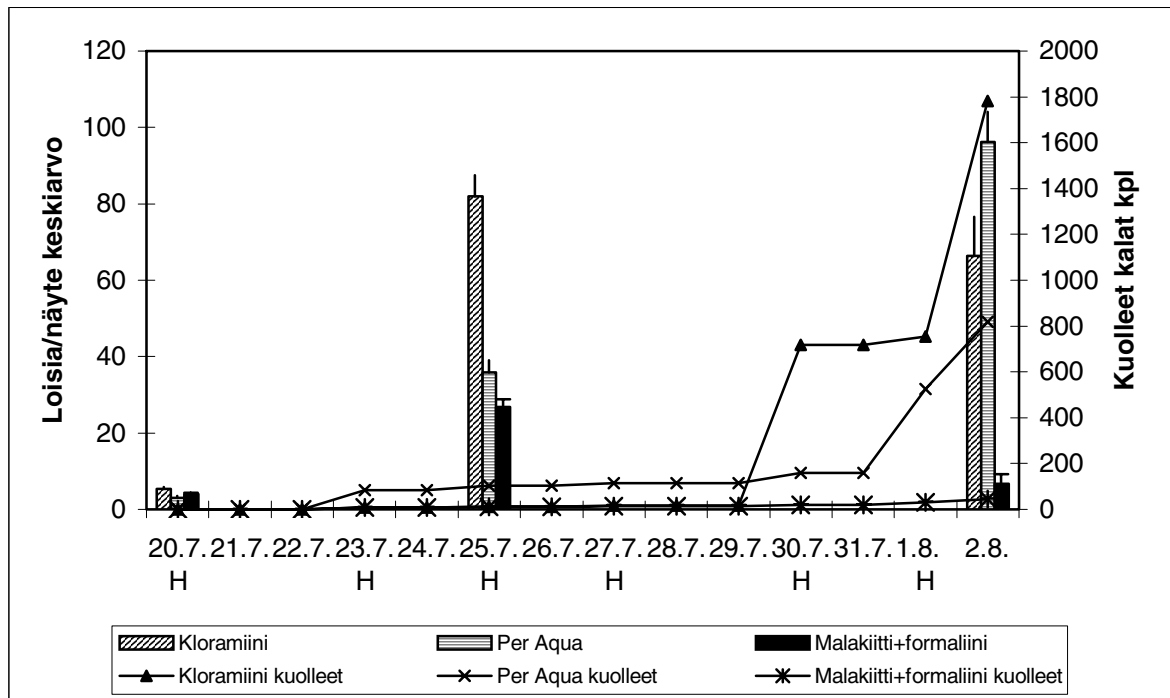
3.2.1 Varsinainen koe

Hoitokylvetykset aloitettiin 20.7. loismäärien keskiarvojen ollessa 3,1-5,4 kalan iholimanäytettä kohti. Loisten määrissä oli eroja käsittelyiden välillä ($\chi^2 = 11,475$, $df = 2$, $p < 0,01$). Kainuussa *I. multifiliis* -loisten määrä oli alusta alkaen korkeampi kuin Montassa ja kasvoi kokeen aikana vaihtoehtoisissa käsittelyissä. Vain malakiitti-formaliinikäsittelyssä loismäärä aleni kokeen aikana (Kuva 3).

Kolmen kylvetyksen jälkeen 25.7. loisten määrät eri käsittelyissä erosivat toisistaan merkitsevästi ($\chi^2 = 67,467$, $df = 2$, $p < 0,001$). Kloramiinikäsittelyn loisten määrän keskiarvo oli 82. Per Aqua ja malakiitti-formaliinikäsittelyissä loismäärien keskiarvo oli n. 30 (Kuva 3). Yhdessä kloramiinialtaassa loismäärä neljännen kylvetyksen

jälkeen oli keskimäärin 182 ja kuolleisuus yli 10 % joten hoitokylvetyksiä jatkettiin malakiitti-formaliinilla.

Kuuden kylvyn jälkeen 2.8. ero käsittelyiden välillä oli edelleen erittäin merkitsevä ($\chi^2 = 67,823$, $df = 2$, $p < 0.001$). Kloramiinikäsittelyssä loisia oli keskimäärin 50/näyte, Per Aqua -käsittelyssä 96/näyte ja malakiitti-formaliinikäsittelyssä 6,6/näyte. Malakiitti-formaliinialtaiden loismäärä väheni, kun taas muissa käsittelyissä loismäärät kohosivat (Kuva 3).



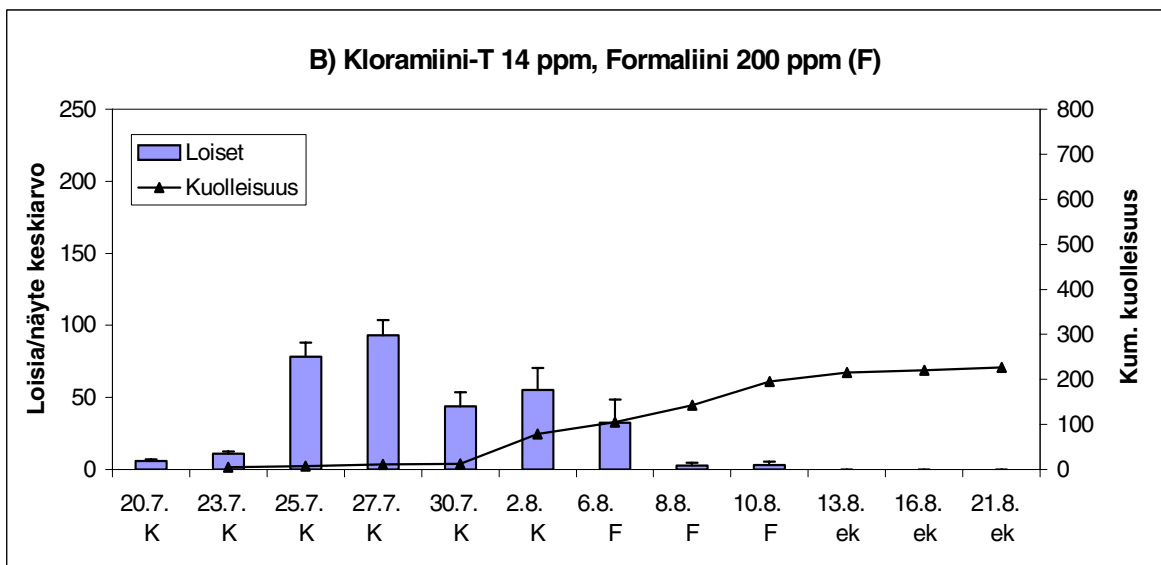
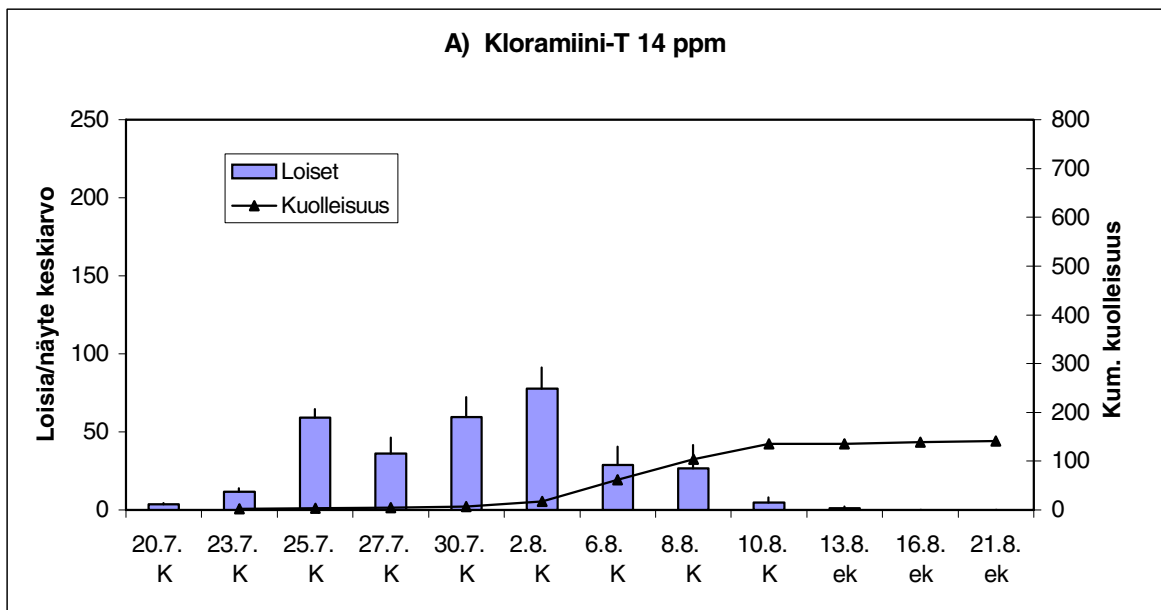
Kuva 3. Kainuun kokeen I. multifiliis -loismäärien keskiarvot ja keskivirheet sekä kumulatiivinen kuolleisuus. H = hoitokylvetus.

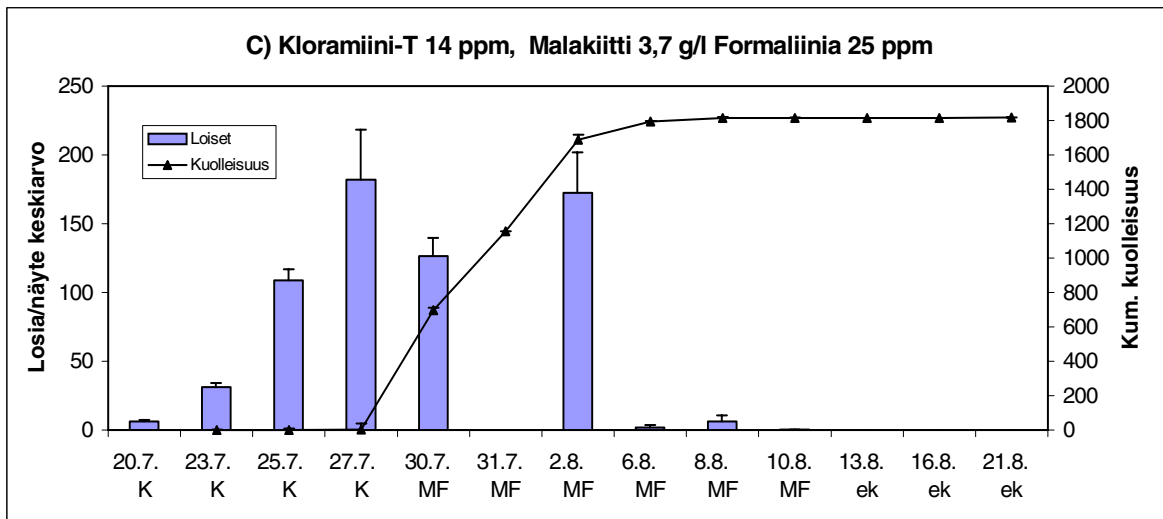
Kloramiinialtaissa kuolleisuus lisääntyi voimakkaasti reilun viikon kuluttua kokeen alusta. Kuolleita kaloja kokeen aikana kolmessa altaassa oli yhteensä 1782 (9,9 %). Kun yksi kloramiinikäsittely jätettiin tarkastelusta pois, kahden altaan kuolleiden määrä oli yhteensä 94 kpl (0,8 %). Per Aqua -käsittelyn kuolleisuus lisääntyi merkittävästi 12 päivän kuluttua kokeen alusta. Per Aqua -käsittelyssä kuolleisuus varsinaisen kokeen lopussa 2.8. oli 4,5 % (818 kalaa) ja malakiitti-formaliinikäsittelyssä 0,2 %, (35 kuollutta kalaa).

Histologisissa tutkimuksissa havaittiin vähäinen kidusepiteelin paksuneminen ennen kylvetyksiä vallinneesta tilanteesta kylvetysten jälkeen otettuihin näytteisiin. Paksuuntuminen oli voimakkaampaa kloramiinilla ja Per Aqualla kuin malakiittivihreä-formaliiniseoksella kylvetetyillä kaloilla. Vaikka kidusärsytyksen aste olikin kloramiini ja Per Aqua -kylvetyksissä voimakkaampi, ei sitä kuitenkaan vielä voida pitää suoranaisesti kalojen terveyttä uhkaavana.

3.2.2 Jatkokylvetykset ja -seuranta

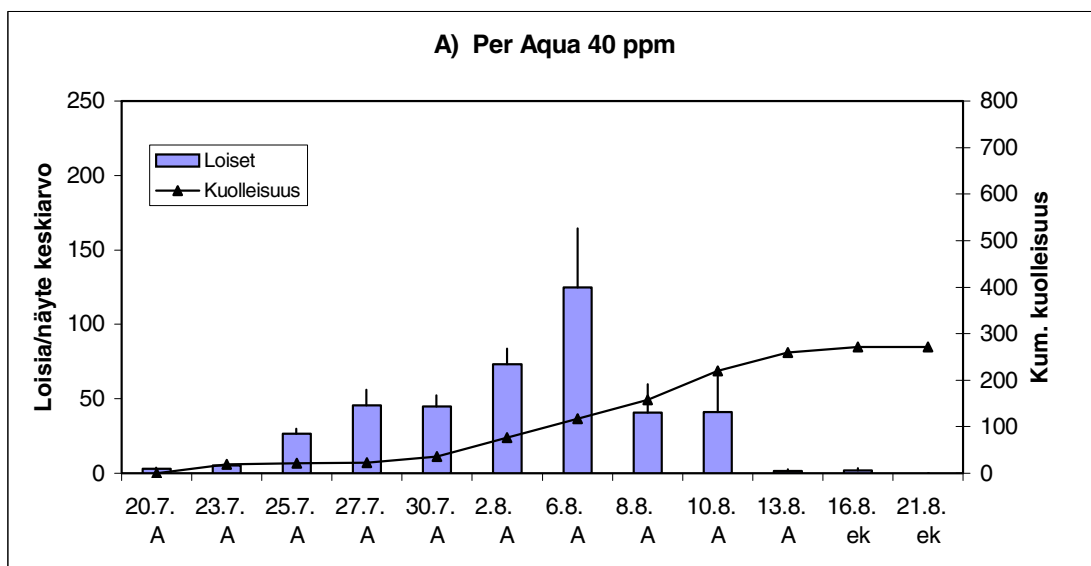
Kloramiinialtaiden kalojen loisten keskiarvo varsinaisen kokeen päätyttyä 2.8. kahdessa altaassa oli 55 ja 78 loista näytettä kohti. Yhden kloramiinialtaan kylvetyksiä oli jatkettu jo neljän kloramiinikäsittelyn jälkeen malakiitti-formaliiniseoksella suuren loismäärän ja kuolleisuuden vuoksi. Kyseinen allas kylvetettiin kuusi kertaa malakiitti-formaliinilla. Kaikkiaan tästä altaasta kuoli n. 30 % kaloista taudin aikana (Kuva 4c). Toinen allas sai kolme kloramiinikylpyä (14 ppm) ja kolmas allas kolme formaliinikylpyä (1:5000) varsinaisen kokeen jälkeen (yhteensä 9 kylpyä per allas). Näiden altaiden kuolleisuus oli 2,4 ja 3,8 % (Kuva 4 a, b).

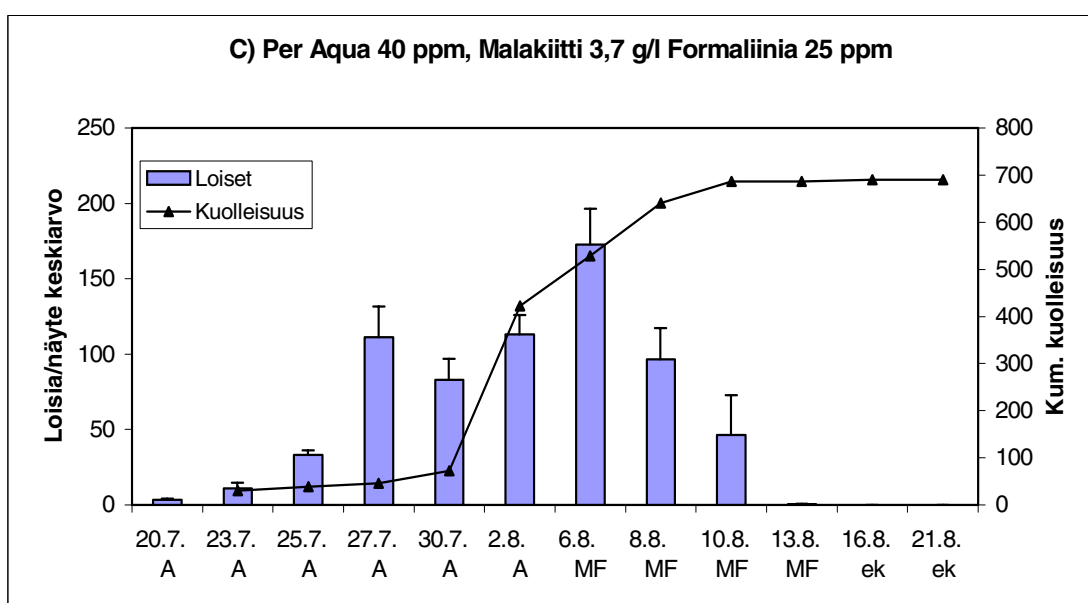
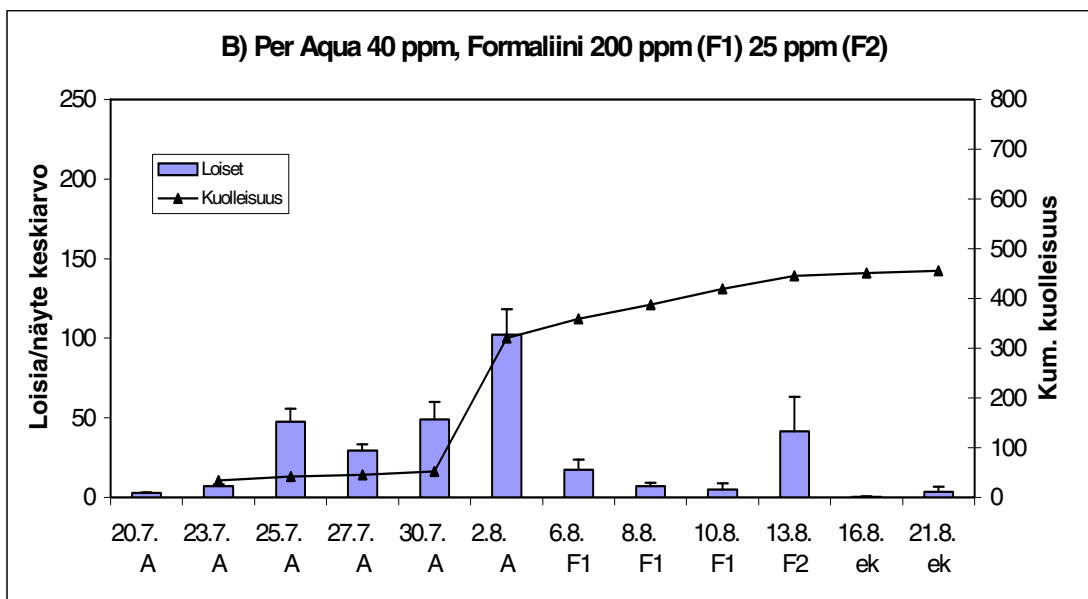




Kuva 4 (A-C). Koealtaiden (3 toistoa/käsittely) loismäärien keskiarvot ja keskivirheet sekä kumulatiivinen kuolleisuus. K= kloramiinikäsittely, MF= malakiitti-formaliinikäsittely, F= formaliini, ek= ei kylpyä. Käytetyt pitoisuudet on ilmoitettu kuvien otsikossa.

Per Aqua -käsittelyssä kuuden kylvetyksen jälkeen loismäärät olivat kohonneet suuremmiksi kuin kahdessa kloramiinikäsittelyssä. Loisia oli kokeen lopussa keskimäärin 73, 102 ja 113 kappaletta yhdessä näytteessä. Per Aqua -kylvetyksiä (40 ppm) jatkettiin yhdessä altaassa neljä kertaa, eli allas sai kaikkiaan 10 kylvetystä. Kuolleisuus oli tässä altaassa alle 5 % koko tarkkailujakson aikana (Kuva 5a). Toisessa altaassa kylvetyksiä jatkettiin formaliinilla kolme kertaa pitoisuudella 1:5000 ja kerran pitoisuudella 1:40 000. Kuolleisuus oli 7,7 % koko kesän kokeen aikana ko. altaassa (Kuva 5b). Kolmas allas kylvetettiin malakiitti-formaliiniseoksella neljä kertaa. Kokeen aikainen kuolleisuus tässä altaassa oli 11,4 % (Kuva 5c).

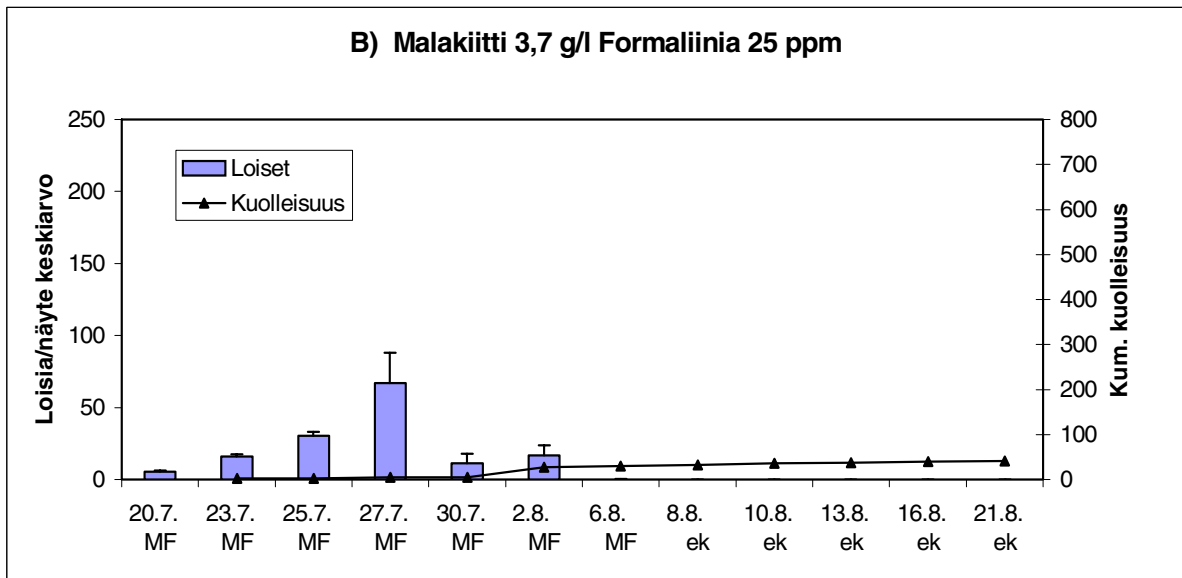
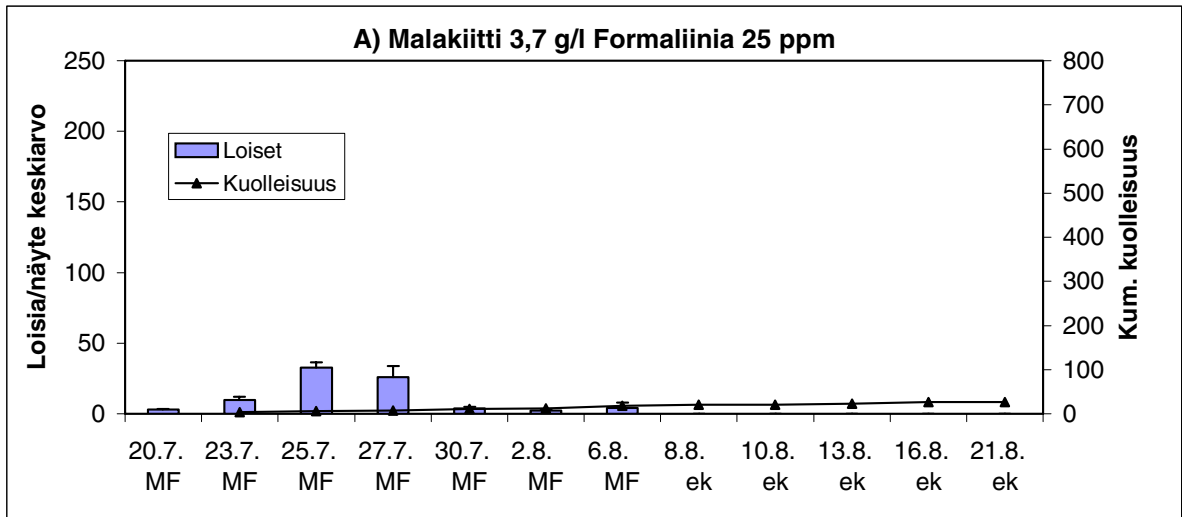


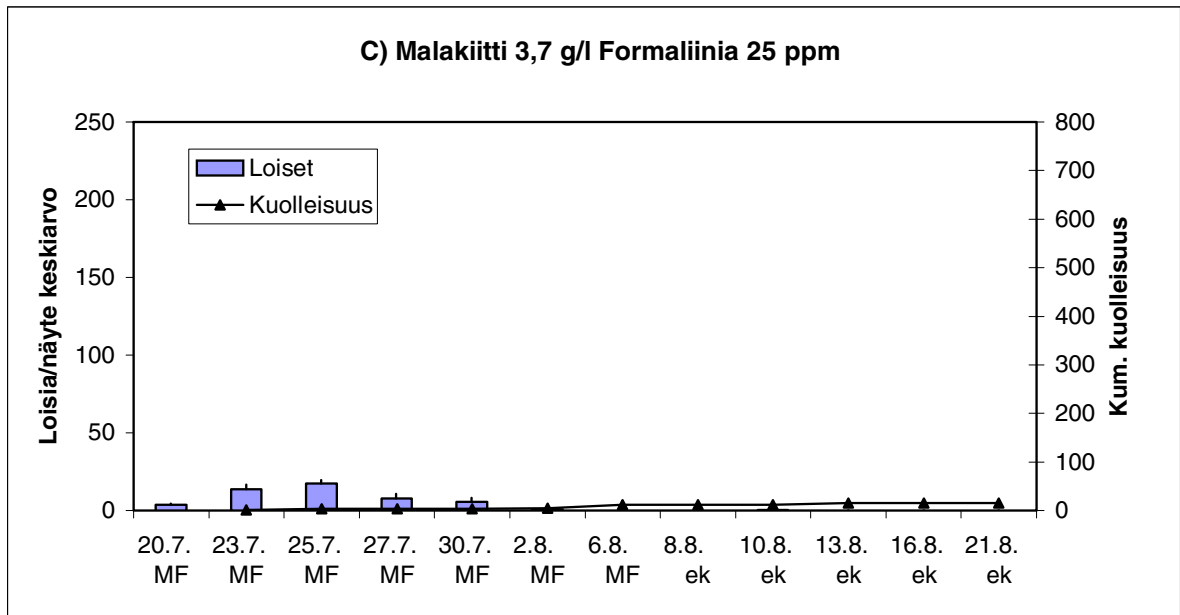


Kuva 5 (A-C). Per Aqua -käsittelyiden loismäärien keskiarvot ja keskiarvot sekä kumulatiivinen kuolleisuus. A= Per Aqua -kylpy, F= formalini, MF= malakiitti-formaliini, ek= ei kylpyä. Käytetyt pitoisuudet on ilmoitettu kuvien otsikossa.

Kloramiini- ja Per Aqua -altaiden jatkoseuranta osoitti, että kaikissa altaissa loiset vähenivät noin kolmen viikon jälkeen (3-4 ylimääräistä kylpyä, yhteensä 9-10 kylpyä). Samaan aikaan kuolleisuus loppui.

Malakiitti-formaliinikäsittelyn saaneita kaloja ei kylvetetty kuin kerran kokeen jälkeen (Kuva 6a-c). Loismäärä ja kuolleisuus oli kaikkein pienen. Varsinaisen kokeen lopussa 2.8. allaskohtainen loismäärien keskiarvo oli 2,3-16,7 ja kuolleisuus 0,5 % koko seurantajaksonkin aikana (Kuva 6a-c).





Kuva 6 (A-C). Malakiitti-formaliinialtaiden loismäärien keskiarvot ja keskivirheet sekä kumulatiivinen kuolleisuus. MF= malakiitti-formaliinikylvytys, ek= ei kylpyä. Käytetty pitoisuus on ilmoitettu kuvien otsikossa.

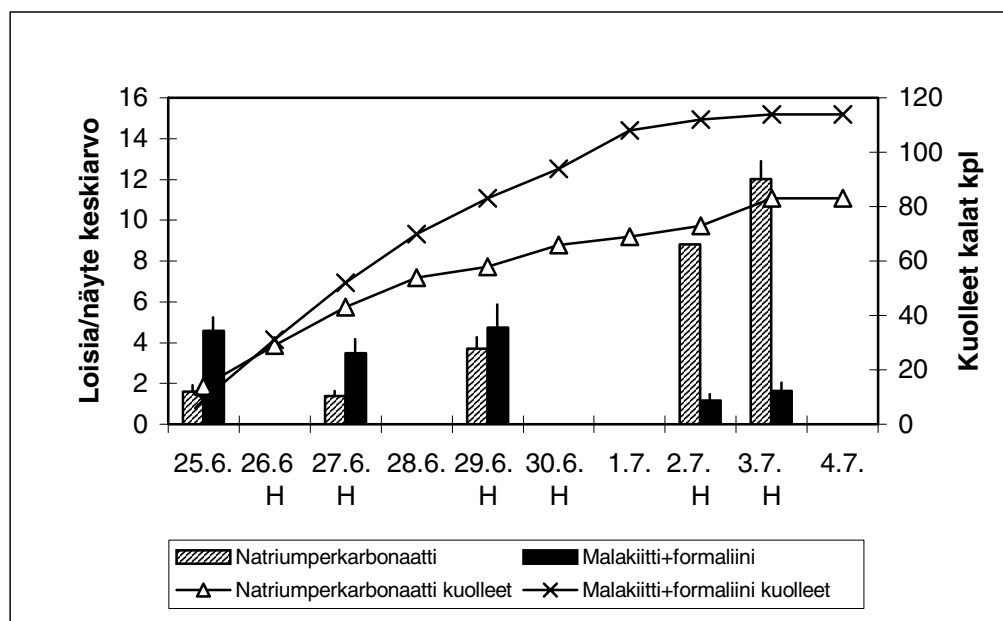
3.3 Tyyrinvirta

3.3.1 Natriumperkarbonaattikoe

Ensimmäiset loiset ilmaantuivat laitokselle ennen juhannusta. Juhannuksen jälkeen vesi alkoi lämmetä ja loismäärä kohosi niin, että koe natriumperkarbonaatilla voitiin aloittaa 25.6. Alkutilanteessa loisinfektio ei ollut tasainen käsittelyiden välillä (Mann-Whitneyn $U = 212,0$, $p < 0,001$) ja loismäärien keskiarvot olivat 1,6 ja 4,5 loista/näyte. Suurimmassa koelaitoksessa, jossa oli malakiitti-formaliinikäsittely, infektiota oli kehittynyt tasolle 6 loista/näyte.

Kahden kylvetyksen jälkeen 27.6. infektioiden keskimääräinen intensiteetti oli tasaisempi kaikissa altaissa, mutta käsittelyt erosivat edelleen toisistaan (Mann-Whitneyn $U = 297,5$, $p < 0,05$). Kolmen kylvetyksen jälkeen käsittelyiden välillä ei ollut eroja. Viiden kylvetyksen jälkeen 2.7. käsittelyt poikkesivat toisistaan merkitsevästi, koska natriumperkarbonaatti ei vaikuttanut loisiin niin hyvin kuin malakiitti-formaliini (Mann-Whitneyn $U = 28,0$, $p < 0,001$).

Kokeen lopussa 3.7. kuuden kylvetyksen jälkeen malakiitti-formaliinialtaiden kaloissa oli 1,6 loista/näyte ja natriumperkarbonaattikäsittelyssä 12 loista/näyte. Aineiden tehossa oli merkitsevä ero (Mann-Whitneyn $U = 82,0$, $p < 0,001$) (Kuva 7)



Kuva 7. Tyyrinvirralla tehdyn natriumperkarbonaattikokeen *I. multifiliis* -loismäärien keskiarvot ja keskivirheet sekä kuolleisuus kokeen aikana. H = hoitokylvetys.

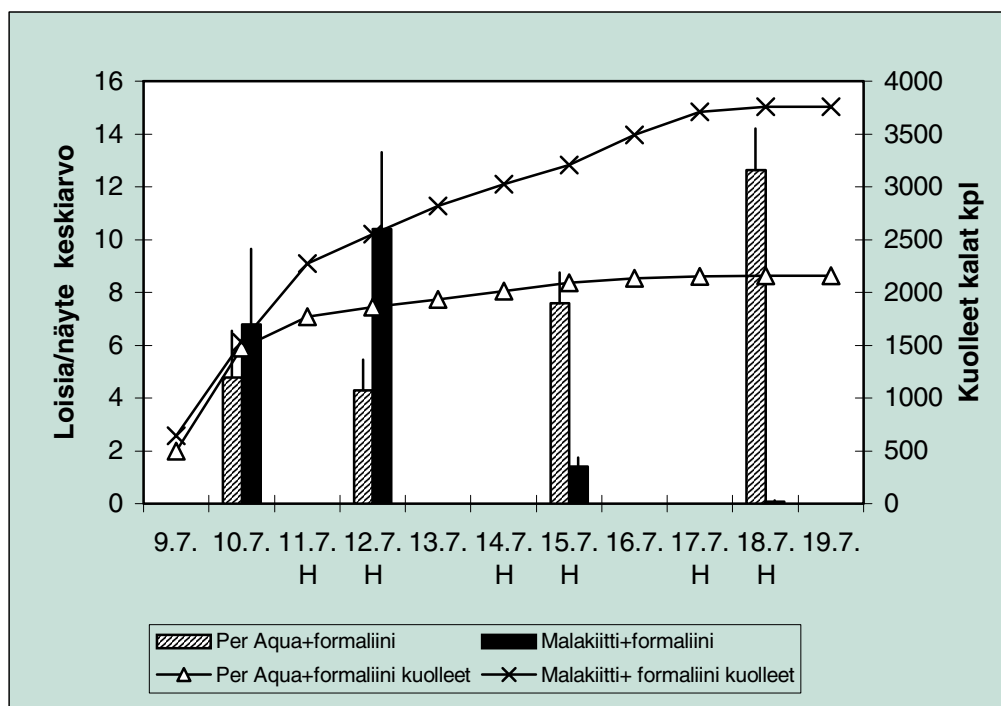
Malakiitti-formaliiniseoksella kylvettyjä kaloja oli pienessä ja isossa koealtaassa yhteensä 1,5-kertainen määrä ja kuolleisuus siellä oli myös 1,5-kertainen. Prosentteina molempien käsittelyiden kuolleisuus oli 0,2 %. Kokeen jälkeen kaikki kylvetyt kalat siirrettiin suurempaan maa-altaaseen ja kalojen kuolleisuutta seurattiin. Kuolleisuutta ei esiintynyt, mutta n. kaksi viikkoa siirrosta kalat jouduttiin kylvettämään kolme kertaa malakiitti-formaliinilla lisääntyneen valkopilkkuinfektion takia.

3.3.2 Per Aqua-formaliinikoe

Koealtaisiin tuodut uudet puhtaat kalat laitettiin pesemättömiin altaisiin, jolloin kalat infektoituivat alle viikossa. Ennen kokeen aloittamista kaloja jouduttiin sekoittamaan eri altaiden välillä, koska infektio eri altaissa oli erittäin epätasainen. Infektion lähtötaso saatiin näin tasaisemmaksi. Kokeen alussa 10.7. kaloissa oli keskimäärin 4,8 ja 6,8 loista/käsittely.

Kahden kylvetyksen jälkeen 12.7. infektio oli edelleen tasainen koealtaiden kesken. Neljän kylvetyksen jälkeen 15.7., aineiden välillä ilmeni eroja (Mann-Whitney $U=127,5$, $p < 0,001$); malakiitti-formaliinikäsittelyssä loiset vähenivät 1,4 loiseen/näyte, kun taas Per Aqua-formaliinikäsittelyn loisten määrä oli 7,6/näyte.

Kalat saivat kuudennen kylvetyksensä 18.7. ja erot olivat erittäin merkitseviä (Mann-Whitney $U=18,0$, $p < 0,001$). Per Aqua-formaliinikäsittelyssä *I. multifiliis* -loisten määrä kasvoi kokeen aikana, kun taas malakiitti-formaliinikäsittely vähensi niitä. Kokeen lopussa Per Aqua-formaliini-käsittelyssä loisia oli 12,6/näyte. Malakiitti-formaliini-käsittelyssä oli keskimäärin 0,1 loista/näyte (Kuva 8).



Kuva 8. Tyyrinvirralla tehty Per Aqua-formaliinikokeen *I. multifiliis* -loisten määrän keskiarvot ja keskivirheet sekä kalojen kumulatiivinen kuolleisuus. H = hoitokylvetys.

Kokeen aikana todettu korkea kuolleisuus kaikissa altaissa ei johtunut loisista vaan bakteeritaudista. Kalat saivat lääkekuurin, joka alkoi ennen koetta ja loppui kokeen alussa. Lääkekuurin ansiosta tautikuolleisuus asettui normaalille tasolle kokeen puoliväliin mennessä. Malakiitti-formaliinikaloja oli 1,5-kertainen määrä eli yhteensä 75 000 verrattuna Per Aqua-formaliinialtaiden 50 000 kalaan, tästä johtuu malakiitti-formaliinialtaiden suurempi kuolleiden kalojen määrä.

Kokeen jälkeen kalat siirrettiin maa-altaaseen väljempään tilaan. Kaloja seurattiin ottamalla näytteitä kerran viikossa ja seuraamalla kuolleisuutta. Normaalista poikkeavaa kuolleisuutta ei ilmennyt ja *I. multifiliis* -loiset hävisivät itsekseen ilman kylvetystä kahden viikon kuluessa.

4. Pohdinta

4.1 Kylvetykset ja kemikaalien teho valkopilkkutautiin

Kesällä 2001 kokeiluista vaihtoehtoisista kemikaaleista yksikään ei ollut teholtaan malakiitti-formaliinin veroinen. Kokeita tehtiin kolmessa eri laitoksessa kunkin laitoksen normaalien rutiinien mukaisesti. Tämä oli tärkeää, koska jokainen laitos on oma yksikkönsä, ja olosuhteet poikkeavat niiden välillä monien tekijöiden suhteen. Näitä tekijöitä ovat esimerkiksi vesitysjärjestelyt, yläpuolisen vesistön loispaine ja hoitorutiinit. Korvaavat aineet eivät tehonneet malakiitti-formaliinin veroisesti annettiinpa niitä päivittäin tai joka toinen päivä. Kainuussa tehdyt jatkokylvetykset ja -seuranta kuitenkin osoittivat, että useimmissa altaissa loismäärät eivät nousseet tappaviin määriin korvaavilla aineillakaan ja toisaalta Per Aqua-formaliiniyhdistelmä auttoi Tyyrinvirralla kaloja selviytymään loisista siinä määrin, ettei hoitokylvetyksiä tarvinnut enää kokeen loputtua tehdä. Montassa käytetyt aineet, kloramiini-T (16 ppm), kaliumpermanganaatti (4 ppm) ja malakiittiformaliini olivat teholtaan samaa tasoa, mikä saattoi johtua alunperinkin erittäin pienestä loismäärästä. Kaliumpermanganaatti oli kaloille haitallisina tappeina ihovaurioituneet kalat. Kuitenkin kuolleisuus pysyi alhaisena 0,5 %.

Kainuussa *I. multifiliis* -loismäärät olivat huomattavasti suurempia kuin Montassa. Per Aqua -käsittelyssä (40 ppm) loisten määrä nousi kokeen loppua kohden. Per Aqua poisti altaan pohjalla kasvaneen levän ja levän mukana mahdollisesti myös pohjalla olevia loisia. Kokeen edetessä loisia ilmeisesti pääsi tarttumaan suoraan pohjaan ja lisääntymään. Tämän voi olla yksi syy loisten määrän ja kuolleisuuden lisääntymiseen kokeen lopussa Per Aqua -käsittelyssä. Kloramiinikylvetyksissä (14 ppm) infektion intensiteetti kasvoi yhdessä altaassa niin, että 10 % kuolleisuus ylittyi ja allasta jouduttiin hoitamaan malakiitti-formaliinilla. Kahdessa muussa altaassa kloramiini piti loisten määrän kurissa ja kuolleisuus varsinaisen kokeen aikana oli alhainen (0,8 %). Malakiitti-formaliini tehosi loisiin parhaiten pitäen loisten määrän ja kuolleisuuden alhaisena.

Tyyrinvirralla tehdyt lyhyempikestoiset kokeet osoittivat malakiitti-formaliiniseoksen olleen tehokkaampi kuin natriumperkarbonaatti (100 ppm) tai Per Aqua-formaliiniseos (40 ppm ja 200 ppm). Kokeen aikana malakiitti-formaliinikäsittelyssä loismäärä laski ja korvaavilla kemikaaleilla se nousi. Kesän ensimmäisen valkopilkkutautiepidemian aikana tehty natriumperkarbonaattikäsittely ei estänyt riittävästi loisten lisääntymistä, vaan kalat piti kylvettää maa-altaissa kolme kertaa malakiitti-formaliinilla reilun kahden viikon kuluttua siirrosta. Per Aqua-formaliinikoe ajoittui myöhemmäksi, eikä kaloja tarvinnut kylvettää enää maa-altaissa.

Koska malakiittivihreän käyttö on jatkossa kielletty, tulee loisten torjunnassa yhtenä vaihtoehtona tarkastella useiden hoitotoimenpiteiden yhdistelmiä laitoskohtaisesti. Valkopilkkutaudin seuranta tulee aiheuttamaan lisätyötä viljelylaitoksilla. Erityisesti vesien lämmitessä ja loisinnan alkuvaiheessa tehostettu seuranta on välttämätöntä. Paljain silmin kaloja tarkkailemalla tapahtuva seuranta ei riitä. Kaloista näytteitä otettaessa havaittiin, että paljaalla silmällä näkyivät vain suurimmat myöhäisen vaiheen loiset. Mikroskoopin 40-kertaisella suurennoksella katsottuna samassa näytteessä *I. multifiliis* -loisia saattoi olla monikertainen määrä verrattuna siihen, mitä nähtiin paljain silmin.

Kesän 2001 kokeissa ei havaittu voimakkaita kidusärsytysreaktioita. Käytetyt pitoisuus-aikayhdistelmät tuntuvat siis turvallisilta kaloille. Lieviä merkkejä ärsytyksestä kuitenkin havaittiin. On hyvä muistaa, että kylvetyskemikaalit ovat kaloille haitallisia aineita, joiden kokeiluissa on toimittava varovaisesti, etenkin jos

käytetään pitkiä kuureja tai nyt esillä olleita korkeampia pitoisuuksia tai pidempiä kertakylvetysaikoja.

4.2 Loisten määrään vaikuttavia tekijöitä

Tärkeä tekijä infektion voimakkuudessa on yläpuolisesta vesistöstä tuleva loisten määrä. Montan laitos ottaa vetensä voimalaitospadon yläpuolelta noin kuuden metrin syvyydestä. Virtaavassa vedessä loisten esiintyminen ei ole samaa luokkaa kuin esim. järvissä, joissa myös kalalajisto ja sen määrä poikkeavat. Kainuun laitokseen vesi tulee Kivesjärvestä pumppaamalla 2-3 ja 7 metrin syvyydestä. Kivesjärvi on rehevä järvi, jossa on runsas särkikalakanta. Lämmintä vettä suosivat särkikalat ovat yleisimmin loisten tartuttajia (Valtonen & Koskivaara 1994), ja niitä on runsaasti matalissa vesissä. Kainuussa tapahtuneeseen loisten määrän suureen nousuun saattoi olla osasyynä suuri yläpuolisen vesistön loispaine. Veden mukana tuleviin loisiin on kuitenkin vaikea vaikuttaa. Pumpulaitosten vesi kannattaa ottaa mahdollisimman syvältä tai ulapalta ja mahdollisuuksien mukaan tutkia luonnonkalojen loisinfektio vedenottoaikan ympäristöstä. Pitkä tulokanava kannattaa pitää mahdollisimman puhtaana luonnonkaloista ja estää siten parveiluvaiheen loisten pääsy altaaseen. Parveiluvaiheen loisten on havaittu elävän ja säilyttävän infektiivisyyden vuorokauden 20 °C:een lämpötilassa (Lahav & Sarig 1973).

Virtaama vaikuttaa *I. multifiliis* -loisen mahdollisuuteen infektoida kala. Virtaamaltaan vähäisempi allas antaa parveilijoille paremman tilaisuuden tarttua kalaan, koska veden ja parveilijoiden viipymä altaassa on pidempi. Bodenstein ym. (2000) tutkivat veden virtaaman vaikutusta ja huomasivat kokeessaan, että kun virtaamaa nostettiin lähtötilanteesta, 5 l/min, kolminkertaiseksi, loisten aiheuttama kuolleisuus puolittui. Kun virtaama oli 25 l/min, kuolleisuus oli vain noin 1/7 siitä, mitä se oli 5 l/min virtaamassa. Huomattavaa oli, että samassa tutkimuksessa kuolleisuus 5 l/min virtaamassa yhdistettynä 25 ppm:n formaliinikylypyyn, oli n. 55 % korkeampi kuin 25 l/min virtaamassa ilman formaliinia.

Vuoden 2001 kokeissa virtaama vaihteli laitoksilla 8-16,6 l/min. Kainuussa virtaama oli pienin ja Tyyrinvirralla suurin. Pieni virtaaman saattoi osaltaan vaikuttaa loisten määrän suureen kasvuun Kainuussa. Hyvä virtaama ja altaan hyvä hydrodynamiikka on tärkeää. Altaaseen tulisi saada tasainen virtaus ja parantaa virtausta erityisesti hitaissa paikoissa. Virtaamattomilla alueilla parveiluvaiheen loisella on pidempi aika ja parempi mahdollisuus infektoida kala huuhtoutumatta pois virran mukana. Erityisesti suuret maa-altaat ovat ongelmallisia veden hitaan vaihtumisen takia.

Montan vähäiseen loismäärään vaikutti ilmeisesti myös altaiden säännöllinen puhdistaminen harjaamalla joka toinen viikko. Harjaamisen yhteydessä poistuivat altaan pohjalla jakautumassa olevat loiset ja näin loisen lisääntyminen estyi. Kainuussa altaita ei puhdistettu kesällä. Tämä saattoi olla yksi tekijä loismäärien suureen eroon ko. laitoksilla. Tyyrinvirralla koelaita puhdistettiin ensimmäisen kokeen aikana kerran. Ensimmäisen ja toisen kokeen välissä puhdistusta ei tehty, jotta vasta tuodut puhtaat kalat olisivat infektoituneet nopeammin Per Aqua-formaliinilla suoritettavaa toista koetta varten. Näin kävikin, kalat saivat tartunnan viikossa. Altaiden puhdistaminen harjaamalla on käytännössä mahdollista pienissä ja pinnoitetuissa altaissa.

4.3 Veden lämpötila ja immuniteetin kehittyminen kaloilla

Kesän 2001 kokeista Tyyrinvirran kylvetyskoe alkoi ensimmäisenä 26.6. Vesi tulee laitokselle syöttökanavaa pitkin ja on pintavettä. Veden lämpötila oli jo heinäkuun alussa 20 °C. Muissa laitoksissa sama lämpötila saavutettiin vasta heinäkuun puolessa

välissä. Tyyrinvirran loisinfektio oli 2-3 viikkoa muiden edellä ja loiset myös hävisivät kaloista aikaisemmin kuin Montassa ja Kainuussa. Elokuussa otetuissa näytteissä Tyyrinvirralla ei enää ollut kuin yksittäisiä loisia.

Kainuussa kylvetyksiä ja loisseurantaa jatkettiin varsinaisen kokeen päätyttyä. Kalojen loismäärä laski noin kolmen viikon kuluttua kokeen alusta ja samalla kuolleisuus väheni. Kaikissa altaissa tapahtunut loisten samanaikainen väheneminen viittaa siihen, että kalat kehittävät riittävän immuniteetin kolmessa neljässä viikossa. Tyyrinvirran seurannassa havaittiin myös toisen kokeen jälkeen, että loiset hävisivät kolmessa neljässä viikossa niiden ilmestymisestä. Karpilla kehittyi vastuskyky *I. multifiliis* -loista vastaan noin kolmessa viikossa 18-23°C lämpötilassa (Hines & Spira 1974). Särjellä spesifisten vasta-aineiden kehittyminen kesti noin neljä viikkoa (Aaltonen ym. 1994). Pidemmät koeajat kertoisivat enemmän loisen ja kalojen käyttäytymisestä. Kehittyneen immuniteetin on havaittu kestävän n. 8 kuukautta (Hines & Spira 1974). Olisikin tärkeää tehdä kokeita hoitamattomat kalat yhtenä kontrollina. Näin immuniteetin merkitys voidaan varmistaa. Tämä ei kuitenkaan ole mahdollista tuotanto-olosuhteissa.

4.4 Korvaavien aineiden käyttöominaisuudet

Natriumperkarbonaatti on rakeinen aine ja helposti käsiteltävissä. Se on hapettava ja nostaa altaan happipitoisuutta keskimäärin 0,4 mg/l ja tekee vahtokalvon altaan pinnalle. Per Aqua on liuos. Per Aqua puhdisti altaan pohjaa ja seinämiä levästä ja saattoi tätä kautta vaikuttaa loisinfektiota hidastavasti infektion alussa poistaen samalla pohjalla olevia loisia. Loppuvaiheessa Per Aqua ei hidastanut infektiota. Per Aqua (40 ppm) -kylvetyksissä kalat kerääntyivät poistomunkin päälle tiukkaan parveen. Per Aqualle on ominaista erittäin pistävä ja voimakas haju ja se on nopeasti hapettava aine, joten käyttäjän pitää olla huolellinen. Kaliumpermanganaattijauhe on myös hapettava aine (ks. esim. Straus & Griffin 2002). Kaliumpermanganaatti (4 ppm) tappoi huonokuntoiset ja ihovaurioiset kalat. Siitä johtui kaliumpermanganaattihoidon aiheuttama kuolleisuus Montassa. Kloramiini-T on jauhe ja sitä käytetään desinfioimiseen. Kloramiini ei ole hapettava aine. Kloramiinia on melko helppo käsitellä ja liuottaa veteen, mutta se pölyää. Kaikki nämä aineet ovat sallittuja käytettäväksi tuotantoeläimille. Kunkin aineen käytössä on sekä haittoja että etuja. Käytettävä vaihtoehto onkin mietittävä tapauskohtaisesti.

Kalat sietivät kaikkia näissä kokeissa käytettyjä aineita ja käytettyjä pitoisuuksia. Äkillisiä kalakuolemia ei ilmennyt muita kuin vähäisessä määrin käytettäessä kaliumpermanganaattia. Jatkoseurannan aikana ei tapahtunut myöskään mitään kylvetsaineisiin viittaavia kalakuolemia.

Kiitokset

Kiitokset kaikkien laitosten henkilökunnalle aktiivisuudesta, avuliaisuudesta, huolellisuudesta ja kiinnostuksesta tehtyjä kylvetyskokeita kohtaan. Maa- ja metsätalousministeriö rahoitti hanketta.

Kirjallisuus

- Aaltonen TM, Jokinen EI and Valtonen ET 1994: Antibody synthesis in roach (*Rutilus rutilus*); analysis of antibody secreting cells in lymphoid organs with ELISPOT-assay. *Fish & Shellfish Immunology* 4: 129-140.
- Bodensteiner LR, Sheehan RJ, Wills PS, Brandenburg AM & Lewis WM 2000: Flowing water: an effective treatment for ichthyophthiriasis. *Journal of Aquatic Animal Health* 12: 209-219.
- Cross DG & Hursey PA 1973: Chloramine-T for the control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet). *Journal of Fish Biology* 5: 789-798.
- Dickerson HW & Dawe DL 1995: *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). In: Woo PTK (ed) *Fish Diseases and Disorders*. Vol. 1. Protozoan and Metazoan Infections. Cab International, Wallingford, p 181-227.
- Elser HJ 1955: An epizootic of ichthyophthiriasis among fishes in a large reservoir. *Progressive Fish-Culturist* 17: 132-133.
- Hines RS & Spira DT 1974: Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* (L.). V. Acquired immunity. *Journal of Fish Biology* 6: 373-378.
- Johnson AK 1961: Ichthyophthiriasis in a recirculating closed-water hatchery. *Progressive Fish-Culturist* 23: 79-82.
- Keyl H-G & Werth G 1959: Strukturveränderungen an Chromosomen durch Malachitgrün. *Naturwissenschaften* 46: 453-454.
- Lahav M & Sarig S 1973: Observation of laboratory infection of carp by *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet. *Bamidgeh* 25: 3-9.
- Ljungberg O 1963: Report on fish diseases and inspection of fish products in Sweden. *Bulletin de l' Office International des Epizooties* 59: 111-120.
- Majeed SK, Gopinath C & Jolly DW 1984: An outbreak of white spot disease (*Ichthyophthirius multifiliis*) in young fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *J small Anim Pract* 25: 517-523.
- Matthews RA 1994. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876: infection and protective response within the fish host. In: Pike AW & Lewis JW (eds) *Parasitic Diseases of Fish*. Samara Publications Limited, Dyfed, p 17-42.
- Meyer FP & Jorgenson TA 1983: Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. *Transactions of the American Fisheries Society* 112: 818-824.
- Prost M & Studnicka M 1972: Investigations on the therapeutic value of some drugs in case of carp ichthyophthiriasis. *Medycyna Weterynaryjna* 28: 69-73.
- Rintamäki-Kinnunen P & Valtonen ET 1997: Epizootiology of protozoans in farmed salmonids at northern latitudes. *International Journal for Parasitology* 27: 89-99.
- Schachte Jr JH 1974: A short term treatment of malachite green and formalin for the control of *Ichthyophthirius multifiliis* on channel catfish in holding tanks. *Progressive Fish-Culturist* 36: 103-104.
- Straus DL & Griffin BR 2002: Efficacy of potassium permanganate in treating ichthyophthiriasis in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 14: 145-148.
- Traxler GS, Richard J & McDonald TE 1998: *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich) epizootics in spawning sockeye salmon in British Columbia, Canada. *Journal of Aquatic Animal Health* 10: 143-151.

Valtonen ET & Keränen A-L 1981: Ichthyophthiriasis of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at the Montta Hatchery in northern Finland in 1978-1979. *Journal of Fish Diseases* 4: 405-411.

Valtonen ET & Koskivaara M 1994: Relationships between the parasites of some wild and cultured fishes in two lakes and a fish farm in central Finland. *International Journal for Parasitology* 24: 109-118.

Wurtsbaugh WA & Tapia RA 1988: Mass mortality of fishes in lake Titicaca (Peru-Bolivia) associated with the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Transactions of the American Fisheries Society* 117: 213-217.

Valkopilkkutaudin torjunta: kylvetyskokeet kesällä 2002

Päivi Rintamäki-Kinnunen¹, Mika Rahkonen², Anna-Liisa Mannermaa-Keränen³, Pasi Anttila¹, Erja Konttinen³, Risto Kannel³, Anu Halttunen⁴, Veli-Matti Haukka⁴, Yrjö Lankinen⁴, Merja Partanen⁵, Vesa Rahikkala⁵, Matti Salonen⁶ & E. Tellervo Valtonen²

¹ Oulun yliopisto, biologian laitos, PL 3000, 90014 Oulun yliopisto

² Jyväskylän yliopisto, bio- ja ympäristötieteiden laitos, PL 35, 40014 Jyväskylän yliopisto

³ Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos, Kainuun kalantutkimus ja vesiviljely, Manamansalontie 90, 88300 Paltamo

⁴ Savon Taimen Oy, Äijäniementie 7, 77700 Rautalampi

⁵ Voimalohi Oy, Raasakan kalanviljelylaitos, Virkkulantie 216 C, 91100 Ii

⁶ Fortum Power and Heat Oy, Montan kalanviljelylaitos, Pyhäkoskentie 10, 91430 Leppiniemi

Tiivistelmä ja johtopäätökset

Kylvetyskokeita suoritettiin malakiittivihreän korvaavilla kemikaaleilla *Ichthyophthirius multifiliis* -loista vastaan kesällä 2002. Kokeita tehtiin neljällä kalanviljelylaitoksella eri puolella Suomea. Koekaloina olivat maa- ja betonialtaissa viljellyt lohet ja meritaimenet. Lohi oli herkempi kalalaji *I. multifiliis* -loiselle kuin taimen. Vaikka kesä oli poikkeuksellisen lämmin ja tartunnat todettiin viikkoa kahta tavallista aiemmin jopa jo kesäkuun alussa, loiset hävisivät kaloista neljän viiden viikon kuluttua tartunnan ja hoidon alusta. Useimmissa tapauksissa kuolleisuus kokeen aikana (kerätyt kuolleet) oli korkeintaan 2 %. Käytetty malakiittivihreän korvaava kemikaali esti loistilanteen kehittymisen kaloille tappavaksi, kun kaloja kylvetettiin riittävän usein. Kainuun betonialtaissa Desirox-formaliiniyhdistelmä (Desiroxia 10 ppm ja formaliinia 100 ppm = D10+F100) oli parempi kuin vetyperoksidi-formaliini (V100+F100) tai kloramiini-formaliini (K10+F100). Montan ja Raasakan maa-altaissa havaittiin suuremman formaliinipitoisuuden (50 ppm) olevan tehokkaampi torjumaan loista kuin 25 ppm joko yksistään (Montassa) tai yhdessä Desiroxin (D10) kanssa käytettynä (Raasakassa). Tyyrinvirran maa-altaissa Desirox-formaliini (D8+F123) ja kloramiini-formaliini (K8+F123) olivat teholtaan saman tasoisia. Korvaavia aineita käytettäessä loistarkkailuun on kiinnitettävä huomiota ja kylvetykset on syytä aloittaa heti kun ensimmäiset loiset havaitaan mikroskoopilla. Loistarkkailu on tehtävä nimenomaan mikroskoopilla, jotta havaitaan varhaisen vaiheen loiset, jotka eivät näy paljaalla silmällä. Tartunnan alussa kylvetyksiä on annettava riittävän usein, esimerkiksi kolme neljä kertaa viikossa. Kylvetsaineiden valinta ja kylvetystekniikat on syytä suunnitella laitospöytäkohtaisesti: altaan tyyppi (esim. maa-allas tai betoniallas) ja koko, veden laatu ja vaihtumisnopeus sekä orgaanisen aineksen määrä altaassa ovat huomioon otettavia asioita, kun etsitään sopivia aineita ja niiden pitoisuuksia. Tässä kokeessa käytetyt pitoisuudet ovat suuntaa antavia: kullakin laitoksella tulee ensin testata pienellä kalamäärällä suunnitellun kemikaalin tai aineyhdistelmän sieto. Tutkimus osoitti myös sen, että joskus saattaa olla hyödyllistä käyttää eri kylvetsaineita tartunnan eri vaiheissa.

1. Johdanto

Suomessa *Ichthyophthirius multifiliis* -loisen aiheuttaman valkopilkkutaudin hoidon tutkimus käynnistyi vuonna 1978, jolloin loinen tappoi Montan kalanviljelylaitoksella noin puolet maalammikoiden 1-vuotiaista lohista (Valtonen & Keränen 1981). Varsin pian hoidoksi vakiintui malakiitti-formaliini, jossa n. 4 g malakiittivihreää sekoitettiin litraan formaliinia, joka laimennettiin sitten 1:40 000 (Leteux & Meyer 1972). Sittemmin tällä yhdisteellä tai pelkällä malakiittivihreällä on valkopilkkutautia torjuttu Suomessa menestyksekkäästi ja suurta kuolleisuutta ei ole taudin vuoksi aiheutunut (ks. esim. Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997).

Malakiittivihreällä on kalanviljelyssä torjuttu valkopilkkutautia kautta Euroopan. Malakiittivihreän tiedetään olevan genotoksinen ja potentiaalisesti karsinogeeninen aine (Keyl & Werth 1959, Steffens ym. 1961, Werth & Boiteaux 1967, Meyer & Jorgenson 1983) ja sen käyttö on ollut Euroopan Yhteisön alueella kielletty tuotantoeläimille 1.1.1998 lähtien. Suomessa malakiittivihreän käyttö on kuitenkin poikkeuksellisesti ollut sallittua Lääkelaitoksen myöntämällä määräaikaaisella erityislupalla aluksi 1.1.2000 saakka, sitten lupaa jatkettiin 1.8.2001 saakka ja vielä kerran 30.9.2001 saakka, jotta kokeet korvaavilla aineilla ehtisivät valmistua. Malakiittivihreän käyttökielto astui Suomessa voimaan 1.10.2001.

Malakiittivihreän korvaavia kylvetysaineita on tutkittu kesällä 2000 ja 2001. Ensimmäisen kesän kokeet olivat pienimuotoisia laboratorioskokeita, joissa pyrittiin löytämään mahdolliset korvaavat kemikaalit jatkotutkimuksia varten. Testasimme useiden eri aineiden tehoa valkopilkkuloiseen. Kesän 2001 kokeissa käytetyt aineet valittiin edellisen kesän töiden pohjalta, ja kokeet suoritettiin tuotantomittakaavassa. Kesän 2002 kokeet jatkoivat tutkimussarjaa korvaavan kemikaalin löytämiseksi valkopilkkutaudin torjumiseen. Kokeet tehtiin neljällä kalanviljelylaitoksella eri puolella Suomea tuotanto-olosuhteissa. Kokeiden tarkoituksena oli löytää tehokkaita korvaavia kemikaaleja ja toimivia kylvetystekniikoita maalammikoiden kalojen hoitoon. Lisäksi pyrittiin selvittämään kylvetysten aloitusajankohta sekä oikea pituus kylvetysjaksolle. Kesän 2002 kemikaalit valittiin kahden edellisen kesän tulosten perusteella. Käyttökielto johtuen malakiittivihreää ei voitu enää käyttää vertailukemikaalina kuten kahden aiemman vuoden kokeissa. Koepaikat, kalalajit ja valitut kylvetysaineet näkyvät taulukossa 1.

Taulukko 1. Koepaikat, kalat ja kokeisiin valitut kylvetysaineet.

Koepaikka		Kalalaji (ikä)	Kylvetysaine
Savon Taimen Oy	Tyyrinvirta	Lohi (1+)	Kloramiini-T-formaliini Desirox-formaliini
Fortum Power and Heat Oy	Montta	Lohi (1+), taimen (1+)	Formaliini
Voimalohi Oy	Raasakka	Lohi (1+)	Desirox-formaliini
Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos Kainuu		Lohi (1+)	Kloramiini-T-formaliini Desirox-formaliini Vetyperoksidi-formaliini

2. Materiaali ja menetelmät

Kokeita tehtiin neljällä kalanviljelylaitoksella kesä-elokuussa 2002. Laitokset olivat Savon Taimen Oy:n Tyyrinvirran laitos Rautalammillä, Fortum Power and Heat Oy:n Montan kalanviljelylaitos Muhoksella, Voimalohi Oy:n Raasakan laitos Iissä ja Riistä- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen (RKTL) Kainuun kalantutkimus ja vesiviljely-yksikkö Paltamossa (jatkossa Tyyrinvirta, Montta, Raasakka ja Kainuu). Käytössä oli kaikkiaan 14 maa-allasta kolmella laitoksella ja 9 betoniallasta Kainuun laitoksella. Yhteensä kokeessa oli mukana 335 000 1-vuotiasta lohta ja 70 000 1-vuotiasta meritaimenta. Kylvetykset suoritettiin kahden kemikaalin yhdistelmällä, joista toinen oli aina formaliini ja toinen joko Desirox, kloramiini-T tai vetyperoksidi. Osa kokeista tehtiin pelkällä formaliinilla (Taulukko 2).

Taulukko 2. Koelaitokset, koeaika (ensimmäinen - viimeinen kylpy), veden lämpötila kokeen alussa ja lopussa sekä koeajan maksimilämpötila suluissa. Kylvetyksaineet: F = formaliini, D = Desirox, V = vetyperoksidi, K = kloramiini-T, eri aineiden pitoisuus vaihteli 10-123 ppm. Suluissa toistojen määrä. Tiheys: kalayksilöitä allasneliötä kohti (yks./m²).

Laitos	Tyyrinvirta	Montta	Raasakka	Kainuu				
Koeaika	5.6.-1.7.	19.6.-29.7.	21.6.-16.7.	8.7.-9.8.				
Veden lämpötila	19,2-17,4	18,2-20,5	19,0-20,9	18,4-17,9				
Maksimi	(20,9)	(21,0)	(20,9)	(20,5)				
		Tiheys	Tiheys	Tiheys	Tiheys			
Lohi 1+	D8+F123 (3)	67	F25 (1)	56	D10+F25 (1)	73	D10+F100 (3)	100
	K8+F123 (3)	67	F50 (1)	69	D10+F25 (1)	59	V100+F100 (3)	100
					D10+F50 (1)	73	K10+F100 (3)	100
					D10+F50 (1)	59		
Meritaimen 1+		F25 (1)	43					
		F50 (1)	47					

Aiempiä vuosina käytetty Per Aqua® korvattiin vastaavalla edullisemmalla yhdisteellä Desirox®. Desirox sisältää peretikkahappoa 12-13 %, etikkahappoa 19-20 %, vetyperoksidia 19-20 % ja rikkihappoa alle 1 %. Lisäksi jokaisella laitoksella seurattiin loistilanteen kehittymistä myös muissa kuin koealtaissa. Tuloksissa ilmoitettu kuolleisuus on laskettu koejakson aikana kerätyistä kuolleista kaloista.

2.1. Savon Taimen Oy, Tyyrinvirran laitos

Tyyrinvirran laitoksella kokeisiin valittiin kuusi pinta-alaltaan n.100 m²:n maa-allasta, joissa oli 1-vuotiaita Nevan kannan lohia. Kalat siirrettiin koealtaisiin toukokuun alkupuolella. Kalojen koko oli 160,1 mm (SD 15,7) ja 42,4 g (SD 14,0). Näitä kaloja kylvetettiin kahden aineen yhdistelmällä, jotka sisälsivät a) 8 ppm Desiroxia ja 123 ppm (1:8130) formaliinia sekä b) 8 ppm kloramiinia ja 123 ppm formaliinia. Altaiden vesitilavuus oli n. 90 m³ ja virtaama n. 18 l/s. Toistoja molemmilla seoksilla oli kolme. Kylvetykset suunniteltiin tapahtuvaksi siten, että kahtena peräkkäisenä arkipäivänä annettiin kylpy, jonka jälkeen pidettiin välipäivä ja kylvetettiin uudelleen kahdesti. Viikonloppuna kylvetyksiä ei tehty. Kemikaalitoimitusten viivästyminen aiheutti kylvetyksiin muutoksia, ja niitä jouduttiin suorittamaan suunnitelmasta poiketen eri aineilla tai ne jouduttiin jättämään pois kokonaan. Taulukossa 3 näkyvät toteutuneet kylvetysten ajankohdat ja käytetyt aineet.

Taulukko 3. Tyyrinvirran lohikokeessa suoritettut kylvetykset. D = Desirox, K = kloramiini . F = formaliini. Kemikaalien pitoisuus 8-123 ppm. Poikkeamat

<i>Allas</i>	<i>I25</i>	<i>I26</i>	<i>I27</i>	<i>I28</i>	<i>I29</i>	<i>I30</i>
Ke 5.6.	D8+F123	K8+F123	K8+F123	D8+F123	D8+F123	K8+F123
Pe 7.6.	D8+F123	K8+F123	K8+F123	D8+F123	D8+F123	K8+F123
Ma 10.6.	D8+F123	K8+F123	K8+F123	D8+F123	D8+F123	K8+F123
Ti 11.6.	D8+F123	K8+F123	K8+F123	D8+F123	D8+F123	K8+F123
To 13.6.	D8+F123	K8+F123	K8+F123	D8+F123	D8+F123	K8+F123
Pe 14.6.	D8+F123	K8+F123	K8+F123	D8+F123	D8+F123	K8+F123
Ma 17.6.	D8+F123	D8+F123	D8+F123	D8+F123	D8+F123	D8+F123
Ti 18.6.	D8+F123	ei kylpyä	ei kylpyä	D8+F123	D8+F123	ei kylpyä
To 20.6.	D8+F123	K8+F123	K8+F123	D8+F123	D8+F123	K8+F123
Pe 21.6.	D8+F123	K8+F123	K8+F123	D8+F123	D8+F123	K8+F123
Ma 24.6.	D8+F123	K8+F123	K8+F123	D8+F123	D8+F123	K8+F123
Ke 26.6.	D8+F123	D8+F123	D8+F123	D8+F123	D8+F123	D8+F123
Pe 28.6.	F123	K8+F123	K8+F123	F123	F123	K8+F123
Ma 1.7.	F123	K8+F123	K8+F123	F123	F123	K8+F123

kylvetyssuunnitelmasta on tummennettu.

Varsinaisen kokeen rinnalla tutkittiin myös 1-vuotiaita meri- ja järvitaimenia 100 m²:n, sekä 0-vuotiaita kirjolohia 100 m²:n ja 500 m²:n maa-altaista. Kyseisiä kaloja kylvetettiin eri kemikaaleilla ja pitoisuuksilla ja myös erilaisilla tekniikoilla (Taulukko 4). Altaassa 15 oli Isojoen kannan meritaimenia ja altaassa 24 Rautalammin reitin järvitaimenia (75 yks./m²) ja altaissa 20 ja 21 Ingarskilajoen kannan meritaimenia (100 yks./m²).

Taulukko 4. Tyyrinvirran meri- ja järvitaimenilla (MT ja JT) ja kirjolohilla (KL) käytetyt kylvetysaineet ja pitoisuudet sekä kylvetyspäivät. D = desirox, K = kloramiini, F = formaliini ja NPK = natriumperkarbonaatti. Kemikaalien pitoisuus 5-123 ppm.

<i>Kala ja allas</i>	<i>MT 15</i>	<i>MT 20</i>	<i>MT 21</i>	<i>JT 24</i>	<i>KL 25</i>	<i>KL 26</i>	<i>KL 62</i>	<i>KL 66</i>
Ti 4.6.					D6+F87	D6+F87	D6+F87	D6+F87
Ke 5.6.					D6+F87	D6+F87	D6+F87	D6+F87
To 6.6.	D8+F123	D10+F123	D8+F123	K10+F123				
Pe 7.7.					D6+F87	D6+F88	D6+F89	D6+F90
Ti 11.6.	D8+F123	D10+F123	D8+F123	D10+F123	siirto	siirto	siirto	siirto
To 13.6.	D8+F123	D10+F123	D8+F123	D10+F123				
Pe 14.6.	D8+F123	D10+F123	D8+F123	D10+F123	D5+F80	D5+F81	D5+F82	D5+F83
Ma 17.6.	D8+F123	D10+F123	D8+F123	D10+F123	D5+F80	D5+F81	D5+F82	D5+F83
Ti 18.6.	D8+F123	D10+F123	D8+F123	D10+F123	D5+F80	D5+F81	D5+F82	D5+F83
To 20.6.	D8+F123	K8+F123	K8+F123	D10+F123	D5+F80	D5+F81	D5+F82	D5+F83
Pe 21.6.	D8+F123	K8+F123	K8+F124	D8+F123				
Ma 24.6.					D5+F80	D5+F80	D5+F80	D5+F80
TI 25.6.	NPK44	NPK44	NPK44	NPK44				
Ke 26.6.	D8+F123	D10+F123	D8+F123	D10+F123				
Pe 28.6.	D8+F123	K8+F123	K8+F123	K10+F123				
Ma 1.7.	F123	K8+F123	K8+F123	F123				

2.2. Fortum Power and Heat Oy, Montan kalanviljelylaitos

Montan laitoksella hoidettavina kaloina olivat 1-vuotiaat Oulujoen kannan lohet ja Ii-joen kannan meritaimenet. Lohien keskipituus oli 142,1 mm (SD 22,9) ja paino 28,0 g (SD 14,2). Taimenet olivat kooltaan 158,9 mm (SD 19,4) ja 46,3 g (SD 20,2). Kalat oli sijoitettu neljään maa-altaaseen (kaksi lohi- ja kaksi taimenallasta), jotka olivat kooltaan 650-810 m² (suurin vesitilavuus 780-970 m³). Virtaama altaissa vaihteli 20-40 l/s. Kalat siirrettiin koealtaisiin toukokuun lopulla. Kylvetykset tehtiin formaliinilla 25 ja 50 ppm:n pitoisuuksilla (1:40 000 ja 1:20 000). Kokeessa yksi lohiallas ja yksi taimenallas saivat saman käsittelyn. Lohialtaaseen, joka sai laimeamman käsittelyn (F25), annettiin kokeen loppupuolella viisi kylpyä vahvemalla (67 ppm) pitoisuudella ja viimeinen kylpy 50 ppm pitoisuudella. Pieniä poikkeuksia lukuun ottamatta kalat pyrittiin kylvettämään joka toinen päivä. Hoitokylvetyksiä kokeen aikana suoritettiin yhteensä 17 kertaa lohialtaksiin ja 13 kertaa taimenaltaksiin. Kylvetykset loppuivat taimenilla 22.7. ja lohilla 29.7. (Taulukko 5).

Varsinaisen kokeen lisäksi Montassa seurattiin valkopilkuloistilannetta yhdessä lohialtaassa (3500 m²) ja meritaimenaltaassa (2300 m²) (Taulukko 5 ja 6).

Taulukko 5. Montan kylvetykset lohi- ja meritaimen altaksiin (altaat M1 ja M2 eivät kuuluneet varsinaiseen koesuunnitelmaan). F = formaliini, pitoisuus 25-67 ppm. Poikkeamat kylvetyssuunnitelmasta on tummennettu.

<i>Allas</i>	<i>M5 taimen</i>	<i>M6 taimen</i>	<i>M7 lohi</i>	<i>M8 lohi</i>	<i>M1 taimen</i>	<i>M2 lohi</i>
Ke 19.6.	F25	F25	F25	F25		
To 20.6.	F50	F50	F50	F50		F25
Ma 24.6.	F25	F50	F25	F50		F25
Ke 26.6.	ei kylpyä	ei kylpyä	ei kylpyä	ei kylpyä		
Pe 28.6.	F25	F50	F25	F50	F25	F25
Su 30.6.	F25	F50	F25	F50	F25	F25
Ti 2.7.	F25	F50	F25	F50	F25	F25
To 4.7.	F25	F50	F25	F50	F25	F25
La 6.7.	F25	F50	F25	F50		F25
Ma 8.7.	F25	F50	F25	F50	F25	F25
Ke 10.7.	F25	F50	F67	F50		F25
Pe 12.7.	F25	F50	F25	F50	F25	F25
Ma 15.7.	F25	F50	F67	F50	F25	
Ke 17.7.			F67	F50		
Pe 19.7.			F67	F50		
Ma 22.7.	F25	F50	F25	F50	F25	F25
To 25.7.			F67	F50		
Ma 29.7.			F50	F50		

Taulukko 6. Koealtaiden lisäksi Montassa ja Raasakassa tutkitut kalat kesä-heinäkuussa. F = formaliini, D = Desirox, pitoisuudet 5 ja 25 ppm.

Kala	Kanta	Ikä	Allas	Altaan koko m ²	Tiheys yks./m ²	Tutk. N	Kylpyjen määrä
Montta							
Lohi	Oulujoki	1+	Maa	3 500	25	30	11 (F25)
Meritaimen	Iijoki	1+	Maa	2 300	22	20	8 (F25)
Raasakka							
Lohi	Iijoki	1+	Maa	340	59	30	14 (D5+F25)

2.3. Voimalohi Oy, Raasakan kalanviljelylaitos

Raasakassa hoidettavina kaloina olivat 1-vuotiaat Iijoen kannan merilohet (pituus 124,6 mm, SD 23,2 ja paino 20,5 g, SD 12,9). Kylvetyskokeet tehtiin neljässä maa-altaassa, jotka olivat kooltaan 340 ja 820 m². Vesitilavuus niissä oli kokeen aikana n. 160 ja 420 m³, mikä oli kolmanneksen normaalikesien tilavuutta pienempi. Tällä parannettiin altaiden vedenvaihtoa. Virtaamat altaissa olivat n. 20 ja 35 l/s. Kalat siirrettiin koealtaisiin toukokuun lopulla. Kokeessa oli kaksi erilaista käsittelyä. Desiroxin pitoisuus oli molemmissa käsittelyissä 10 ppm, mutta formaliinipitoisuus oli joko 25 tai 50 ppm (1:40 000 ja 1:20 000). Toistoja oli kaksi käsittelyä kohden (yhdelta isolle ja yhdelle pienelle altaalle sama käsittely). Suunnitelman mukaan kalat kylvetettiin joka toinen päivä myös viikonloppuisin. Hoitokylvetyksiä suoritettiin kokeen aikana yhteensä 13 (Taulukko 7).

Lisäksi Raasakassa seurattiin lohien valkopilkkuloistilannetta yhdessä 340 m²:n maa-altaassa (Ma8), jota kylvetettiin joka toinen päivä Desirox-formaliinin pitoisuudella 5 ppm Desiroxia ja 25 ppm formaliinia (Taulukko 6 ja 7).

Taulukko 7. Raasakassa suoritettut kylvetykset ja kylvetyspäivät (allas M8 ei kuulunut varsinaiseen koesuunnitelmaan). D = Desirox, F = formaliini. Pitoisuudet 5-50 ppm.

	Allas	Ma6	Ma7	Ma9	Ma10	Ma8
Ti	18.6.					D5+F25
Pe	21.6.	D10+F25	D10+F50	D10+F25	D10+F50	D5+F25
Su	23.6.	D10+F25	D10+F50	D10+F25	D10+F50	D5+F25
Ti	25.6.	D10+F25	D10+F50	D10+F25	D10+F50	D5+F25
To	27.6.	D10+F25	D10+F50	D10+F25	D10+F50	D5+F25
La	29.6.	D10+F25	D10+F50	D10+F25	D10+F50	D5+F25
Ma	1.7.	D10+F25	D10+F50	D10+F25	D10+F50	D5+F25
Ke	3.7.	D10+F25	D10+F50	D10+F25	D10+F50	D5+F25
Pe	5.7.	D10+F25	D10+F50	D10+F25	D10+F50	D5+F25
Su	7.7.	D10+F25	D10+F50	D10+F25	D10+F50	D5+F25
Ti	9.7.	D10+F25	D10+F50	D10+F25	D10+F50	D5+F25
To	11.7.	D10+F25	D10+F50	D10+F25	D10+F50	D5+F25
La	13.7.	D10+F25	D10+F50	D10+F25	D10+F50	D5+F25
Ti	16.7.	D10+F25	D10+F50	D10+F25	D10+F50	D5+F25

2.4. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos, Kainuun kalantutkimus ja vesiviljely

Kainuun laitoksen kokeessa hoidetut kalat olivat 1-vuotiaita Iijoen kannan merilohia (pituus 116,3 mm, SD 9,1 ja paino 14,7 g, SD 4,0). Koealtaat olivat 50 m²:n kokoisia pyöreitä, kattamattomia betonialtaita, joiden virtaama oli 9 l/s ja vesitilavuus n. 60 m³. Kalat siirrettiin kasvatushallista koealtaisiin juhannuksen jälkeen 26.-27.6. Kokeessa käytettiin kalojen kylvetyksessä kolmea eri kemikaalia erikseen altaaseen lisätyn formaliinin kanssa (Taulukko 2). Kullekin kylvetyksineelle oli kolme toistoa (9 allasta). Kylvetyksiä suoritettiin yhteensä 16 kertaa. Kylvetyspäivät olivat maanantai, keskiviikko ja perjantai (Taulukko 8). Lisäksi annettiin ylimääräinen kylvetyks torstaina 1.8. Ensimmäisessä kylvetyksessä kloramiinin pitoisuus oli 14 ppm, Desiroxin 20 ppm ja vetyperoksidin 200 ppm. Se jälkeen kylvetyksiä jatkettiin laimeammilla pitoisuuksilla. Desiroxin ja kloramiinin pitoisuus oli jatkossa 10 ppm ja vetyperoksidin 100 ppm. Formaliinin pitoisuus oli läpi kokeen 100 ppm (1:10 000). Kuudennen kylvyn jälkeen yhden vetyperoksidi- ja yhden Desirox-altaan kalat kuolivat, joten niistä käsittelyistä jäi kokeeseen kaksi toistoa.

Taulukko 8. Kainuussa suoritettut kylvetykset altaittain. K = Kloramiini 10 ppm, V = vetyperoksidi 100 ppm, D= Desirox 10 ppm, F = formaliini 100 ppm, # = kalat kuolleet. Poikkeamat kylvetyssuunnitelmasta on tummennettu, 8.7. pitoisuudet K 14, D 20 ja V 200 ppm.

<i>Allas</i>	<i>610</i>	<i>611</i>	<i>612</i>	<i>702</i>	<i>701</i>	<i>703</i>	<i>713</i>	<i>714</i>	<i>716</i>
Ma 8.7.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	DF	VF	KF
Ke 10.7.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	DF	VF	KF
Pe 12.7.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	DF	VF	KF
Ma 15.7.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	DF	VF	KF
Ke 17.7.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	DF	VF	KF
Pe 19.7.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	DF	VF	KF
Ma 22.7.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	#	#	KF
Ke 24.7.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	#	#	KF
Pe 26.7.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	#	#	KF
Ma 29.7.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	#	#	KF
Ke 31.7.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	#	#	KF
To 1.8.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	#	#	KF
Pe 2.8.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	#	#	KF
Ma 5.8.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	#	#	KF
Ke 7.8.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	#	#	KF
Pe 9.8.	KF	VF	DF	VF	KF	DF	#	#	KF

Taulukko 9. Muista kuin koealtaista tutkitut kalat heinä-elokuussa Kainuun laitoksella. Kylvetykset tehtiin formaliinilla (100 ppm) 24.7. saakka ja siitä lähtien Desirox-formaliinilla (D10+F100). Lisäksi kaloille annettiin yksittäisiä kylpyjä vetyperoksidi-formaliinilla, pelkällä Desiroxilla, vetyperoksidilla tai kloramiinilla käyttäen samoja pitoisuuksia kuin yhdessä formaliinin kanssa (ks. Taulukko 2), va = vesistöalue.

Kala	Kanta	Ikä	Altaiden määrä	Altaan koko m ²	Tiheys yks./m ²	Tutk. N	Kylpyjen määrä/allas
Lohi	Iijoki	1+	6	50	100-111	230	14-18
Lohi	Simojoki	1+	9	50	77-125	415	11-13
Järvitaimen	Oulujoen va	1+	7	50	17-107	207	8-14
Järvitaimen	Oulujoen va	2+	6	50, 75	51-151	97	0-8
Meritaimen	Iijoki	1+	1	75	118	34	8
Meritaimen	Iijoki	2+	1	75	19	9	6
Purotaimen	Vaarainjoki	1+	1	50	90	10	0
Purotaimen	Vaarainjoki	2+	1	50	36	15	2
Järvilohi	Vuoksen va	1+	1	50	27	16	11
Järvilohi	Vuoksen va	2+	3	50	29-101	36	0-6
Kirjolohi	Jalostetut	0+	3	50	70-590	53	8-9
Kirjolohi	Jalostetut	1+	1	50	20	12	6

Varsinaisten koealtaiden lisäksi *I. multifiliis* -loistilannetta seurattiin näytteitä mikroskooppisesti tutkimalla säännöllisesti 40 muusta altaasta, joissa viljeltiin mm. eri taimenlajeja (Taulukko 9). Altaat olivat pääsääntöisesti 50 m²:n betonialtaita kuten varsinaisessa kokeessa.

2.5. Kylvetysten suorittaminen

Ennen uusien aineiden käyttöönottoa tehtiin jokaisella laitoksella pienimuotoisia kylvetykskoikeita turvallisten pitoisuuksien löytämiseksi. Liitteessä 1 on esimerkkinä Raasakassa ja Liitteessä 2 Kainuussa tehdyt testit. Tyyrinvirralla kylvetykset suoritettiin siten, että osa veteen laimennetuista kemikaaleista (Desirox tai kloramiini) annosteltiin tuloveden mukana ja osa suoraan altaiden reunoille. Tämän jälkeen formaliini ruiskutettiin pumpulla altaaseen. Kemikaaliseos vaikutti altaassa n. 2 tuntia. Natriumperkarbonaattijauhe levitettiin sellaisenaan taimenaltaiden reunamille. Montassa formaliini juoksettiin altaaseen tuloveden mukana. Altaiden suuri koko ja pitkä veden viipymä vaikutti kylvyn kestoon. Kemikaali vaikutti altaassa samalla laimentuen noin 10 tuntia. Raasakassa altaan vedenpintaa laskettiin 10 cm ennen kylvetystä. Tällä estettiin kemikaalia huuhtoutumasta altaasta ennen kuin allas oli täyttynyt ensin normaaliin vedenkorkeuteen, jolloin läpivirtaus jälleen alkoi. Veteen laimennettu Desirox-formaliiniseos suihkutettiin altaaseen vesipumpun avulla. Kylvetyksen viipymä altaassa oli noin 10 tuntia. Kainuussa altaan vedenpintaa laskettiin kylvetystä varten n. 30 cm:iin (normaali vesisyvyys n. 1 m). Veteen laimennettu kemikaali (Desirox, kloramiini tai vetyperoksidi) lisättiin ensin altaaseen kastelukannun avulla ja sen jälkeen formaliini samalla tavalla, minkä jälkeen tulovesiventtiili suljettiin 5 minuutiksi. Suljetulla kylvyllä tavoiteltiin halutun kemikaalipitoisuuden säilymistä kylvetyksvedessä jonkin aikaa. Sitten tulovesiventtiili avattiin ja allas täyttyi normaaliin korkeuteen. Kylvetyksen viipymä altaassa oli noin 2 tuntia.

2.6. Näytteenotto

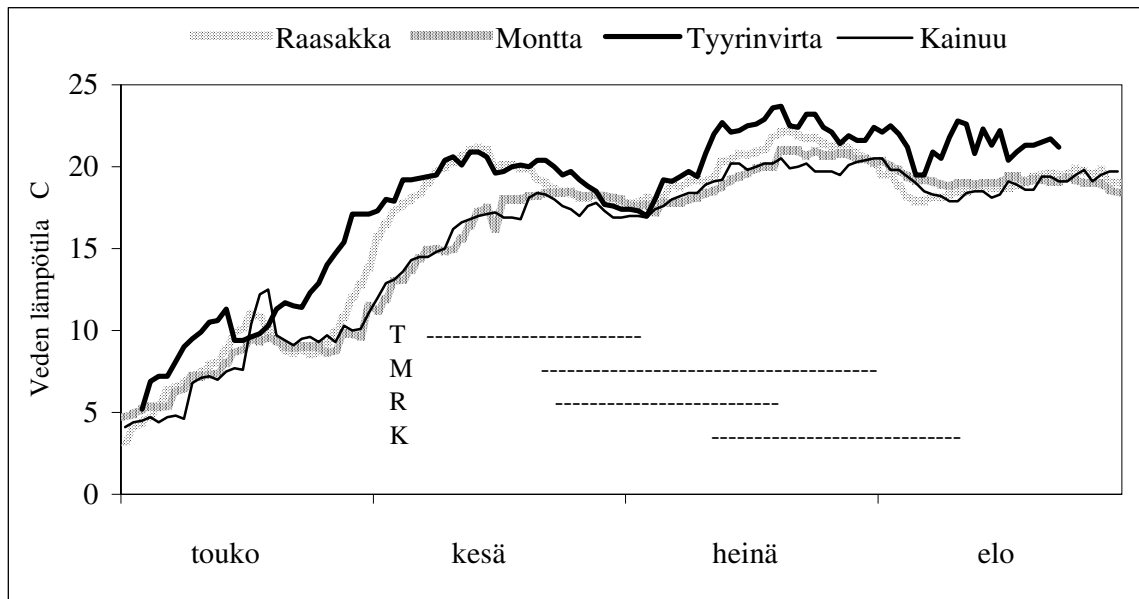
Jokaisella laitoksella näytteitä tutkittiin joka kolmannen kylvetyksen jälkeen joko samana (Tyyrinvirta, Kainuu) tai seuraavana päivänä (Montta, Raasakka). Näytekaloja otettiin kerrallaan 15 yksilöä/allas ja varsinaisen kokeen rinnalla tutkituista altaista 4-6 kalaa/tutkimuskerta. Näytekalat otettiin altaasta nuottaamalla (Tyyrinvirta) tai haavimalla (Kainuu, Raasakka). Kainuussa altaiden vedenpinta laskettiin alas näytekalojen ottamista varten. Montassa näytekalat otettiin altaasta tarkoitusta varten rakennetun erikoishaavin (liipin) avulla. Saadut näytekalat kuljetettiin vesiasiassa laboratorioon. Tyyrinvirralla ja Kainuussa kalat nukutettiin ensin MS-222-liuoksen yliannoksella 3-5 kalaa kerrallaan ja sitten loisnäyte otettiin pyyhkäisemällä preparointiveitsellä objektilasille limaa kalan toiselta kyljeltä n. 40%:n alalta. Montassa ja Raasakassa kalat tapettiin katkaisemalla selkäydin niskan kohdalta saksilla ennen limanäytteen ottamista. Näytteet tutkittiin mikroskoopilla 40-kertaisella suurennoksella (Kainuussa 38,5-50-kertainen) ja niistä laskettiin kaikki *I. multifiliis* -loiset. Jos näytteessä oli paljon loisia, laskettiin ne aina 200 asti ja sitä suuremmat määrät merkittiin 200:ksi.

2.7. Tilastokäsittely

Aineisto ei noudattanut normaalijakaumaa, joten tilastokäsittely tehtiin ei-parametrisilla testeillä. Testaamiseen käytettiin Kruskal-Wallis ja Mann-Whitney U-testiä. Kussakin koepaikassa jokaisesta kalasta otettua näytettä käsiteltiin omana tilastoyksikkönään verrattaessa eri pitoisuuksia kullakin kylvetyskerralla. Edellä mainittuja tuloksia kuvattiin mediaanilla (arvo, joka jakaa aineiston kahteen yhtä suureen osaan, ”keskimäinen” havainto) ja kvartiileilla, jotka jakavat aineiston neljään osaan, neljänneksiin. Infektio-%:lla tarkoitetaan loisittujen kalojen osuutta kaikista tutkituista kaloista. Loismäärien havainnollistamiseksi mediaanien lisäksi käytettiin myös keskiarvoa (loisten määrä tutkittua kalan iholimanäytettä kohti).

3. Tulokset

Aikaisen kevään ja kesän takia vedet lämpenivät normaalia nopeammin. Veden lämpötila ylitti 15 °C jo touko-kesäkuun vaihteessa Tyyrinvirralla ja Raasakassa ja kesäkuun 10. päivän tienoilla Montassa ja Kainuun laitoksella (Kuva 1).



Kuva 1. Veden lämpötila kokeen aikana eri laitoksilla sekä kylvetysjakson kesto katkoviivalla merkittynä Tyyrinvirran (T), Montan (M), Raasakan (R) ja Kainuun (K) laitoksilla.

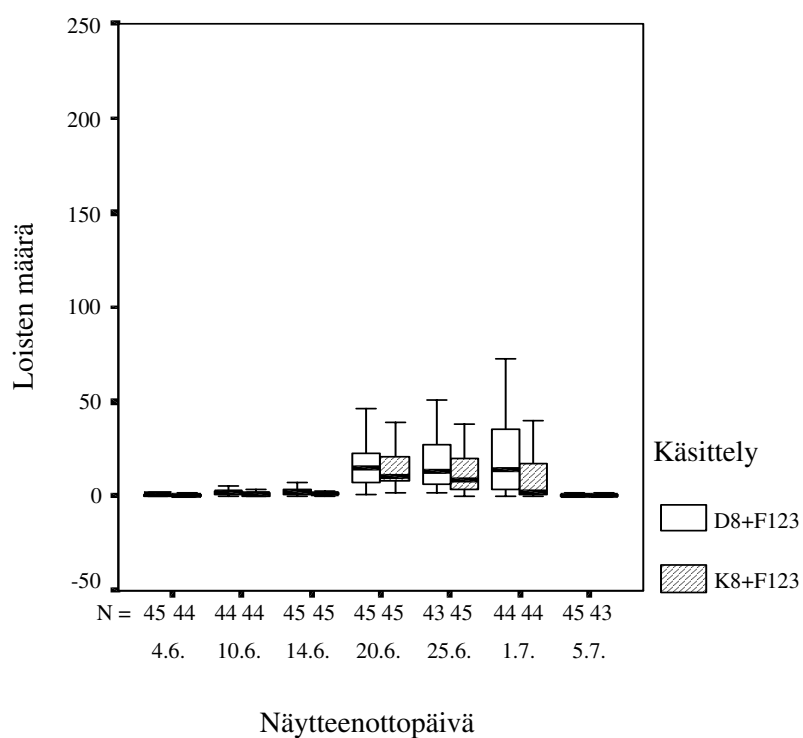
3.1. Tyyrinvirran kylvetyskokeet

3.1.1. Lohi

Koealtaiden lohista loisia löytyi jo 4.6. Kylvetykset aloitettiin seuraavana päivänä. Lähtötilanteessa loisten määrissä altaiden välillä ei ollut tilastollista eroa ja kolmen ensimmäisen näytteen loismäärä oli pieni (Kuva 2, Taulukko 10). Kloramiinin loppuminen 6. kylvyn jälkeen sekoitti kylvetyssuunnitelmaa. Seitsemäs kylpy suoritettiin Desirox-formaliinilla ja kahdeksatta kylpyä ei annettu kloramiinialtaisiin lainkaan. Loisten määrä oli hieman korkeampi Desirox-formaliinialtaissa kuin kloramiini-formaliinialtaissa (Kuva 2). Loisten määrä kokeen aikana oli kuitenkin vähäinen, ja kuolleisuus oli 1,2 % molemmissa käsittelyissä. Käsittelyiden välillä loisten määrässä ei myöskään ollut tilastollista eroa, paitsi 1.7. otetussa näytteessä (Taulukko 10). Kuvasssa 3 on esitetty koealtaiden allaskohtaiset infektiio-% ja keskiarvot tutkimusjakson aikana. Viimeinen eli 14. kylpy annettiin 1.7.

Taulukko 10. Desirox-formaliini- ja kloramiini-formaliinikäsittelyn välinen tilastollinen eroavaisuus eri näytteenottokerroilla.

<i>PVM</i>	<i>Kylpyjen määrä</i>	<i>Mann-Whitney U</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>
4.6.	alkutilanne	904,5	-0,757	0,449
10.6.	3	813,5	-1,322	0,186
14.6.	6	804,5	-1,72	0,085
20.6.	9	940,5	-0,582	0,561
25.6.	11	758	-1,751	0,08
1.7.	14	638	-2,763	0,006
5.7.	loppunäyte	879,5	-0,89	0,373

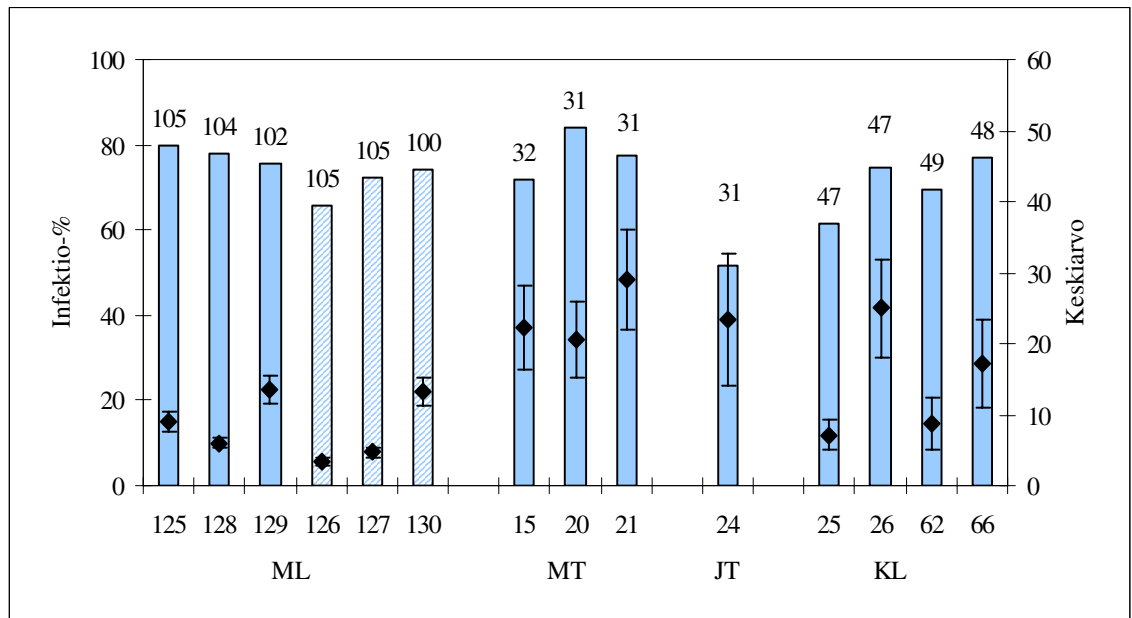


Kuva 2. Tyyrinvirran laitoksen lohien loisten määrät. Musta poikkiviiva on mediaani, sen molemmin puolin 25 % ja 75 % kvartiilit. D = Desirox, F = formaliini, K = kloramiini, 8 ja 123 ppm. N = näyttekalojen määrä kullakin tutkimuskerralla.

3.1.2. Koesuunnitelman ulkopuoliset kalat

Taimenten kylvetykset aloitettiin 6.6., kun loisia havaittiin kaloissa. Kaloja kylvetettiin 12 kertaa kesän aikana (Taulukko 4). Osalla taimenista oli runsaasti loisia (> 200 loista/näyte) (Kuva 3), mikä aiheutti kaloille vaikeuksia. Kalat kerääntyivät heikkokuntoisina altaan reunamille matalaan veteen. Natriumperkarbonaattikylvetysten vaikutus kohdistettiin altaan reunoille, missä virtaus oli kaikkein vähäisin ja mahdollisesti loispaine kaikkein suurin. Loinen aiheutti 3,3 % (kerätyt kuolleet) kuolleisuuden altaiden 20 ja 21 Ingarskilajoen meritaimenille. Isojoen meritaimenten ja Rautalammin reitin järvitaimenten (altaat 15 ja 24) kuolleisuus koejakson aikana oli 0,5 %.

Kirjolohien loismäärä oli vähäisempi kuin taimenilla (Kuva 3). Yhdessä altaassa loismäärä kuitenkin ylitti 200 kahdella kalalla 48 tutkitusta. Kirjolohet kylvetettiin kesän aikana 8 kertaa, neljä kertaa taimenia vähemmän, ja ne siirrettiin altaasta toiseen kolmen kylvetyksen jälkeen (Taulukko 4). Loiset myös hävisivät kirjolohista nopeammin kuin taimenista, noin kolmessa viikossa.



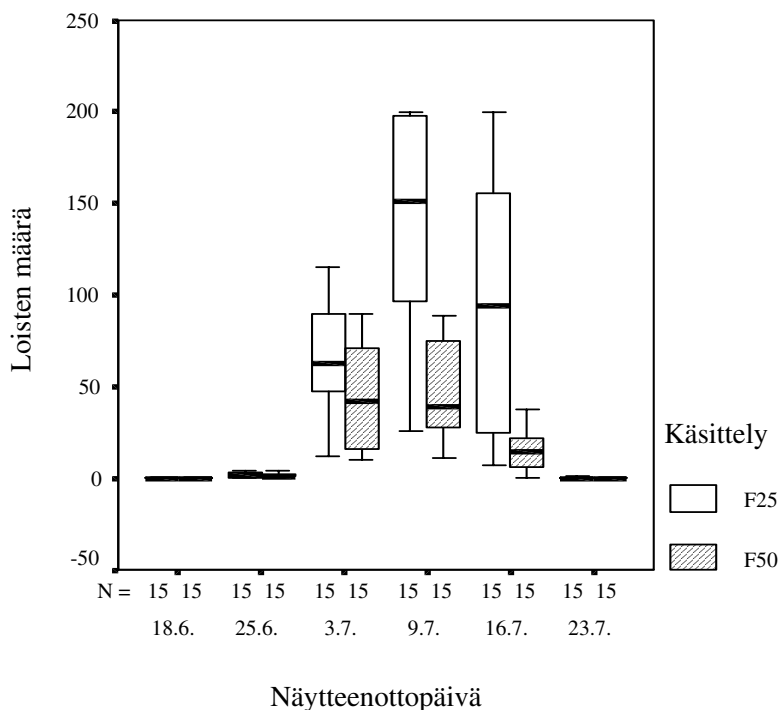
Kuva 3. Tyyrinvirralla tutkitut kalat allaskohtaisesti esitettynä (altaan numero pylvään alla, ks. taulukot 3 ja 4). Loisinnan määrä (%) on ilmaistu pylväillä ja *I. multifiliis* -loisten keskiarvo (±SE) pisteillä. ML = merilohi (koekalat, D8+F123-altaat harmaalla, K8+F123-altaat viivoitettu), MT = meritaimen, JT = järvitaimen ja KL = kirjलोhi. Tutkittujen kalojen määrä pylvään päällä.

3.2. Montan lohi- ja meritaimenkie

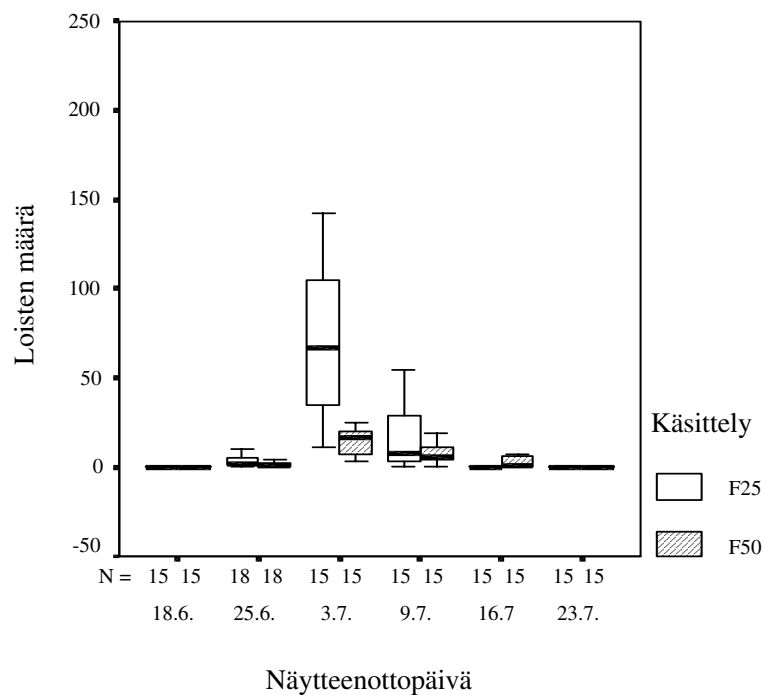
Ensimmäiset valkopilkkuloiset havaittiin 18.6. ja hoitokylvetykset aloitettiin 19.6. sekä lohi- että meritaimenaltaisiin kahdella formaliinipitoisuudella. Lähtötilanteessa loisia oli vähän. Viikon päästä kylvetyksen aloituksesta loisia oli edelleen vähän ja loistilanne lohialtaiden ja taimenaltaiden välillä oli tasainen (Kuvat 4 ja 5). Kuudennen kylvetyksen jälkeen käsittelyiden välinen ero kasvoi. Sekä lohilla että taimenilla loisia oli vähemmän väkevemmän formaliinikäsittelyn (F50) saaneissa altaissa (Kuva 4 ja 5). Yhdeksännen ja 12. kylvyn jälkeen (9.7. ja 16.7.) otetussa näytteessä ero oli edelleen

suuri lohialtaiden välillä (Kuva 4). Taimenaltaista loiset olivat lähes hävinneet 16.7. mennessä (Kuva 5), joten taimenia kylvetettiin enää vain kerran. Lohialtaissa loisia esiintyi pidempään. Koska loismäärät olivat huolestuttavan korkeita laimeamman kylvyn saaneissa lohialtaissa (M7, Kuva 6) vielä 9. kylvyn jälkeen (4/15 kalalla yli 200 loista), annettiin kaloille muutama voimakkaampi kylpy (Taulukko 5). Sekä taimenet että lohet olivat lähes loisettomia 23.7. otetussa näytteessä, viiden viikon kuluttua ensimmäisestä loishavainnosta.

Taimennäytteiden välillä ei ollut tilastollista eroa laimeamman ja väkevämmän kylvetyksen saaneilla kaloilla. Kuitenkin F25-kylvyn saaneilla lohilla oli merkitsevästi enemmän loisia kuin väkevämmän kylvyn (F50) saaneilla (Mann-Whitney $U = 5997,0$, $Z = -2,343$, $p < 0,05$) (M7 ja M8, Kuva 6). Kuolleisuus oli taimenaltaissa alhaisempi kuin lohialtaissa. F25-käsittelyn saaneissa taimenaltaissa kuolleisuus oli 0,1 %, kun taas lohilla se oli 0,7 %. Vahvemman, F50-käsittelyn saaneissa taimenaltaissa kuolleisuus oli vain 0,05 % ja lohialtaan kuolleisuus oli 0,9. Kylvetyksen jälkeen seuranta jatkettiin syyskuun lopulle saakka. Elokuun lopussa todettiin loismäärien lievä lisääntyminen sekä taimen- että lohialtaissa.

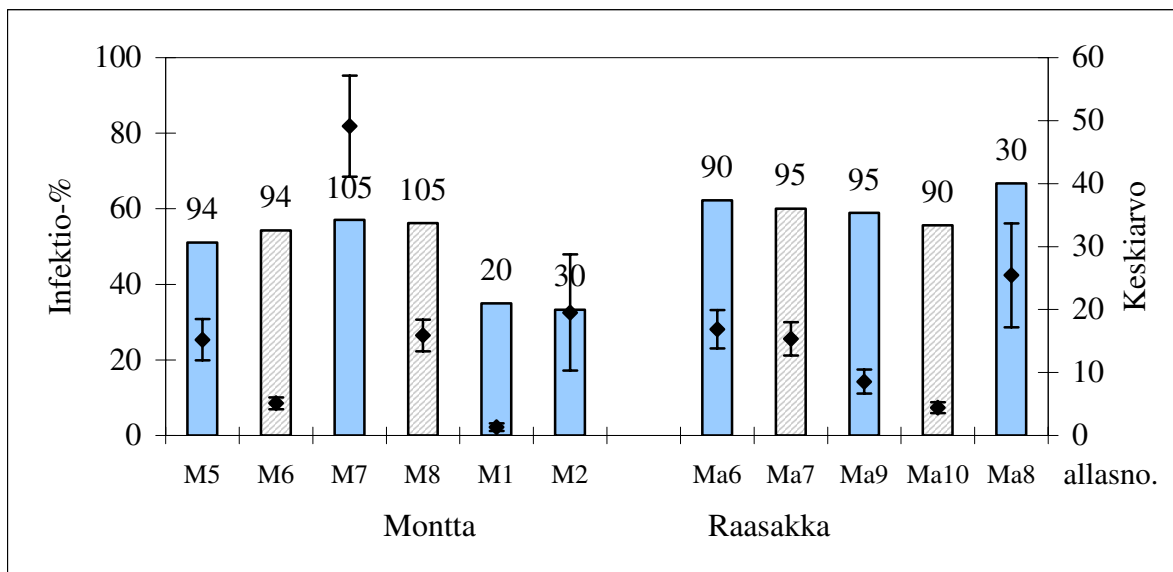


Kuva 4. Montan kokeessa olleiden lohialtaiden käsittelyiden erot. Musta poikkiviiva on mediaani, sen molemmin puolin 25 % ja 75 % kvartiilit. F25-50 = formaliinipitoisuus 25-50 ppm. N = näytekalojen määrä kullakin tutkimuskerralla.

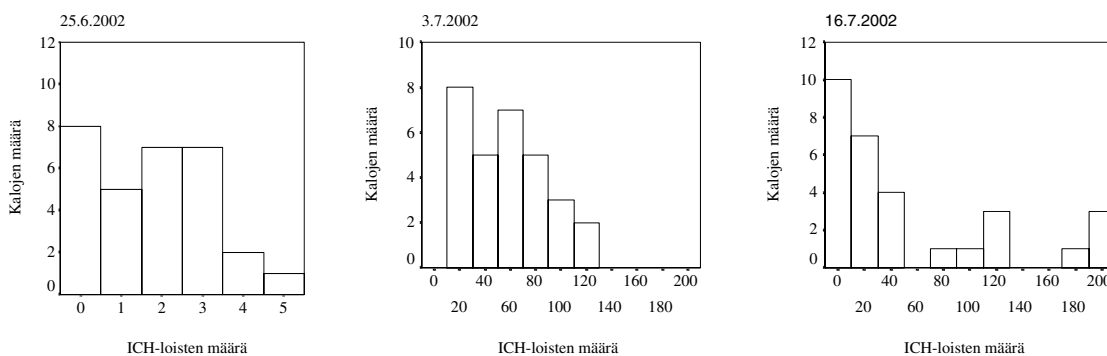


Kuva 5. Montan kokeessa olleiden meritaimenaltaiden käsittelyiden erot. Musta poikkiviiva on mediaani, sen molemmin puolin 25 % ja 75 % kvartiilit. F25-50 = formaliinipitoisuus F25-50 ppm. N = näytekalojen määrä kullakin tutkimuskerralla.

Montassa tutkittiin ylimääräisenä yhden meritaimen- (M1) ja yhden lohialtaan (M2) loistilannetta. Taimenet saivat yhteensä 8 kylpyä ja lohet 11 (Taulukko 5). Kyseisissä meritaimenissa loisia esiintyi hyvin vähän (maksimi loismäärä 11). Tulos ei kuitenkaan poikennut koealtaiden meritaimenista. Lohialtaassa loisia oli vähemmän kuin saman kylvyn saaneessa koealtaassa (Mann-Whitney $U = 1322,5$, $Z = -2,41$, $p < 0,05$) (Kuva 6).



Kuva 6. Montassa ja Raasakassa tutkitut kalat allaskohtaisesti esitettynä (varsinaisen kokeen lisäksi kaloja tutkittiin altaista M1, M2 ja Ma8). Loisinan määrä (%) on ilmaistu pylväillä ja *I. multifiliis* -loisten keskiarvo (\pm SE) pisteillä. Viivoitetut altaat saivat formaliniä 50 ppm (Raasakassa lisäksi kaikki altaat Desiroxia 10 ppm), muut 25 ppm. M5, M6 ja M1 meritaimenaltaita, muut lohialtaita. Tutkittujen kalojen määrä pylvään päällä.



Kuva 7. Loisten jakaantuminen kaloissa kokeen eri vaiheissa Montan lohilla. Näytteet kolmen (a), kuuden (b) ja 12:n (c) kylvyn jälkeen eli viikon, kahden viikon ja neljän viikon kuluttua tartunnan alusta. N = 30 kaikissa näytteissä.

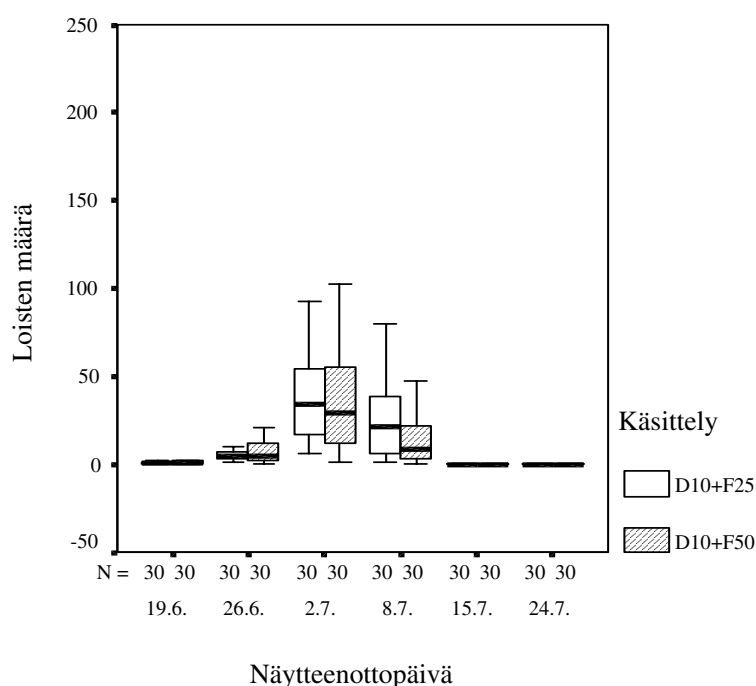
Kuvassa 7 näkyy loismäärien kehitys Montan lohialtaissa. Tartunnan alussa ja vielä muutamien kylpyjen jälkeen, eli noin viikko tartunnan alusta, kaloissa oli vain vähän loisia melko tasaisesti jakaantuneena. Tällöin oli myös loisettomia kaloja. Tartunnan keskivaiheilla, eli 2-3 viikkoa tartunnan alusta, kaikki kalat olivat loisittuja. Useimmilla oli kohtalaisesti loisia ja hyvin pieniä tai suuria loismääriä oli pienellä osalla kaloista. Noin neljän viikon kuluttua oli yleensä tilanne, jolloin tutkituissa kaloissa oli jälleen runsaasti joko loisettomia kaloja tai kaloja, joilla oli vain vähän loisia. Vielä kuitenkin löytyi kaloja, joilla oli runsaasti loisia. Viiden viikon kuluttua tartunnan ja ko-

keen alusta kalat olivat täysin tai lähes täysin loisettomia. Vastaava ilmiö oli havaittavissa kaikilla laitoksilla.

3.3. Raasakan lohikoe

Desirox-formaliinikylvetykset aloitettiin 21.6. Kolmen kylvetyksen jälkeen 26.6. käsittelyiden välisiä eroja ei ollut ja loisten määrä oli alhainen (Kuva 8, Taulukko 11). Saman käsittelyn saivat yhden ison ja yhden pienen altaan lohet. Loisten määrä oli korkeimmillaan kahden viikon kuluttua (2.7.) ensimmäisestä loishavainnosta. Käsittelyiden loismäärät eivät eronneet tilastollisesti toisistaan (Taulukko 11). Yhdeksännen kylvyn jälkeen 8.7. loismäärä oli alentunut. Vahvemman formaliinikäsittelyn (D10+F50) saaneiden altaiden kalojen loismäärä oli pudonnut laimeampaa (D10+F25) nopeammin tilastollisesti merkitsevästi (Kuva 8, Taulukko 11). 12. kylvyn jälkeen eroja ei enää esiintynyt (Taulukko 11).

Pienemmissä altaissa (Ma9 ja Ma10) D10+F50-kylvyn saaneet kalat olivat vähemmän loisittuja kuin D10+F25-kylvyn saaneet. Pienempien altaiden kalat olivat kautta linjan vähemmän loisittuja kuin suurempien altaiden kalat (Mann-Whitney $U = 14\ 661,5$, $Z = -2,47$, $p < 0,05$) (Kuva 6). Kalat kylvetettiin 13. ja viimeisen kerran 16.7, neljä viikkoa kokeen alusta. Loiset hävisivät kaloista neljän viikon kuluttua niiden ilmaantumisesta. Kuolleisuus pysyi alhaisena läpi kokeen molemmissa käsittelyissä. D10+F25-käsittelyssä se oli 0,65 % ja D10+F50 0,35 %. Loismäärien tarkkailua jatkettiin syyskuun lopulle saakka. Loisia ei enää merkittävästi esiintynyt loppukesällä, vaikka uusi lievä loismäärien lisääntyminen todettiin elokuun lopussa.



Kuva 8. Raasakan lohialtaiden loisten määrä. Musta poikkiviiva on mediaani, sen molemmin puolin 25 % ja 75 % kvartiilit. D = Desirox, F = formaliini, 10-50 ppm. N = näytekalojen määrä kullakin tutkimuskerralla.

**Taulukko 11. Raasakan lohikokeen käsittelyiden (D10+F25 ja D10+F50) väli-
nen tilastollinen tarkastelu. Pvm = näytteenottopäivä.**

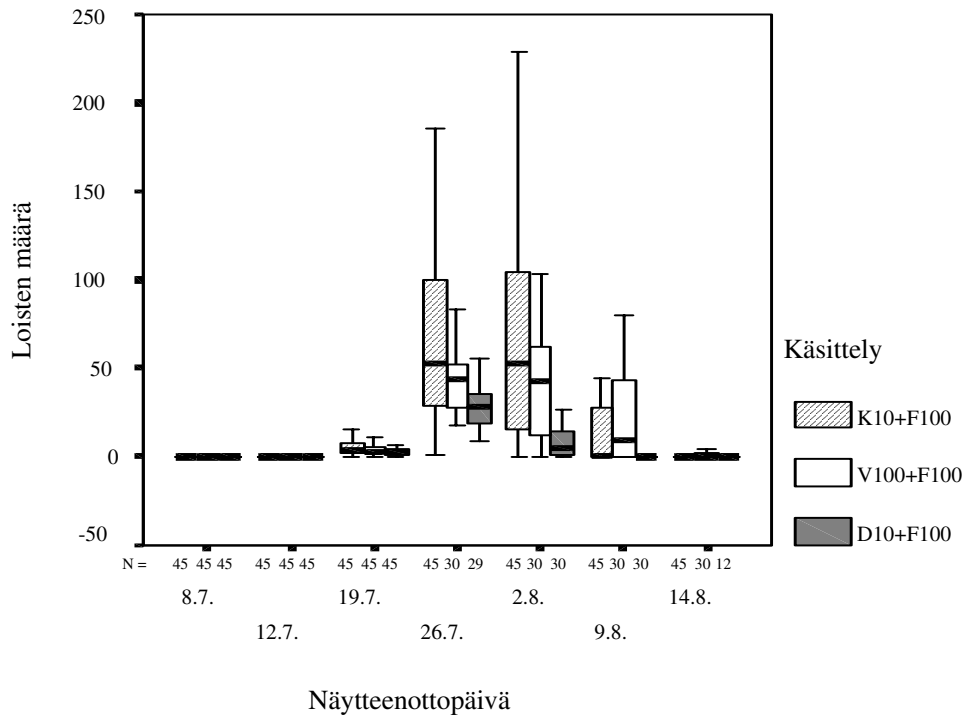
<i>PVM</i>	<i>Kylpyjen määrä</i>	<i>Mann-Whitney U</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>
19.6.	alkutilanne	442,5	-0,12	0,905
26.6.	3	408,5	-0,616	0,538
2.7.	6	428	-0,325	0,745
8.7.	9	297,5	-2,258	0,024
15.7.	12	441,5	-0,187	0,825

Varsinaisen kokeen lisäksi seurattiin loistilannetta yhdessä pienessä maa-altaasta (Ma8), jonka kaloja hoidettiin laimeammalla Desirox-pitoisuudella (D5+F25) kuin koealtaissa (D10+F25 tai 50). Kyseisen altaan kaloista löytyi suurempia loismääriä (maksimi > 200 loista/näyte) kuin saman kokoisten koealtaiden kaloista (Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 7,61$, $df = 2$, $p < 0,05$) (Kuva 6). Loiset kuitenkin hävisivät samaan aikaan kuin koealtaista, eikä kuolleisuudessa ollut eroa.

3.4. Kainuun kylvetyskokeet

3.4.1. Lohi

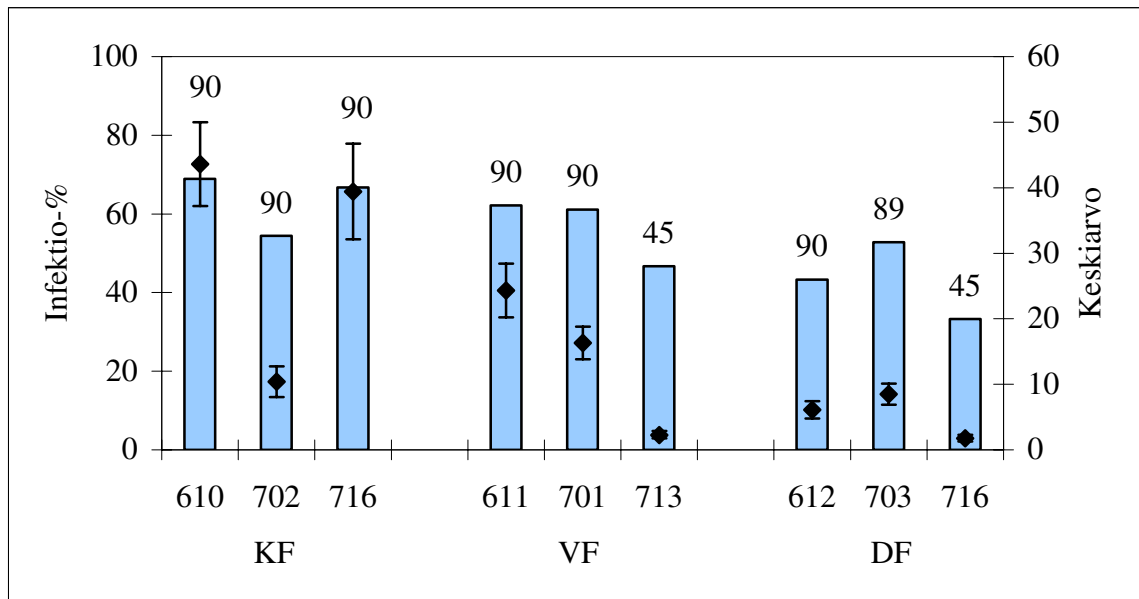
Hoitokylvetykset aloitettiin 8.7. maanantaina, jolloin loisia oli viidessä altaassa yhdeksästä. Kylvetykset menivät suunnitelman mukaisesti 6. kylpyyn asti, jonka jälkeen kahdesta altaasta kuolivat kaikki kalat. Kokeissa käytetyt kemikaalipitoisuudet eivät kuitenkaan aiheuttaneet tätä. Tutkimuksista huolimatta kuolinsyytä ei saatu selville. Kuten muissakin koepaikoissa, loisten määrä lisääntyi noin kahden viikon kuluttua tartunnan alusta (Kuva 9). Tilastollisesti D10+F100-, K10+F100- ja V100+F100-käsittelyt erosivat toisistaan merkitsevästi kuudennen kylvyn jälkeen 19.7. alkaen (Taulukko 12), jolloin D10+F100-käsittelyn loismäärä oli muita alhaisempi (Kuva 9, Taulukko 12). Kloramiini-formaliinikäsittelyssä kuolleisuus oli koejakson aikana 15,6 %, vetyperoksidi-formaliinikäsittelyssä 8,7 % ja Desirox-formaliinikäsittelyssä 1,8 % Kloramiini- ja vetyperoksidi-formaliinikäsittelyn toistojen välillä oli suurta eroa kuolleisuudessa. Esimerkiksi kolmen kloramiini-formaliinialtaan kuolleisuudet kokeen aikana olivat 1,8, 7,8 ja 37,2 %. Desirox-formaliinikäsittelyssä allaskohtaiset erot sekä kuolleisuudessa että loisten määrissä olivat pienimmät (Kuva 10). Kylvetykset lopetettiin 16. kylvyn jälkeen 9.8. perjantaina, mutta seuranta jatkettiin 28.8. asti. Osassa kloramiini- ja vetyperoksidi-formaliinialtaiden kaloja oli vielä runsaasti loisia viimeisen kylvyn (9.8.) jälkeen. Kuitenkin myös näiden altaiden kalat olivat lähes loisetomia noin viisi viikkoa kokeen alusta 14.8. (Kuva 9).



Kuva 9. Kainuun lohialtaiden loisten määrä. Musta poikkiviiva on mediaani, sen molemmin puolin 25 % ja 75 % kvartiilit. K = kloramiini, V = vetyperoksidi, D = Desirox ja F = formaliini, 10-100 ppm. N = näyttekalojen määrä kullakin tutkimuskerralla.

Taulukko 12. Kainuun laitoksen käsittelyiden (D10+F100, K10+F100 ja V100+F100) välinen tilastollinen tarkastelu (Kruskal-Wallis testi), pvm = näytteenottopäivä.

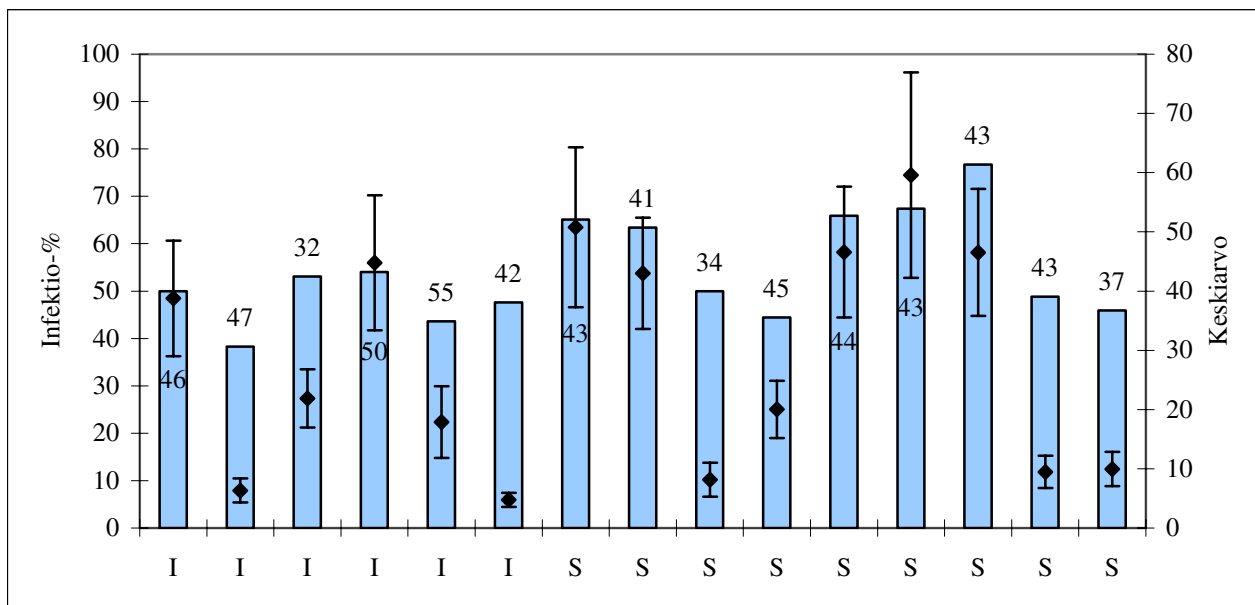
PVM	Kylpyjen määrä	χ^2	df	p
5.7.	alkunäyte	0,299	2	0,861
12.7.	3	0,234	2	0,889
19.7.	6	6,443	2	0,040
26.7.	9	14,265	2	0,001
2.8.	12	28,024	2	0,000
9.8.	15	31,739	2	0,000
14.8.	loppunäyte	10,434	2	0,005



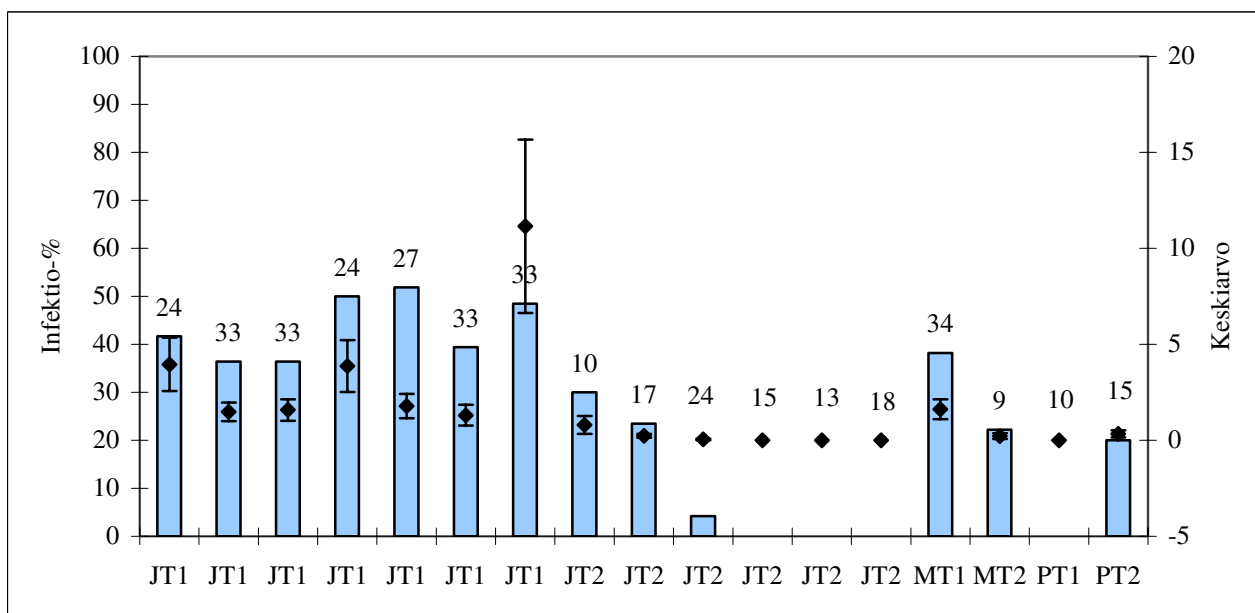
Kuva 10. Kainuun laitoksella tutkitut koekalat allaskohtaisesti esitettynä (altaan numero pylvään alla, ks. tauluko 8). Loisinnan määrä (%) on ilmaistu pylvällä ja *I. multifiliis* -loisten keskiarvo (\pm SE) tutkittua kalan iholimänäytettä kohti pisteillä. Pylvään päällä tutkittujen kalojen määrä. K, V ja D = kloramiini, vetyperoksidi ja Desirox, F = formaliini.

3.4.2. Koesuunnitelman ulkopuoliset kalat

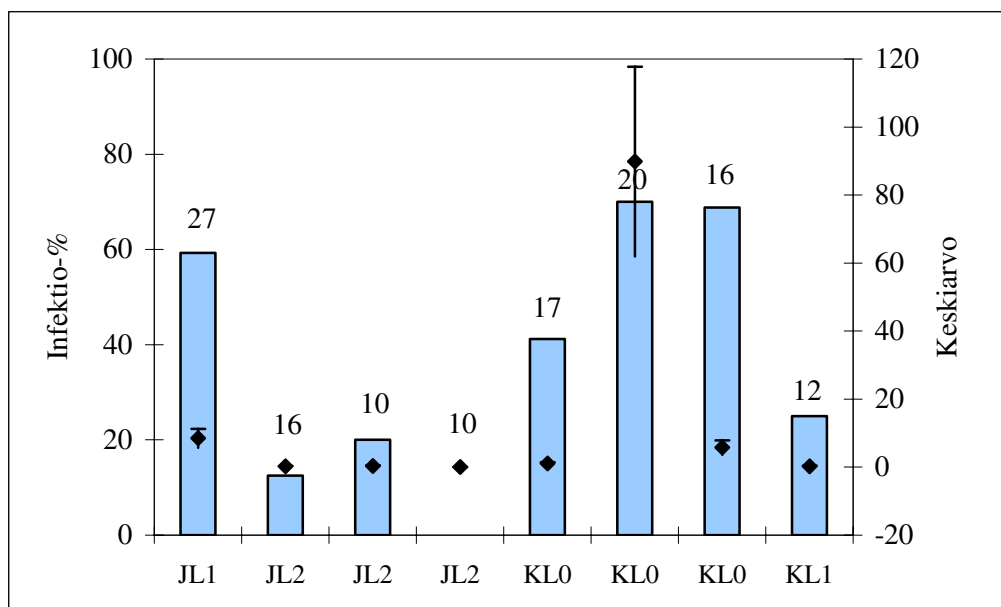
Varsinaisten koealtaiden lisäksi Kainuun laitoksella tutkittiin useiden muiden altaiden kalojen loistilanne. Simojoen kannan 1-vuotiaat lohet olivat voimakkaammin loisittuja kuin Iijoen kannan lohet (Mann-Whitney, $U = 43779,0$, $Z = -3,13$, $p < 0,01$) (Kuva 12). Iijoen kannan lohet saivat useamman kylvetyksen pelkällä formaliinilla (keskimäärin 5 kylpyä/allas) kuin Simojoen kannan lohet (keskimäärin 2 kylpyä). Desirox-formaliinikylpyjen määrässä ei ollut eroa (keskimäärin 8 kylpyä/allas). Myös saman kannan eri altaiden välillä esiintyi lohilla suurta vaihtelua tartunnan voimakkuudessa erityisesti Simojoen kannan altaissa (Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 28,75$, $df = 8$, $p < 0,001$) (Kuva 12). Iijoen kannan lohialtaiden välillä tilastollista eroa ei löytynyt kuten ei myöskään 1-vuotiaitten järvitaimenaltaiden kalojen loisinnasta (Kuva 13). Kaksivuotiailla kaloilla loisia esiintyi 1-vuotiaita vähemmän, esim. 2-vuotiailta järvitaimenilta tavattu suurin loismäärä näytteessä oli 4, meritaimenilla 1 ja järvilohilla 2 (Kuva 13 ja 14). Yhdessä 0-vuotiaiden kirjolohien altaassa esiintyi runsaasti loisia, keskimäärin 89,9 ($\pm 27,9$) loista yhdellä tutkitulla kalalla ($N = 20$) (Kuva 14). Kyseisiä kirjolohia ei kuolleet tartunnan aikana.



Kuva 12. Kainuun laitoksella tutkitut lijoen ja Simojen kannan 1-vuotiaat lohet (I ja S) altaittain. Loisinnan määrä (%) on ilmaistu pylväillä ja *I. multifiliis*-loisten keskiarvo (\pm SE) pisteillä. Tutkittujen kalojen määrä pylvään päällä.



Kuva 13. Kainuun laitoksella tutkitut 1-2-vuotiaat järvi-, meri- ja purotaimenet (JT1, MT1, MT2, PT2). Loisinnan määrä (%) on ilmaistu pylväillä ja *I. multifiliis*-loisten keskiarvo (\pm SE) pisteillä. Tutkittujen kalojen määrä pylvään päällä.



Kuva 14. Kainuun laitoksella tutkitut 0-2-vuotiaat järvi- ja kirjoloheet (JL1, JL2, KL0, KL1). Loisinnan määrä (%) on ilmaistu pylväillä ja *I. multifiliis* -loisten keskiarvo (\pm SE) pisteillä. Tutkittujen kalojen määrä pylvään päällä.

4. Tulosten tarkastelu

Kokeita malakiittivihreän korvaavan kemikaalin löytymiseksi valkopilkkutaudin hoitoon kesällä 2002 tehtiin neljällä kalanviljelylaitoksella (Tyyrinvirta, Montta, Raasakkaa ja Kainuu) kesä-heinäkuun aikana. Kokeet tehtiin maalammikoissa olevilla kaloilla Tyyrinvirralla, Montassa ja Raasakassa sekä betonialtaissa olevilla kaloilla Kainuussa. Koekaloina olivat 1-vuotiaat lohet ja meritaimenet. Testattavina kemikaaleina olivat pelkkä formaliini sekä formaliinin kanssa käytetty Desirox, vetyperoksidi tai Kloramiini-T.

4.1. Kalalajin ja kalakannan vaikutus

Montassa ja Kainuun laitoksella taimenet selvisivät loistartunnasta nopeammin ja pienemmällä loismäärillä kuin lohet. Montan koelaitosten meritaimenten loismäärät laskivat noin neljässä viikossa ja lohien loismäärät viidessä. Samanlainen tilanne havaittiin myös Kainuun laitoksen 1-vuotiailla taimenilla, joita seurattiin varsinaisen kokeen ohessa. Vaikka Kainuun laitoksen järvi-, meri- ja purotaimenet olivat lähes yhtä usein loisittuja kuin lohet, tavattiin niistä paljon alhaisempia loismääriä kalaa kohti. Vastava meritaimenten tilanne havaittiin myös Voimalohi Oy:n Ossauskosken kalanviljelylaitoksella Tervolassa: kahdeksassa maa-altaassa viljellyissä 1-vuotiaissa meritaimenissa (42 yks./ m²) loisia esiintyi noin neljän viikon ajan (keskiarvo 16,3 loista, SD 25,2, maksimi loismäärä 106, N = 35), jona aikana kalat saivat vain 1-3 kertaa 40 ppm formaliinia (Päivi Rintamäki-Kinnunen, julkaisematon tieto). Ainoastaan Tyyrinvirralla taimenten loismäärä oli pahimmillaan kymmenkertainen lohiin verrattuna. Kuitenkin Tyyrinvirralla taimenet vapautuivat loisista yhtä nopeasti kuin lohet, 4-5 viikossa. Kirjoloheet sietivät suuriakin loismääriä sekä Tyyrinvirran että Kainuun laitoksella.

Kainuussa kokeen ulkopuolisista lohialtaista havaittiin, että altaiden välillä esiintyi suurta vaihtelua loistartunnan voimakkuudessa, vaikka kalakanta, kala- ja kylvetysmäärät eivät poikenneet toisistaan. Myös lohikantojen välillä havaittiin eroja, Simojoen lohet olivat voimakkaammin loisittuja kuin Iijoen kannan lohet. Iijoen lohet saivat kuitenkin keskimäärin kolme formaliinikylpyä enemmän kuin Simojoen lohet. Myös taimenkantojen välillä havaittiin eroja Tyyrinvirralla, vaikka siellä taimenet eivät kuuluneet varsinaiseen koeohjelmaan: Ingarskilajoen meritaimenia kuoli enemmän kuin Isojoen meritaimenia ja Rautalammin reitin järvitaimenia. Viitteitä kalalajien ja -kantojen välisistä valkopilkkutaudin vastustuskyvyn eroista ovat saaneet myös Clayton & Price (1992) ja Price & Clayton (1999) tutkiessaan useita akvaariokalalajeja ja karppeja sekä Gleeson ym. (2000) tutkiessaan luonnosta pyydettyjä sateenkaarikalajoja.

4.2. Veden lämpötila ja kalojen kuolleisuus

Kevät 2002 oli lämmin ja veden lämpötila kohosi nopeasti. Tyyrinvirran vesi tulee laitokselle pintavetenä ja vedenlämpötila ylitti 15 °C:een rajan jo toukokuun lopussa. Sama lämpötila saavutettiin muilla laitoksilla kesäkuun 10. päivään mennessä. Nopeasti lämpenevällä vedellä oli selvä vaikutus loisten esiintymiseen. Jokaisella koelaitoksella valkopilkkuoloistartunta alkoi viikkoa kahta aiemmin kuin tavallisesti. Tyyrinvirralla ensimmäiset loiset koelaitoksissa havaittiin jo ensimmäisellä näytteenottokerralla 4.6., Montan ja Raasakan loiset ilmestyivät 18.-19.6. Kainuun laitoksen myöhemmin kehittyneeseen loistilanteeseen vaikutti kalojen siirtäminen ulkoaltoiin vasta kesäkuun lopulla.

Lämpötila vaikuttaa loisen elinkiertoa siten, että elinkierto nopeutuu veden lämmetessä (Bauer 1959, Ewing ym. 1986, Matthews 1994). Loiset tuottavat uuden sukupolven 8 päivässä, jos veden lämpötila on 20 °C, 3-4 päivässä 24 °C:ssa. Loisilla on myös todettu paikallisia sopeutumia, esimerkiksi lämpötilaoptimi saattaa vaihdella (Price & Clayton 1999). Pahimmat *I. multifiliis* -epidemiat ovat olleet esim. Montan ja Raasakan sekä Tyyrinvirran laitoksilla kesinä, jolloin veden lämpötila on ollut noin 17-18 °C ja korkeimmillaan noin 20 °C (Valtonen & Keränen 1981, Päivi Rintamäki-Kinnunen, julkaisematon tieto, Yrjö Lankinen, julkaisematon tieto). Tyyrinvirralla veden lämpötila kohosi kesällä 2002 yli 23 °C:een, myös Raasakassa ja Montassa todettiin korkeimpia lämpötiloja vuosiin (ylimmillään n. 22 °C heinä-elokuussa). Kuitenkaan *I. multifiliis* -määrät eivät kohonneet suurta kuolleisuutta aiheuttaviksi. Todennäköisin syy tähän on immuniteetin nopeampi kehittyminen lämpimässä, minkä ansiosta kalat pystyivät torjumaan loisia tehokkaammin (Bly & Clem 1992).

Kainuussa veden lämpötila kokeen aikana oli 18-20,5 °C. Valkopilkkutauti aiheuttikin eniten kuolleisuutta, vaikka koealtaiden kalojen kuolleisuusluvussa oli suurta vaihtelua. Vain yhdessä Kainuun laitoksen seitsemästä koealtaasta kuolleisuus nousi korkealle ja oli vajaa 40 % kokeen aikana; kolmessa koealtaassa kuolleisuus oli kuitenkin vain noin 2 %. Raasakan ja Montan koealtaiden kuolleisuus oli alle 1 % ja Tyyrinvirralla noin 1 %. Kuolleisuusluvut perustuvat kokeen aikana altaista kerättyihin kuolleisiin kaloihin. Maalammikoiden kalojen kuolleisuusluvut ovat aina epävarmempia kuin betonialtaiden, kaikkia kuolleita kaloja ei välttämättä havaita lammikon pohjalta, reunamilta tai poistosihdeiltä. Myös lokit saattavat verottaa osansa.

4.3. Kylvetysaineet, allastyypit ja kylpyjen määrä

Kainuussa havaittiin vetyperoksidin allasta puhdistava ominaisuus. Muut koealtaat likaantuivat huomattavasti. Pahiten likaantui kloramiini-formaliinilla kylvetetty allas, Desirox-formaliiniallas oli pinnaltaan limaisin. Tämä antaa viitteitä siitä, että ehkä valkopilkkutartunnan aikana onkin tarpeen käyttää eri kemikaaleja samassa altaassa riippuen tartunnan vaiheesta. Esimerkiksi tartunnan alussa, jolloin loisia on vähän, voisi käyttää vetyperoksidia, joka puhdistaa altaat, tartunnan keskivaiheilla, jolloin loisia on paljon, Desiroxia ja tartunnan lopussa kloramiinia, joka parantaa haavoja. Kokeen loppuvaiheessa havaittiin vetyperoksidi-formaliinilla kylvetetyissä altaissa verenvuotoa muutamien kalojen kiduksissa. Vetyperoksidin puhdistava vaikutus saattaa olla liian voimakas kaloille pitempään käytettyinä. Vetyperoksidi on lisäksi erittäin myrkyllistä kalalle korkeissa lämpötiloissa, esim. sen toksisuus lisääntyy 10-kertaiseksi kirjolohella, jos veden lämpötila kohoaa 7 °C:sta 22 °C:een (Rach ym. 1997). Jos puhdasta laimennettua ainetta annetaan suoraan liuoksena, niin sen reaktionopeus lienee kuitenkin nopeampi kuin jos sitä annetaan sitoutuneena esim. peretikkahappoon ja etikkahappoon.

Allastyypit ja veden orgaanisen aineen määrä vaikuttavat kylvetysaineiden tehoon. Maa-altaiden pohjaan jäävä orgaaninen aine vie tehoa hapettavilta kylvetysaineilta, joita ovat Desirox ja vetyperoksidi (ks. myös Straus & Griffin 2002). Kainuun laitoksen betoniallaskokeessa Desirox-formaliini (D10+F100) oli selvästi paras yhdistelmä. Kloramiini-formaliini (K8+F123) ja Desirox-formaliini (D8+F123) olivat teholtaan saman tasoisia Tyyrinvirran maalammikoissa, joissa orgaanisen aineksen määrä pohjalla on suurempi kuin betonialtaissa. Tulokseen saattoi vaikuttaa myös kemikaalin levitystapa ja altaan koko. Tyyrinvirralla Desiroxia ja kloramiinia valutettiin 100 m²:n maa-altaisiin sekä tuloveden mukana että altaan reunoille, kun taas Kainuussa kemikaalit levitettiin tasaisesti 50 m²:n betonialtaisiin. Ehtikö Desirox menettää tehoaan Tyyrinvirralla ennen kuin se ehti sekoittua koko maa-altaan vesimäärään, vaikka sekoittumista tehostettiin suihkuttamalla formaliini vesipumpulla altaaseen Desiroxin perään. Raasakassa em. vaikutus pyrittiin torjumaan suihkuttamalla Desirox-formaliiniseos pumpun avulla säiliöstä ympäri allasta tasaisesti sen sijaan, että kylve-

tysaineen olisi annettu levitä tuloveden mukana. Raasakassa saatiin viitteitä myös siitä, että Desiroxilla ja sen pitoisuudella olisi kuitenkin merkitystä myös maa-altaiden hoidossa. Varsinaisen kokeen lisäksi seuratussa altaassa, joka sai laimeamman pitoisuuden Desiroxia kuin koaltaat (D5+F25, koaltaissa D10+F25 tai F50), loisia löytyi enemmän kuin samankokoisissa koaltaissa. Formaliini hapettaa kuluttavana aineena saattaa myös vaikuttaa Desiroxin hapettavaa tehoa alentavasti. Tämän vaikutusta pitäisi tutkia jatkossa kuten myös optimaalista Desiroxin ja formaliinin suhdetta.

Vastausta kysymykseen, riittäisikö valkopilkkutaudin hoitoon pelkkä formaliini, haettiin Montassa. Kokeessa oli eroa F25- ja F50-pitoisuuden välillä. Väkevemmän kylvyn (F50) saaneissa kaloissa oli vähemmän loisia sekä taimenilla että lohilla. Kyseisen lohialtaan (F50) loismäärät eivät poikenneet suuresti Raasakan saman kokoisten altaiden kalojen loismääristä, vaikka Raasakassa kalat saivat formaliinin lisäksi Desiroxia. Raasakassa loiset kuitenkin hävisivät lohista viikkoa aikaisemmin kuin Montan lohista. Tähän saattoi kuitenkin vaikuttaa myös säännöllinen kylvetyksrytmi (joka toinen päivä) heti ensimmäisestä kylvystä lähtien Raasakassa. Montassa joka toinen päivä tapahtuvaan rytmiin päästiin vasta reilun viikon kuluttua ensimmäisestä kylvystä johtuen mm. kemikaalien toimitusviiveestä. Kuitenkin erityisesti Montan kokeen perusteella voidaan olettaa, että pelkkä formaliini säännöllisesti annettuna vähentää loisten määrää ja estää kuolleisuutta. Kesän kokeissa suurinta formaliinipitoisuutta (123 ppm) yhdessä Desiroxin (8 ppm) kanssa käytettiin Tyyrinvirralla, jossa myös todettiin alhaisimmat loismäärät.

Montassa varsinaisen kokeen lisäksi seuratuissa maa-altaissa, jotka olivat paljon suurempia kuin koaltaat (2300 ja 3500 m² verrattuna noin 800 m²:n koaltaisiin), loistilanne ei ryöstäytynyt käsistä ja oli jopa parempi kuin koaltaissa, vaikka altaiden kalat saivat vähemmän kylpyjä (F25). On huomattava, että ko. altaissa kalatiheys oli puolta pienempi.

Raasakan pienemmissä koaltaissa väkevemmän kylvyn (D10+F50) saaneet kalat olivat vähemmän loisittuja kuin laimeamman kylvyn (D10+F25) saaneet. Suuremmissa altaissa tätä ei havaittu. Kaiken kaikkiaan Raasakassa pienempien altaiden kalat olivat vähemmän loisittuja kuin suuremmissa altaissa olleet kalat. Pienessä altaassa myös veden viipymä on lyhyempi kuin suuressa altaassa. Raasakassa maa-altaiden vedenvaihtoa pyrittiin vielä tehostamaan laskemalla altaiden vedenkorkeus aiempia kesiä alemmalle tasolle alkukesän ja kokeen ajaksi (vesitilavuus noin kolmanneksen pienempi) ja nostamalla vedenkorkeus normaalitasolle vasta loppukesällä, jolloin kalat olivat kasvaneet isommiksi. Veden virtaaman ja vaihtumisnopeuden vaikutusta *I. multifiliis* -loisesta aiheutuneeseen kuolleisuuteen ovat tutkineet Bodenstainer ym. (2000): USA:ssa uoma-altaissa viljeltyjen pilkkupiikkimonniinien kuolevuus oli sitä pienempi mitä suurempi veden vaihtumisnopeus oli.

Tyyrinvirran laitoksella taimenia kylvetettiin myös natriumperkarbonaatilla. Näiden kylvetysten vaikutus pyrittiin kohdistamaan altaan reunoille, missä virtaus oli kaikkein vähäisin ja jonne heikkokuntoisia, voimakkaasti loisittuja kaloja oli kerääntynyt.

Montan lohilla kylpyjä jatkettiin vielä sen jälkeen, kun loismäärä oli jo selvästi pudonnut, mikä saattoi olla turhaa. Kainuussa kylvetykset lopetettiin aikaisemmin, valtaosa kaloista oli loisettomia, mutta osalla oli loisia vielä runsaasti. Silti myös Kainuussa kaikki kalat olivat lähes loisettomia viikon kuluttua kylvetysten lopettamisesta. Kriittisempi vaihe on todennäköisesti tartunnan alussa. Kesällä 2002 erällä kokeisiin kuumattomalla laitoksella valkopilkkutauti aiheutti suurta kuolleisuutta (jopa 70 % yhdessä altaassa) pyöröaltaiden 1-vuotiaille lohille (Päivi Rintamäki-Kinnunen, julkaisematon tieto). Näiden altaiden kaloja kylvetettiin vain kerran viikossa formaliinilla tai kloramiini-formaliinilla tartunnan kahden ensimmäisen viikon aikana.

Kesän 2002 kokeissa käytetyt korvaavat kemikaalit estivät useimmissa tapauksissa loistilanteen kehittymisen kaloille tappavaksi, kun kaloja kylvetettiin riittävän usein erityisesti infektioiden alussa. Kaikilla laitoksilla kylvetyksiä tehtiin kuitenkin kaksinkertainen määrä verrattuna aiempiin vuosiin, jolloin malakiittivihreä oli käytössä. Tämä

luonnollisesti nosti myös kylvetyskustannukset kaksin- tai jopa moninkertaisiksi (kalorit korvaavat kemikaalit) (ks. esimerkki Raasakasta Liite 3). Oli vahinko, että kesän 2002 kokeissa ei saatu lupaa käyttää perinteistä malakiittivihreä-formaliinia kontrollina, jolloin tuloksia olisi voitu selvemmin peilata aikaisempaan kokoemukseen valkopilkkutaudin hoidosta.

Kiitokset

Lämmin kiitos kunkin koelaitoksen henkilökunnalle. Kylvetykset ja näytteiden otot sujuivat joka laitoksella avuliaassa ja innostuneessa ilmapiirissä. Kiitokset myös Markku Juolalle (Voimalohi Oy), Mauno Liukkoselle (Savon Taimen Oy) ja Jussi Tuolokkaalle (Fortum Power and Heat Oy, nykyään Montan lohi) myönteisestä suhtautumisesta ja kannustuksesta kokeen eri vaiheissa. Tämän työn rahoitti maa- ja metsätalousministeriön kala- ja riistaosasto.

Kirjallisuus

- Bauer ON (1959) The ecology of parasites of freshwater fish and the biological basis for their control. Bulletin of the State Scientific Research Institute of Lake and River Fisheries Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem 1962, 49: 3-215.
- Bly JE and Clem LW (1992) Temperature and teleost immune functions. Fish & Shellfish Immunology 2: 159-171.
- Bodensteiner LR, Sheehan RJ, Wills PS, Brandenburg AM & Lewis WM (2000) Flowing water: an effective treatment for ichthyophthiriasis. Journal of Aquatic Animal Health 12: 209-219.
- Clayton GM & Price DJ (1992) Interspecific and intraspecific variation in resistance to ichthyophthiriasis among poeciliid and goodeid fishes. Journal of Fish Biology 40: 445-453.
- Ewing MS, Lynn ME & Ewing SA (1986) Critical periods in development of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) populations. Journal of Protozoology 33: 388-391.
- Gleeson DJ, McCallum HI & Owens IPF (2000) Differences in initial and acquired resistance to *Ichthyophthirius multifiliis* between populations of rainbowfish. Journal of Fish Biology 57: 466-475.
- Keyl H-G & Werth G (1959) Strukturveränderungen an Chromosomen durch Malachitgrün. Naturwissenschaften 46: 453-454.
- Leteux F & Meyer FP (1972) Mixtures of malachite green and formalin for controlling *Ichthyophthirius* and other protozoan parasites of fish. Progressive Fish-Culturist 34: 21-26.
- Matthews RA (1994) *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876: infection and protective response within the fish host. In: Pike AW & Lewis JW (toim.) Parasitic Diseases of Fish. Samara Publications Limited, Dyfed, s 17-42.
- Meyer FP & Jorgenson TA (1983) Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. Transactions of American Fisheries Society 112: 818-824.
- Price DJ & Clayton GM (1999) Genotype-environment interactions in the susceptibility of the common carp, *Cyprinus carpio*, to *Ichthyophthirius multifiliis* infections. Aquaculture 173:149-160.
- Rach JJ, Schreier TM, Howe GE & Redman SD (1997) Effect of species, life stage, and water temperature on the toxicity of hydrogen peroxide to fish. Progressive Fish-Culturist 59: 41-46.
- Rintamäki-Kinnunen P & Valtonen ET (1997) Epizootiology of protozoans in farmed salmonids at northern latitudes. International Journal for Parasitology 27: 89-99.
- Steffens W, Lieder U, Nehring D & Hattop HW (1961) Möglichkeiten und Gefahren der Anwendung von Malachitgrün in der Fischerei. Zeitschrift für Fischerei NF 10: 745-771.
- Straus DL & Griffin BR (2002) Efficacy of potassium permanganate in treating ichthyophthiriasis in channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health 14: 145-148.
- Werth G & Boiteaux A (1967) The toxicology of the triphenylmethane dyestuff, malachite green, as an uncoupler of oxidative phosphorylation *in vivo* and *in vitro*. Archives fur Toxicologie 23: 82-103.

Valtonen ET & Keränen A-L (1981) Ichthyophthiriasis of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at the Montta Hatchery in northern Finland in 1978-1979. *Journal of Fish Diseases* 4: 405-411.

MALAKIITIN KORVAAVIEN AINEIDEN KOEKYLVETYKSET

Liite 1

RAASAKAN KALANVILJELYLAITOKSELLA v. 2002

<p><u>Allas 1</u> Form. 50 ppm / 1:20 000 Desirox 10 ppm / 1:100 000</p>	<p><u>Allas 2</u> Form.50 ppm / 1:20 000 Desirox 15 ppm /1:66 000 <u>30 % kuolleisuus</u></p>	<p><u>Allas 3</u> Form.50 ppm / 1:20 000 Desirox 30 ppm /1: 33 000 <u>100 % kuolleisuus</u></p>	<p><u>Allas 4</u> Form.50 ppm / 1:20 000 Desirox 50 ppm /1: 20 000 <u>100 % kuolleisuus</u></p>
<p><u>Allas 5</u> Form. 25 ppm / 1:40 000 Desirox 10 ppm / 1: 100 000</p>	<p><u>Allas 6</u> Form.25 ppm / 1:40 000 Desirox 15 ppm /1: 66 000 <u>20 % kuolleisuus</u></p>	<p><u>Allas 7</u> Form. 25 ppm / 1:40 000 Desirox 30 ppm / 1:33 000 <u>100 % kuolleisuus</u></p>	<p><u>Allas 8</u> Form.25 ppm / 1:40 000 Desirox 50 ppm /1:20 000 <u>100 % kuolleisuus</u></p>

- Koe tapahtui huuhteluna altaisiin, virtaamaa ei katkaistu, mutta veden pintaa laskettiin.
- Ensimmäinen huuhtelu 11.6. ja kokeeksi annetaan toinen huuhtelu 13.6.
- Koekylvetysaltaat ovat 8 m² altaita, joissa on vettä n.20 cm.
- Jokaisessa altaassa on 20 yks. 1-v. merilohia.
- Virtaama olosuhteet yritetään saada vastaamaan maa-altaiden virtaamia.
- Huuhtelu hetkellä veden lämpötila oli 20,6 astetta ja happi n.7,2 mg/l.

13.6.2002 VR

LIITE 2

MALAKIITIN KORVAAVAT AINEET VALKOPIILKKUTAUDIN TORJUN- NASSA 2002-TUTKIMUS KOEKYLVETYKSET KAINUUSSA

Uudet kylvetsaineet ja yhdistelmät testattiin Kainuun laitoksella pienillä kalamäärillä ennen varsinaisia isojen kalaryhmien kylvetyksiä. Tutkimuksessa oli määrä käyttää kylvetsaineena kloramiinia, vetyperoksidia ja Desiroxia sekä niiden ja formaliinin yhdistelmiä. Koska yhdistelmäkylyjä ei oltu aikaisemmin käytetty, testattiin ne samoissa pitoisuuksissa, joissa niitä oli tarkoitus käyttää varsinaisessa kokeessa (KOE A).

Desirox oli laitoksella uusi aine, joten sitä testattiin tarkemmin. Desiroxista tehtiin ilman formaliinia yksi voimakkaan pitoisuuden testi (40 ppm, KOE B) ja Desirox-formaliinista lisätestejä (KOE C) eri Desirox-pitoisuuksilla (10, 20 ja 30 ppm). Kokeessa A ei ollut toistoja, kokeessa B kylpy toistettiin peräkkäisinä päivinä. Kokeessa C oli kolme toistoa peräkkäisinä päivinä. Ensimmäiset kaksi kylvetystä olivat aamupäivällä ja viimeinen kylvetys kolmannen päivän iltapäivänä.

Pvm	1.7.2002	Lt °C	17,1	O ₂ mg/litra	8,8
	2.7.2002		17,1		8,4
	3.7.2002		16,5		8,0
	4.7.2002		17,7		8,0

Koejärjestelyt: Koealtaat olivat pyöreitä 3,5 m² lasikuitualtaita kasvatushallissa.

Koekylvetykset suoritettiin lähes samalla tavalla kuin varsinaiset tutkimuskylvetykset:

Altaan vedenpinta laskettiin 10 cm:n korkeuteen. Vettä on altaassa silloin 350 litraa. Tulovesiventtiili laitettiin kiinni. Vedellä laimennettu kylvetsaine suihkutettiin kastelukannulla kauttaaltaan altaaseen. Kloramiini (jauhe) oli liuotettu vesijohtoveteen jo aikaisemmin. Ensin suihkutettiin altaaseen tutkittava aine (kloramiini, vetyperoksidi tai Desirox) ja heti perään formaliini. Kukin aine oli omassa kastelukannussaan. Vedentulo oli suljettuna 5 minuuttia, jonka jälkeen tulovesiventtiili avattiin 2 kierrosta ja allas sai täytyä itsekseen.

Koealtaissa 1-3 ja 5-7 n. 30 kpl 1-vuotiaita Iijoen kannan lohia, koealtaassa 4 20 kpl (korkean Desirox-pitoisuuden testi).

Kalojen käyttäytymistä ja kuolemista seurattiin kylvyn aikana ja sen jälkeen säännöllisin väliajoin.

KOE A

Koeallas 1 4,9 g kloramiini (14 ppm) + 35 ml formaliini (1:10 000 = 100 ppm)

Kalojen seuranta

Kuolleisuus

Kylvyn aikana	kylvyn jälkeen			seuraava aamu	Yhteensä kpl	%
ok	15 min ok	30 min ok	2 h ok	ok	0	0,0

Koeallas 2 70 ml vetyperoksidi (200 ppm = 1:5000) + 35 ml formaliini (1:10 000 = 100 ppm)

Kylvyn aikana	kylvyn jälkeen			seuraava aamu	Yhteensä kpl	%
ok	ok	30 min	2 h	ok	0	0,0

Kalojen seuranta

Kuolleisuus

Koeallas 3 3,5 ml Desirox (10 ppm) + 35 ml formaliini (1:10 000 = 100 ppm)

Kalojen seuranta

Kuolleisuus

Kylvyn aikana	kylvyn jälkeen			2.7. klo 7.30	Yhteensä kpl	%
Levottomia	ok	30 min	ok	ok	0	0,0

KOE B

Koska kuolleisuutta ei ilmennyt, seuraavaksi kokeiltiin pelkkää Desiroxia hyvin voimakkaalla pitoisuudella

Pvm 1.7.2002

Lt °C 17,1

Koeallas 4 14 ml Desirox (40 ppm)

Kalojen seuranta

Kuolleisuus

Kylvyn aikana	kylvyn jälkeen			seuraava aamu	Yhteensä kpl	%
Levottomia	ok	30 min	4 kuollutta	1 kuollut	5	13,5

Kylvetykset toistettiin kahtena peräkkäisenä päivänä, toisella kerralla ei ollut kuolleisuutta.

KOE C

Kokeiltiin eri Desirox-pitoisuuksia yhdessä formaliinin kanssa. Formaliinin pitoisuus pysyi samana.

Koe toistettiin kolmena peräkkäisenä päivänä. Ensimmäisenä ja toisena päivänä kylvyt tehtiin aamupäivällä ja kolmantena päivänä iltapäivällä. Kalat käyttäytyivät kylvyn aikana levottomasti kuten yleensä Desirox-kylvetyksissä. Kuolleisuutta ei ollut.

Koeallas 5 10 ppm Desiroxia + 100 ppm formaliinia (3 toistoa)

Kuolleita yhteensä

Kpl	%
0 kpl	0,0

Koeallas 6 20 ppm Desiroxia + 100 ppm formaliinia (3 toistoa)

Kuolleita yhteensä

kpl	%
0	0,0

Koeallas 7 30 ppm Desiroxia + 100 ppm formaliinia (3 toistoa)

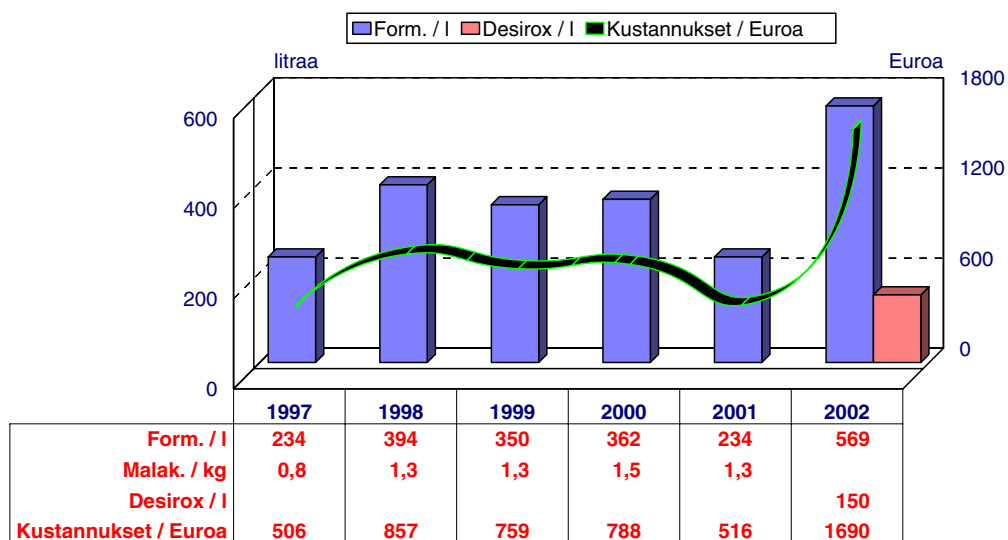
Kuolleita yhteensä

kpl	%
0	0,0

EK / A-LM-K

Raasakan kalanviljelylaitoksella valkopilkkutaudin hoitoon käytetyt kemikaalit ja niiden kustannukset vuosina 1997-2002.

RAASAKAN KVL:N KYLVETYSAINOIDEN KULUTUKSET JA KUSTANNUKSET VALKOPIHKUN HOITOON MAA-ALTAILLA VUOSINA 1997-2002



25.11.2002 MP/VR

Raportti kidusnäytteiden histologisista tutkimuksista

Perttu Koski

1. Johdanto

Kesällä 2002 Kainuun, Montan ja Raasakan laitoksilta otettiin jokaisesta koealtaasta näyte 10 kalasta kidusten histologista tutkimusta varten ennen kylvetysten aloittamista ja niiden päättymisen jälkeen. Montasta ja Raasakasta otettiin lisäksi näytteet kylvetysten aikana. Tutkimuksella pyrittiin selvittämään, vaurioittavatko kylvetysaineet kiduksia ja onko eri aineiden välillä eroja. Tutkimuksessa selvitettiin myös mahdollisia eroja eri kylvetysaineiden tehossa kiduksilla todettuun valkopilkkutautitartuntaan.

2. Aineisto ja menetelmät

Kaikkiaan näytteitä otettiin neljästä Montan, neljästä Raasakan ja yhdeksästä Kainuun kalanviljelylaitoksen altaasta (Taulukko 1).

Taulukko 1. Koelaitokset, koeaika (ensimmäinen - viimeinen kylpy). Kylvetysaineet: F = formaliini, D = Desirox, V = vetyperoksidi, K = kloramiini, pitoisuus 10-100 ppm. Suluissa altaiden numerot.

Laitos Koeaika	Montta 19.6.-29.7.	Altaan koko m ²	Raasakka 21.6.-16.7.	Altaan koko m ²	Kainuu 8.7.-9.8.	Altaan koko m ²
Lohi 1+	F25 (M7)	810	D10+F25 (Ma6)	820	D10+F100 (J612, J703, J713)	50
	F50 (M8)	650	D10+F25 (Ma9)	340	V100+F100 (J611, J702, J714)	50
			D10+F50 (Ma7)	820	K10+F100 (J610, J701, J716)	50
			D10+F50 (Ma10)	340		
Meritaimen 1+	F25 (M5)	810				
	F50 (M6)	750				

Valkopilkkutaudin hoitokokeiden yhteydessä otettiin jokaisesta histologiseen tutkimukseen valitusta kalasta vasemman puolen ensimmäinen kiduslehti formaliiniin. Näytteenottoajankohdat eri kalanviljelylaitoksilla olivat seuraavat:

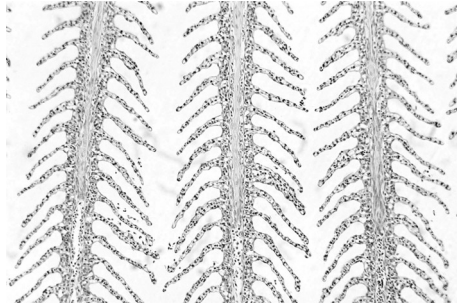
Kalanviljelylaitos	Ennen kylvetyksiä	Pvm.	Kylvetysten aikana	Pvm.	Viim. kylv. kerran jälk.	Pvm.	Huom.
Kainuun kalantutkimus ja vesiviljely	10 vrk	28.6.	Ei otettu		Samana päivänä	9.8.	Altaista J713 ja J714 kuolivat kaikki kalat 26.7. ja näyte otettiin silloin.
Montan kvl	7 vrk	11.6.	6. kerran jälkeen	3.7.	MT: Seur. päivänä ML: 2 vrk kuluttua	MT: 23.7. ML: 31.7.	
Raasakan kvl	9 vrk	12.6.	6. kerran jälkeen	2.7.	8 vrk kuluttua	24.7.	

Kidusten muutosten arvostelussa otettiin huomioon vain lamellien puoleinen osa kiduksista, muutoksia tai loisia, jotka havaittiin siivilähampaiden puolella, ei siis otettu huomioon. Aivan kaikista kiduslehdistä ei onnistuttu saamaan riittävän suurta leikettä ja tällaiset kidukset jätettiin pois. Kaikkiaan tutkittiin 375 kalan kidusnäyte. Tietystä altaasta otettujen näytteiden määrä vaihteli 8-10/näytteenottokerta. Kidusta arvostellessa ei tiedetty, mihin ryhmään se kuului. Tiedossa oli ainoastaan se, mistä kalanviljelylaitoksesta peräisin näyte oli.

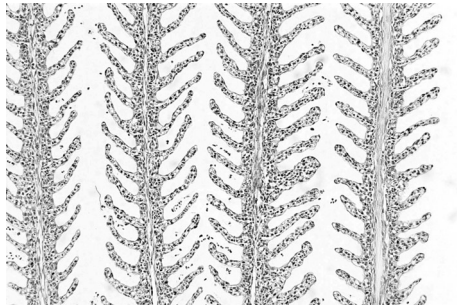
Kiduksista tutkittiin leikkeessä näkyvien valkopilkkutrofonttien lukumäärän lisäksi seuraavat muutokset:

Yleinen hyperplasia:

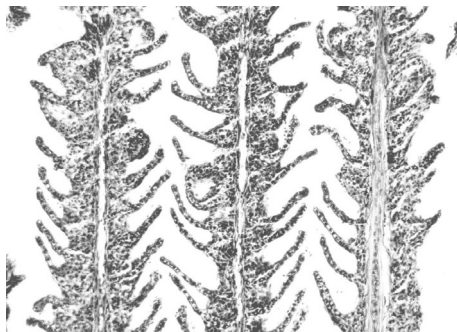
Arvosteluasteikko käy ilmi alla olevista kuvaesimerkeistä:



0: Ei lainkaan

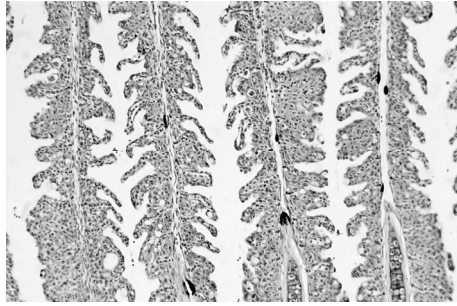


1: Hyvin vähäistä, vain alle kolmasosassa primaarilamelleja esiintyvää.

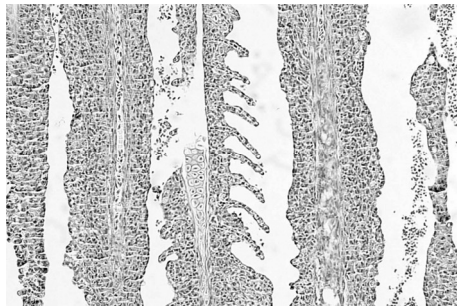


2. Enemmän kuin edellisessä, mutta reagoineissa sekundaarilamelleissa reagoineet, alle 1/3 lamellien pituudesta hyperplasioitunut. Joukossa voi olla primaarilamelleja, joissa ei havaita muutoksia.

3: Jokseenkin kaikki primaarilamellit reagoineet, mutta ainakin 1/2 sekundaari lamellien pituudesta vielä normaaleja.



4: Suurimmassa osassa sekundaarilamelleja vähemmän kuin $\frac{1}{2}$ lamellien pituudesta paksuuntumatta.



5: Kidusten sekundaarilamellien välit jokseenkin umpeen kasvaneet.

Pesäkkeinen hyperplasia:

Vain sellainen pesäkkeinen hyperplasia, joka ei ympäröinyt valkopilkkutrofontteja, otettiin huomioon.

0: Ei lainkaan.

1: 1-2 pesäkettä/kiduslehti.

2: Kohtalaisesti tai suurigranuloomaisia.

3: Paljon.

Lisäksi arvosteltiin sekundaarilamellien yhteenliimautumisen, kuolioiden ja teleangiectasian esiintymisen aste. Koska näitä muutoksia havaittiin vain yksittäisissä leikkeissä, ei niitä käsitellä raportissa. Lisäksi osassa kidusnäytteitä todettiin *Aeromonas salmonicida* -tartunnalle tyypillisten pesäkkeiden esiintymistä. Niiden esiintymistä ei myöskään käsitellä tässä raportissa.

Tulosten tilastollisessa käsittelyssä käytettiin eiparametrisiä testejä, koska parametrisien testien edellytykset eivät yleensä täytyneet.

3. Tulokset

3.1 Kainuun kalantutkimus ja vesiviljely

3.1.1. Ichthyophthirius multifiliis -loisten esiintyminen kidusleikkeissä

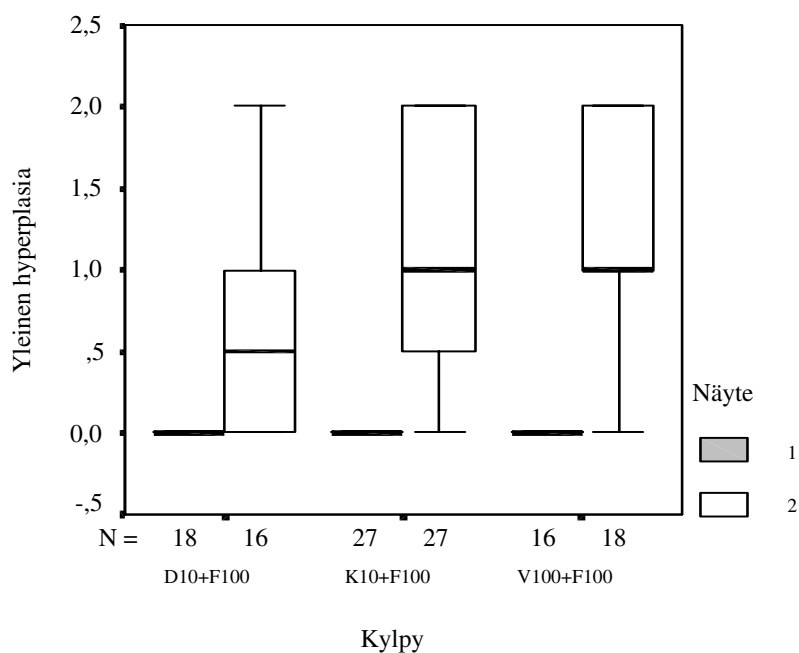
Ennen kylvetyksien aloittamista otetuista näytteistä ei valkopilkkuloisia todettu.

Altaista J713 (vetyperoksidi-formaliiniseoksella kylvetetty) ja J714 (Desirox-formaliiniseoksella kylvetetty) otetuista näytekiduksista pystyttiin kudosten voimakasta autolyysimuutoksista huolimatta laskemaan valkopilkkufonttien lukumäärät: al-
las J713 mediaani 5 loista (minimi 0 ja maksimi 13 loista/kiduslehti) ja J714 3 (0-11) -
tulokset 16 vrk kylvetyksen aloittamisesta (9. kylvyn jälkeen). Muiden altaiden toiset
näytteet otettiin 31 vrk:n kuluttua ensimmäisestä kylvetyksestä (15. kylvyn jälkeen).
Kaikissa näissä altaissa mediaani oli 0 (loisia havaittiin vain kolmessa altaan J701 ja
yhdessä altaan J610 kalassa). Kruskall-Wallis testin perusteella ($p < 0,05$) voisi ajatel-
la, että joku käsittelyistä olisi ollut toisia parempi tai huonompi, mutta parittaisissa ti-
lastollisissa vertailuissa ei tällaista vertailuparia löydetä. Ylipäänsä 31 vrk:n kuluttua
ensimmäisestä kylvetyksestä otetuissa näytteissä havaittu kidusinfektion aste oli vä-
häinen, joten johtopäätöstä eri aineiden välisistä tehoeroista ei voida perustellusti teh-
dä.

3.1.2. Yleisen hyperplasian esiintyminen kidusleikkeissä

Altaiden J713 ja J714 tulokset jätettiin pois tarkastelusta myös ennen kylvetystä otet-
tujen näytteiden osalta. Mukaan tuli siten kaikkiaan seitsemän altaan näytteet.

Kylvetystä edeltävissä näytteissä ei yleistä hyperplasiaa havaittu juuri lainkaan. Vain
kolmen kalan näytteissä tutkituista 61:stä havaittiin vähäistä yleistä hyperplasiaa,
muissa ei lainkaan. Em. kolme kalaa olivat kaikki eri altaista. Tarkasteltaessa viimei-
sen kylvetyksen jälkeen otettuja näytteitä, havaittiin kaikkien kolmen käsittelyn saa-
neissa ryhmissä tilastollisesti merkitsevä yleisen hyperplasian lisääntyminen (Desirox-
formaliiniseoksella kylvetetyissä $p < 0,05$, muissa $p < 0,001$; Mann-Whitneyn testi,
Bonferroni-korjaus). Yleisen hyperplasian aste oli kuitenkin edelleen korkeintaan koh-
talainen ja käsittelykohtaiset mediaanit olivat 0,5-1 (Kuva 1). Koska tilanne ennen
kylvetyksiä oli hyperplasian osalta kaikilla käsittelyillä samanlainen, testattiin myös
31 vrk kylvetyksen aloittamisen jälkeinen tilanne Kruskall-Wallis testin ($p < 0,05$) ja
Mann-Whitneyn testeillä. Ero parittaisessa vertailussa Desirox-formaliinilla ja vetype-
roksiidi-formaliinilla kylvetettyjen välillä oli tilastollisesti merkitsevä ($p < 0,05$, Bon-
ferroni-korjattu arvo). Muiden vertailuparien välillä tilastollisesti merkitsevää eroa ei
havaittu.



Kuva 1. Yleisen kidusepiteelihyperplasian esiintyminen Kainuun laitoksen kidusleikkeissä eri aineilla kylvetetyillä kaloilla. Laatikossa oleva paksu viiva ilmoittaa mediaanin ("keskimäinen arvo"), laatikko sen yläpuolisen $\pm 25\%$:n, janat korkeimman ja alimman 25% :n arvojen sijainnin. D = Desirox, F = formaliini, K = kloramiini, V = vetyperoksidi, pitoisuus 10-100 ppm.

3.1.3. Pesäkkeisen hyperplasian esiintyminen kidusleikkeissä

Koska altaiden J713 ja J714 kylvetysten alkamisen jälkeisiä näytteitä ei voitu analysoida, ei muidenkaan altaiden näytteissä havaitun pesäkkeisen hyperplasian tarkastelua tehdä. Pesäkkeinen hyperplasia on lähinnä loisten aiheuttamaa ja valkopilkku- tai muita hyperplasiaa aiheuttavia loisia havaittiin muiden altaiden kaloissa melko vähän.

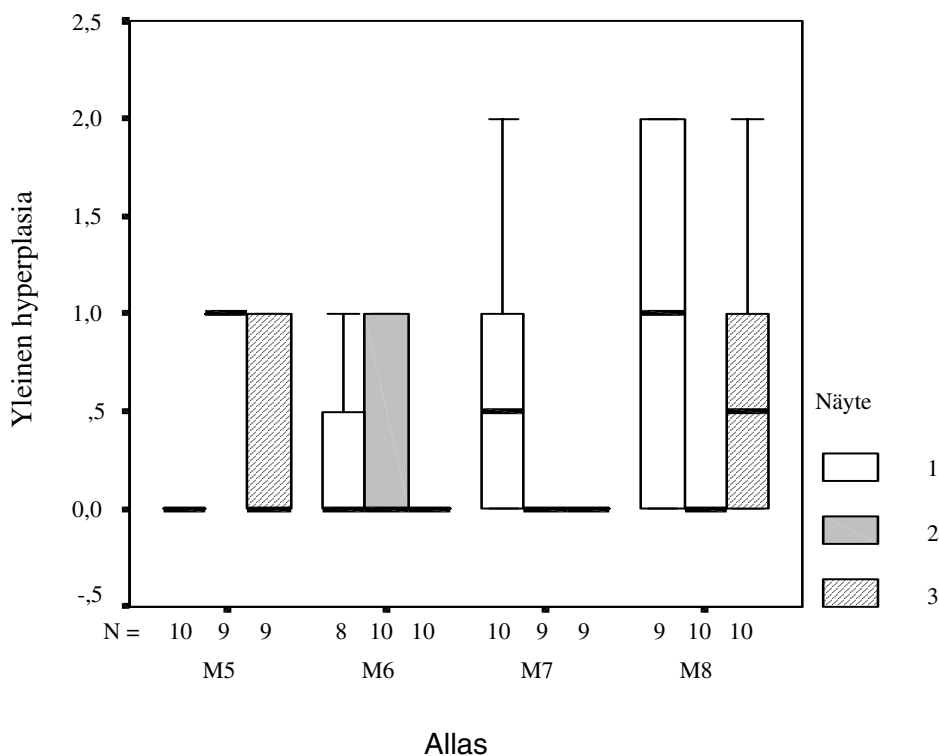
3.2. Montan kalanviljelylaitos

3.2.1. *Ichthyophthirius multifiliis* -loisten esiintyminen kidusleikkeissä

Ennen kylvetystä otetuissa näytteissä ei loisia havaittu.

Kuudennen kylvyn jälkeen otetuissa näytteissä havaittiin valkopilkkuoloisia seuraavia lukumääriä: Meritaimenallas M5 mediaani 1 loinen (minimi 0 ja maksimi 5 loista/kiduslehti), meritaimenallas M6 0 (0-1), lohiallas M7 4 (0-9) ja lohiallas M8 3,5 (0-13). Mann-Whitneyn testin perusteella tilastollisesti merkitsevä ero ($p < 0,05$) havaittiin meritaimenaltaiden välillä. Laimeammalla formaliinikylvetyksellä olleiden taimenten kiduksissa havaittiin enemmän loisia. Lohialtaiden välillä vastaavaa eroa ei havaittu.

1-2 vrk viimeisen kylvetyksen jälkeen otetuissa kidusleikkeissä ei havaittu valkopilkuloisia lukuun ottamatta yhtä kalaa altaasta M5, jonka näytteessä havaittiin 1 loinen.



Kuva 2. Yleisen kidusepiteelihyperplasian esiintyminen Montan laitoksen kidusleikkeissä eri formaliinipitoisuuksilla kylvetetyillä kaloilla kolmella eri näytteenotokerralla (ennen kylvetyksiä, 6. kylvyn jälkeen ja viimeisen kylvyn jälkeen). Altaat M5 (meritaimen) ja M7 (lohi): formaliini 25 ppm ja altaat M6 (meritaimen) ja M8 (lohi) formaliini 50 ppm. Ks. selitykset Kuva 1.

3.2.2. Yleisen hyperplasian esiintyminen kidusleikkeissä

Yleisen kidusepiteelihyperplasian esiintyminen eri altaissa oli melko vähäistä, kuten kuvasta 2 käy ilmi. Kun verrataan peräkkäisten näytteenottojen allaskohtaisia tuloksia, ei missään altaassa voida havaita tapahtuneen tilastollisesti merkitseviä muutoksia (Mann-Whitney testi, $p > 0,05$).

3.2.3. Pesäkkeisen hyperplasian esiintyminen kidusleikkeissä

Pesäkkeistä hyperplasiaa ei havaittu lainkaan tai se oli vain vähäistä (aste 1) kahta kidusleikettä lukuunottamatta. Näissä eri altaiden ja näytteenotokertojen kaloissa pesäkkeisen hyperplasian aste arvioitiin olevan 2. Vähäisen esiintymisen takia ei pesäkkeisen hyperplasian esiintymisen tarkempaa analyysia Montan näytteistä tehdä.

3.3. Raasakan kalanviljelylaitos

3.3.1. *Ichthyophthirius multifiliis* -loisten esiintyminen kidusleikkeissä

Ennen kylvetyksiä otetuissa näytteissä ei loisia havaittu.

Kuudennen kylvyn jälkeen havaittiin loisrakenteita seuraavia lukumääriä eri altaista otetuissa näytteissä: Allas Ma6 mediaani 0 loista (minimi 0 loista ja maksimi 3 loista/kiduslehti), Ma7 2 (0-8) loista/kiduslehti, Ma9 1 (0-2) ja Ma10 0 (0-1) loista/kiduslehti. Kruskal-Wallis testin perusteella allaskohtaiset tulokset eroavat merkitsevästi toisistaan ($p < 0,05$), mutta koska äärevimmät altaat Ma7 (eniten loisia) ja Ma10 (vähiten loisia) olivat saaneet saman käsittelyn, ei käsittelyllä voida tämän perusteella sanoa olleen vaikutusta kidusleikkeissä havaittuihin loisten määriin. Kun yhdistetään isot (Ma6 ja Ma7) ja pienet (Ma9 ja Ma10) altaat omiksi ryhmikseen ja verrataan ryhmiä toisiinsa, ei ero näidenkään välillä ole tilastollisesti merkitsevä (Mann-Whitneyn testi, $p > 0,05$).

Loisia ei havaittu lainkaan 8 vrk viimeisen kylvetyksen jälkeen otetuissa näytteissä.

3.3.2. Yleisen hyperplasian esiintyminen kidusleikkeissä

Yleistä hyperplasiaa havaittiin lievänä kaikissa koealtaissa. Ainoan kerran allaskohtainen mediaani nousi nolaa korkeammaksi 2.7. (kuuden kylvyn jälkeen) altaasta Ma6 otetuissa näytteissä (mediaani 0,5). Missään altaassa ei peräkkäisten näytteenotokertojen tulokset kuitenkaan eronneet tilastollisesti merkitsevästi toisistaan (Mann-Whitneyn testi, $p > 0,05$).

3.3.3. Pesäkkeisen hyperplasian esiintyminen kidusleikkeissä

Ennen kylvetystä otetuissa näytteissä ei pesäkkeistä hyperplasiaa havaittu. Tämä on heijastuma koko aineistossa havaitusta *Ichthyophthirius multifiliis* -loisten lukumäärän ja pesäkkeisen hyperplasian asteen välisestä korrelaatiosta (Spearmanin korrelaatio $\rho = 0,33$, $p < 0,001$, $N = 106$). Todennäköisesti pesäkkeisesti esiintyvä hyperplasia on suuressa määrin valkopilkkuloisten aiheuttama.

Kuudennen kylvyn jälkeen pesäkkeisen hyperplasian aste oli altaittain seuraava (mediaani ja vaihteluväli): Ma6 0,5 (0-2); Ma7 1 (0-2); Ma9 1 (0-1) ja Ma10 1 (0-2). Tilastollinen ero ennen kylvetystä vallinneeseen on merkitsevä kaikissa altaissa (Mann-Whitneyn testi, $p < 0,05$). Kruskal-Wallis testin perusteella missään altaassa kidusten pesäkkeisen hyperplasian aste ei eroa muista merkitsevästi.

8 vrk viimeisestä kylvetyksestä otetuissa näytteissä oli pesäkkeisen hyperplasian aste selvästi pienenemässä. Kaikissa altaissa mediaani oli nolla ja maksimiarvo korkeintaan 1.

4. Yhteenveto havainnoista

- Kaikissa koealtaissa todettiin kylvetysten aikana otetuissa näytteissä valkopilkkuloisia kiduksilla Montan ja Raasakan kalanviljelylaitoksilla. Kainuun laitoksella ei kylvetysten aikaista näytteenottoa tehty, mutta iholimanäytteistä loisia todettiin kaikista koealtaista. Tämä osoittaa, että jokaiseen koealtaaseen tuli valkopilkkuinfektio. Kaikkien koealtaiden (lukuun ottamatta kahta Kainuun laitoksen allasta, joista kalat kuolivat) kidusnäytteissä oli kylvetysten päätyttyä hyvin vähän loisia. Näyttää siltä, että kylvetysten avulla saatiin kidusinfektio paranemaan. Kylvettämättömien kontrollien puute tekee johtopäätöksen jossain määrin epävarmaksi.
- Eri kylvetysten tehon vertailu on vaikeaa, mutta seuraavat huomiot kidusinfektion voimakkuudesta voidaan kirjata:
Raasakka: Vertailussa yhdistelmien D10+F25 ja D10+F50 välillä ei todettu eroa lohella.
- Montta: Vertailussa formaliinin 25 ppm ja 50 ppm pitoisuuden välillä ei lohella todettu eroa, mutta meritaimenella vahvemmalla liuoksella saatiin hieman parempi teho.
Kainuu: Kokeessa formaliinin (100 ppm) ja kolmen muun aineen sekoitusten välillä ei havaittu eroa lohella.
- Kaikissa koealtaissa todettiin vain lievää kylvetysten aikaista kidusepiteelin liikakasvua. Liikakasvu oli niin vähäistä, ettei mikään käytetty kylvetys todennäköisesti vaaranna kalojen terveyttä. Yleensä kidusepiteelin liikakasvu lieveni kylvetysten loputtua, vaikka loisia saattoi edelleen esiintyä kiduksilla. On todennäköistä, että kidusten epiteelin yleinen liikakasvu johtui kylvetysaineen lisäksi loisinfektiosta.
- Eri kylvetysten vaikutuksesta kiduksiin voidaan tehdä vain vähäisiä viitteellisiä vertailuja:
Raasakka: Vertailujen tekeminen hankalaa. On epätodennäköistä, että kylvetysaineen väkevyydellä olisi ollut merkitystä kidusepiteelin liikakasvulle.
Montta: Vertailujen tekeminen hankalaa. On epätodennäköistä, että kylvetysaineen väkevyydellä olisi ollut merkitystä kidusepiteelin liikakasvulle.
Kainuu: Desirox-formaliini (D10+F100) aiheutti hieman vähemmän epiteelin liikakasvua kuin kloramiini-formaliini (K10+F100).