

KALA- JA RIISTARAPORTTEJA nro 204

*Tapani Lyytikäinen
Kari Ruuhonen*

Stressi ja sen vaikutus kirjolohituotannossa

Loppuraportti projektista "Ympäristötekijöiden vaihtelun
vaikutukset kirjolohituotannossa"

Evo 2000



RIISTAN- JA KALANTUTKIMUS

Stressi ja sen vaikutus kirjolohituotannossa

Maa- ja metsätalousministeriön Kala- ja riistaosasto myönsi 16.6.1998 määrärahan Pesca-yhteistyö-aloitteeseen, jonka tarkoituksena oli toteuttaa hanke "Ympäristötekijöiden vaihtelun vaikutukset kirjolohituotannossa". Hankkeen tavoitteena oli selvittää kalojen stressin ja ympäristötekijöiden äkillisten muutosten suhdetta ja merkitystä kirjolohen viljelyssä etenkin kirjolohen energiatalouden kannalta mittaamalla kalojen ruokailua, hapenkulutusta ja kasvua tietokoneohjatussa integroidussa itseruokinta- ja hapenkulutustilauslaitteistossa. Stressireaktiota jäljiteltiin kohottamalla keinotekoisesti kalojen veren kortisolipitoisuuksia vaikka kohonneet kortisolipitoisuudet muodostavatkin vain osan kalojen stressireaktiosta. Tulosten perusteella voidaan todeta seuraavaa:

- kohonnut veren kortisolipitoisuus näyttää lisäävän lyhytaikaisesti kalojen ruokailuaktiivisuutta, mutta myöhemmin stressin pitkittyessä vaikutus muuttuu hitaasti inhiboivaksi,
- kortisolipitoisuuden kohoaminen ei näyttänyt lisäävän hukkarehun määrää yhdessäkään tehdyssä kokeessa, jossa hukkarehun määrä mitattiin,
- kortisolipitoisuuden kohoaminen hidastaa kalan kasvua ilmeisesti pienentämällä kalojen ravinnonkulutusta,
- kohonnut veren kortisolipitoisuus ei lisännyt kalojen hapenkulutusta,
- kohonnut kortisolipitoisuus näyttäisi voivan ohjata kalan aineenvaihduntaa valkuaisainesynteesistä rasvavarastojen kertymisen suuntaan, mikä vaikuttaa rehun valkuaisaineiden hyödyntämistehokkuuteen,
- kalojen stressi näyttää vaikuttavan ympäristökuormituksen suuruuteen välillisesti kasvun hidastumisen kautta,
- yksittäiset äkilliset lämpötilan tai happipitoisuuden muutokset näyttäivät vaikuttavan vain vähän kalojen stressiin.

stressi, kirjolohi, hapenkulutus, lämpötilan vaihtelu, happipitoisuuden vaihtelu, kortisoli, ravinnonkulutus

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos
Evon kalantutkimusasema
16970 Evo

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos
PL 6
00721 Helsinki

Sisällys

YHTEENVETO	1
1. JOHDANTO.....	3
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	5
2.1. Kokeiden kulku	5
2.2. Tulosten laskentamenetelmät ja tilastollinen analyysi.....	6
3. TEHDYT KOKEET	8
3.1 Paastoavan kirjolohen aineenvaihdunta.....	8
3.2. Kortisolin vaikutus kirjolohen veriparametreihin ja kasvuun ryhmässä	10
3.3. Kortisolin vaikutus kirjolohen veriparametreihin, kasvuun, aineenvaihduntaan ja ravinnonottoon - osakoe 1	13
3.4. Kortisolin vaikutus kirjolohen veriparametreihin, kasvuun, aineenvaihduntaan ja ravinnonottoon - osakoe 2	17
3.5. Kortisolin vaikutus kirjolohen veriparametreihin, kasvuun, aineenvaihduntaan ja ravinnonottoon - osakoe 3	22
3.6. Lämpötilan nousun vaikutus kirjolohen stressitasoon.....	28
3.7. Happipitoisuuden alenemisen vaikutus kirjolohen stressitasoon.....	29
4. PÄÄTELMÄT.....	30
4.1. Stressi ja sen merkitys	30
4.2. Ympäristötekijöiden muutosten vaikutus stressiin	31
4.3. Stressin merkitys kirjolohituotannossa	32
KIITOKSET	34
KIRJALLISUUS	35

Yhteenveto

Maa- ja metsätalousministeriön Kala- ja riistaosasto myönsi 16.6.1998 määrärahan Pesca-yhteistyöaloitteeseen, jonka tarkoituksena oli toteuttaa hanke "Ympäristötekijöiden vaihtelun vaikutukset kirjolohituotannossa". Hankkeen tavoitteena oli selvittää kalojen stressin ja ympäristötekijöiden äkillisten muutosten suhdetta ja merkitystä kirjolohen viljelyssä etenkin kirjolohen energiatalouden kannalta mittaamalla kalojen ruokailua, hapenkulutusta ja kasvua tietokoneohjatussa integroidussa itseruokinta- ja hapenkulutusmittauslaitteistossa. Stressireaktiota jäljiteltiin kohottamalla keinotekoisesti kalojen veren kortisolipitoisuuksia vaikka kohonneet kortisolipitoisuudet muodostavatkin vain osan kalojen stressireaktiosta. Tulosten perusteella voidaan todeta seuraavaa:

- kohonnut veren kortisolipitoisuus näyttää lisäävän lyhytaikaisesti kalojen ruokailuaktiivisuutta, mutta myöhemmin stressin pitkittyessä vaikutus muuttuu hitaasti inhiboivaksi,
- kortisolipitoisuuden kohoaminen ei näyttänyt lisäävän hukkarehun määrää yhdesäkään tehdyssä kokeessa, jossa hukkarehun määrä mitattiin,
- kortisolipitoisuuden kohoaminen hidastaa kalan kasvua ilmeisesti pienentämällä kalojen ravinnonkulutusta,
- kohonnut veren kortisolipitoisuus ei lisännyt kalojen hapenkulutusta,
- kohonnut kortisolipitoisuus näyttäisi voivan ohjata kalan aineenvaihduntaa valkuaisainesynteesistä rasvavarastojen kertymisen suuntaan, mikä vaikuttaa rehun valkuaisaineiden hyödyntämistehokkuuteen.
- kalojen stressi näyttää vaikuttavan ympäristökuormituksen suuruuteen välillisesti kasvun hidastumisen kautta,
- yksittäiset äkilliset lämpötilan tai happipitoisuuden muutokset näyttävät vaikuttavan vain vähän kalojen stressiin.

1. Johdanto

Suomalainen kalanviljely tuottaa vuosittain 17500–22000 tonnia kirjolohta (RKTL 1997). Kalanviljelyn vesistökuormitus koostuu pääosin tpestä ja fosforista, jotka ovat peräisin syömättömästä kalanrehusta, ulosteista sekä kalan aineenvaihdunnassa kulltamasta aineesta. Kalankasvatuksen ravinnekuormitusta on esitetty alennettavaksi noin 30 % (Suomen ympäristökeskus 1996), mutta kalanviljelyn kannattavuus ja investointikyky ovat huonoja. Elinkeinoon tulevaisuuden kannalta onkin olennaista kyetä vähentämään kuormitusta ja alentamaan tuotantokustannuksia menetelmillä, jotka eivät vaadi suuria investointeja ja jotka voidaan ottaa helposti ja laajasti käyttöön. Rehuja kehittämällä on kyetty vähentämään kalanviljelyn ominaiskuormitusta huomattavasti viimeisen 30 vuoden aikana (Ruohonen & Vielma 1998). Ominaiskuormitusta voitaneen edelleen vähentää parantamalla kalankasvatuksen hyötysuhdetta. Tätä varten tarvitaan kalan kasvun ja siihen vaikuttavien tekijöiden tutkimusta. Parempi tietämys kalan kasvusta ja siihen vaikuttavista tekijöistä voi myös alentaa tuotantokustannuksia.

Valtaosa Suomen kirjolohesta tuotetaan verkkoaltaissa Saaristomerellä ja Ahvenanmaalla. Verkkoallas on kasvatusympäristönä erittäin vaihteleva ja vaikeasti ennustettava. Vaihtelevuus onkin yksi merkittävimmistä kalankasvatuksen tehokkuuteen vaikuttavista ympäristön ominaisuuksista. Kalanviljelijän mahdollisuudet vaikuttaa ympäristötekijöihin ovat rajalliset: hän voi pyrkiä sopeutumaan vallitseviin olosuhteisiin tai pyrkiä vakioimaan tai muuttamaan ympäristöä toivottuun suuntaan. Vaihtelevien ympäristöolojen vaikutukset kalanviljelyn tehokkuuteen tunnetaan huonosti.

Ympäristötekijän muuttuessa kala pyrkii sopeutumaan uusiin oloihin, se saattaa muuttaa ravinnonkulutustaan, ruokailurytmiään ja sen aineenvaihduntaa pyrkii saavuttamaan uusiin oloihin soveltuvan tasapainotilan. Uuden tasapainotilan saavuttamiseen kuluu aikaa, joka riippuu kalan fysiologisen säätelyn tarkkuudesta ja nopeudesta. Säätelyyn kuluu energiaa ja se saattaa vaikuttaa kalan ruokahaluun. Viljelijä puolestaan pyrkii toimimaan havaitsemansa kalan käyttäytymisen mukaan vaikka ei ymmärräkään miten kala reagoi erilaisiin ympäristötekijöiden muutoksiin. Tämä on hyvä strategia vain, jos kalat pystyvät säätämään omat elintoimintonsa kulloinkin optimaaliseksi. Todennäköisesti näin ei ole, koska kala ei ole geneettisesti sopeutunut kasvatusympäristöönsä. Kalan sopeutuminen muutoksiin ja muutosten aiheuttamat fysiologiset vasteet saattavat aiheuttaa stressiä, joka vaikuttaa aineenvaihduntaan, ruokailukäyttäytymiseen ja kasvuun (Rice 1990, Davis & Schreck 1997, Beyers et al. 1999).

Luonnossa stressi auttaa kalaa sopeutumaan uhkaaviin ilmiöihin ja valmistaa sen pakenemista varten mutta kalanviljelyssä stressi on haitallista, koska stressireaktio on osittain hyödytön: kala ei pääse pakenemaan (Wedemeyer 1997). Ruokahalun ja ympäristöolojen merkitystä kalan ravinnonoton säätelyssä ei tunneta kovinkaan hyvin, mistä seuraa että kalanviljelijäkään ei tiedä tarpeeksi voidakseen säätää kasvatusprosessia muuttuvien olojen mukaan. Tämän seurauksena osa kasvatukseen käytettävästä rehusta hukataan ja se päättyy kuormittamaan vesistöjä. Tilanteen parantamiseksi kalanviljelijät tarvitsevat tietoa sekä kalan sopeutumisesta vaihteleviin olosuhteisiin että keinoista vaikuttaa sopeutumiseen.

Syödyistä ravinnosta osa menetetään ulosteissa ja osa aineenvaihdunnan kautta. Aineenvaihdunnan osuus koostuu useista osatekijöistä, joihin ympäristön muutokset vaikuttavat eri tavoin. Osa syödyistä ravintoaineista kuluu kalan välttämättömien toimintojen ylläpitämiseen. Stressi voi aiheuttaa aineenvaihdunnan kiihtymistä (Davis & Schreck 1997), joka osaltaan voi nostaa aineenvaihdunnassa menetetyt ravinnon osuutta. Syöminen kohottaa aineenvaihduntatasoa ja tämän lisäksi kalat käyttävät ravinnosta saamaansa energiaa liikkumiseen. Muutokset aineenvaihdunnassa vaikuttavat kasvatuksen tehokkuuteen, mutta näiden havaitseminen ja ennakoiminen on kasvatusoloissa vaikeaa. Tämän vuoksi pitäisi kehittää keinoja, joilla voitaisiin ennustaa ja arvioida aineenvaihdunnassa tapahtuvia muutoksia.

Yksi tapa vähentää ympäristökuormitusta ja pienentää tuotantokustannuksia on parantaa rehun hyväksikäyttösuhdetta. Tähän voidaan vaikuttaa paitsi rehun koostumuksen avulla myös ymmärtämällä paremmin ympäristötekijöiden vaikutus kalaan. Koska rehun hyväksikäyttötehokkuus riippuu aineenvaihduntanopeudesta, voidaan aineenvaihduntaan kuluva osaa pienentämällä parantaa ravinnon hyötysuhdetta ja alentaa ravinnekuormitusta. Koska stressi voi kohottaa aineenvaihduntatasoa (Davis & Schreck 1997), stressiä alentamalla voidaan parantaa kasvatustulosta. Tämän projektin yhtenä tavoitteena oli selvittää paljonko stressi voi vaikuttaa kirjolohen kasvatuksen tehokkuuteen sekä lisäksi pyrkiä selvittämään näkyykö stressi ravinnonoton tai aineenvaihdunnan rytmiikassa, jolloin stressiä voitaisiin arvioida tätä rytmiikkaa seuraamalla. Jos kalojen stressautuminen kasvatuksessa vähenee, voidaan myös kalojen sairastuvuuden ja kuolleisuuden olettaa alenevan (Weyts et al.1999).

Ympäristöolojen vaihtelu voi heikentää tuotannon tehokkuutta aiheuttamansa stressin kautta. Projektin toisena perustavoitteena olikin selvittää miten happipitoisuuden ja lämpötilan muutokset näkyvät kalojen stressitasoissa. Projekti käynnistettiin syksyllä 1998 Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen Evon kalantutkimusasemalla. Projekti päättyi 30.6.2000.

2. Aineisto ja menetelmät

Projektia varten ryhdyttiin syksyllä 1998 rakentamaan kalojen respirometri-järjestelmää, johon liitettiin kalan ruokailuaktiivisuuden seurantalaitteisto. Tavoitteena oli rakentaa 48-kanavainen järjestelmä, jossa suhteellisen pienellä päivittäisellä hoidolla kyetään ruokkimaan kaloja niiden ruokahalun mukaan, mittaamaan jatkuvasti kalojen hapenkulutusta sekä seuraamaan määrävälein kalojen kasvua.

Järjestelmän vesitys rakennettiin (huhti–toukokuussa 1999) ensin kiertovesiperiaatteella veden käytön minimoimiseksi. Myöhemmin marras–joulukuussa 1999 järjestelmä muutettiin läpivirtausperiaatteella toimivaksi, koska kiertovesityksessä havaittiin mittauksia ja kalan kasvatusta haittaavia ongelmia. Mittaus-, ruokinnanohjaus- ja veden lämpötilan säätöjärjestelmät, koealtaat sekä tarvittavat tietokoneohjelmat tehtiin itse. Rungas koeyksikkömäärä edellytti uuden ruokintalaitteen kehittämisen, koska aikaisemmat olivat joko liian työteliäitä, epätarkkoja, kalliita tai suurikokoisia. Tässä tavoitteessa onnistuttiin ja lisäksi kehitettiin mittaustekniikkaa ottamalla käyttöön uusia anturitiedon käsittelymenetelmiä. Järjestelmän tekniset yksityiskohdat ja kehitystyön kulku on kuvattu liitteessä.

2.1. Kokeiden kulku

Koetta ennen kalat akklimoitiin eli totutettiin tutkimuslaitteistossa kulloinkin käytettyyn veden lämpötilaan erillisissä altaissa. Kalat siirrettiin akklimointiin noin 2–4 viikkoa ennen kokeen alkua. Kerralla siirrettiin 70 kalaa, jotka punnittiin siirron yhteydessä yksilöittäin ja huonot/sairaot yksilöt karsittiin pois. Lämpötila oli akklimoinnin aikana 12–15 °C tulevista koelämpötiloista riippuen ja ruokintasuhde 1–1,4 % ruumiinpainosta päivässä. Kaloja pidettiin 12:12 tunnin (valot päällä joko klo 8–20 tai 6–18) valojaksossa kuten varsinaisen kokeen aikana. Akklimointialtaiden veden lämpötila tarkistettiin päivittäin ja altaat puhdistettiin tarpeen mukaan. Akklimoinnin jälkeen 48 kalaa siirrettiin kukin omaan koealtaaseensa. Lo put 70 kalasta otettiin alkunäytteiksi, joista määritettiin kalojen kosteus sekä kuiva-aineen energiapitoisuus.

Kaloja ruokittiin kaupallisella 5 mm rehulla, joka valmistajan ilmoituksen mukaan sisälsi 40 % proteiineja, 30 % rasvaa, 17 % hiilihydraatteja, 1 % kuitua, 6 % tuhkaa ja 6 % vettä. Laskennallinen rehun energiapitoisuus oli koostumustietojen mukaan 24,3 kJ g⁻¹. Rehun mitattu energiapitoisuus oli 24,88 kJ g⁻¹ ja vesipitoisuus 1,1 %.

Veden happipitoisuutta mitattiin jatkuvasti koko kokeen ajan ja antureita kalibroitiin 1–3 kertaa viikossa. Antureiden kalvot pidettiin puhtaina. Lämpötila-anturit kalibroitiin kerran, koska ne ovat vakaita (valmistajan suositus). Virtausmittarit kalibroitiin kunkin kokeen aikana käsin mitattujen virtaamien avulla.

Altaita puhdistettiin tarpeen mukaan 3–5 kertaa viikossa ja veden virtaamaa altaassa säädettiin veden happipitoisuuden mukaan. Happipitoisuus koealtaissa pyrittiin pitämään koko ajan yli 6 mg:n litrassa, mutta kuitenkin myös niin, että altaan happipitoisuus oli korkeintaan 95 % tulevan veden happipitoisuudesta.

Syödyn ravinnon mittaaminen tehtiin eri kokeissa eri tavoin ja on kuvattu koekohtaisissa menetelmissä.

Kaikki kokeissa olleet kalat sekä akklimoinnista ylijääneet kalat pakastettiin, jauhettiin leikkurilla (Metos VCM-041) hienoksi, jauhetusta massasta otettiin kolme näytettä /yksilö, jotka kuivattiin kylmäkuivurilla vakiopainoon (3–4 päivää). Tämän jälkeen saman yksilön näytteet yhdistettiin ja jauhettiin pommikalorimetrille sopivaksi mäsäksi, josta määritettiin kuiva-aineen energiapitoisuus.

Kokeille on myönnetty RKTL:n koe-eläinlupa 17/99.

2.2. Tulosten laskentamenetelmät ja tilastollinen analyysi

Kasvunopeutta kuvaavina suureina käytettiin päivittäistä kasvunopeutta (SGR, kasvu % ruumiinpainosta päivässä), jonka laskemisessa tarvitaan kasvukerrointa (G):

$$G = [\ln(WW_2) - \ln(WW_1)] / (t_2 - t_1), \text{ missä}$$

G = kasvukerroin

WW₂ = yksilön paino hetkellä 2 (t₂)

WW₁ = yksilön paino hetkellä 1 (t₁)

Tämän jälkeen laskettiin kasvunopeus (SGR) seuraavasti:

$$SGR = 100 * (e^G - 1)$$

Kokeissa, joissa laskettiin myös muita energiabudjetin komponentteja (ravinnonotto, hapenkulutus), kasvun yksikkönä oli:

$$\text{kasvu (g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}) = (WW_{2g} - WW_{1g}) / [(WW_{1kg} + WW_{2kg}) / 2] / t, \text{ missä}$$

WW_{2g} = kalan paino hetkellä 2 (g)

WW_{1g} = kalan paino hetkellä 1 (g)

WW_{2kg} = kalan paino hetkellä 2 (kg)

WW_{1kg} = kalan paino hetkellä 1 (kg)

t = jakson kesto hetken 2 ja 1 välillä (vrk)

Kasvu muutettiin energiaksi estimoimalla kalan energiapitoisuus kokeen alussa ja käyttämällä yksilökohtaista mitattua energiapitoisuutta energiapitoisuuden loppuarvona ja sijoittamalla em. arvot edellä esitettyyn kaavaan.

Kirjolohen hapenkulutus laskettiin seuraavasti:

$$M_{12} = Q * (O_{2in12} - O_{2out12}) * O_{kalib} + V * (O_{2out1} - O_{2out2}) * O_{kalib}, \text{ missä}$$

M₁₂ = kalan hapenkulutus (mg h⁻¹) ajanjaksolla 1-2

Q = virtaama (l h⁻¹)

O_{2in12} = keskimääräinen mV-arvo altaaseen tulevalle vedelle jaksolla 1-2

O_{2out12} = keskimääräinen happianturin mV-arvo altaan vedelle jaksolla 1-2

O_{kalib} = kalibrointikerroin (mg mV⁻¹)

V = altaan tilavuus (l)

O_{2out1} = happianturin mV-arvo altaan vedelle hetkellä 1

O_{2out2} = happianturin mV-arvo altaan vedelle hetkellä 2

Vuorokautinen hapenkulutus ($g\ d^{-1}$) saatiin kertomalla em. arvo 24:llä ja jakamalla 1000:lla. Hapenkulutus muutettiin painokorjattuun muotoon ($g\ kg^{-1}\ d^{-1}$) jakamalla kalan painolla (kg) ja energiaksi kertomalla hapenkulutus rehun raakakoostumuksen perusteella arvioidulla kertoimella ($13,73\ kJ\ kg^{-1}\ d^{-1}$).

Ravinnonoton kuvaamiseen tarvitaan useita suureita, koska kyseessä on itseruokintajärjestelmä, jossa mitataan suoraan vain kalan ruokailuaktiivisuutta ja altaaseen syötetyn rehun määrää. Syömätön rehu vähennetään syöttömäärästä, jolloin kyetään epäsuorasti arvioimaan syödyn ravinnon määrä:

Ruokailuaktiivisuus ($kpl\ kg^{-1}\ d^{-1}$) = ruokinta-anturiin ruokinta-aikana vuorokaudessa kohdistettujen iskujen määrä

Ravinnon syöttömäärä ($g\ kg^{-1}\ d^{-1}$) = vuorokaudessa altaaseen ruokailuaktiivisuuden perusteella syötetty rehumäärä

Syöty ravintomäärä ($g\ kg^{-1}\ d^{-1}$) = ravinnon syöttömäärä – syömätön rehu

Syömättömän rehun laskentatapa vaihteli koekohtaisesti ja on kuvattu koekohtaisissa menetelmissä. Ravinnonoton suureet muutettiin energiaksi kertomalla em. suureet rehun energiapitoisuudella ($24,88\ kJ\ g^{-1}$)

Tilastollisessa analyysissä käytettiin SYSTAT 9 -ohjelmaa. Veriparametrien analyysimenetelmänä oli yksisuuntainen varianssianalyysi. Jos käsittelyryhmiä oli yli 2, merkitsevät erot identifioitiin parittaisilla kontrasteilla. Kasvun, hapenkulutuksen ja ravinnonoton suhteen sovellettiin joko yksisuuntaista varianssianalyysia tai kovarianssianalyysia, mikäli jonkin tekijän aiheuttama vaihtelu selitettävässä muuttujassa haluttiin poistaa. Normaalisti havaintojoukkona käytettiin kalakohtaista mittauksia tai havaintojakson keskiarvoa (eli havaintojoukko = kalamäärä). Luvussa 3.1. ja 3.5 tehtyjen aika-tarkastelujen havaintojoukkoina käytettiin tunti- ja päiväkohtaisia mittauksia.

3. Tehdyt kokeet

3.1 Paastoavan kirjolohen aineenvaihdunta

Aineenvaihduntaa voidaan mitata epäsuorasti mittaamalla hapenkulutusta. Tämä voidaan muuntaa energia-arvoiksi happikalorisen kertoimen avulla, joka vaihtelee eri pääravintoaineille välillä 13,36–14,72 kJ g⁻¹ happea. Happikalorinen kerroin on suurin hiilihydraateilla ja pienin rasvoilla. Koska kertoimet ovat suhteellisen lähellä toisiaan (pienimmän ja suurimman välinen ero on <10 %), aineenvaihdunnan energiankulutuksen arvioinnissa voidaan tehdä korkeintaan tämän suuruinen virhe. Käytännössä virhe on pienempi, koska kalat käyttävät aineenvaihduntansa ensisijaisena energianlähteenä pääasiassa proteiineja ja rasvoja, joiden kertoimet ovat lähempänä toisiaan (rehu koostuu pääasiassa rasvoista ja proteiineista).

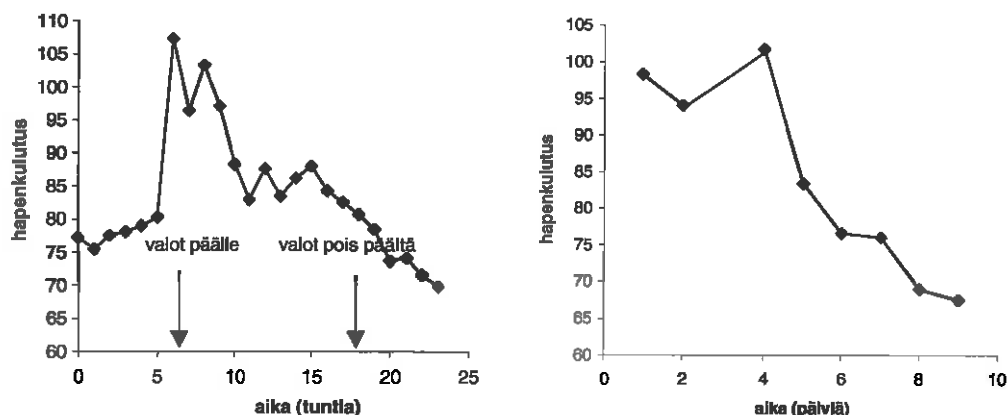
Paastoavan kalan aineenvaihdunta kuvastaa kalan aineenvaihduntatasoa pienimmillään.

Liikkumattoman, paastoavan kalan aineenvaihdunnasta käytetään termiä standardimetabolialia.

Kesäkuussa 1999 tehtiin esikoe paastoavilla kaloilla. Kokeen pääasiallisena tarkoituksena oli toimia käytännön testinä vesinäytteenotto- ja mittauslaitteiston toimivuudelle. Tämän lisäksi haluttiin saada minimiarvio kirjolohen hapenkulutuksesta koelämpötilassa (15 °C) sekä arvioida siirron jälkeiseen toipumiseen tarvittavaa aikaa sekä mil-laista vuorokausirytmä paastoavat kalat noudattavat.

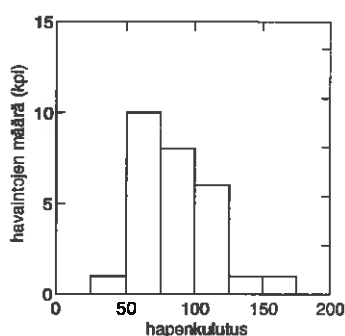
Kalat (keskiarvo=369 g, keskihajonta=110 g, vaihteluväli 154–604 g) punnittiin, siirrettiin 15 °C:een veteen koejärjestelmään ja kalojen hapenkulutusta mitattiin hieman yli viikon ajan. Tämän jälkeen kalat punnittiin uudelleen painonmenetyksen mittaamiseksi.

Paastoavalla kalalla havaittiin hapenkulutuksen vuorokausirytmä. Hapenkulutus oli korkeimmillaan välittömästi valojen syttymisen jälkeen klo 6 ja laski sitten hitaasti ol-len alimmillaan puolen yön aikaan (kuva 1). Päiväkohtainen hapenkulutus laski koko mittausjakson aikana yli 30 %. Ensimmäisenä päivän keskimääräinen hapenkulutus oli noin 102 mg kg⁻¹ h⁻¹ ja kokeen lopussa vain 67 mg kg⁻¹ h⁻¹ (kuva 1). Kalojen väliset erot hapenkulutuksen tasossa olivat suuria ja yksilöiden keskimääräiset hapenkulutukset kokeen aikana vaihtelivat välillä 44–155 mg kg⁻¹ h⁻¹ (kuva 2). Energiankulutukseksi muutettuna em. vastaa 14,5–56,0 (kJ kg⁻¹ d⁻¹) energiankulutusta. Keskimääräinen hapenkulutus paastoavalla kirjolohella oli 85,3 mg kg⁻¹ h⁻¹ (keskihajonta=26,5 mg kg⁻¹ h⁻¹, n=27)



Kuva 1. Koko koejakson hapenkulutuksen ($\text{mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$) keskimääräinen vuorokausirytmä sekä päiväkeskiarvon kehitys kokeen aikana paastoavalla kirjolohella ($n=27$) (364 g, keskihajonta = 110 g) 15 °C:ssa.

Esikokeen perusteella voidaan todeta, että hapenkulutuksen vuorokausirytmä säilyi selkeänä paastoavalla kalalla ($P<0,01$). Korkean hapenkulutuksen vaihe oli kuitenkin suhteellisen lyhyt - vain 4–5 tuntia valojen syttymisen jälkeen. Koska päivittäinen hapenkulutus laski koko kokeen ajan voidaan arvioida, että kirjolohen toipuminen ja aineenvaihdunnan tasautuminen siirron jälkeen voi kestää yli viikon 15 °C:ssa. Tulos on yllättävä, ja merkitsee käytännössä sitä että hapenkulutuksen perustaso ylittyy 15–20 % viikon ajan siirrosta. Koska kaloja ei paastotettu ennen koetta, hapenkulutuksen laskeminen saattoi johtua myös kalojen ruuansulatuskanavan tyhjenemisestä.



Kuva 2. Kirjolohiysilöiden ($n=27$) keskimääräisen hapenkulutuksen ($\text{mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$) jakauma esikokeessa. Päivien välisen ja vuorokaudenaikaisen vaihtelun vaikutus hapenkulutukseen poistettu.

Hapenkulutuksen jakauma on vino (kuva 2). Vuorokauden aika, päivä, kalayksilö ja kalayksilön ja päivän välinen interaktio selittivät yhdessä vajaat 60 % kaikesta hapenkulutuksen vaihtelusta kokeen aikana. Loppuosa hapenkulutuksen hajonnasta oli vuorokauden ja kalayksilön välisen interaktion aiheuttamaa, mikä tarkoittaa lähinnä kalayksilön lyhytaikaisen aktiivisuuden vaihtelua sekä mittausvirhettä.

Koe osoitti, että mittauslaitteisto toimi hyvin ja kalojen hapenkulutusta kyettiin mittaamaan suunnitellusti. Ongelmaksi muodostui kuitenkin se, että viikon aikana yli 40 % kaloista hyppäsi pois altaasta. Altaan katteen rakennetta muutettiin kokeen jälkeen. Myös vesinäytteiden mittausohjelmaan, virtaamamittareiden rakenteeseen, lämpötila-antureiden telineisiin, kiertoveden ilmastukseen sekä tuloveden esikäsittelyyn tehtiin parannuksia esikokeesta saatujen kokemusten perusteella.

- Paastoavan kalan hapenkulutuksessa esiintyi vuorokausirytmä.
- Siirron jälkeen paastoavan kalan hapenkulutus alenee viikon aikana selvästi.

3.2. Kortisolin vaikutus kirjolohen veriparametreihin ja kasvuun ryhmässä

Stressin vaikutuksen tutkimiseksi käytettiin implanttitekniikkaa (Specker et al. 1994). Tekniikassa tutkittavaa ainetta sekoitetaan rasvaseokseen. Rasvaseos sijoitetaan kalan vatsaonteloon, josta se liukenee hitaasti ja mahdollistaa siten pitkäkestoisten vaikutusten tutkimisen. Koska implanttitekniikka oli uusi, täytyi selvittää miten hyvin implantit kykenevät pitämään kalan plasman kortisolipitoisuuden korkeina.

Kaloihin asennettiin passiivinen radiolähetin, joka toimii yksilömerkkinä eli ns. PIT-merkki, jotta eri käsittelyjen kalat kyettäisiin tunnistamaan ja samasta kalasta tehdyt mittaukset yhdistämään toisiinsa. 10 päivän kuluttua kaloille asennettiin joko placebo-rasvaimplanti tai kortisoli-rasvaimplanti. Kortisoliannos oli $91,3 \text{ ug g}^{-1}$. Kalat sijoitettiin yhteen altaaseen ja niitä syötettiin 2 viikon ajan 1,4 % ruumiinpainosta päivässä samalla rehulla kuin mitä käytettiin respirometrijärjestelmän kokeissa. Kaloista otettiin verinäyte ennen implanttien asennusta ja 2 kertaa tämän jälkeen (viikon välein) kaudaalipunktuurilla. Verinäytteitä sentrifugoitiin 6000 rpm:ssä 1–2 minuutin ajan, plasma erotettiin ja säilöttiin nestetyypeen. Näytteistä mitattiin plasman glukoosi-, kortisoli-, natrium-, kalium-, proteiini- ja kalsiumpitoisuus. Analyysit tehtiin RKTL:n Helsingin toimipisteen laboratoriossa.

Kalojen maksat punnittiin heptosomaattisen indeksin määrittämiseksi:

$$\text{HSI} = 100\% * (\text{WW}_1 / \text{WW}), \text{ missä}$$

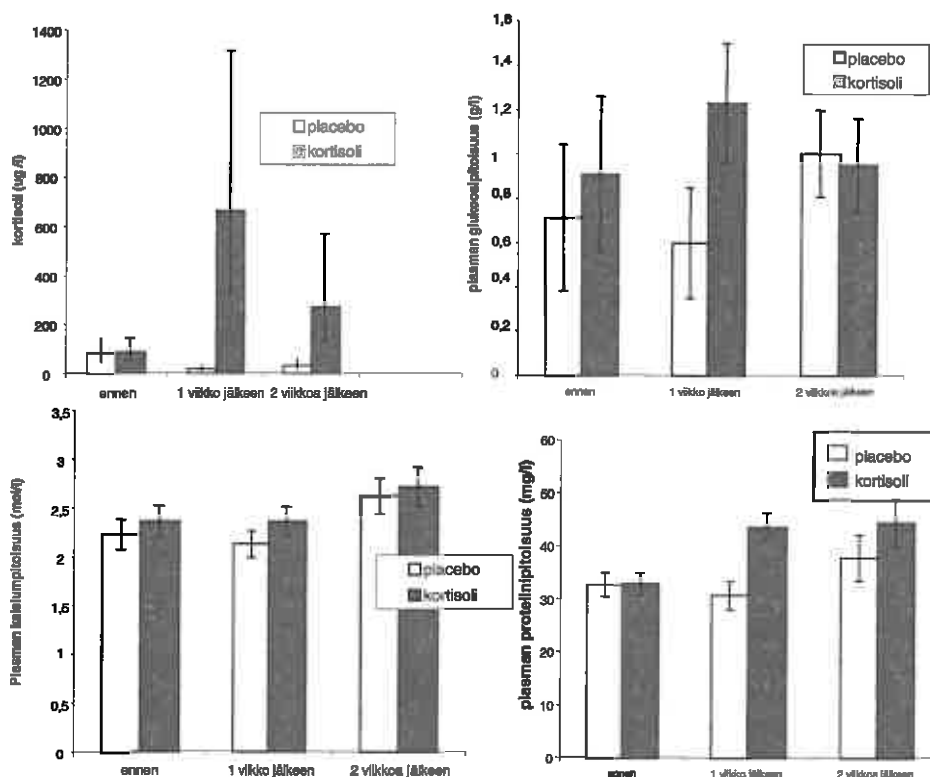
HSI = heptosomaattinen indeksi (% kalan painosta)

WW_1 = maksan paino (g)

WW = kalan paino (g)

Kokeella tutkittiin miten hyvin kortisoli-implantit kohottavat kirjolohen plasman kortisolitasoja ja miten kauan tämä kortisolitasojen kohoaminen säilyy. Tämän lisäksi haluttiin selvittää minkälaisia heijastusvaikutuksia korkeilla kortisolitasoilla on muihin veriparametreihin ja kalan kasvuun ryhmässä.

Ennen implanttien asennusta ryhmien keskimääräiset kortisolitasot olivat samat ($P > 0,1$). Kortisoliryhmässä plasman kortisolipitoisuus kohosi implantin asennuksen jälkeen ja oli selvästi korkeampi kuin placeboryhmällä kahden viikon ajan implanttien asennuksesta ($P < 0,01$). Placeboryhmän plasman kortisolipitoisuudet laskivat asennuksen jälkeen ja kohosivat sitten hieman kokeen loppupuolella.



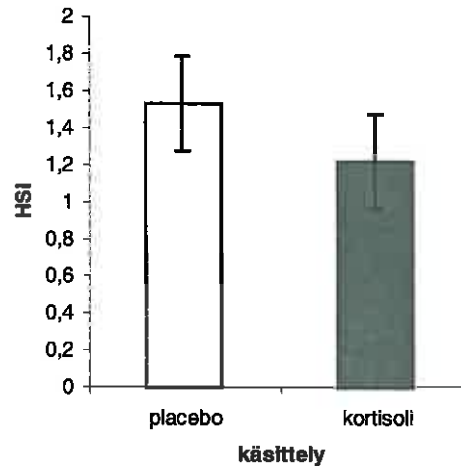
Kuva 3. Implanttiasennuksen vaikutus kirjolohen plasman kortisoli- ($\mu\text{g l}^{-1}$) glukoosi- (g l^{-1}) proteiini- (g l^{-1}) ja kalsiumpitoisuuteen (mmol l^{-1}). Pystyviivat esittävät 95 % luottamusvälejä estimateille.

Käsittelyryhmien plasman keskimääräinen glukoosipitoisuus oli sama ennen implanttien asennusta. Implanttien asennuksen jälkeen kortisoliryhmässä plasman glukoosipitoisuus nousi selvästi ($P < 0,05$). Kaksi viikkoa implanttien asennuksen jälkeen käsittelyryhmien plasman glukoosipitoisuudet olivat jälleen keskimäärin samat (kuva 3).

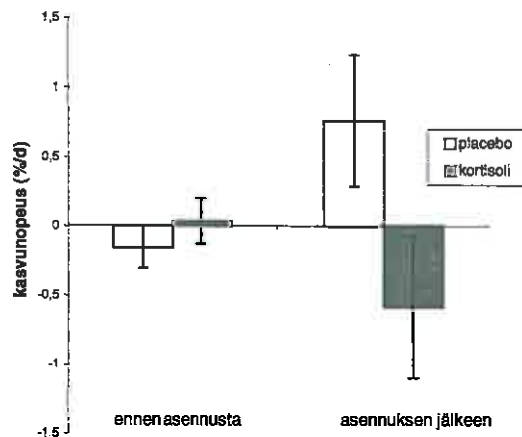
Käsittely ei vaikuttanut plasman kalsiumpitoisuuteen tilastollisesti merkitsevästi ($P > 0,1$) mutta plasman kalsiumpitoisuus kohosi molemmissa ryhmissä kokeen aikana tilastollisesti merkitsevästi ($P < 0,001$) (kuva 3).

Kortisolikäsittely kohotti selvästi kirjolohen plasman proteiinipitoisuutta ($P < 0,001$). Plasman proteiinipitoisuudet olivat korkeimmillaan kokeen lopussa. Käsittelyryhmien sisällä ei esiintynyt erilaista ajallista muutosta plasman proteiinipitoisuuksissa ($P < 0,1$) (kuva 3).

Kortisoli-implantti ei aiheuttanut eroja plasman keskimääräisiin kalium- ja natriumpitoisuuksiin rasvaimplanttiryhmään verrattuna. Hepatosomaattinen indeksi oli hieman korkeampi placeboryhmällä kuin kortisoliryhmällä, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($P > 0,1$) (kuva 4).



Kuva 4. Kortisoli- ja placeboimplantin vaikutus kirjolohen heptosomaattiseen indeksiin (% ruumiinpainosta), kaksi viikkoa implantin asennuksen jälkeen. Pylväät esittävät käsittelykeskiarvoja ja virhejanat keskiarvojen 95 % luottamusvälejä.



Kuva 5. Kortisoli- ja rasvaimplantin vaikutus kirjolohen kasvunopeuteen (% ruumiinpainosta vuorokaudessa) 15 °C:ssa, virhejanat kuvaavat 95 % luottamusvälejä keskiarvoille.

Kirjolohen kasvunopeus oli lähestulkoon sama kummassakin käsittelyryhmässä ennen implanttien asennusta ($P > 0,1$). Asennuksen jälkeen placeboryhmällä oli selkeästi positiivinen kasvukerroin, kun taas kortisoliryhmän kalat laihtuivat selvästi ($P < 0,01$) (kuva 5).

- Kortisoli-implantit kykenivät kohottamaan kalan plasman kortisolitasoja vähintään kahdeksi viikoksi.
- Korkeat kortisolitasot kohottivat plasman proteiini- ja glukoosipitoisuuksia.
- Korkeat kortisolitasot alensivat kalan kasvunopeutta kasvatettaessa kaloja ryhmässä.

3.3. Kortisolin vaikutus kirjolohen veriparametreihin, kasvuun, aineenvaihduntaan ja ravinnonottoon - osakoe 1

Kun kala kokee äkillisen muutoksen ympäristössään, pelästyy jotakin tai on vaikeissa olosuhteissa kala pyrkii sopeutumaan tilanteeseen stressireaktion avulla. Lyhytaikaisesti stressi kohottaa kalan kykyä sopeutua ja selviytyä. Kun rasitus pitkittyy, stressi muuttuu kalalle epäedulliseksi. Tätä tilaa kutsutaan krooniseksi stressiksi, ja sen yhtenä tunnusmerkkinä ovat kohonneet veren kortisolitasot. Tutkiaksemme miten krooninen stressi vaikuttaa kirjolohen energiabudjettiin, sijoitimme kalan vatsaonteloon joko stressihormoni-implantin (kortisoli), puhtaan implantin (rasva) tai kortisolin vaikutusta estävän implantin (mifepironi) (Vijayan & Leatherland 1992, Vijayan et al. 1994, Mommsen et al. 1999).

Kaloja akklimoitiin 2 viikkoa 15 °C:ssa ja siirrettiin sen jälkeen koejärjestelmään. Tämän jälkeen kaloja paastotettiin 10 päivää, jonka jälkeen kaloille asennettiin, rasvaimplantti, kortisoli-rasvaimplantti (kortisolia 7,92 % painosta) tai mifepironi-rasvaimplantti (mifepironia 5,32 % painosta), kalat punnittiin ja niistä otettiin verinäyte. Veden happipitoisuuksia ja altaiden virtaamia mitattiin sekä ennen implanttien asennusta että sen jälkeen. Ruokintajärjestelmä käynnistettiin implanttien asennusta seuraavana päivänä. Kaloja ruokittiin 3 viikkoa, jonka jälkeen kalat nukutettiin nopeasti (1,5 g MS-222 + 2 ml Aqui-S 10 l⁻¹), punnittiin ja niistä otettiin verinäyte (23G neulalla kaudaalisuonesta, 0,5 ml näyte). Näytteet esikäsiteltiin kuten aikaisemmin on kuvattu ja niistä tehtiin samat analyysit.

Plasman kortisolitasot olivat korkeimpia kortisoli- ja mifepironiryhmässä implantin asennuksen jälkeen. Näiden ryhmien kortisolitasot asennuksen jälkeen olivat myös selkeästi korkeampia kuin asennusta edeltävät arvot. Placeboryhmällä oli alhaisempi plasman kortisolipitoisuus kuin muilla ryhmillä (kuva 6).

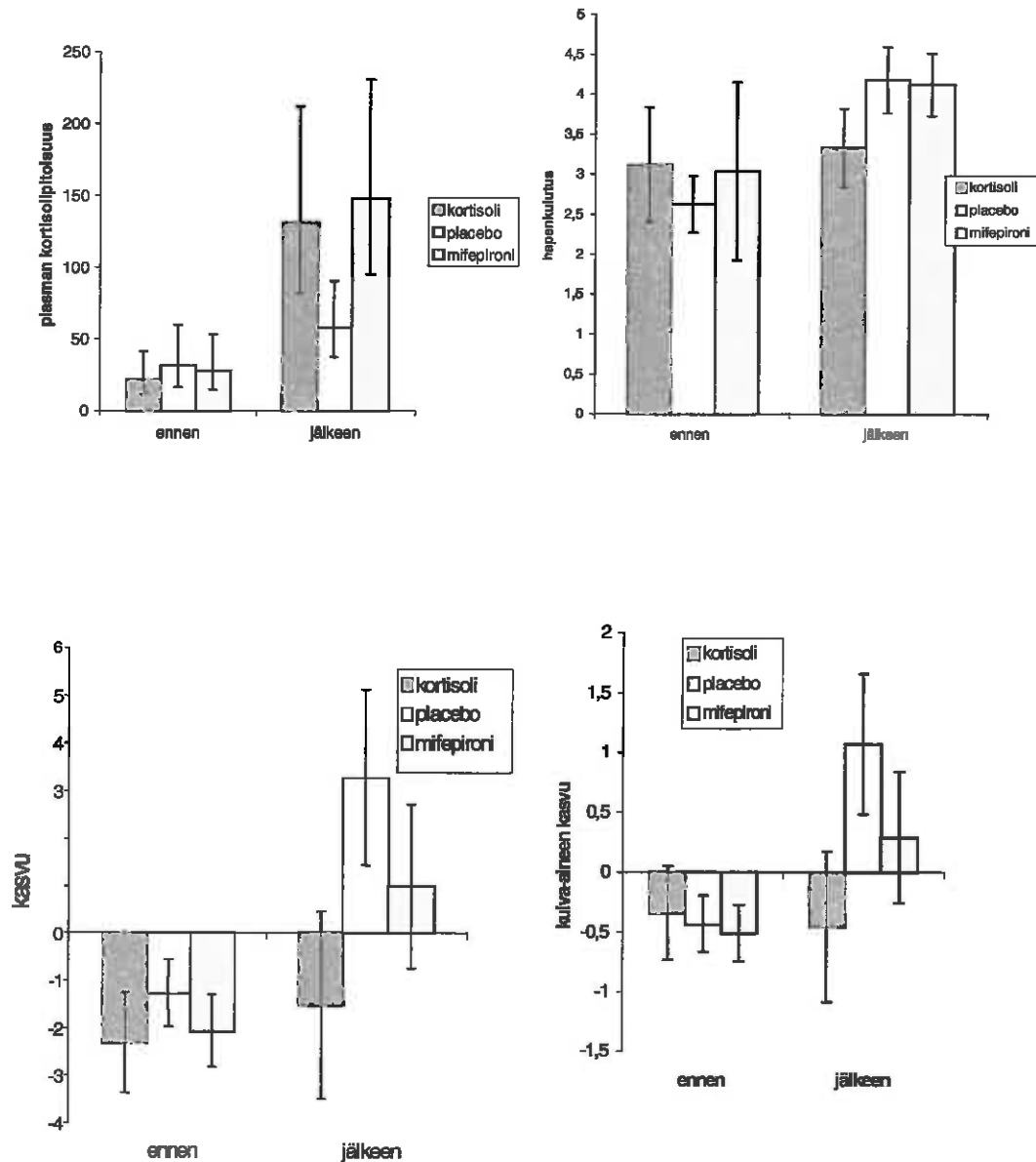
Implantin luonne vaikutti tilastollisesti merkitsevästi plasman natrium- ja kaliumpitoisuuksiin, mutta ei plasman proteiini-, glukoosi- ja kalsiumpitoisuuksiin (taulukko 1). Plasman kaliumpitoisuus oli korkein kortisoliryhmässä kolme viikkoa asennuksen jälkeen (taulukko 1) ja erosi tilastollisesti merkitsevästi mifepironiryhmän plasman kaliumpitoisuudesta ($P < 0,05$). Mifepironiryhmällä oli myös kortisoliryhmää alhaisempi plasman natriumpitoisuus ($P < 0,05$). Myös kalsiumpitoisuus oli hivenen alhaisempi kuin kortisoliryhmällä, mutta ei eronnut siitä tilastollisesti merkitsevästi ($P > 0,1$). Implanttien luonteella ei ollut vaikutusta plasman glukoosi- tai proteiinipitoisuuteen. Mifepironi näyttäisi kokeen tulosten valossa lähinnä estävän kortisolin kykyä ylläpitää plasman ionitasapainoa.

Taulukko 1. Kirjolohen plasman glukoosi-, proteiini-, Na-, K-, Ca-pitoisuudet, kasvu, hapenkulutus ja ravinnon syöttömäärä ennen ja jälkeen placebo-, mifepironi- ja kortisoli-implanttien asennuksen. Sarakkeissa ensin keskiarvo ja sitten sulkeissa keskiarvon keskivirhe. P= tilastollinen todennäköisyys ryhmien samanlaisuudelle.

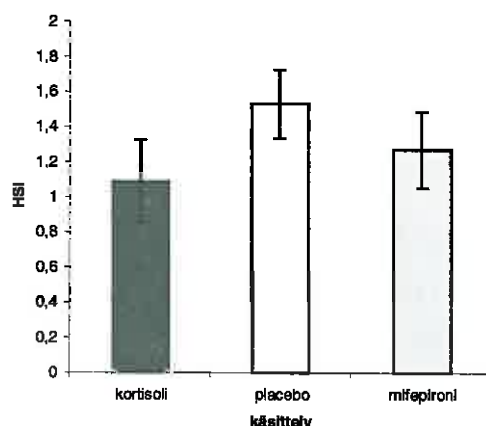
	placebo	mifepironi	kortisoli	P
ennen	n=13	n=13	n=14	
Glukoosi (g/l)	1,23 (0,17)	1,23 (0,20)	1,01 (0,16)	-
Proteiini (g/l)	43,26 (1,03)	39,37 (1,43)	40,35 (1,66)	-
Na (mmol/l)	156,69 (3,02)	155,54 (4,01)	160,14 (3,86)	-
K (mmol/l)	2,07 (0,12)	2,11 (0,17)	2,29 (0,12)	-
Ca (mmol/l)	2,38 (0,06)	2,18 (0,06)	2,25 (0,06)	-
Kasvu (kJ/kg/d)	-11,95 (3,38)	-14,08 (3,26)	-9,57 (5,07)	-
Hapenkulutus (kJ/kg/d)	35,84 (2,16)	41,71 (7,79)	45,07 (5,18)	-
jälkeen	n=9	n=7	n=6	
Glukoosi (g/l)	1,03 (0,12)	1,21 (0,28)	1,11 (0,14)	>0,1
Proteiini (g/l)	36,57 (2,32)	34,07 (5,17)	42,77 (3,44)	>0,1
Na (mmol/l)	154,33 (3,70)	138,86 (5,45)	156,00 (4,78)	<0,05
K (mmol/l)	2,81 (0,09)	3,07 (0,21)	3,63 (0,21)	<0,01
Ca (mmol/l)	2,19 (0,17)	1,87 (0,16)	2,18 (0,09)	>0,1
Ravinnonsyöttö (kJ/kg/d)	138,14 (40,84)	121,97 (43,31)	146,36 (50,01)	-
Kasvu (kJ/kg/d)	14,28 (20,31)	6,67 (13,04)	-4,98 (18,86)	-
Hapenkulutus (kJ/kg/d)	60,58 (4,77)	56,85 (4,56)	54,83 (10,22)	-

Implantin luonne vaikutti heptosomaattisen indeksiin ($P<0,05$), joka oli korkein placebo-ryhmällä ja pienin kortisoli-ryhmällä (kuva 7).

Kirjolohen ruokailuaktiivisuuteen implantin luonne ei vaikuttanut vaan kaikissa ryhmissä keskiarvo oli sama ($P>0,1$) ja hajonta suuri. Myös ravinnon syöttömäärä ($\text{kJ kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) oli eri ryhmissä samansuuruinen (taulukko 1).



Kuva 6. Kortisoli-, mifeprironi- ja placeboimplantin vaikutus kirjolohen plasman kortisolipitoisuuksiin ($\mu\text{g l}^{-1}$), kasvuun, kuiva-aineen kasvuun ja hapenkulutukseen ($\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) ennen ja jälkeen implantin asennuksen. Ennen implantin asennusta kalat paastosivat. Implantin asennuksen jälkeinen kasvu, ja kuiva-aineen kasvu on suhteutettu ruokailuaktiivisuuteen ($n=22$) ja hapenkulutus ravinnon syöttömäärään ($\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$). Virhejanat esittävät 95 % luottamusvälejä keskiarvoille



Kuva 7. Kortisoli-, placebo- ja mifeproni-implantin vaikutus kirjolohen hepa-
tosomaattiseen indeksiin (% ruumiinpainosta) kolme viikkoa implantin
asennuksen jälkeen. Pylväät esittävät käsittelykeskiarvoja ja virhejanat ke-
sikiarvojen 95 % luottamusvälejä.

Implantin luonne vaikutti kokeessa selvästi kalan kasvuun (kuva 6). Kasvua implantin asennuksen jälkeen selitti hyvin kovarianssianalyysimalli, jossa selittävinä tekijöinä käytettiin kalan saamaa rehumäärää ja implantin luonnetta. Malli on ositettuna seuraava:

kortisoliryhmälle: $G = 1.05 \cdot C - 6.84$

placeboryhmälle: $G = 1.05 \cdot C - 2.04$

mifeprioniryhmälle: $G = 1.05 \cdot C - 4.40$

Malleissa G = kasvu ($\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$), C =syöty ravintomäärä ($\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$).

Koko malli selitti 81,6 % kirjolohen kasvusta siirrännäisten asentamisen jälkeen. Käsittelyn vaikutus oli tilastollisesti merkitsevä ($P < 0,05$) ja rasvaimplantilla varustetut kalat kasvoivat selkeästi nopeammin kuin mifeproni- ja kortisoli-implantilla varustetut kalat.

Käsittelyjen välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja kalan vesipitoisuudessa ($P > 0,1$).

Vesipitoisuuden keskiarvot kortisoli-, placebo- ja mifeprioniryhmälle olivat 67,4 %; 67,6 % ja 68,6 % (keskivirhe=0,3 %). Kuiva-aineen kasvu ($\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) oli implantin asennuksen jälkeen korkeinta placeboryhmässä ja alhaisinta kortisoliryhmässä (kuva 6). Implantin luonne vaikutti tilastollisesti merkitsevästi asennuksen jälkeiseen kuiva-aineen kasvunopeuteen ($P < 0,05$).

Kortisoliryhmän kaloilla hapenkulutuksen taso oli alhaisempi kuin muilla kaloilla (kuva 6) ($P < 0,05$) ja ravinnon syöttömäärä vaikutti selvästi hapenkulutukseen ($P < 0,001$). Yhden rehugramman syöttäminen altaaseen kohotti kalan hapenkulutusta $0,19 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Kovarianssimalli, jossa selittävinä tekijöinä käytettiin ravinnon syöttömäärää ja implantin luonnetta, selitti 75,4 % hapenkulutuksen vaihtelusta implantin asennuksen jälkeen. Selitys hapenkulutuksen alhaiselle tasolle kortisolisiirännäisryhmässä löytyy todennäköisesti siitä, että ryhmän kalat eivät syöneet altaaseen syötettyä rehua. Tätä ei voida kuitenkaan vahvistaa, koska tässä kokeessa ei mitattu syömättömän rehun määrää.

Kokeen aikana yli 50 % kaloista kuoli. Tähän oli todennäköisimpänä syynä ruokinnasta johtuva kiertovesijärjestelmän likaantuminen, joka aiheutti virtaaman alentumisen ja happipitoisuuden laskun altaassa. Saatujen kokemusten perusteella koerakennelmaan tehtiin lukuisia parannuksia. Altaiden vesitysputkia, katteita, ruokintalaitteita, mittausohjelmaa, ruokintaohjelmaa, hoitorutiineja, altaan sisäistä kiertoa, moduulin kiertoveden ilmastusta ja akklimointijakson hoitorutiineja parannettiin ennen seuraavaa koetta. Toimilla lisättiin laitteiston toimintavarmuutta ja pyrittiin vähentämään kuolleisuusriskiä myöhemmin tehtävissä kokeissa.

- Plasman kortisolitasot pysyvät kohonneina kolme viikkoa implantin asennuksesta.
- Koska mifepironi-implanttikalojen plasman natrium ja kaliumpitoisuudet olivat alhaisemmat kuin kortisolikaloilla, kortisolilla näyttäisi olevan plasman ionitasoja ylläpitävä rooli.
- Kortisoli-implantit alensivat kalan kasvua myös yksittäin pidetyillä kaloilla.
- Kasvuero kortisoli ja placebo-ryhmän välillä ei selity hapenkulutuserojen avulla, joten kasvun täytyy muuttua jonkin muun vaikutusmekanismin kautta.

3.4. Kortisolin vaikutus kirjolohen veriparametreihin, kasvuun, aineenvaihduntaan ja ravinnonottoon - osakoe 2

Edellinen koe toistettiin. Kokeessa käytettiin 3 viikkoa 15°C :ssa akklimoituja kirjolohia. Kirjoloheet siirrettiin koejärjestelmään ja niiden annettiin olla ja ruokailla järjestelmässä 2 viikkoa. Tämän jälkeen kaloille asennettiin joko rasvaimplanti tai kortisoli-rasvaimplanti (kortisolia 7,92 % painosta) ja kalat punnittiin. Implantin koko suhteutettiin kalan painoon siten, että kortisoliannos oli $91,3 \text{ ug g}^{-1}$. Kolme viikkoa implanttien asennuksen jälkeen koe lopetettiin, kalat punnittiin, ja niistä otettiin verinäyte, joka sentrifugoitiin ja plasmasta määritettiin kortisoli-, glukoosi-, proteiini-, kalsium-, kalium- ja natriumpitoisuus.

Syömättömän rehun kappalemäärä laskettiin poistoputkesta 3 kertaa viikossa. Syömättömän rehun määrä laskettiin seuraavasti:

$$UC = [\text{average}(4W_p n_{mk}) / W_f] / t, \text{ missä}$$

$$UC = \text{syömätön rehu (g kg}^{-1} \text{ d}^{-1})$$

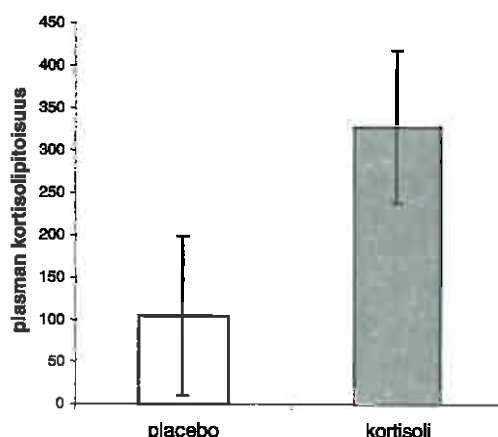
$$n_{mk} = 1/4 \text{ muovikartiossa havaittujen rehupellettien määrästä (kpl d}^{-1})$$

$$W_p = \text{rehupartikkelin paino (g)}$$

$$W_f = \text{kalan keskimääräinen paino havaintojaksolla (kg)}$$

$$t = \text{aika (d)}$$

$$\text{average} = \text{laskentapäivien keskiarvo}$$



Kuva 8. Kirjoloheen plasman kortisolipitoisuus ($\mu\text{g l}^{-1}$) kolme viikkoa kortisoli- ja placeboimplanttien asennuksen jälkeen. Pylväät kuvaavat keskiarvoja ja virhejانات keskiarvojen 95 % luottamusvälejä.

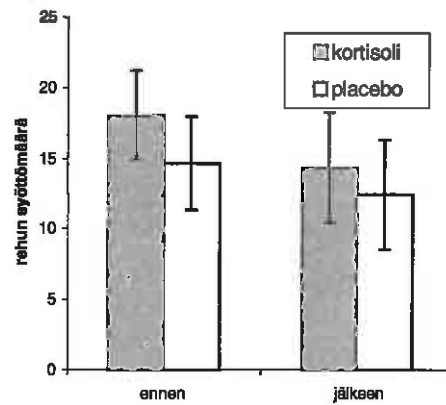
Plasman kortisolipitoisuus oli noin kolminkertainen kortisoli-implanttiryhmällä placeboryhmään verrattuna (kuva 8). Ero oli tilastollisesti merkitsevä ($P < 0,05$). Placeboryhmän kortisolitaso oli myös korkeampi kuin aikaisemmissa kokeissa, mikä viittaa voimakkaaseen stressiin. Tämä on saattanut olla seurausta kokeessa käytetyn kiertovesijärjestelmän kontaminoitumisesta.

Plasman proteiini-, glukoosi-, natrium- tai kaliumpitoisuuksiin implantin luonne ei vaikuttanut tilastollisesti merkitsevästi (taulukko 2). Plasman kalsiumpitoisuus oli kortisoliryhmällä 10 % korkeampi kuin placeboryhmällä (taulukko 2).

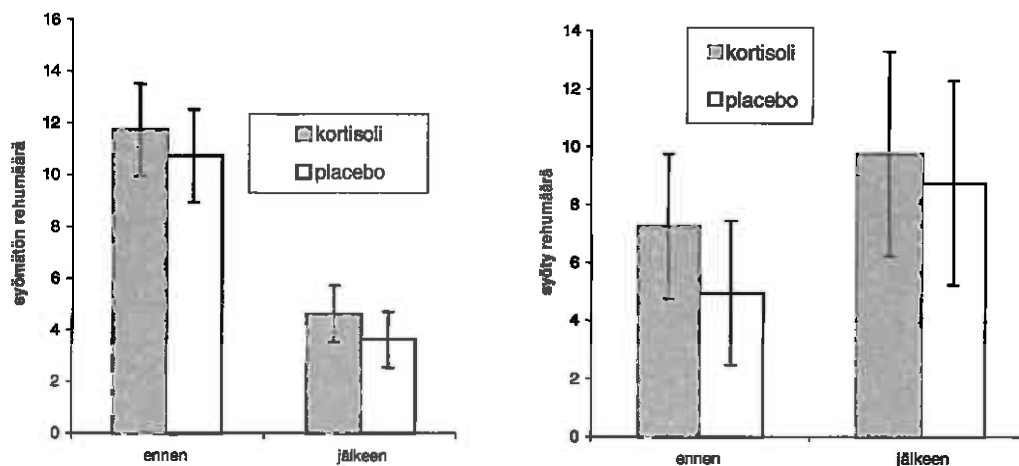
Taulukko 2. Kirjoloheen plasman glukoosi-, proteiini-, Na-, K-, Ca-pitoisuudet kolme viikkoa kortisoli- tai placeboimplantin asennuksen jälkeen sekä asennuksen jälkeisen jakson ravinnonoton, kasvun ja hapenkulutuksen energia-arvot. symbolit: ka =keskiarvo ja kv=keskivirhe ja P=tilastollinen todennäköisyys ryhmien samanlaisuudelle.

	placebo		kortisoli		P
	ka	kv	ka	kv	
Glukoosi (g/l)	1,91	(0,16)	1,81	(0,16)	$>0,1$
Proteiini (g/l)	43,10	(1,52)	47,01	(0,05)	$>0,05$
Na (mmol/l)	143,53	(2,68)	150,37	(2,68)	$>0,05$
K (mmol/l)	3,21	(0,19)	2,92	(0,19)	$>0,1$
Ca (mmol/l)	2,47	(0,05)	2,70	(0,05)	$<0,01$
Ravinnonotto (kJ/kg/d)	218,17	(52,36)	252,87	(36,81)	-
Kasvu (kJ/kg/d)	-76,65	(7,25)	-81,85	(7,20)	-
Hapenkulutus (kJ/kg/d)	74,47	(4,56)	83,14	(4,56)	-

Ravinnon syöttömäärissä ei ollut koko koejaksolla tilastollisesti merkitseviä eroja ($P>0,05$) käsittelyjen välillä (kuva 9). Syöttömän rehun määrässä ($\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) ei myöskään ollut käsittelyjen välillä merkitseviä eroja ($P>0,05$), mutta syöttömän rehun määrä aleni kokeen aikana (kuva 10). Implanttien asennuksen jälkeen syöttömän rehun määrä oli vain noin 50 % implanttien asennusta edeltävästä tasosta. Tämän seurauksena syödyn rehun määrä kasvoi toisella koejaksolla, mutta siinäkin ei esiintynyt tilastollisesti merkitseviä eroja käsittelyjen välille ($P>0,05$) (kuva 10).



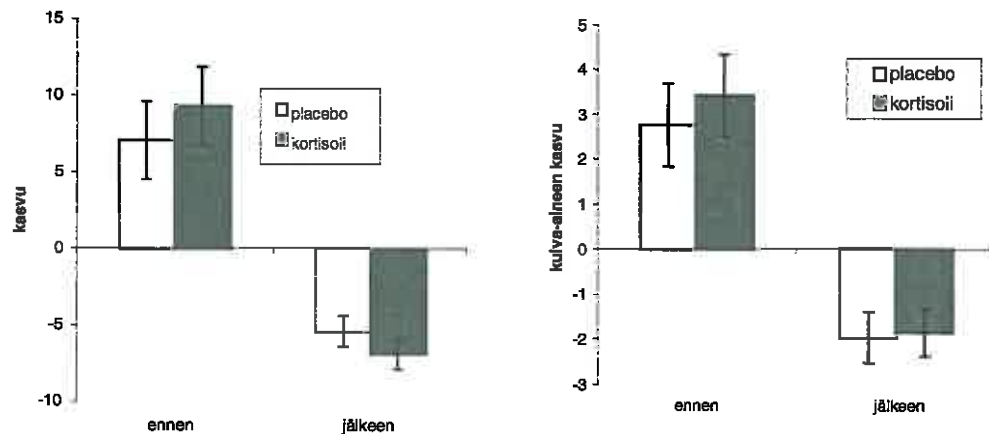
Kuva 9. Ravinnon syöttömäärät ($\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) ennen ja jälkeen kortisoli- ja placeboimplanttien asennusta. Pylväät edustavat käsittelykeskiarvoja ja virhe-
janat keskiarvojen 95 % luottamusvälejä.



Kuva 10. Syöttömän ja syöty rehumäärä ($\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) ennen ja jälkeen kortisoli- ja placeboimplanttien asennusta. Pylväät edustavat käsittelykeskiarvoja ja virhe-
janat keskiarvojen 95 % luottamusvälejä.

Implanttien asennusta seuraavien 5 päivän aikana ruokailu-aktiivisuus oli korkeampaa kortisoli-implanttiryhmällä placeboryhmään verrattuna ($P<0,05$). Jos ravinnon syöttömääriä tarkastellaan koko implanttien asennusta seuraavan kolmen viikon jaksolla käsittelyiden välillä ei kuitenkaan ollut eroa ($P>0,1$). Tulos viittaa siihen että kortisolin

vaikutus ruokailu-aktiivisuuteen on ajasta riippuva, ja että se stimuloisi lyhytaikaisesti ruokailuaktiivisuutta.



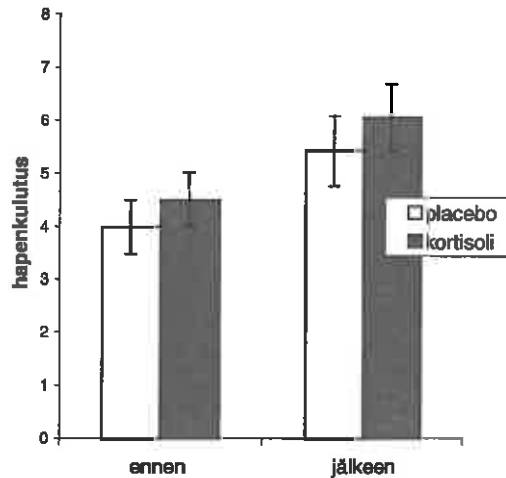
Kuva 11. Kirjolohen tuorepainon ja kuivapainon kasvu ($\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) ennen kortisoli- ja placeboimplantin asennusta ja sen jälkeen. Pylväät esittävät käsittelykeskiarvoja ja janat pylväiden sisällä keskiarvojen 95 % luottamusvälejä.

Ennen implanttien asennusta kalat kasvoivat yhtä nopeasti, mutta asentamisen jälkeen kummankin ryhmän kalat laihtuivat. Kortisoliryhmän kalat laihtuivat nopeammin kuin placeboryhmän kalat ($P < 0,05$) (kuva 11).

Alkunäytteenä otettujen kalojen vesipitoisuus oli 63,4 % (keskivirhe, kv.=0,2 %). Kokeen lopussa kortisolikaloiden vesipitoisuus (61,3 %, kv.=0,1 %) oli hieman alhaisempi kuin placebokaloiden (63,1 %, kv.=0,1 %) ja ero oli tilastollisesti merkitsevä ($P < 0,01$). Jotta kalojen kasvua kyetään arvioimaan energiana ($\text{kJ kg}^{-1} \text{d}^{-1}$), täytyy kyetä arvioimaan kalan kuiva-aine- ja energiapitoisuus sekä kokeen alussa että lopussa. Koska kalasta kyetään määrittämään em. arvot vain kerran, täytyy kuiva-aineen alkuarvot arvioida epäsuorasti. Kalan vesipitoisuus (% $W_{w\%}$) alkuhetkellä voitiin kuvata regressiomallilla ($\pm \text{kv.}$):

$W_{w\%} = -0,0037(\pm 0,0015)W + 65,0322(\pm 0,6951)$, missä W =kalan tuoremassa (g) alkuhetkellä.

Koska vesipitoisuudessa oli kokeen lopussa käsittelyjen välillä eroa, kuiva-aineen kasvunopeus oli implantin asennuksen jälkeen samansuuruisia käsittelyryhmillä ($P > 0,1$) huolimatta erilaisesta tuoremassan keskimääräisestä painonmenetyksestä (kuva 11). Jos painonmenetystä arvioidaan energiana, käsittelyjen välillä ei ollut merkitsevää eroa ($P > 0,1$). (taulukko 2).



Kuva 12. Kirjolohen keskimääräinen hapenkulutus (g kg⁻¹ d⁻¹) ennen asennusta ja sen jälkeen. Pylväät kuvaavat käsittelykeskiarvoja ja virhejannot 95 % luottamusvälejä keskiarvoille.

Kalojen hapenkulutus oli alhaisempaa ennen implanttien asennusta kuin sen jälkeen, mutta implanttien luonteella ei ollut vaikutusta hapenkulutuksen tasoon kokeen aikana ($P > 0,1$) (kuva 12).

Syömättömän rehun määrä oli ensimmäisellä jaksolla korkeampi kuin syödyn rehun määrä. Vaikka kalat laihtuivat jälkimmäisellä jaksolla tämä suhde oli kääntynyt toisinpäin ja mittaustemme mukaan kalat olivat syöneet jopa hieman enemmän kuin ensimmäisellä koejaksolla. Nämä seikat yhdessä viittaavat siihen, että itseruokintajärjestelmässä, syömättömän rehun mittaustavassa ja kierrätysvesijärjestelmässä oli jotakin kaloja ja mittauksia häiritseviä elementtejä. Tämä näkyy myös energiabudjetin komponenttien estimaateissa (taulukko 2). Tämän johdosta järjestelmän vesityksen toimintaperiaate muutettiin kiertovesijärjestelmästä läpivirtausjärjestelmäksi ja syömättömän rehun mittausten menetelmää parannettiin.

- Placeboryhmän kortisolitasot olivat kokeen lopussa korkealla, mikä viittaa stressautumiseen koeoloissa. Vaikka kortisoliryhmällä oli vieläkin korkeammat plasman kortisolipitoisuudet, kokeen tuloksista ei voitane tehdä kovin voimakkaita päätelmiä.
- Kortisoli-implantti ei kohottanut kalan hapenkulutustasoa eikä vaikuttanut merkittävästi kalan laihtumisnopeuteen energiana tai kuiva-aineena tarkasteltuna mikä tukee edellisen kokeen havaintoa, ettei kortisoli-implantti vaikuta kalan hapenkulutuksen tasoa kohottavasti.
- Korkea kortisolitaso voi lisätä lyhytaikaisesti kalojen ruokailuaktiivisuutta.

3.5. Kortisolin vaikutus kirjolohen veriparametreihin, kasvuun, aineenvaihduntaan ja ravinnonottoon - osakoe 3

Kokeessa käytettiin aikaisempaa miedompaa kortisoli-implanttia, koska aikaisemmissa kokeissa kortisolikalat olivat laihtuneet implantin asennuksen jälkeen (katso luvut 3.2, 3.3. ja 3.4.) ja kokeen lopussa kortisolipitoisuudet olivat niin korkeita, että ne vastasivat lähinnä akuuttia (katso luvut 3.3. ja 3.4.) kuin kroonista vastetta. Mittausjärjestelmä oli muutettu läpivirtausperiaatteella toimivaksi, jotta kalojen kasvuolot säilyisivät parempina koko kokeen ajan ja jotta kalojen keskinäinen, ts. moduulien sisäinen riippuvuus vähenisi.

Kaloja akklimoitiin 12 °C:ssa kolme viikkoa, jonka jälkeen ne siirrettiin koejärjestelmään. Kolmen viikon mittausjakson jälkeen kalat saivat joko aikaisempaa miedomman kortisoli-implantin (kortisolia 4,90 % painosta) tai pelkän rasvaimplantin vatsaonteloonsa. Altaiden happipitoisuuksia, virtaamia, lämpötiloja sekä ruokailuaktiivisuutta mitattiin kolme viikkoa ennen ja jälkeen implanttien asennuksen. Kalan kasvu mitattiin kahdessa jaksossa: ennen ja jälkeen implanttien asennuksen.

Kokeen lopussa kaloilta otettiin verinäytteet, jotka esikäsiteltiin ja joista analysoitiin samat veriparametrit kuten aikaisemminkin. Kalat pakastettiin ja käsiteltiin sen jälkeen kuten on kuvattu kokeiden yhteisissä menetelmissä ja kalojen kosteus- ja energiapitoisuus mitattiin.

Muovikartioon kertyneet syömättömät rehupartikkelit sekä puhdistuksen yhteydessä poistuvat rehupartikkelit laskettiin 5 kertaa viikossa ja altaan pohjalle jääneet rehupartikkelit kerran viikossa. Syömättömän rehun (UC , $g\ kg^{-1}\ d^{-1}$) määrä arvioitiin seuraavasti:

$$UC = [(4\Sigma n_{mk} + \Sigma n_p + \Sigma n_a)W_p/W_f]/t, \text{ missä}$$

$$UC = \text{syömättömän rehun määrä (} g\ kg^{-1}\ d^{-1} \text{)}$$

$$n_{mk} = \text{muovikartion neljänneksestä laskettujen rehupartikkelien määrä (kpl}\ d^{-1} \text{)}$$

$$n_p = \text{puhdistuksessa poistuneiden rehupartikkelien määrä (kpl}\ d^{-1} \text{)}$$

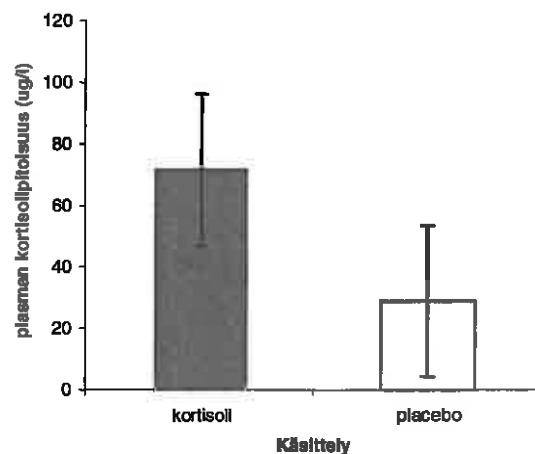
$$n_a = \text{altaassa olevien rehupartikkelien määrä (kpl}\ d^{-1} \text{)}$$

$$W_p = \text{rehupartikkelin paino (} g\ kpl^{-1} \text{)}$$

$$W_f = \text{kalan keskimääräinen paino havaintojaksolla (kg)}$$

$$t = \text{aika (d)}$$

Kortisoli-implantti kohotti plasman kortisolipitoisuutta siten, että kortisolipitoisuus 2,5-kertainen placeboryhmään verrattuna vielä kolmen viikon kuluttua implantin asennuksesta. Ero oli tilastollisesti merkitsevä ($P < 0,05$) (kuva 13).



Kuva 13. Kortisoli- ja placeboimplantin vaikutus kirjolohen plasman kortisolipitoisuuteen ($\mu\text{g l}^{-1}$) kolme viikkoa Implanttien asennuksen jälkeen. Pylväät esittävät keskiarvoja ja janat 95 % luottamusvälejä keskiarvoille.

Muiden mitattujen veriparametrien osalta implantin luonteella ei havaittu olevan vaikutusta enää kolme viikkoa asennuksen jälkeen (taulukko 3).

Taulukko 3. Kortisoli- ja placeboryhmien veriparametrit kolme viikkoa implanttien asennuksen jälkeen sekä ravinnonoton, kasvun ja hapenkulutuksen energia-arvot ennen ja jälkeen implanttien asennuksen. ka.=keskiarvo ja kv. keskiarvon keskivirhe. P=tilastollinen todennäköisyys ryhmien samanlaisuudelle.

muuttuja	placeboryhmä		kortisoliryhmä		P
	ka.	kv.	ka.	kv.	
Glukoosi (g/l)	1,24	(0,16)	1,42	(0,16)	>0,1
Na (mmol/l)	169,80	(2,60)	171,81	(2,60)	>0,1
K (mmol/l)	3,09	(0,12)	2,77	(0,12)	>0,05
Ca (mmol/l)	2,64	(0,07)	2,54	(0,07)	>0,1
Proteiini (g/l)	47,58	(1,68)	47,79	(1,68)	>0,1
ennen-Ravinnonotto (kJ/kg/d)	384,53	(39,13)	359,78	(31,58)	-
Kasvu (kJ/kg/d)	134,98	(19,55)	142,23	(20,17)	-
Hapenkulutus (kJ/kg/d)	52,62	(3,53)	51,60	(3,67)	-
jälkeen- Ravinnonotto (kJ/kg/d)	371,55	(38,99)	280,10	(41,39)	-
Kasvu (kJ/kg/d)	138,97	(18,72)	84,07	(40,80)	-
Hapenkulutus (kJ/kg/d)	73,47	(4,91)	62,12	(3,07)	-

Ruokailuaktiivisuudessa oli suurta yksilön sisäistä ajallista vaihtelua. Kortisoli-implanttiryhmän keskimääräinen ruokailuaktiivisuus näytti laskevan implantin asennuksen jälkeen, kun taas placeboryhmässä keskimääräinen ruokailuaktiivisuus säilyi ennallaan (kuva 14). Implanttien asennuksen jälkeistä ruokailuaktiivisuuden (kpl d⁻¹) aikariippuvuutta tutkittiin laskemalla jokaiselle kalalle regressiomalli:

$$\text{ruokailuaktiivisuus} = a \cdot \text{aika} + b$$

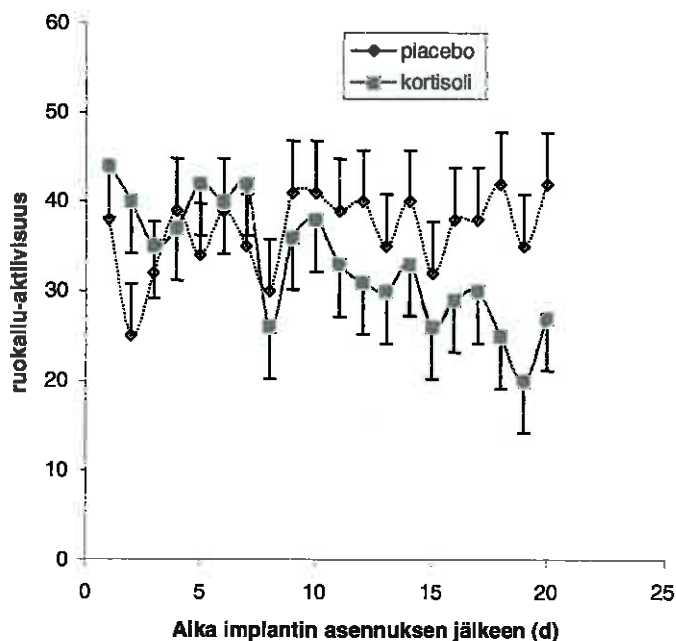
Mallin antamia kulmakertoimia (a) ja lähtötasoja (b) vertaamalla havaittiin, että log-transformoitu plasman kortisolipitoisuus (ln(cort)) korreloi negatiivisesti ruokailuaktiivisuuden ja ajan (päiviä asennuksen jälkeen) välisen suhteen kulmakertoimeen (a):

$$a = -3,27(\pm 0,84) \cdot \ln(\text{cort}) + 8,96(\pm 3,32), r^2 = 0,25, P < 0,01; \text{funktion kulmakertoimelle.}$$

Plasman kortisolipitoisuus vaikutti myös positiivisesti lähtötasoon (b):

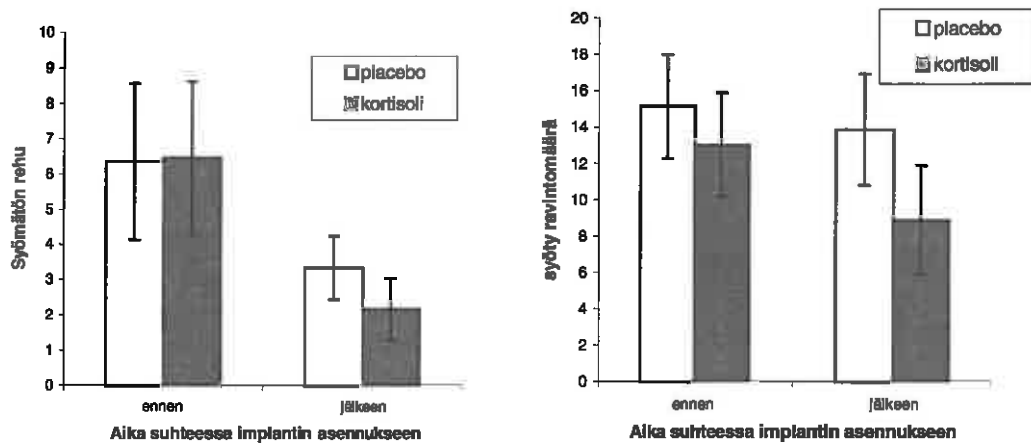
$$b = 25,87(\pm 10,31) \cdot \ln(\text{cort}) + 61,88(\pm 29,81), r^2 = 0,12, P < 0,05; \text{funktion kulmakertoimelle.}$$

Alhaiset selitysasteet viittaavat siihen, että ruokailuaktiivisuuden dynamiikkaan vaikuttavat myös muut tekijät.



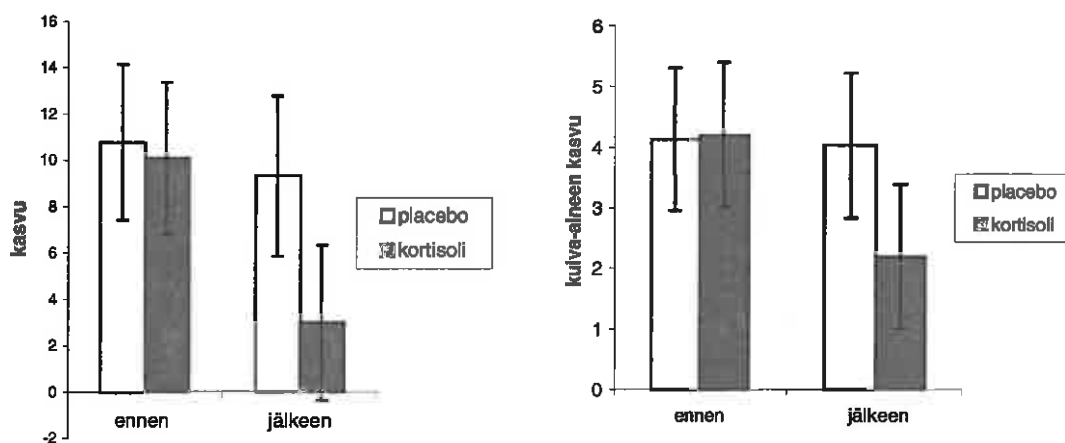
Kuva 14. Kortisoli- ja placeboimplantin vaikutus kirjoloihen ruokailuaktiivisuuden (kpl d⁻¹) ajalliseen kehittymiseen, pisteet esittävät käsittelykeskiarvoja ja janat keskivirhettä.

Ennen implanttien asennusta syömättömän rehun määrä oli kummassakin ryhmässä keskimäärin samanlainen ($6,4 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $P>0,1$) ja aleni 30-50 % implanttien asennuksen jälkeen. Implantin luonne ei kuitenkaan vaikuttanut syömättömän rehun määrään ($P>0,05$) (kuva 15).



Kuva 15. Kortisoli- ja placeboimplantin vaikutus kirjolohen syömättä jättämän ja syömän rehun määrään ($\text{g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Janat palkkien sisällä kuvaavat käsittelykeskiarvojen 95 % luottamusvälejä. Kummankin mittausjakson kesto 20 vuorokautta.

Implantin luonne vaikutti asennuksen jälkeiseen syötyyn ravintomäärään ($\text{g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$) tilastollisesti merkitsevästi ($P<0,05$). Kortisoli-implantilla varustetut kalat söivät keskimäärin kolmanneksen vähemmän kuin placeboimplantilla varustetut kalat (kuva 15).



Kuva 16. Kortisoli- ja placeboimplantin vaikutus kirjolohen kasvuun ja kuiva-aiheen kasvuun ($\text{g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$) sekä kasvu ennen implanttien asennusta. Janat pylväiden sisällä kuvaavat 95 % luottamusvälejä pylvään esittämälle keskiarvolle.

Kirjolohet, joille oli asennettu kortisoli-implantti kasvoivat huomattavasti hitaammin kuin ne kalat, joille oli asennettu placeboimplantti ($P < 0,01$). Kasvu oli kortisoliryhmällä vain noin kolmanneksen placebokalojen kasvunopeudesta. Ennen asennusta kummankin ryhmän kalat kasvoivat yhtä nopeasti ($> 10 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$) ja myös näihin arvoihin verrattuna kortisoliryhmän kalat kasvoivat hitaammin implantin asennuksen jälkeen, kun taas placeboryhmän kalat kasvoivat lähestulkoon samalla nopeudella kuin ennen asennusta (kuva 16).

Syöty ravintomäärä (C , $\text{g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$) ja implantin luonne vaikuttivat kalan kasvuun seuraavasti (kovarianssimalli, $r^2=0,46$, $n=43$):

kortisoliryhmä: $G=0,68 \cdot C - 1,59$

placeboryhmä: $G=0,68 \cdot C - 0,13$

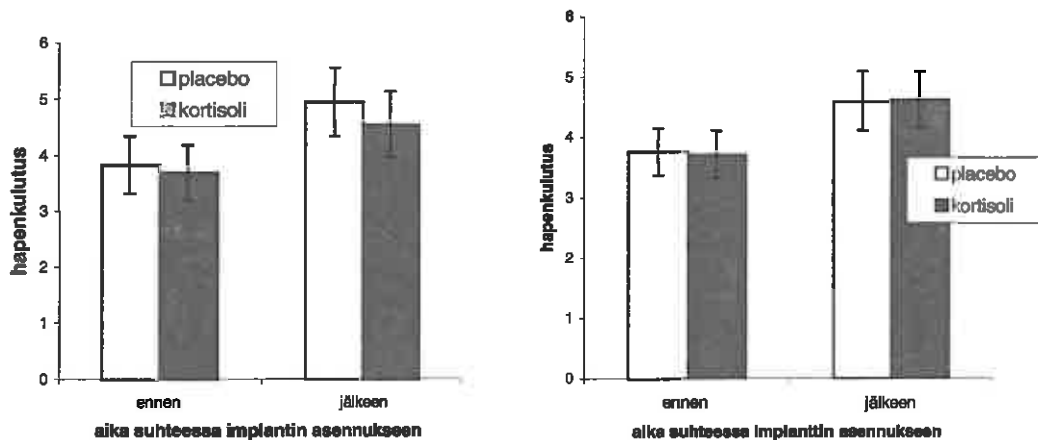
Käsittelyjen välinen ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($P > 0,1$) vaan mallin mukaan kalan kasvu kokeen aikana selittyi syödyn ravintomäärän avulla. Havaitut kasvuerot implanttiryhmien välillä selittyivät siten sillä, että implantit vaikuttivat kasvuun epäsuorasti ravinnonkulutuksen kautta.

Alkunäytteiden keskimääräinen vesipitoisuus oli 71,0 % (kv.=0,2%). Kalan koko vaikutti negatiivisesti kalan vesipitoisuuteen (% $W_{w\%}$) ja voitiin arvioida seuraavasti ($\pm \text{kv.}$):

$W_{w\%} = -0,0127(\pm 0,0055)W + 73,4399(\pm 1,0606)$, missä W =kalan tuoremassa (g).

Kokeen lopussa kalojen vesipitoisuus oli alhaisempi kuin alunäytteissä ja kuiva-ainepitoisuus vastaavasti korkeampi. Placeboryhmän kuiva-aineen kasvunopeus oli implanttien asennuksen jälkeen nopeampaa kuin kortisoliryhmän ($P < 0,05$) (kuva 16). Jos syötyä ravintomäärää käytettiin kovariaattina, implanttiryhmien kuiva-aineen kasvunopeudessa ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevää eroa ($P > 0,1$). Energiakasvussa ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa ($P > 0,05$) käsittelyryhmien välillä.

Implanttien asennusta edeltävänä jaksena energian sitoutumistehokkuus oli placeboryhmällä 33,95 % (kv.=6,40 %) ja kortisoliryhmällä 41,53 % (kv.=2,78 %). Placeboryhmän keskimääräinen energian sitoutumistehokkuus oli implanttien asennuksen jälkeen 36,65 % (kv.=6,45 %) syödyn ravinnon energiamäärästä ja kortisoliryhmällä 23,79 % (kv.=7,22 %). Implantin luonne ei vaikuttanut tilastollisesti merkitsevästi energian sitoutumistehokkuuteen ($P > 0,1$).



Kuva 17. Kortisoli- ja placeboimplantin vaikutus kirjolohen hapenkulutukseen ($\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) (vasemmalla) sekä hapenkulutukseen, kun kasvun vaikutus on poistettu (oikealla). Janat esittävät 95 % luottamusvälejä käsittelykeskiarvoille. Molempien mittausjaksojen kesto oli 20 vuorokautta. Kalojen lukumäärä oli 20 placeboryhmässä ja 22 kortisoliryhmässä.

Ennen implanttien asennusta ryhmien keskimääräisessä hapenkulutuksessa ei ollut eroa ($P>0,1$) (kuva 17). Implantin asennuksen jälkeen kummankin ryhmän keskimääräinen hapenkulutus kohosi jonkin verran, mutta implanttien välillä ei ollut eroa ($P>0,1$). Sekä ennen asennusta että asennuksen jälkeen kalan kasvu vaikutti tilastollisesti erittäin merkitsevästi hapenkulutuksen tasoon ($P<0,001$). Ennen implantin asennusta kalan kasvu yhdellä grammalla ($\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) kohotti hapenkulutusta $0,086 \text{ g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ ja asennuksen jälkeen $0,080 \text{ g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ kertoimien välinen ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($P>0,1$). Kun kasvunopeuden ero otettiin huomioon, keskimääräinen hapenkulutus oli lähes identtinen implanttiryhmien välillä (kuva 17). Tämä tukee osaltaan sitä, että kortisoli vaikuttaa kasvuun vaikuttamalla ravinnonottoon, kuten myös muut tämän kokeen tulokset osoittivat, eikä kohottamalla hapenkulutusta.

- Aikaisempaa miedommat kortisoli-implantit kykenivät kohottamaan kirjolohen plasman kortisolipitoisuuksia kolmen viikon ajan.
- Kortisoli vaikutti aikariippuvaisesti ravinnonottoon, lyhytaikaisesti kortisoli stimuloi ruokailuaktiivisuutta ja myöhemmin laskee sitä hitaasti.
- Korkea kortisolipitoisuus ei kohota hapenkulutusta.
- Korkea kortisolipitoisuus hidastaa kalan märkä- ja kuiva-aineen kasvua.
- Korkea kortisolipitoisuus ei kuitenkaan hidasta tilastollisesti merkitsevästi kalan kasvua energiana, mikä viittaa siihen, että kortisoli saattaa stimuloida kasvun suuntaamista rasvakasvun suuntaan.

3.6. Lämpötilan nousun vaikutus kirjolohen stressitasoon

Lämpötilannousun on osoitettu kohottavan kalan hapenkulutusta lyhytaikaisesti yli samassa lämpötilaan sopeutuneen (aklimoituneen) kalan hapenkulutustason (Evans 1990, Lyytikäinen & Jobling 1998). Tällä kokeella halusimme selvittää aiheuttaako nopea lämpötilannousu stressiä, joka voisi selittää osittain lämpötilan nousuun liittyvän hapenkulutuksen kohoamisen.

Kaloja ei ruokittu kokeen aikana, mutta ruokintajärjestelmä pidettiin päällä, jotta kyettiin mittaamaan kalojen ruokailuaktiivisuuden kestoa ilman rehuannosta. Viikon paaston aikana noin 40 % kaloista poistui koealtaista hyppäämällä. Akklimoinnin jälkeen veden lämpötiloja nostettiin 24 altaassa 13:sta 19 °C:een ja 24 allasta pidettiin samanaikaisesti 13 °C:ssa. Kaloista otettiin verinäyte, joka esikäsiteltiin kuten edellä ja josta määritettiin kortisoli-, kalsium-, kalium-, natrium-, glukoosi- ja proteiinipitoisuus.

Yksittäinen lämpötilan nousu ei aiheuttanut mitattavaa stressiä kirjolohelle, koska plasman kortisoli-, glukoosi-, proteiini- ja kalsiumpitoisuudet olivat samanlaisia kuin ryhmässä, jonka lämpötila pidettiin 13 °C:ssa. Kaliumpitoisuudet kohosivat plasmassa kuitenkin noin 20 % lämpötilan nousun seurauksena ja indikoivat luultavasti hermostollista stimulaatiota, joka on aiheutunut lämpötilan noususta (taulukko 4).

Taulukko 4. Lämpötilan nousun vaikutus kirjolohen veriparametreihin. ka.=keskiarvo ja kv. =keskiarvon keskivirhe. P=tilastollinen todennäköisyys ryhmien samanlaisuudelle.

muuttuja	normaali		lämpötilan nousu		P
	ka.	kv.	ka.	kv.	
Kortisoli (µg/l)	17,74	(5,69)	22,57	(5,69)	>0,1
Glukoosi (g/l)	0,721	(0,05)	0,729	(0,05)	>0,1
Proteiini (g/l)	29,35	(0,95)	31,22	(1,00)	>0,1
Na (mmol/l)	175,09	(1,71)	176,00	(1,89)	>0,1
K (mmol/l)	2,89	(0,17)	3,58	(0,19)	<0,05
Ca (mmol/l)	1,99	(0,07)	2,01	(0,07)	>0,1

- Yksittäinen lämpötilan nousu 6 °C:lla ei aiheuta välitöntä stressireaktiota kirjolohella, koska plasman kortisoli- ja glukoositasot olivat samanlaiset kuin vakio- lämpötilassa pidetyssä ryhmässä.

3.7. Happipitoisuuden alenemisen vaikutus kirjolohen stressitasoon

Vastaava koe kuin lämpötilan äkillisen muutoksen kanssa tehtiin myös veden happipitoisuuden nopealla laskulla. Kaloja ei ruokittu kokeen aikana, mutta ruokintajärjestelmä pidettiin päällä, jotta kyettiin seuraamaan kalojen ruokailuaktiivisuuden kehitystä ilman rehuannosta. Viikon akklimoinnin jälkeen vesitys pysäytettiin 24 altaassa ja 24 altaan vesitys pidettiin normaalina. Kaloista otettiin verinäyte noin tunnin kuluttua pysäytyksestä. Verinäyte esikäsiteltiin kuten aikaisemmin on kuvattu ja siitä määritettiin plasman kortisoli-, kalsium-, natrium-, kalium-, glukoosi- ja proteiinipitoisuus. Koikkeella haluttiin selvittää aiheuttaako happipitoisuuden aleneminen stressiä.

Yksittäinen happipitoisuuden lasku altaan vesitys pysäyttämällä ei aiheuttanut stressin tunnusmerkkejä kirjolohelle, plasman kortisoli-, glukoosi-, Na-, K-, Ca- ja proteiinipitoisuus olivat samanlaisia kuin normaaliryhmässä. Kortisolitasot olivat kummassakin ryhmässä matalia (taulukko 5).

Taulukko 5. Happipitoisuuden laskun vaikutus kirjolohen veriparametreihin noin tunnin kuluttua vesityksen pysäyttämisestä. ka.=keskiarvo ja kv.=keskiarvon keskivirhe. P=tilastollinen todennäköisyys ryhmien samanlaisuudelle.

muuttuja	normaali		happipitoisuuden lasku		P
	ka.	kv.	ka.	kv.	
Kortisoli (µg/l)	9,91	(2,38)	9,27	(2,44)	>0,1
Glukoosi (g/l)	0,750	(0,03)	0,759	(0,03)	>0,1
Proteiini (g/l)	29,38	(0,78)	28,33	(0,79)	>0,1
Na (mmol/l)	174,70	(1,41)	171,26	(1,44)	>0,1
K (mmol/l)	3,03	(0,08)	2,92	(0,08)	>0,1
Ca (mmol/l)	2,06	(0,05)	2,02	(0,05)	>0,1

- Yksittäinen happipitoisuuden lasku ei aiheuttanut mitattavaa stressireaktiota kirjolohen plasman kortisoli- ja glukoosipitoisuuksissa.

4. Päätelmät

4.1. Stressi ja sen merkitys

Tyypillisesti stressireaktio voidaan jakaa kolmeen osaan, hälytysvaiheeseen, sietovaiheeseen ja voipumisvaiheeseen (Wedemeyer et al. 1990). Ensimmäisessä vaiheessa hypothalamus-aivolisäke-munuaisakseli aktivoituu, katekolamiineja ja kortikosteroideja eritetään ja niiden vaikutuksesta fysiologiassa tapahtuu useita muutoksia, joilla kala pyrkii sopeutumaan ja säilyttämään sisäisen tilansa vakaana.

Sietovaiheessa kalan elimistö on kyennyt palauttamaan sisäisen fysiologisen tilan vakaaksi. Kala on toipunut, mutta on voinut uhrata paljon voimavarojaan, jolloin kalan kyky toimia on heikentynyt. Voipumisvaiheessa stressi on ajallisesti kestänyt niin pitkään, ettei kala enää kykene ylläpitämään sisäistä vakauttaan ja osasta fysiologisista prosesseista, joilla kala on alunperin pyrkinyt sopeuttamaan elimistöään stressiin tulee vähitellen kalan sisäistä tilaa edelleen pahentavia.

Jos kalan elimistö jaetaan organisaatiotasoihin, voimme erottaa toisenlaisen jaottelun kalan stressin ilmenemiselle (Wedemeyer et al. 1990). Primaarissa stressireaktiossa keskushermosto stimuloi stressihormonien tuottamista. Sekundaarisessa stressireaktiossa nämä kohonneet stressihormonipitoisuudet aiheuttavat muutoksia kudoksissa ja veressä (esim. nostavat veren glukoositasoja, vähentävät veren hyytymisaikaa, lisäävät virtsaneritystä ja elektrolyyttien menetystä sekä alentavat maksan glykokeenipitoisuuksia). Tertiaarisessa stressireaktiossa nämä primaariset ja sekundaariset stressireaktiot vaikuttavat kokonaisen kalayksilön kykyyn kasvaa, sietää taudinaiheuttajia, lisääntyä ja säilyä elossa.

Yleisin esimerkki voipumisvaiheesta on kortisolin vaikutus elimistössä. Primaarivaiheessa sitä eritetään verenkiertoon ja sen pitoisuus nousee moninkertaiseksi lepovaiheen kortisolipitoisuuteen verrattuna. Jos stressi menee ohi, pitoisuudet alkavat laskea mutta jos stressi jatkuu, kortisolitasot voivat pysyä korkeina pitkäänkin. Kohonneiden kortisolipitoisuuksien on osoitettu lisäävän kahden viikon mittaisissa altistuskokeissa maksan katekolamiinireseptorien määrää (Reid et al. 1992). Tämä puolestaan lisää kalan reaktiivisuutta äkillisiin stressitekijöihin. Jos kortisolitasot ovat vielä kauemmin korkeita, ne aiheuttavat kortisolireseptoreiden määrän alenemista (Pottinger 1990, Weyts et al. 1998), jolloin vastaavaan kortisolipitoisuuden nousuun reagoidaan laimeammin.

Tässä työssä haluttiin tutkia stressin vaikutusta tertiääritason ominaisuuksiin simuloimalla primaarivaiheen reaktiota. Tämä tehtiin kohottamalla kirjolohen kortisolitasoja rasvaimplanttien avulla. Tämän lähetyksellisen validiteettia voidaan tarkastella tutkimalla miten kortisoli-implanttien vaikutukset vastaavat "luonnollisen" stressin vaikutuksia sekundaarivaiheen stressireaktiossa. Jos vaikutukset ovat samansuuntaisia, mutta vain osittaisia (näkyvissä vain osassa parametreista), lähestymistapamme johtaa stressin vaikutusten aliarvioon tertiäärivaiheessa.

Kortisoli-implantit kohottivat plasman kortisolitasoja selvästi ja vielä kolmen viikon kuluttuakin nämä olivat selvästi korkeampia kuin placebokaloilla tai samoilla kaloilla ennen kortisoli-implantin asennusta. Kortisoli-implantit kohottivat plasman kalsium-, proteiini- ja glukoosipitoisuuksia ja alensivat hepatosomaattista indeksia aivan kuten kohonneiden kortisolitasojen on havaittu vaikuttavan muissakin töissä (Leach & Taylor 1982, Flik & Perry 1989, Vijayan & Leatherland 1989, Postlethwaite & McDonald 1995, Morgan & Iwama 1996). Kortisoli-implantti ei kuitenkaan alentanut plasman Na- ja K-ionien määrää, joka poikkeaa selvästi sekundaarisen stressireaktion kaavasta (Barton & Iwama 1991, McDonald & Milligan 1997). Tuloksesta voidaan päätellä, et-

tä veren ionien tasapaino järkkyy todennäköisesti muiden tekijöiden kuin kortisolin vaikutuksen vuoksi eli lähinnä katekolamiinien erityksestä (McDonald & Milligan 1997). Sitä vastoin mifepironi- ja kortisoliryhmien väliset erot plasman ionitasapainossa osoittavat, että kortisoli auttaa ylläpitämään plasman ionitasoja normaaleina ja sen vaikutuksen estäminen mifepironilla johtaa plasman ionitason alenemiseen. Tulos on samansuuntainen aikaisempien tutkimustulosten kanssa (esim. Bern & Madsen 1990, Morgan & Iwama 1996, McDonald & Milligan 1997). Kortisoli-implantin vaikutukset ovat tietyllä tavalla aliarvioita todellisesta stressistä, koska katekolamiinien eritykseen liittyviä stressireaktioita ei mitattu eikä niiden vaikutusta siten kyetä arvioimaan tämän tutkimuksen perusteella.

Kortisoli-implantti alensi kasvua kuten kohonneiden kortisolitasojen on havaittu aikaisemminkin vaikuttavan (Barton et al. 1987, Vijayan & Leatherland 1989, Pickering 1990b). Tämä vaikutus selittyi viimeisessä kokeessa, jossa syömättömän rehun mittaus oli menetelmällisesti tarkinta, suoraan alentuneella ravinnon syöntimäärällä. Hapenkulutukseen kortisoli-implantti ei juuri vaikuttanut, joten on oletettavaa, että hapenkulutuksen kohoaminen stressissä (Barton & Schreck 1987, Morgan & Iwama 1996) on seurausta katekolamiinien erityksestä. Aikaisemmin julkaistut positiiviset korrelaatiot hapenkulutuksen ja plasman kortisolipitoisuuden välillä (Barton & Schreck 1987, Morgan & Iwama 1996), indikoivatkin ehkä vain sitä että katekolamiinien ja kortisolipitoisuudet korreloivat voimakkaasti. Toinen selitysmalli tulosten eroille voi olla, että kortisolipitoisuudet stimuloivat hapenkulutusta vain lyhytaikaisesti kortisolipitoisuuden kohoamisen jälkeen. Em. tutkimuksissa hapenkulutusta on mitattu lyhytaikaisesti (60-90 min) ja pian kortisolipitoisuuden kohoamisen jälkeen (1,5 tuntia-3 päivää). Jos hapenkulutuksen nousu stressireaktiossa on seurausta katekolamiinierityksestä, tästä seuraa myös se, että hapenkulutuksen muutokset stressireaktiossa ovat hyvin nopeita ja myös häviävät nopeasti. Korkeisiin kortisolitasoihin liittyvä osa stressistä voi vaikuttaa rehun hyväksikäyttöhokkuuteen alentamalla ravinnon syöntimäärää, jolloin kasvuun käytettävä osuus alenee. Tämä vaikutus oli ruokailuaktiivisuuden perusteella aika-riippuvainen ja ilmeni vasta, kun kortisolitasot olivat olleet kohonneina noin 10 päivää. Mittaustulostemme perusteella vaikutus on myös suhteellisen pieni, koska suoraan mitattuna rehun hyväksikäytön tehokkuudessa ei löytenyt tilastollisesti merkitsevää eroa kuin osakokeessa 1 (GLM-malli luvussa 3.3). Tässä kokeessa ravinnonkulutus ja kasvu olivat niin pieniä, ettei sen perusteella voida väittää, että ravinnon hyväksikäyttöhokkuus alenisi huomattavasti kohonneiden kortisolipitoisuuksien vaikutuksesta myös silloin, kun ravinnon syöntimäärä ja kasvu ovat "normaalilla" tasolla.

Kirjallisuuden perusteella kortisolipitoisuudella voi olla yhteyttä kirjolohen vuorokausirytmiiin (Boujard & Leatherland 1992). Tällöin pitkäaikaisesti kohonneiden kortisolipitoisuuksien voi odottaa vähentävän kalan vuorokausirytmiiikkaa (eli hapenkulutuksen ja ravinnonoton vuorokausirytmiiä), koska kohonneet kortisolitasot alentavat kortisolireseptorien määrää ja siten vähentävät kalan reaktiivisuutta kortisolipitoisuuksien muutoksiin (Pottinger 1990, Weyts et al. 1998). Toisaalta katekolamiinivasteet voivat toimia nopeina hapenkulutus- ym. rytmien tahdistajina, jolloin niitä voisi kenties tutkia epäsuorasti tarkastelemalla kalan rytmejä. Pitkäaikaisen stressin (pitkään kohonneiden kortisolitasojen) tulisi näkyä vuorokausirytmien vaimenemisena ja katekolamiinivasteet nopeina epäsäännöllisinä vasteiden kohoamisina.

4.2. Ympäristötekijöiden muutosten vaikutus stressiin

Yksittäisten äkillisten ympäristömuutosten vaikutus kirjolohen stressitasoihin vaikuttaa vähäiseltä. On epätodennäköistä, että katekolamiinitasot kohosivat tekemissämme ympäristötekijäkokeissa, koska plasman glukoositasot eivät kohonneet altistusten aikana (luvut 3.6. ja 3.7.). Samaan suuntaan viittaa myös se, etteivät plasman natriumpitoisuudet laskeneet ryhmissä, joissa lämpötilaa tai happipitoisuutta muutettiin. Kateko-

lamiinierityksen kohoamisen tulisi aiheuttaa plasman glukoositasojen kohoamista (Pankhurst & Van Der Kraak 1997), koska katekolamiinit säätelevät glykokeenin muuntamista glukoosiksi. Vaikka kalan aineenvaihdunta reagoi nopeasti ympäristötekijöiden muutoksiin (esim. Evans 1990, Lyytikäinen & Jobling 1998), nämä reaktiot eivät tuloksiemme mukaan liity suoranaisesti kalan stressireaktioon - vaan ovat luonteeltaan toisenlaisia. Niinpä ympäristötekijöiden muutosten tutkimisessa voidaan stressireaktio jättää ottamatta huomioon yhtenä selitysmallina, jos ympäristömuutokset ovat alueella, jonka sisällä kala kykenee säätelemään toimintaansa eli sopeutumaan uusiin olosuhteisiin. Jos ympäristötekijöiden muutokset ovat suurempia, ne saattavat laukaista pakoreaktion ja siihen liittyvän primaarisen stressireaktion. Kirjolohituotannon ja ympäristötekijöiden muutoksien suhdetta tulisi jatkossa tarkastella akklimoitumisen ja säätelyn epätarkkuuden kautta, koska yleensä ympäristötekijöiden muutokset ovat alueella, jolla kala on vielä kykenevä sopeuttamaan elintoimintonsa uuteen tilanteeseen (esim. 6 °C äkillinen lämpötilannousu on suhteellisen harvinainen - joskaan ei mahdoton - kalanviljely-ympäristössä). Sopeutumisen vaatimaa aikaa ja sen kustannuksia kalalle ei kuitenkaan tunneta vielä riittävästi, jotta kykenisimme arvioimaan niiden vaikutukset kalanviljelyn tuotannon tehokkuuteen ja ympäristökuormitukseen.

4.3. Stressin merkitys kirjolohituotannossa

Kohonneisiin kortisolipitoisuuksiin liittyvä osa stressistä näyttää lisäävän lyhytaikaisesti kalan ruokailu-aktiivisuutta. Tällä hetkellä ei kuitenkaan vielä tiedetä johtuuko tämä kohoaminen lisääntyneestä ravinnonkulutuksesta vai "innostuksesta". Myöhemmin ruokahalu näyttäisi alenevan korkeiden kortisolipitoisuuksien seurauksena (luku 3.5.). Tämä vaikutus näyttäisi olevan hidas ja näkyvän vasta, kun kortisolitasot ovat olleet kohonneita yli 10 päivää. Normaaleissa kasvatusolosuhteissa näin pitkäkestoinen kortisolitasojen kohoaminen edellyttää taajaa pakoreaktion laukeamista tai suurta akuuttien stressitekijöiden esiintymistiheyttä. Tällä hetkellä emme myöskään tiedä kuinka nopeasti tämän hitaan alenemisen jälkeen ruokahalu kykenee palautumaan normaaliksi.

Kortisolipitoisuuksien kohoaminen ei näyttänyt kohottavan hukkarehun määrää yhdessäkään kokeessa, jossa asiaa mitattiin (luvut 3.4 ja 3.5.). Nämä arviot pätevät kuitenkin vain koko mittausjaksolle ja myös tässä tekijässä saattaa olla kortisolipitoisuuden ja ajan välistä vuorovaikutusta. Asian tutkiminen edellyttää hukkarehun rytmiiikan ja kortisolipitoisuuden välisen suhteen tarkastelua.

Kalan kasvu oli korkeiden kortisolipitoisuuksien vuoksi negatiivista kaikissa kokeissa (luvut 3.2., 3.3. ja 3.4) paitsi viimeisessä (luku 3.5.). Viimeisessä kokeessa kortisoli-implanttiryhmän kortisolipitoisuuksien keskiarvo oli jopa alhaisempi kuin edellisen kokeen placeboryhmässä. Implantin kortisolipitoisuus oli myös asennushetkellä huomattavasti alhaisempi kuin aikaisemmissa kokeissa (noin 62 % aikaisemmasta pitoisuudesta). Tulokset viittaavat siihen, että kortisolipitoisuuden vaikutus kasvuun saattaa olla annosriippuvainen: mitä suurempi kortisolipitoisuuden nousu, sitä suurempi kasvunopeuden alenema. Kasvunopeuden alenemisen seurauksena kirjolohen tuotantokierto hidastuu ja aika tietyn markkinakoon saavuttamiseen pitenee.

Kohonneet kortisolipitoisuudet eivät vaikuttaneet pitkäaikaisesti hapenkulutukseen (luvut 3.3., 3.4. ja 3.5.). Tästä seuraa, ettei kirjolohen hapen/veden virtaaman tarve painoyksikköä kohden nouse pitkäaikaisessa stressissä. Normaalin akuutin stressireaktion katekolamiinivaste kuitenkin kohottaa hapenkulutusta ja niinpä "normaalisti" stressaantuneiden kalojen hapen/veden virtaaman tarve kohoaa. Tämä vaikutus on lyhytaikainen ja riippuu siitä, miten nopeasti kala kykenee toipumaan akuutin stressireaktion aiheuttamista aineenvaihduntamuutoksista. Myös kortisolilla voi olla lyhytaikaisia hapenkulutukseen vaikuttavia funktioita, joiden ilmenemistä tulisikin tutkia projektin tuottamista hapenkulutuksen aikasarjoista.

Koska kortisolipitoisuus alensi kasvua ja ravinnonottoa mutta ei hapenkulutusta, kasvun aleneminen oli seurausta ravinnonoton alenemisesta. Ravinnon hyväksikäyttöhokkuudessa ei kuitenkaan löydetty tilastollisesti merkitseviä eroja mikä saattaa johtua siitä, että ravinnonoton mittaaminen on metodisesti vaikeaa. Kuitenkin, koska hapenkulutuksessa ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa käsittelyjen välillä, tämän vaikutuksen voi olettaa olevan suhteellisen vähäinen, silloin kun kalat ruokailevat normaalisti. Katekolamiinivasteiden vaikutusta rehun hyväksikäyttöhokkuuteen olisi myös tutkittava, jolloin saataisiin parempi kuva stressin vaikutuksesta kirjolohen tuotantoparametreihin.

Tässä tutkimuksessa keskityttiin stressin vaikutuksen arvioimiseen yksilötasolla. Jatkotutkimuksissa olisikin selvitettävä millä tavalla tulokset ovat siirrettävissä ryhmätasolle. Ryhmätasolla stressi voi vaikuttaa myös sosiaalisten hierarkioiden ja aggression muutosten kautta (Øverli et al. 1999), jolloin ryhmä itsessään voi muuttaa stressireaktion aiheuttamaa yksilötason vastetta tuotantoparametreissa.

Stressi näyttää vaikuttavan ympäristökuormitukseen välillisesti kasvun hidastumisen kautta. Kasvun hidastuminen aiheuttaa väistämättä myös rehun hyväksikäyttöhokkuuden alenemisen. Koska tietyn kokoisen kalan tuottamiseen menee tuolloin enemmän aikaa ja tämä taas aiheuttaa standardimetaboliaan käytetyn energiaosuuden kasvua (kala käyttää osan syömästään energiasta jatkuvasti standardimetaboliaan). Koska rehun hyväksikäyttöhokkuudessa ei ollut säännönmukaista tilastollisesti merkitsevää eroa eikä korkea kortisolipitoisuus kohottanut hapenkulutuksen tasoa pitkäaikaisesti, tämä vaikutus on kuitenkin suhteellisen pieni.

Jos kirjolohen rehun hyväksikäyttöhokkuutta tarkastellaan proteiinien kannalta, tilanne voi olla toinen mutta tällä hetkellä ei ole olemassa tutkimustietoa, jonka pohjalta voisi tehdä päätelmiä näiden asioiden suhteesta. Kortisoli- ja katekolamiinistressivasteen vaikutuksia kalan typpieritykseen tulisi tutkia, jotta saataisiin kokonaiskäsitys stressin vaikutuksesta ympäristökuormitukseen. Viimeisessä implanttikokeessa (luku 3.5.) saatiin lieviä viitteitä siitä, että korkeat kortisolitasot saattaisivat suunnata kalan kasvua rasvakasvun suuntaan (pois proteiinikasvusta), mikä osaltaan vahvistaa käsitystä, että typpierityksen ja stressin välistä suhdetta tulisi tutkia tarkemmin.

Koska korkeilla kortisolipitoisuuksilla oli selkeitä tertiärisiä vaikutuksia, kuten kasvun hidastuminen ja muutokset ruokahalussa, pitkäaikaisesti kohonneita kortisolitasoja voidaan tunnistaa tutkimalla kalan ruokahalun rytmiikkaa ja trendejä. On myös mahdollista, että hapenkulutuksen ja typpierityksen rytmejä tutkimalla (esim. vuorokausirytmien vaimenemista) voidaan edelleen parantaa rytmeistä tehtävien päätelmien luotettavuutta.

Kiitokset

Projekti rahoitettiin Maa- ja metsätalousministeriön myöntämän rahoituksen turvin. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos rahoitti hankkeen omarahoitusosuuden. Projektin koejärjestelmien rakentamisvaiheeseen osallistuivat Pekka Jokela, Kari Puranen sekä Jouko Kuikka. Varsinaisen koeohjelman aikana kokeiden hoitoon osallistuivat tutkimusmestari Pekka Jokela sekä siviilipalvelusmies Pasi Antila. Verinäytteet analysoitiin Helsingissä Soili Nikosen toimesta ja Leena Kytömaa mittasi kalojen energiapi- toisuudet Laukaan kalantutkimus ja vesiviljelyssä.

- Barton B.A. & Schreck C.B. 1987: Metabolic cost of acute physical stress in juvenile steelhead. *Transactions of the American Fisheries Society* 116:257-263.
- Barton B.A. & Iwama G.K. 1991: Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1:3-26
- Bern, H.A. & Madsen, S.S. 1990: A selective survey of the endocrine system of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with emphasis on the hormonal regulation of ion balance. *Aquaculture* 100:237-263.
- Beyers D.W., Rice J.A., Clements W.H. & Henry C.J. 1999: Estimating physiological cost of chemical exposure: integrating energetics and stress to quantify toxic effects in fish. *Canadian Journal of Aquatic and Fisheries Science* 56:814-822.
- Boujard T. & Leatherland J.F. 1992: Circadian rhythms and feeding in fishes *Environmental biology of Fishes*, 35:109-131.
- Brett J.R. & Groves T.D.D. 1979: Physiological energetics - In: *Fish Physiology Vol VIII*. Eds: Hoar W.S. and Randall D.J., Academic Press, London, s.280-344.
- Brown K.K. & Nestor K.E. 1973: Some physiological responses of turkeys selected for high and low adrenal responses to cold stress. *Poultry Science* 52:1948-1954.
- Davis L.E. & Schreck 1997: The energetic response to handling stress in juvenile coho salmon. *Transactions of American Fisheries Society* 126:248-258.
- Evans, D.O. 1990: Metabolic thermal compensation by rainbow trout: effects on standard metabolic rate and potential usable power. *Transactions of the American Fisheries Society* 119:585-600.
- Flik G. & Perry S.F. 1989: Cortisol stimulates whole body uptake and the branchial calcium pump in freshwater rainbow trout. *Journal of Endocrinology* 120:75-82.
- Leach, G.L. & Taylor, M.H. 1982: The effect of cortisol treatment on carbohydrate and protein metabolism in *Fundulus heteroclitus*. *General and Comparative Endocrinology* 48:76-83.
- Lyytikäinen, T. & Jobling, M. 1998: The effect of temperature fluctuations on oxygen consumption and ammonia excretion of underyearling Lake Inari Arctic charr. *Journal of Fish Biology* 52:1186-1198.
- McDonald G. & Milligan L. 1997: Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress, kirjassa: *Fish stress and health in aquaculture* (toim. Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P. & Schreck, C.B.), Cambridge University Press, Cambridge. sivut:119-144.
- Mommsen T.P., Vijayan M.M. & Moon T.W. 1999: Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action. and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9:211-268.
- Øverli Ø., Olsen R.E., Løvik F. & Ringø E. 1999: Dominance hierarchies in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L.: differential cortisol profiles of dominant and subordinate individuals after handling stress. *Aquaculture research* 30:259-264.
- Pankhurst N.W. & Van Der Kraak G. 1997: Effects of Stress on Reproduction and Growth of fish, kirjassa: *Fish stress and health in aquaculture* (toim. Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P. & Schreck, C.B.), Cambridge University Press, Cambridge. sivut:73-93.
- Pickering, A.D. 1990: Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture* 100:125-139.

- Pickering A.D. 1990b: Stress and the suppression of somatic growth in teleost fish, kirjassa: *Progress in Comparative Endocrinology* (toim. Eppler A., Scanes C.G. & Stetson M.H.). Wiley-Liss. New York. sivut:473-479.
- Postlethwaite E.G. & McDonald D.G. 1995: Mechanisms of Na and Cl regulation in freshwater-adapted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exercise and stress. *Journal of Experimental Biology* 198:295-304.
- Pottinger T.G. 1990: The effect of stress and exogenous cortisol on receptor-like binding of cortisol in the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 78:194-203.
- Reid S.D., Moon T.W. & Perry S.F. 1992: Rainbow trout hepatocyte β -adrenoreceptors, catecholamine responsiveness, and effects of cortisol. *American Journal of Physiology* 262:R794-799.
- Rice J.A. 1990: Bioenergetic modelling approaches to evaluation of stress in fishes. *American Fisheries Society Symposium* 8:80-92.
- RKTL 1997: Kalavirrat, tietoa kalan tarjonnasta ja käytöstä. 68 s.
- Ruohonen K. & Vielma J. 1998: Kalojen ravitsemustutkimus tukee kalanviljelyn ympäristökuormituksen alentamista. *Vesitalous* 5: 27-30.
- Salo H. & Sundell P. 1994: Kalanviljelyn ympäristövaikutukset ja niiden vähentäminen. Suomen kalankasvattajaliitto ry. 82 s.
- Selye, H. 1973: The evolution of the stress concept. *American Scientist* 61:692-699.
- Specker J.L., Portesi D.M., Cornell S.C. & Veillette P.A. 1994: Methodology for implanting cortisol in Atlantic salmon and effects of chronically elevated cortisol on osmoregulatory physiology. *Aquaculture* 121:181-193.
- Suomen ympäristökeskus 1996: Kalankasvatuksen ympäristönsuojeluohjelma 1996-2005, Saaristomeren, Selkämeren rannikko ja Ahvenanmaa. Suomen ympäristökeskuksen moniste 14, 117 s.
- Tilastokeskus 1994: Ympäristötilasto, Environment statistics 216 s.
- Vijayan M.M. & Leatherland J.F. 1989: Cortisol-induced changes in plasma glucose, protein and thyroid hormone levels, and liver glycogen content of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *Canadian Journal of Zoology*, 67:2746-2750.
- Vijayan M.M. & Leatherland J.F. 1992: In Vivo effects of the steroid analogue RU486 on some aspects of intermediary and thyroid metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Journal of Experimental Zoology* 263:265-271.
- Vijayan M.M., Reddy P.K., Leatherland J.F. & Moon T.W. 1994: The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid analogue RU486. *General and Comparative Endocrinology* 96:75-84.
- Wedemeyer G.A. 1997: Physiology of Fish in intensive fish culture systems 242 s.
- Wedemeyer G.A., Barton B.A. & McLeay D.J. 1990: Stress and Acclimation, Kirjassa: *Methods for fish biology* (toim. Schreck C.B. & Moyle P.B.), American Fisheries Society, Bethesda, USA, 451-489.
- Weyts F.A.A., Verburg-van Kemenade B.M.L. & Flik G. 1998: Characterization of glucocorticoid receptors in peripheral blood leukocytes of carp. *General and Comparative Endocrinology* 111:1-8.
- Weyts F.A.A., Cohen N., Flik G. & Verburg-Van Kemenade B.M.L. 1999: Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 9:1-20.

Liite. Laitteiston tekninen kuvaus

1. Altaat

Altaat valmistettiin 30 litran kanistereista, joiden suuaukkoon asennettiin poistoputki (PEH, 75 mm halkaisija) ja yksi kanisterin laita leikattiin auki. Poistoputkessa oli vakiokorkeudella T-kappale, josta vesi ohjattiin joko suoraan pois altaasta tai virtausmittarin kautta. Poistoputken alaosassa oli kiinnitettynä läpinäkyvä muovikartio. Muovikartioon oli kiinnitetty poistoletku, jota käytettiin altaiden puhdistukseen. Ensimmäisessä versiossa letku kiinnitettiin poistoputkeen pyykkipojalla, mutta lopulta päädyttiin siihen että lyhyt kumiletkun kappale kiinnitettiin muoviseen hanaan.

Poistoputken kiinnityskohdasta - altaan sisäpuolelta - hiottiin altaan kokoamisvaiheessa tarpeetonta muovia pois, jotta altaan sisäpuolelle ei jäisi rehua kerääviä rakenteita. Tämän lisäksi altaat asennettiin 2 cm kallistukseen, mikä osaltaan paransi rehun poistumista altaasta.

Altaan etuosassa oli 4 reikää, joihin kiinnitettiin ruokinta-anturi, ruokinta-automaatin syöttöaukko sekä altaaseen tulevan veden että kierrätysveden putki. Altaan sisällä vetä kierrätettiin poistoputkeen sijoitetulla akvaariopumpulla (Sicce), josta se ohjattiin L-muotoiseen syöttöputkeen altaan etuosaan. Vuoden 1999 kokeissa ilmeni, että akvaariopumput tukkeentuivat kalan ulosteen ja syömättömän rehun tukkeuttamina. Tukketumisriskiä vähentämään asennettiin poistoputkeen akvaariopumpun alapuolelle pala muovitettua teräsverkkoa. Samoin poistoputken suulle altaan sisäpuolelle asetettiin jousiteräksestä valmistettu lanka, joka esti kalojen pakenemisen poistoputkeen.

Altaan vesipinnassa käytettiin kelluvaa muovikalvoa vähentämään ilmasta liukenevan hapen määrää. Myöhemmin kelmun päälle sijoitettiin vielä metalliverkosta valmistettu hyppyeste vähentämään kalojen poistumista kesken koejakson. Hyppyeste kiinnitettiin altaaseen ensin U-mallisen rautalangan ja myöhemmin hakasen ja kuminauhan avulla. Huhtikuussa 2000 kelluvaan katteeseen ja hyppyesteeseen tehtiin edelleen rakenteellisia parannuksia.

2. Vesitysjärjestelmä

Koko koejärjestelmä perustui vuoden 1999 kokeissa kiertovesiratkaisuun, jossa 48 altaasta oli jaettu 8 moduuliin, kullakin moduulilla oli oma ylävesisäiliö, joista vettä jaettiin moduulin altaille. Altaan poistoputken T-kappaleen toinen haara oli kytketty altaiden alapuolella sijaitsevaan keruualtaaseen. Keruualtaasta vettä nostettiin tehokkaalla akvaariopumpulla takaisin ylävesisäiliöön noin 25 l min^{-1} , ja valtaosa vedestä palasi takaisin ylävesisäiliön ylijuoksuputken kautta, koska altaiden virtaamat olivat yleensä alle 1 l min^{-1} . Keruualtaaseen johdettiin kaivosta tuleva korvausvesi, jonka määrää säädeltiin moduulikohtaisella hanalla. Keruualtaassa oli suodatinyksikkö (Fluval), joka suodatti veden kiintoainetta ja epäpuhtauksia pois. Ylimääräinen vesi johdettiin pois keruualtaan ylivuodon avulla.

Ylävesipöntöt rakennettiin samoista kanistereista kuin koealtaatkin. Kuhunkin ylävesisäiliöön kiinnitettiin 6 hanaa, joihin kiinnitettiin 12 mm PVC-letku, joka toisesta päästä oli supistettu noin 6 mm halkaisijaan. Tähän kiinnitettiin 6 mm akvaarioletkua, ja toinen pää liitettiin altaan tulovesiputkeen. Aluksi putki työnnettiin suoraan tulovesiputkeen mutta myöhemmin siirryttiin käyttämään T-kappaleita, joilla vakioitiin tulovesiputken korkeus suhteessa altaan vedenpintaan. Laboratorioletkuissa käytettiin letkunkiristimiä, joiden avulla kunkin altaan virtamaa kyettiin säätämään.

Kun järjestelmä muutettiin läpivirtausperiaatteella toimivaksi, alavesipöntöt hävitettiin. Kaivovesi johdettiin kahteen 300 l astiaan, joihin oli yhdistetty uusi veden läm-

mitysjärjestelmä. Altaisiin tulevaa vettä ilmastettiin, ja se pumpattiin kahden vesiautomaatin avulla runkoputkiin, joista se johdettiin altaisiin. Ylijuokseva vesi johdettiin takaisin lämmitysastioihin. Altaista poistuva vesi johdettiin suoraan pois lattiakaivoihin samoin kuin vesinäytteitä varten johdettu vesi.

3. Lämmitysjärjestelmä

Tulevaa vettä (kaivovesi 4-6 °C) lämmitettiin kiertovesijärjestelmässä (15 °C) (luvut 3.1., 3.3. ja 3.4.) akvaariolämmittimillä (600 w / moduuli) ja säädettiin kahdeksan lämpötila-anturin (PT-1000), tietokoneen ja tarkoitusta varten tehdyn lämmönsäätö-ohjelman avulla (Labview-sovellutus). Ohjelma avasi relekortin kanavia (12V DC), joilla ohjattiin voimareleiden (16A) toimintaa. Voimareleet päästivät täyttä virtaa (220V AC) moduulikohtaisille virtasyötöille, joista kuhunkin oli liitetty 2 akvaariolämmittintä. Myöhemmin järjestelmään lisättiin erillinen 2 kW lämmitin, jolla vettä esilämmitettiin ennen kuin se ohjattiin moduulien ylävesisäiliöihin.

Koko vesitysjärjestelmä muutettiin marraskuun 1999 ja tammikuun 2000 välisenä aikana läpivirtausperiaatteen mukaiseksi. Tulevaa kaivovettä (30 l /min) lämmitettiin maksimissaan 30 kW teholla, joka oli jaettu kahteen erilliseen lämmitysastiaan, joissa kummassakin oli kaksi erillistä lämmönsäätöjärjestelmää. Jokaisella vastuksella on oma termostaattinsa (on-off kytkentäväli 0.7 °C), jota voitiin ohjata myös kellokytkimellä.

4. Ruokintajärjestelmä

Ruokintajärjestelmäksi valittiin itseruokintaperiaatteella toimiva järjestelmä. Valmiita itseruokintajärjestelmiä yksittäisille kaloille ei ollut kaupan, joten järjestelmä suunniteltiin, kehitettiin ja rakennettiin itse.

Ruokinta-antureina testattiin kahta eri tyyppiä. Ensimmäisenä testattiin valokuituoptiikkaan perustuvaa anturia, joka toimi veden alla hyvin. Varsinaiseen koejärjestelmään hankittiin kuitenkin jo aikaisemminkin käytössä ollut ruokinta-anturityyppi. Anturi koostuu induktiivisesta anturista, johon on kytketty heiluritanko, jonka päässä on punainen pallo. Kun heiluritanko liikkuu pois anturin keilasta, induktiivinen anturi lähettää 12 V (DC) viestin tietokoneelle. Tämä anturityyppi oli osoittautunut suhteellisen luotettavaksi ja anturi antoi kalalle välittömän havaittavan palautteen toisin kuin valokuituoptiikkaan perustuva anturi. Anturi on myös hieman edullisempi kuin valokuituoptiikkaan perustuva anturi.

48 ruokinta-anturia ovat kukin kytketty erilliseen optoerotettuun tietokonelinjaan (ACL-7122 digitaalikortti kytkettynä kahteen TB-24P optoisoloituun digitaalikorttiin). Tietokone luki ruokinta-antureiden on-off -tilaa 100 ms välein, mikä on alle puolet keskimääräisestä heiluritangon heilahdusajasta. Samaan digitaalikorttiin oli kytketty 2 kpl 12 V vaihtovirralla toimivaa relekorttia (TB 24R), jotka säänsäätelivät 24 V (AC) jännitteen jakamista ruokinta-automaateille.

Sekä antureiden lukemista, että ruokintalaitteiden virransyöttöä ohjattiin tarkoitusta varten kehitetyllä tietokoneohjelmalla (Labview-sovellutus). Lisäksi ohjelma ylläpiti kalakohtaisia tiedostoja, joihin tallennettiin kalan pyytämien rehupartikkelien kellonajat. Ohjelman rakenne oli modulaarinen eli ohjelman sisällä oli 48 itsenäisesti toimivaa pienempää ohjelmaa - yksi kutakin ruokintalaitteiden ruokinta-anturi yhdistelmää varten. Ohjelmaan tehtiin virheenkorjaus, joka vähentää virheruokinnan määrää: joskus ruokinta-anturi saattaa juuttua on-tilaan, jolloin anturi lähettää ruokkimispyyntöjä jatkuvasti. Ilman virheenkorjausta tällaisessa tilanteessa ruokintalaitte tyhjentyisi kokonaan altaaseen. Virhelaskuri rekisteröi ruokinta-anturin pyynnön virheeksi, jos edel-

lisestä pyynnöstä oli kulunut alle 15 sekuntia (aika säädettävissä). Ruokinnan päivittäiseksi seuraamiseksi ja virhetilanteiden korjaamiseksi ohjelman etupaneelissa olivat myös kalakohtaiset ruokintapyyntölaskurit, jotka nollautuivat vuorokauden vaihtuessa sekä indikaattorivalo, joka syttyi palamaan, jos joku ruokinta-anturi oli antanut vuorokaudessa vähintään kymmenen virheellistä pyyntöä.

Ohjelman asetukset päätettiin sijoittaa erilliseen tekstitiedostoon. Tekstitiedostossa oli mahdollista säätää ruokinnan alku ja loppu-aika vuorokauden sisällä. Asetusohjelman avulla ruokkimia voitiin ohjailta myös ilman ruokinta-antureita - eli käyttää ruokinta-suhteiden ruokkimiseen. Asetustiedosto sisälsi myös ruokintalaitteiden yksilökohtaiset kalibrointitiedot.

Järjestelmää varten kehitettiin uusi ruokintalaite, koska aikaisemmat tyypit eivät soveltuneet tarkoitukseen. Yksilöiden ruokinnassa on käytettävä yhden pelletin kerrallaan ruokkivaa laitetta, koska esimerkiksi 500 g kirjolohi syö vain noin 5-10 g päivässä. Koska kalat olivat suhteellisen pieniä 150-700 g, ajateltiin että 5 mm (150 mg) rehupellettikoko on sopiva lähtökohta ruokintalaitteen kehityksessä. Lisäksi automaatin oli kyettävä ruokkimaan pelletti suhteellisen nopeasti altaaseen, jotta kala oppisi varmemmin ymmärtämään ruokinta-anturin käytön ja rehun ilmestymisen välisen yhteyden. Tavoitteeksi asetettiin 5 sekuntia. Koska automaatteja tulisi järjestelmään yhteensä 48 kappaletta, olisi hyvä jos laitteen täyttäminen olisi mahdollisimman helppoa, esim. kaatamalla.

Laitteen lähtökohdaksi valittiin hihnaruokkijaa muistuttava ratkaisu, jonka hihnassa olisi kuppeja, joihin mahtuisi vain yksi pelletti kerrallaan. Ensin kokeiltiin perinteisiä ratkaisuja, joita kallistettiin ja joihin asennettiin erillinen syöttöosa. Lopulta oivallettiin sijoittaa kallistus automaatin sisään. Ruokintalaite rakennettiin 4 mm akryylilevyistä, se oli sivulta katsottuna neliön muotoinen (kukin sivu 15 cm), leveyttä automaatilla on 2,5 cm. Laitteen runko koottiin liuottamalla akryyliä kloroformiin ja käyttämällä saatua liimaa osien liittämiseen. Toinen sivuprofiili jätettiin kuitenkin liimaamatta ja kiinnitettiin sen sijaan kolmella rungon läpi viedyllä pultilla, jotta laite olisi huolettavissa. Laitteen sisällä on 45 asteen kulmaan kallistettu hihna, jossa on kuppeja, joihin mahtui vain yksi 5 mm:n rehupelletti kerrallaan. Kun moottori pyörittää hihnaa (5 rpm), vain yksi partikkeli putoaa kuppiin ja muut pelletit jäävät rehunsäiliöön tai valuivat sinne takaisin hihnan 45° kallistuksen avulla. Laitteen sisään sijoitettiin syöttölevy, jonka varassa automaatin sisällä saattoi olla kerrallaan 20-30 g rehua.

Laitteen hihna koottiin liimaamalla vahakankaasta ja mustasta solukumista leikatut kappaleet, joista jälkimmäiseen oli isketty tasavälein 10 kpl 8 mm halkaisijaltaan olevia reikiä. Kuhunkin reikään asennettiin 1.5 ml eppendorf-putken kansiosa, joka oli kooltaan sopiva 5 mm rehupelletille. Laitteet kiinnitettiin alaisiin ensin ruuveilla ja myöhemmin lisättiin aluslevy, johon ne kiinnitettiin pyykkipojilla.

Laitteen akselit valmistettiin (kuten perinteisissäkin hihna-automaateissa) harjanvarsista, mutta koska vetoakselit olivat lyhyitä ja halkesivat rakennusvaiheessa helposti, ne kyllästettiin pellavaöljyllä. Prototyypivaiheen aikana vetoakseliin kiinnitettiin vielä liukuestettä, joka paransi hihnan toimivuutta selvästi. Hihnan kireys oli säädettävissä käsin siipimutterin avulla.

Kokeiden aikana havaittiin laitteen toiminnassa puutteita: yksi keskeinen puute oli syöttölevyn siirtyminen pois paikaltaan ja toinen oli rehun tippuminen syöttölevyn ja hihnan välisestä raosta, jonnekin muualle kuin altaaseen. Ongelma ratkaistiin hiomalla kupeista noin 1 mm pois ja pyöristämällä syöttölevyn alakulmaa niin, ettei hihna kyennyt enää tarttumaan kiinni syöttölevyn reunaan.

Laitteet kalibroitiin aina ennen uuden kokeen aloittamista. Laitteiden vikatiheys oli luvun 3.4. kokeessa 20 %/4 viikkoa, joista yli 50 % johtui syöttölevyjen siirtymisestä hihnan mukana. Muutoksen jälkeen laitteita ei seuraavan kahden viikon kokeen aikana rikkoutunut lainkaan.

5. Vesinäytteenottojärjestelmä

Järjestelmän ajatuksena oli mahdollistaa yksittäisten kalojen aineenvaihdunnan, kasvun ja ravinnonoton samanaikainen jatkuvan seuranta. Tähän tarkoitukseen suunniteltiin ja rakennettiin aivan uusi vesinäytteenottojärjestelmä, johon kytkettiin hapen, lämpötilan ja virtaaman mittausjärjestelmät. Kullakin moduulilla oli oma ylävesisäiliö, jonka tarkoituksena oli tasata altaisiin virtaavan veden virtaamia vakioimalla syöttöveden paine (vakiointi tapahtuu ylijouksuputken avulla, joka tasaa ylävesisäiliön vedenkorkeuden). Kunkin altaan virtaamaa kyettiin säätämään altaan happipitoisuuden mukaan.

Näytteenottojärjestelmää ohjattiin ohjelmoitavalla logiikalla (Mitsubishi Inc.), jolla avattiin vuoronperään kunkin moduulin happimagneettiventtiilejä. Ensin avautui kunkin moduulin tuloveden venttiili ja tämän jälkeen 8,5 minuutin välein muut venttiilit (altaat 1-6). Vesi johdettiin happianturille (Oxyguard) ja lämpötila-anturille (PT-1000), joista lukemat tallentuivat tietokoneelle, joka luki anturien lukemat noin 6 minuutin kuluttua venttiilin aukaisemisesta. Samanaikaisesti ohjain avasi poistoputken T-kappaleeseen liitettyjä virtausmagneettiventtiilejä, joiden kautta altaiden ylijouksuista poistuva vesi ohjattiin edelleen partikkelisuodattimien kautta elektronisille virtausmittareille (McMillan, 101 Flo-sen). Virtausmittausten järjestys oli 30 minuuttia happinäytteenottoa jäljessä, jotta veden virtaus oli ehtinyt tasaantua happinäytteenoton jälkeen. Kunkin moduulin sisällä tiettyä vesilähdettä mitattiin siis tunnin välein ja jokaisessa moduulissa mitattiin samaa vesilähdettä samaan aikaan. Ohjain lähetti viestin tietokoneelle aina, kun se oli avannut kertaalleen kaikki moduulin magneettiventtiilit - eli tunnin välein. Tietokoneen mittausohjelma aloitti uuden mittausjakson vasta, kun se on saanut viestin edellisen jakson loppumisesta. Mittausohjelma ylläpiti neljää tiedostoa: happi-, lämpötila- ja virtaamatiedostoa sekä seurantatiedostoa, jossa altaiden happipitoisuutta suhteutettiin tulevan veden happipitoisuuteen.

6. Veden happipitoisuuden ja lämpötilan mittausjärjestelmä

Koska altaat sijaitsivat kahdessa kerroksessa näytteenottoveden virtaamissa oli eroja, jotka tasattiin supistamalla näytteenottoletkuja. Happianturikammio valmistettiin 75 mm PVC-putkesta, jonka sisäosaan valettiin silikonista happianturin muotoinen vastakappale. Kaikki kammion kautta kulkeva vesi ohjattiin kulkemaan happianturin kalvon alapuolella olevassa uurteessa.. Uurre mitoitettiin niin, että happianturin lukema ei muutu yli 0.1 l min^{-1} virtaamissa (virtausnopeus happi-anturin kalvon pinnalla oli em. virtaamissa yli 3 cm s^{-1}). Kammion toiseen päähän kiinnitettiin seitsemän letkuliitintä, joihin liitettiin tuleva näytteenottovesi. Kammion toiseen päähän kiinnitettiin poistovesiliitin, joka kiinnitettiin U-muotoiseen muoviletkuun. Poistuva vesi täytti U-putken ja kuhunkin U-putkeen sijoitettiin lämpömittari (PT1000).

Koska happianturien antamat jännitteet (mV) sisältävät jonkin verran virheellisiä arvoja, yhtä happianturin lukemaa varten luettiin samaa anturia 2 s aikana 400 kertaa ja näistä 400 arvosta laskettiin mediaani, joka tallennettiin tietokoneelle. Happiantureita huollettiin 2-5 kertaa viikossa ja kalibroitiin 1-3 kertaa viikossa.

7. Veden virtausmittausjärjestelmä

Veden virtauksen mittaamiseen käytettiin McMillan-virtausmittareita, joiden käyttöjännite oli 12 V (DC). Mittari soveltuu mittausalueelle $0.1\text{--}2.0\text{ l min}^{-1}$. Virtausmittari oli liitetty pystysuorassa olevaan PVC-putkeen, joka toimi veden pudotuskorkeuden säätäjänä. Virtaaman kasvaessa vesipatsas putkessa nousi ja lisäsi virtaamaa putken läpi. Esikokeissa havaittiin, että virtausmittarin läpivirtaus saavutti maksimissaan 0.8 l min^{-1} arvoja. Virtausta mittarin läpi saatiin nostetuksi 1.4 l min^{-1} asti poraamalla virtausmittarin suuttimet halkaisijaltaan 6 mm:ksi. Ruokintakokeiden aikana virtausmittari saattoi tukkeentua, mikä ratkaistiin lisäämällä pystyputken päähän suodatin, joka esti yli 1,5 mm partikkelien pääsyn mittariin.

Virtausmittari antoi tietokoneelle 0-5 V tasajänniteviestin. Mittarien kalibroinnissa havaittiin, että eri mittareiden väliset erot olivat pieniä ja mittarit antoivat luotettavia lukemia.