

Ruokaviraston raportti

Vesihomeen ajallinen esiintyminen ja estomenetelmien optimointi kalanviljelylaitoksilla

Loppuraportti



EUROOPAN MERI- JA KALATALOUSRAHASTO
SUOMEN TOIMINTAOHJELMA
2014-2020



RUOKAVIRASTO
Livsmedelsverket • Finnish Food Authority

| | |
|-------------------------------|--|
| Päiväys: | 30.11.2022 |
| Asianumero: | 4257/05.08/2021 |
| | Ruokavirasto |
| Linja, osasto ja/tai yksikkö: | Laboratorio- ja tutkimuslinja, Eläinterveystutkimuksen yksikkö |
| Hyväksyjä: | Laboratorio- ja tutkimuslinjan ylijohtaja Janne Nieminen |
| Laatija/laatijat: | Korkea-aho T.L., Viljamaa-Dirks S., Holopainen R., Luke vesiviljely, Savon Taimen Oy, Voimalohi Oy |
| Lisätietoja: | EMKR hankenumero 169768 |

SISÄLLYSLUETTELO

| | |
|--|----------|
| 1 Johdanto | 4 |
| 2 Aineisto ja menetelmät | 4 |
| 3 Hankkeen tulokset | 5 |
| 3.1 Yleistä vesihomeen esiintymisestä kalanviljelylaitoksilla..... | 5 |
| 3.2 Vesihomeen ajallinen esiintyminen laitoksilla | 6 |
| 3.3 Muiden patogeenien esiintyminen vesihomeen yhteydessä | 7 |
| 3.4 Estomenetelmien vaikutus vesihomeeseen käytännössä ja tutkimusolosuhteissa..... | 7 |
| 4 Hankkeen toteutus | 9 |
| 4.1 Hankkeen tiedotteet ja julkaisut | 9 |
| Liite 1. Vesihomehankkeen näytteidenotto lomake | 11 |
| Liite 2. Tutkimuksen tilastolliset menetelmät..... | 13 |
| Liite 3. <i>S. parasitica</i> tutkituilla kalanviljelylaitoksilla..... | 14 |
| Liite 4. Kalanviljelylaitosten <i>S. parasitica</i> -määrät tulo- ja poistovesissä, sekä veden lämpötilan vaihtelu vuoden aikana | 16 |
| Liite 5. Muut patogeenit ja <i>S. parasitica</i> | 22 |
| Liite 6. Vesihomeen estomenetelmät | 24 |
| Liite 7. Käytetyn eDNA menetelmän luotettavuuden varmistaminen ja kehittäminen | 28 |
| Lähdeluettelo | 29 |

Tiivistelmä

Vesihome aiheuttaa suuria tappioita varsinkin lohikalujen viljelyssä. Tässä tutkimuksessa seurattiin *Saprolegnia parasitica* -vesihomeen esiintymistä kalanviljelylaitoksilla. Tutkimus on harvinainen, sillä aikaisempia tutkimustuloksia *Saprolegnia* -vesihomeen esiintymisestä kalanviljelylaitosten vedessä on vähän ja tutkimukset on yleensä tehty vähemmän sensitiivisillä viljelymenetelmillä kuin tässä tutkimuksessa käytetty qPCR-menetelmä. Tutkimuksessa havaittiin laitosten välillä suuria vaihteluja *S. parasitica* -vesihomeen esiintymisen määrissä, eli erilainen ympäristö ja erilaiset laitostyytit vaikuttavat vesihomeen esiintymiseen laitoksella. Esimerkiksi kiertovesilaitoksella *S. parasitica* esiintyi vedessä ympäri vuoden runsaana, toisin kuin läpivirtauslaitoksilla. Vesihometta esiintyi sekä kaloissa että vedessä eniten kesällä, mutta myös yksittäisissä altaissa talvella. Veden lämpötilan ei suoraan todettu vaikuttavan vesihomeinfektion esiintymiseen kalalla tai vesihomeen määrään vedessä. Selkein tutkimuksessa huomattu riskitekijä vesihomeelle oli *S. parasitica* -vesihometta kantavat kalat, joiden kautta vesihome kulkeutui laitoksille ja *S. parasitica* -määrät nousivat korkeiksi vedessä. Läpivirtauslaitosten tuloveden *S. parasitica* -määrät olivat suhteessa korkeampia silloin kun vesihomeinfektioita esiintyi tutkittujen altaiden kaloissa, joka viittaa siihen, että tuloveden suuremmalla *S. parasitica* -määrällä on vaikutusta kalojen sairastuvuuteen laitoksella. Tuloveden *S. parasitica* -määrä ei kuitenkaan vaikuttanut lisääntyvän yksittäisillä laitoksilla tarkasteltuna vesihomeen esiintymiseen ja lisää tutkimusta tarvitaan selvittämään miten tulovedessä huomattu *S. parasitica* -infektiopaine vaikuttaa kalojen sairastuvuuteen. Veden näytteenottomenetelmiä tulisikin edelleen kehittää niin, että *S. parasitica* -seuranta vedestä pystyttäisiin käyttämään joustavammin vesihomeen riskinarviointiin laitoksilla. Lisäksi tulee huomioida myös muut tekijät, jotka vaikuttavat infektiopaineeseen vedessä esiintyvän *S. parasitica* lisäksi. Yksittäisten riskitekijöiden selvittämiseksi laitoksia tulisi tutkia pitemmällä aikavälillä esimerkiksi verrokkitapaustutkimuksella, jossa seurataan vesihomeen lisäksi myös muita vesihomeelle altistavia tekijöitä laitoksilla. Tutkimuksessa arvioitiin kirjallisuuden perusteella useita kylvetysaineita, jotka vaikuttavat *S. parasitica* -vesihomeen kasvuun ja tuhoutumiseen. Tutkimustulokset ovat kuitenkin vaihtelevia, sillä kylvetysten tehoon vaikuttaa kylvetysaineen lisäksi monet ulkopuoliset tekijät, kuten ympäristöolosuhteet ja lajispesifisyys. Lisäksi kylvetys- ja pesuaineiden käyttö lainsäädännön näkökulmasta elintarvikelaitoksilla ja/tai eläinlääkinnällisesti on hyvin vaikeaselkoista.

1 Johdanto

Oomykeettejä, jotka infektoivat vesieliöitä, kutsutaan usein puhekielessä vesihomeiksi. Oomykeettejä esiintyy satoja lajeja vesistöissä, mutta *Saprolegnia* -suvun oomykeetit ovat erityisen haitallisia kaloille aiheuttaen saprolegnioosia eli vesihometartunnan. Vesihometta pidetäänkin yhtenä suurimmista ekonomisista kasvuja vähentävistä tekijöistä makeanveden kalanviljelyssä, sillä tarpeeksi tehokkaita menetelmiä vesihomeen torjumiseksi tai hoitoon ei tällä hetkellä ole käytössä [1, 2]. Suomessa vesihometta on löydetty useilta kalanviljelylaitoksilta ja sen aiheuttamaa kuolleisuutta pidetään erittäin ongelmallisena, jopa niin, että tiettyjen vesihomeelle alttiiden kalalajien tai ikäryhmien viljely on jouduttu lopettamaan kokonaan joillakin laitoksilla [3]. Tämän tutkimuksen aikaiset tappiot vesihomeinfektioista johtuen yhdellä laitoksella aiheutuivat varsinkin taimenille ja bakteerien vastaisen rokotuksen jälkeen kirjolohille, joiden menetys aiheutti 75 000 – 100 000 euron tappion tutkimuksen aikana. Myös toisella tutkimuksessa mukana olleella laitoksella vesihomeen aiheuttamia menetyksiä raportoitiin ennen hanketta jopa 50 000 kuollutta lohta ja lähemmäs 100 000 euron taloudellinen tappio. Vuosittainen vaihtelu vesihomeen esiintymisessä yksittäisillä laitoksilla oli kuitenkin suurta ja tutkimuksen aikana kyseisellä laitoksella ei havaittu vesihomeen aiheuttamaa kuolleisuutta kaloissa. Menetelmiä *Saprolegnia*-suvun vesihomeiden hillitsemiseksi kalanviljelylaitoksilla on käytännössä vähän, vaikka tutkimusta erilaisista vesihomeen estomenetelmistä, kuten vedenkäsittelyistä, kylvetyksistä ja rokotteestakin on tehty kokeellisesti [4, 5].

Suomessa kaloista ja vesistöistä eristettyjä *Saprolegnia* -lajeja on vertailtu geneettisesti ja huomattu, että yleisimmin Suomen kalanviljelylaitoksilta eristettiin *S. parasitica* -vesihometta [6]. Tutkimuksissa on kehitetty kvantitatiivinen qPCR-menetelmä, jolla pystytään arvioimaan pieniäkin määriä *S. parasitica* -vesihometta kaloissa ja vedessä sen DNA:n esiintyvyyteen perustuen ja aikaisemmin käytettyjä menetelmiä nopeammin [7]. Tällä menetelmällä voidaan ensi kertaa tarkemmin ja tehokkaammin arvioida vesihomeen määrän vaihtelua ja sen mahdollisesti aiheuttamaa tautipainetta erilaisissa kalanviljelylaitosten olosuhteissa. Vähän tiedetään *S. parasitica* -vesihomeen esiintymisen vaihtelusta ympäri vuoden kalanviljelylaitoksilla ja sen esiintymiseen vaikuttavista riskitekijöistä. Monia riskitekijöitä on mainittu tutkimuksissa ja yksi näistä aikaisempien tutkimusten perusteella on veden lämpötila [8].

2 Aineisto ja menetelmät

Tutkimuksessa oli mukana viisi kalanviljelylaitosta Suomen kolmelta eri vesistöalueelta (Taulukko 1). Laitokset valittiin tutkimukseen, koska niillä oli todettu vesihometta kaloissa aikaisemmin. Vesinäytteitä otettiin laitoksilta vuoden ympäri altaiden tulo- ja poistovesistä vähintään kerran kuukaudessa, ja kahden viikon välein keväisin ja syksyisin. Kalanäytteitä ja vesinäytteitä kerättiin tiheästi vesihomeinfektioiden yhteydessä liitteenä 1 olevan ohjeistuksen mukaisesti. Laitoksilla dokumentoitiin läheteeseen näytteenottoajankohtana ainakin veden lämpötila ja visuaalinen havainto vesihomeisten kalojen osuudesta näytteenottoaltaissa (Liite 1).

Taulukko 1. Tässä tutkimuksessa mukana olleet kalanviljelylaitokset ja altaat, sekä otettujen vesinäytteiden tiedot

| Laitos | Näytteenottoaltaat ja vesitys | Kalalaji | Vesinäytteet, N | Näytteenotto ajat |
|--------|---|-----------------------------------|-----------------|---------------------|
| 1 | 2x maa-allas, läpivirtaus | Järvitaimen, Kirjolohi | 58 | 1.6.2021-4.5.2022 |
| 2 | Kiertovesi | Siika | 30 | 1.6.2021-4.5.2022 |
| 3 | 3 x muoviallas, läpivirtaus | Merilohi | 64 | 2.6.2021-8.6.2022 |
| 4 | Lasikuitu- ja betoniallas, läpivirtaus | Merilohi | 44 | 2.6.2021-8.6.2022 |
| 5 | Lasikuitu ja betoniallas, läpivirtaus | Järvilohi | 24 | 22.6.2021-12.5.2022 |
| 5 | Tulovesinäytteet; pohjaputki, pintaputki, laitos, halliallas, ulkoallas, sekä laitoksen poistovesinäyte | Laitoksella useita lohikalalajeja | 66 | 12.5.-20.6.2022 |

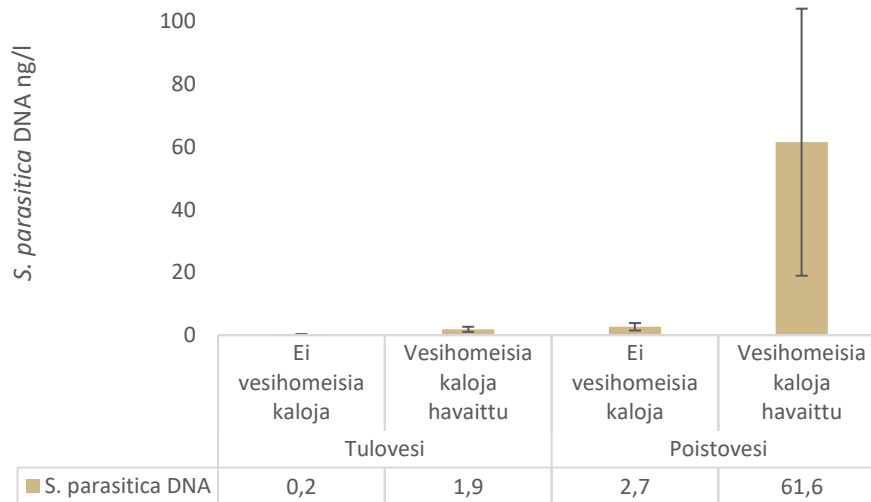
Vesinäytteiden *S. parasitica* DNA:n eristys ja PCR tehtiin aiemmassa tutkimuksessa testatun menetelmän [7] mukaisesti. Jokaisen vesinäytteen DNA -määrä laskettiin kahden filtoitimen (2 x 15 ml) ja kahden PCR -ajon (4 PCR tulosta per vesinäyte) keskiarvona ja muutettiin *S. parasitica* DNA ng/l per vesinäyte. Tuloksia tarkasteltiin kaikkien läpivirtauslaitosten tulovesien ja poistovesien keskiarvona, mutta myös *S. parasitica* -vesihomeen esiintymistä yksittäisillä laitoksilla ajallisesti (Liite 2).

3 Hankkeen tulokset

3.1 Yleistä vesihomeen esiintymisestä kalanviljelylaitoksilla

Kaikilla läpivirtauslaitoksilla *S. parasitica* -vesihometta havaittiin tulovedessä hyvin pieniä määriä, kun taas poistovesissä *S. parasitica* -vesihometta havaittiin ajoittain runsaasti (Liite 3). Tämä vahvisti tietoa, että *S. parasitica* lisääntyy tehokkaasti kalanviljelylaitoksissa ja kaloissa.

Kun verrattiin kaikkien läpivirtauslaitosten tuloveden *S. parasitica* -määrää silloin, kun laitoksella oli kaloissa vesihomeinfektio ja silloin, kun laitoksella ei ollut vesihomeinfektiota, huomattiin, että tuloveden *S. parasitica* -määrä on suurempi tulovedessä silloin, kun laitoksella oli vesihomeinfektio (Kuva 1, Liite 3). Tämä tulos viittaa siihen, että tuloveden *S. parasitica* -vesihomeen suuremmalla määrällä on myös vaikutusta vesihomeinfektioiden puhkeamiseen kalanviljelylaitoksella. Yksittäisiä laitoksia tarkasteltaessa tuloveden *S. parasitica* -määrällä ei ollut merkitystä vesihomeinfektion esiintymiseen laitoksella (Liite 4), joten lisää tutkimusta tarvitaan selkeyttämään, kuinka tärkeä tuloveden *S. parasitica* -määrän vaihtelu on vesihomeinfektoriskille kalanviljelylaitoksella.



Kuva 1. Läpivirtauslaitosten *S. parasitica* DNA-määrä altaiden tulovedessä ja poistovedessä silloin, kun näytteenoton yhteydessä havaittiin vesihomeisia kaloja ja silloin, kun niitä ei havaittu. Ero *S. parasitica* DNA:n määrässä vesinäytteessä ja vesihomeen esiintymisessä kaloissa oli tulovedessä ($p=0,016$) ja poistovesissä ($p<0,001$) tilastollisesti merkitsevä.

3.2 Vesihomeen ajallinen esiintyminen laitoksilla

Kaikkien läpivirtauslaitosten tutkituissa altaissa esiintyi vedessä *S. parasitica* -vesihometta sekä kesällä että talvella, lukuun ottamatta yhtä laitosta, jossa vesihomeisia kaloja ei havaittu kuin vasta tutkimuksen loputtua (laitos 4). Veden lämpötilalla ei huomattu olevan vaikutusta *S. parasitica* -vesihomeen esiintymiseen tulovedessä tai laitoksilla 1,2 ja 4 (Liite 4). Laitoksella 3 veden lämpötila korreloi positiivisesti *S. parasitica* -vesihomeen määrän kanssa laitoksen vedessä, eli *S. parasitica* -vesihometta esiintyi runsaimmin lämpimän veden aikaan. Tästä poiketen laitoksella 5 *S. parasitica* -vesihomeen määrä korreloi negatiivisesti veden lämpötilan kanssa, eli *S. parasitica* -vesihometta esiintyi runsaimmin kylmän veden aikaan (Liite 4). Laitoksella 5 tihennettiin näytteenottoa keväällä 2022, niin että näytteitä otettiin kaksi kertaa viikossa useasta tuloveden näytteenottopisteestä ja poistovedestä. Tässä tutkimuksessa ei löydetty tuloveden *S. parasitica* -määrän vaikuttavan vesihomeen leviämiseen laitoksella, eikä veden lämpötila korreloinut havaitun vesihomeen määrän kanssa laitoksella (Liite 4, Kuva 8). Tämä viittaa siihen, että jokin tietty lämpötila ei ole merkittävä tekijä *S. parasitica* -vesihomeen esiintymisessä vedessä. Liitteen 4 kuvista kuitenkin huomataan, että vesihomeinfektiot kaloilla esiintyvät ajallisesti yleisesti silloin, kun veden lämpötilassa tapahtuu muutos. Myös laitoksella 5 jossa oli tihennetty seuranta, veden lämpötila muuttui ja laitoksella havainnointiin vesihometta koko seurannan ajan. Lämpötilan vaihtelu on todennäköisempi syy altistamaan kalat stressille ja immunosuppressiolle ja tätä kautta myös vesihomeinfektioille [9], kuin jokin tietty veden lämpötila. Erityisesti kissakaloilla esiintyvän saprolegniosisin on osoitettu aiheutuvan veden lämpötilan nopeasta laskusta, jolloin kaloilla aiheutuu immunosuppressiota, mutta myös *Saprolegnia* itiöiden määrä lisääntyy vedessä [10].

3.3 Muiden patogeenien esiintyminen vesihomeen yhteydessä

S. parasitica -vesihomeen lisäksi kaloista löytyi bakteereista *Flavobacterium psychrophilum* yhdesti, *Vibrio anguillarum* yhdesti, *Chryseobacterium chaponense* yhdesti ja *Iodobacter limnosediminis* seitsemän kertaa, kahdessa tutkimuserässä ei spesifiä bakteeria löytynyt (Liite 5). Bakteeri-infektioissa tavataan usein ihovaurioita ja vesihomeen yhteydessä eristetään usein *I. limnosediminis* -bakteeria. Varmuutta ei kuitenkaan ole siitä, aiheuttaako bakteeri ensin ihovaurion, joka altistaa vesihomeelle vai tuleeko bakteeri ihovaurioon, kun vesihome häviää iholta esim. kylvetysten yhteydessä. Tietyissä olosuhteissa *I. limnosediminis* ja muut tässä tutkimuksessa havaitut bakteerit pystyvät aiheuttamaan kallalle ihovaurioita ja tämä altistaa kalan osaltaan vesihomeelle. Kuitenkin vesihometta esiintyi myös tapauksissa, joissa muita taudinaiheuttajia ei todettu. Varsinkin merilohien poikasilla on kuvattu Skotlannin poikaslaitoksilla tyypillisesti vesihomeinfektio joka esiintyy kalojen kiduksilla, mutta muuta taudinaiheuttajaa kaloista ei löydy [11]. Myös tutkituissa merilohen poikasissa vesihometta esiintyi pääosin kiduksilla, kun taas taimenet, siiat ja merilohet olivat vanhempia ja niillä vesihome esiintyi yleensä evien tyvillä ja pään alueella.

3.4 Estomenetelmien vaikutus vesihomeeseen käytännössä ja tutkimusolosuhteissa

a. Estomenetelmien vaikutus *S. parasitica* -vesihomeen esiintyvyyteen vedessä

Flavobakteeri-rokotus ei vaikuttanut tässä tutkimuksessa seurattujen järvilohien vesihomeinfektioihin; vesihometta esiintyi niin rokotetuilla kuin rokottamattomillakin kaloilla (kts tarkemmin Vekki-hanke: <https://www.luke.fi/fi/projektit/vekki>). Yksittäisten kylvetysaineiden tehokkuutta vesihomeen estossa ei voida tämän tutkimuksen perusteella arvioida, sillä *S. parasitica* -vesihomeen määrään vedessä vaikutti muutkin kuin yksittäinen kylvetysaine, kuten esimerkiksi tuloveden *S. parasitica* -määrä (Liite 6).

Myös altaiden tyhjentämisen ja pesujen vaikutusta tutkittiin *S. parasitica* -määrään laitosten vedessä. Pesujen tehokkuudesta estomenetelmänä ei voida arvioida tässä tutkimuksessa, koska *S. parasitica* -määrät tulo- ja poistovedessä oli vähäisiä tai sitä ei havaittu ollenkaan sekä ennen pesuja että pesujen jälkeen (Liite 6). Kuitenkin kahdella laitoksella, yhteensä viidessä eri altaassa huomattiin selkeä nousu veden *S. parasitica* -vesihomeen määrässä sen jälkeen, kun kaloja tuotiin altaaseen pesujen jälkeen. Tämä selkeästi osoittaa, että kalojen kantama *S. parasitica* on yksi tärkeimmistä lähteistä vesihomeen esiintymisessä laitoksilla.

b. Kylvetysaineiden tehokkuus tutkimuksissa

Potentiaalisia kylvetysaineita vesihomeen kontrolloimiseksi on tutkittu paljon niin laboratorioissa kuin laitoksilla (Liite 6, Taulukko 3). Aikaisemmin vesihomeen kontrolloimiseksi käytetty malakiittivihreä ei ole hyväksytty käytettäväksi EU:ssa elintarvikkeeksi päätyvien eläinten hoidossa sen myrkyllisyyden ja syöpää aiheuttavien ominaisuuksien vuoksi [12].

Liitteessä 6, taulukossa 3. luetellaan vesihomeen estoon tutkittuja aineita, niiden käytettyjä ja suositeltuja pitoisuuksia, sekä mahdollisia muita vaikutuksia. Koska kemikaaleilla on aina jonkinasteisia haittavaikutuksia, niiden käytössä tulee olla hyvin selvillä turvallisista pitoisuuksista. Väärin käytettynä kemikaalit voivat olla jopa vahingollisempia kalalle kuin itse vesihome. Lisäksi käyttäjäturvallisuus ja suojainten käyttö tulee aina selvittää jokaiselle

kemikaalille käyttöturvallisuustiedotteesta. Tämän vuoksi kemikaalien käyttöä säädellään lainsäädännössä. Sairauden ehkäisyssä ja hoidossa tulee huomioida eläinten lääkitsemislainsäädäntö. Lääkkeiden käyttöä tuotantoeläimille voidaan rajoittaa, jos se vaarantaa elintarvikkeen turvallisuuden tai laadun. EU:n asetuksessa 37/2010 luettelossa 1 mainittuja aineita voidaan käyttää lääkinnällisissä tarkoituksissa listatuille eläinlajeille. Lisäksi on listattu käytetyn kemikaalin sallittu jäämien enimmäismäärä, jos sellaisia kemikaalista jää. Osa taulukossa 3. luetelluista kemikaaleista on vain tutkimuskäytössä ja niitä ei eläinten lääkitsemislainsäädännön tai EU:n asetuksen 37/2010 mukaan kaikkia voi käyttää eläimille. Monet vesihomeen estoon käytetyt kemikaalit ovat myös desinfiointiaineita, joita ei käytetä pelkästään lääkinnällisissä tarkoituksissa, vaan myös pintojen ja veden desinfiointiin vesihomeen estossa. Tällöin kemikaalin käyttö on desinfektioikäyttöä ja siihen sovelletaan EU:n biosidiasetusta N:o 528/2012.

Nykyisin vesihomeen estossa käytetään yleisimmin formaliinia eli formaldehydin vesiliuosta, jonka on todettu olevan tehokas estomenetelmä varsinkin mädissä esiintyvään vesihomeeseen. EU:ssa formaldehydi on sallittu eläinten hygieniassa, siihen käyttöön hyväksytyillä valmisteilla. Formaldehydiä kuitenkin suositellaan korvattavaksi turvallisimmilla aineilla silloin kun se on mahdollista, sen potentiaalisten karsinogeenisten vaikutusten vuoksi [15,13]. Schreier ym. [14] tutkimuksessa vaikuttavin annostus estämään vesihometta kirjolohen ja järvitaimenen mädissä oli 0,5 - 1,5 ml/l 37 % formaldehydiä annosteltuna 15 minuuttia joka toinen päivä kahden viikon ajan. Vesihometta sairastaneissa kirjolohissa 37 % formaldehydikylvyt (60 min) joka toinen päivä, kolmen päivän ajan, 0,05 – 0,15 ml/l annosteltuna vähensi kuolleisuutta. Formaliinilla on kuitenkin haittapuolia, kuten kidesvauriot ja hapen sitominen vedestä. Useat lohikalat ovat varsin herkkiä formaliinille ja terapeuttinen annostus on usein lähellä kalan sietorajaa (Taulukko 3).

Formaldehydi on tehokas useita ektoparasiitteja ja patogeenejä vastaan vesihomeen lisäksi ja siksi yksi käytetyimmistä kylvetyskemikaaleista vesiviljelyssä ympäri maailman. Estomenetelmien yksipuolisuus kuitenkin lisää lohikalan viljelyn haavoittuvuutta, jos aineen käyttöä rajoitetaan tai sen tehokkuus kärsii, joten tarvitaan vaihtoehtoisia menetelmiä. Vetyperoksidi on pidetty yhtenä tällä hetkellä lupaavimmista vaihtoehtoisista formaliinille vesihomeen estossa, sillä sen ominaisuus hajota nopeasti vedessä tekee siitä ympäristöystävällisemmän ja turvallisemman kemikaalin [16], toisaalta tämä ja orgaaniseen aineeseen sitoutuminen vaikeuttaa vetyperoksidin tehokasta annostelua. Vetyperoksidi 500 – 1000 mg /l päivittäisenä huuhteluna haudonnan ajan on huomattu olevan tehokas mädin homehtumisen estossa lohikaloilla [17, 18]. Se myös vähensi lohenpoikasten kuolleisuutta, kun sitä annosteltiin päivittäin 30 min neljän viikon ajan 0,2 mg/l [19]. Kyseisessä tutkimuksessa [19] ei huomattu näissä olosuhteissa peretikkahapon (0,2 tai 0,5 mg/l) vähentävän lohenpoikasten kuolleisuutta, mutta kiertovesisysteemin (RAS) olosuhteissa peretikkahappo vähensi vesihomeen esiintymistä lohenpoikasilla (0,2-1 mg/l), ilman että se vaikutti biofilttereiden mikrobistoon [31].

Vaikka lupaavia estomenetelmiä vesihomeen estoon on olemassa (Taulukko 3), lisää tutkimusta tarvitaan niiden toimivuudesta käytännössä. Kylvetysaineiden tehokkuuteen vaikuttaa aina käytetyn aineen ominaisuudet, mutta myös ympäristötekijät kylvetyksen aikana, kuten viljelymenetelmä, lämpötila, kiintoaineen määrä jne. Tämä tarkoittaa että tietyllä aineella saatu tulos vesihomeen estossa tietyssä ympäristössä ei olekaan aina toistettavissa toisessa ympäristössä tai eri kalalajilla.

c. Menetelmien validointi

Tässä tutkimuksessa käytetty eDNA -menetelmä [7] on verrattain uusi, joten osa vesinäytteistä tutkittiin lisäksi sekvensoimalla. Vesinäytteistä monistuneen PCR -tuotteen sekvensointi varmisti, että qPCR -menetelmä tunnisti *S. parasitica* -DNA:ta (Liite 7). Lisäksi menetelmässä veden suodattaminen tulee tehdä mahdollisimman nopeasti, että saadaan luotettavia tuloksia *S. parasitica* -määrästä vedessä näytteenottohetkellä. Tässä kuitenkin logistiikkaongelmat aiheuttivat tutkimuksen yhteydessä sen, että vesinäytettä ei saatu ajoissa suodatettua ja näyte oli tutkimuskelvoton. Tämän vuoksi hankkeen yhteydessä kokeiltiin vesinäytteen pakastamista ja vesinäytteen suodattamista paikan päällä, jotka voisivat ratkaista tämän ongelman ja mahdollistaa menetelmän sujuvamman käytön kalanviljelylaitoksilla. Pakastaminen kuitenkin muutti *S. parasitica* -määriä vesinäytteessä (Liite 7). Paikan päällä tehtävää suodatustakin tulee vielä kehittää, että sillä saadaan varmasti luotettavia tuloksia.

4 Hankkeen toteutus

Hanke aloitettiin kesällä 2021 ja se päättyi syyskuussa 2022. Hanke toteutettiin suunnitellun aikataulun ja myönnettyjen määrärahojen puitteissa (Taulukko 2). Hankkeen vetäjä ja koordinaattori oli Ruokavirasto, jossa hankkeen vastuullisena johtajana toimi johtava asiantuntija Satu Viljamaa-Dirks ja yksikön johtaja Riikka Holopainen. Hankevastaavana tutkijana toimi Tiina Korkea-aho. Tutkimusyhteistyötä hankkeessa tehtiin Luken vesiviljelytutkijoiden, sekä Savon Taimen Oy ja Voimalohi Oy kanssa.

Taulukko 2. Hankkeeseen myönnetty rahoitus ja toteutuneet menot

| Kustannuslaji | Myönnetty rahoitus € | Hankkeessa toteutuneet menot € |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| Henkilöstökustannukset | 43161,77 | 39369,26 |
| Kiinteämääräinen tuki | 6474,27 | 5905,39 |
| Kone- ja laitehankinnat | 14630 | 13357,84 |
| Matkakulut | 4825 | 1633,62 |
| Ostopalvelut | 3336 | 163,98 |
| Muu kustannus | 5454,86 | 2212,36 |
| Vastikkeeton työ ja työpanos | 3400 | 3240 |
| Yhteensä | 81281,90 | 65882,45 |

4.1 Hankkeen tiedotteet ja julkaisut

Vesihomeen ajallinen esiintyminen ja estomenetelmien optimointi kalanviljelylaitoksilla.

Päivitetty 5.10.2022. Katsottu 21.11.2022. [Vesihomeen ajallinen esiintyminen ja estomenetelmien optimointi kalanviljelylaitoksilla - Ruokavirasto](#)

Vesihomehankkeessa jatketaan tutkimuksia kalanviljelylaitoksilla. Suomen kalankasvattajaliitto ry tiedote. Julkaistu 14.12.2021. Katsottu 21.11.2022.

[Vesihomehankkeessa jatketaan tutkimuksia kalanviljelylaitoksilla - Suomen Kalankasvattajaliitto ry \(kalankasvatus.fi\)](#)

Vesihomehankkeista. Eläinterveystutkimuksen uutiskirje 4/2022. Katsottu 21.11.2022.

[Eläinterveystutkimuksen uutiskirje 4/2022 \(ruokavirasto.fi\)](#)

Tuomela, S.: *S. parasitica* -vesihometta tunnistavien kolmen qPCR-menetelmän vertailu ja valitun menetelmän toimivuus kalanviljelylaitosten vesinäytteissä. Pro gradu-tutkielma. Helsingin yliopisto. 2022. [S. parasitica-vesihometta tunnistavien kolmen qPCR-menetelmän vertailu ja valitun menetelmän toimivuus kalanviljelylaitosten vesinäytteissä \(helsinki.fi\)](#)

Korkea-aho T, Wiklund T, Engblom C, Vainikka A, Viljamaa-Dirks S: Detection and Quantification of the Oomycete *Saprolegnia parasitica* in Aquaculture Environments. *Microorganisms* 2022, 10(11):2186. [Microorganisms | Free Full-Text | Detection and Quantification of the Oomycete Saprolegnia parasitica in Aquaculture Environments \(mdpi.com\)](#)

Korkea-aho, T., Viljamaa-Dirks, S., Holopainen, R. Vesihomeen ajallinen esiintyminen ja estomenetelmien optimointi kalanviljelylaitoksilla. Hankkeen loppuraportti 10 s. 2022.

Kiitokset

Haluamme kiittää kaikkia hankkeen työhön osallistuneita, erityisesti kaikkia tutkimuksessa mukana ollutta henkilöstöä Ruokavirastossa, Luke vesiviljelyssä, Savon Taimen Oy:ssä ja Voimalohi Oy:ssä. Kiitos myös hankkeessa pro gradun Helsingin yliopistolle tehneelle Suvi Tuomelalle. Tämän hankkeen mahdollisti Pohjois-Savon ELY keskuksen myöntämä hankerahoitus Euroopan meri- ja kalatalousrahastosta (Hankenumero 169768).

Liite 1. Vesihomehankkeen näytteidenotto lomake

Tutkimme Ruokaviraston koordinoimassa hankkeessa vesihomeen määrän vaihtelua Suomen kalanviljelylaitoksilla ja miten ympäristötekijät ja mahdolliset käsittelyt vaikuttavat vesihomeen määriin kalanviljelylaitoksilla. Tutkituista altaista ja tulovedestä otetaan vesinäyte kerran kuukaudessa. Silloin kun tutkitussa altaassa esiintyy tai epäillään vesihometta, otetaan vesinäyte, joka säilytetään kylmässä. Tämän jälkeen allas käsitellään normaali käytäntöjen mukaisesti (esim. formaliini) ja vuorokausi kylvetyksen jälkeen otetaan uudet vesinäytteet. Tautitapausten yhteydessä lähetetään myös oireellisia kaloja tutkittavaksi. Täytä tämä lomake jokaiselle altaalle ja vedenotto paikalle, josta otetaan näytteet.

Näytteenotto-ohjeet:

- Vesinäytteenotto.** Ota ensimmäiseksi näyte tulovedestä veden käsittelyn jälkeen (esim. rumpusuodattimen jälkeen). Tämän jälkeen ota vesinäytteet altaista poistoputken suulta tai mahdollisimman kaukana altaan tulovedestä. Käsittele vesinäytepulloja vain puhtaat kertakäyttöhanskat kädessä. Älä koske pullon suuhun tai korkin sisäpintaan käsin. Vie avoin pullo vinossa asennossa vedenpinnan alle ja kuljeta sitä pois päin itsestäsi vastavirtaan, niin että se täyttyy vedellä. Sulje korkki ja säilytä vesinäytepullo kylmässä. Merkitse myös vesinäytepulloon milloin ja mistä näyte on otettu.
- Kalanäytteenotto.** Ota vesinäytteiden lisäksi tarvittaessa altaista näytteeksi myös oireellisia kaloja, noin 5-10 kalaa/ allas, lopeta ne ja säilytä kylmässä.
- Lähetä/ kuljeta** kala- ja vesinäytteet mahdollisimman pian Kuopion Ruokavirastoon. Näytteet tulee olla perillä viimeistään vuorokauden kuluessa näytteenotosta ja ne tulee säilyttää kylmässä koko ajan. Kun tiedät näytteenotto- ja lähetysajankohdan ole yhteydessä Ruokaviraston tutkijaan (tiina.korkea-aho@ruokavirasto.fi tai p. 040 489 3380).

Kala- ja vesinäytteen mukaan nämä tiedot

| | | |
|---|---|------------------|
| Näytteenottopäivämäärä: | Näytteenottajan nimi, puhelinnumero ja/tai s-posti: | |
| Allastyypin ja tunnisteen: | | Veden lämpötila: |
| Veden käsittely (rumpusuodatin tms.) ja muita vesiarvoja (pH, happisaturaatio ym.) | | |
| Kalalaji: | Kalojen ikä: | Kalatiheys: |
| Onko näytteenottoaltaassa havaittu vesihomeisia kaloja, milloin alkanut? Arvioi silmämääräisesti vesihomeisten kalojen osuus altaassa (%) | | |
| Altaan kuolleisuus % / pv | | |
| Altaiden kylvetykset / käsittelyt ja ajankohdat? | | |
| Näytekalat lkm. | | |
| Muita havaintoja/tietoja: | | |

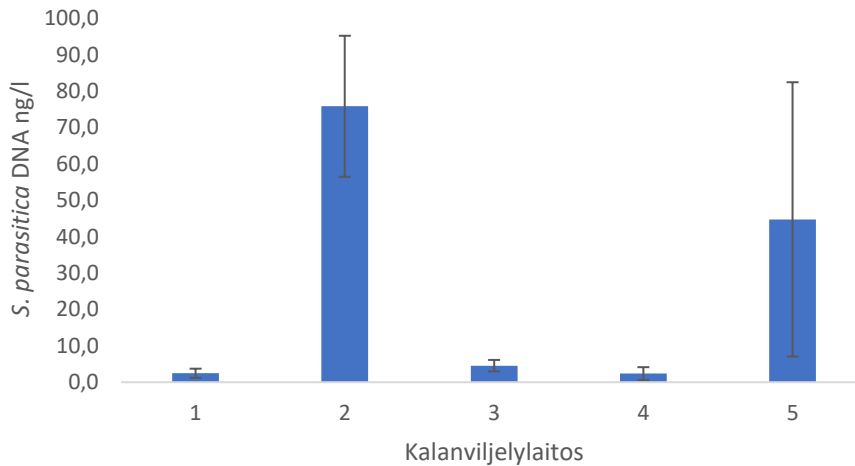
Liite 2. Tutkimuksen tilastolliset menetelmät

Läpivirtauslaitosten *S. parasitica* DNA -määrien keskiarvoja tarkasteltiin ensin kaikkien laitosten kaikkia altaita yhdessä, ja myös erikseen ei parametrisilla Mann-Whittney U (parittaiset vertailut) ja Kruskal-Wallis (usean ryhmän vertailut) -testeillä. Laitoksen 2. *S. parasitica* DNA -määrien aineisto oli normaalijakautunut, joten DNA -määrien keskiarvojen vertailuun käytettiin varianssianalyysiä (ANOVA).

Vedessä esiintyvän *S. parasitica* -vesihomeen määrän ja veden lämpötilan vaikutusta vesihomeen esiintymiseen kaloissa tarkasteltiin läpivirtauslaitoksilla yleisellä tasolla kaikissa altaissa Mann-Whittney U -testillä. Yksittäisiä laitoksia tarkasteltaessa DNA määrät luokiteltiin järjestysasteikollisesti *S. parasitica* DNA-määrän mukaan; 1. 0 ng/l *S. parasitica* DNA:ta, 2. $\leq 0,1$ ng/l *S. parasitica* DNA:ta, 3. ≤ 1 ng/l *S. parasitica* DNA:ta, ≤ 10 ng/l *S. parasitica* DNA:ta, 4. > 10 ng/l *S. parasitica* DNA:ta. Luokiteltua DNA -määrään vaikutusta tulo- ja poistovedessä vesihomeinfektioiden esiintyvyyteen testattiin yksittäisillä laitoksilla Pearson χ^2 -testillä. Analyyseistä poistettiin tulokset altaista, jotka olivat jäässä, koska silloin havaintoja vesihomeisista kaloista ei pystytty tekemään luotettavasti. Spearmanin järjestyskorrelaatiota ja Pearsonin korrelaatiota (normaalijakautunut aineisto) käytettiin veden lämpötilan, vesihomeisten kala-altaiden prosenttiosuuden sekä kuolleisuuden korrelaation tutkimiseen *S. parasitica* DNA-määrän kanssa yksittäisissä laitoksissa. Tilastolliset testit tehtiin IBM SPSS tilastollisella analyysiohjelmalla, tilastollisen merkitsevyyden rajana oli 0,05.

Liite 3. *S. parasitica* tutkituilla kalanviljelylaitoksilla

S. parasitica -vesihomeen esiintyminen vaihteli laitoksesta riippuen (tilastollisesti merkitsevä ero laitosten välillä; $p < 0,001$, Kuva 1). Tämä tulos on samanlainen kuin tutkimuksessa, jossa vertailtiin *S. parasitica* -vesihomeen esiintymistä kahdella italialaisella ja kahdella skotlantilaisella laitoksella, ja todettiin, että *S. parasitican* esiintyminen kaloissa ja vedessä vaihteli laitoksesta riippuen [21]. Nämä tulokset vahvistavat sitä tietoa, että laitosten erilaiset ympäristötekijät ja olosuhteet, sekä laitostyyppi vaikuttavat suuresti vesihomeen esiintymiseen ja lisääntymiseen laitoksilla.



Kuva 1. *S. parasitica* -vesihomeen DNA:n (ng/L) keskiarvo ja keskivirhe (\pm SE) ympäri vuoden viideltä eri kalanviljelylaitokselta otetuissa vesinäytteissä. Laitosten ja vesinäytteiden tiedot taulukossa 1.

Läpivirtauslaitosten (laitokset 1,3,4,5) tuloveden *S. parasitica* DNA-määrä ($\bar{x} \pm \text{SE}$; $0,59 \pm 0,22$) oli selkeästi pienempi kuin altaiden poistoveden keskimääräinen *S. parasitica* DNA -määrä ($13,41 \pm 7,84$). Havaittu ero oli tilastollisesti merkitsevä ($p = 0,044$). Tämä vahvistaa tiedon, että *S. parasitica* lisääntyy kaloissa tehokkaasti.

Kun tarkasteltiin kaikkien läpivirtauslaitosten *S. parasitica* DNA-määriä, altaiden tulo- ja poistovesissä mitattiin vähemmän *S. parasitica* DNA:ta silloin, kun kaloissa ei ollut näkyvää vesihomeinfektiota ja toisaalta vesihometta oli vedessä enemmän silloin, kun myös kaloissa havaittiin vesihomeinfektio (Kuva 2.). Tämä oli tilastollisesti merkitsevä ero tulovedessä ($p = 0,016$), sekä poistovedessä ($p < 0,001$). Tämä tulos viittaa siihen, että *S. parasitica* DNA:n korkeampi määrä tulovedessä vaikuttaa todennäköisesti kalojen vesihomeinfektion esiintymiseen laitoksella. *S. parasitica* DNA-määrät tulovedessä ovat hyvin pieniä ja selkeitä eroja laitoskohtaisissa mittauksissa ei saatu tuloveden korkeammasta määrästä, silloin kun laitoksella havaittiin vesihomeinfektio (kts luku 3.2). Lisäksi läpivirtauslaitosten 1, 3 ja 5 tuloveden *S. parasitica* DNA-määrää verrattaessa laitoksen 4 tuloveden DNA-määrään, jossa vesihomeisia kaloja vesinäytteiden ottohetkellä ei havaittu koko vuoden aikana, tuloveden *S. parasitica* DNA-määrä ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi laitosten välillä ($p \geq 0,075$). Toisaalta tulee muistaa, että on todennäköistä, että tuloveden *S. parasitica* -määrä altistaa kalat vesihomeinfektioille jo ennen kuin vesihometta näkyy kaloissa ja tuloveden *S. parasitica* DNA-määrää tulisikin tarkastella tiheämmin ja seurata *S. parasitica* -määrän vaikutusta juuri ennen vesihomeinfektion puhkeamista tulevaisuudessa, että sen vaikutusta vesihomeinfektion syntymiseen pystytään tarkemmin määrittämään. Poistoveden *S.*

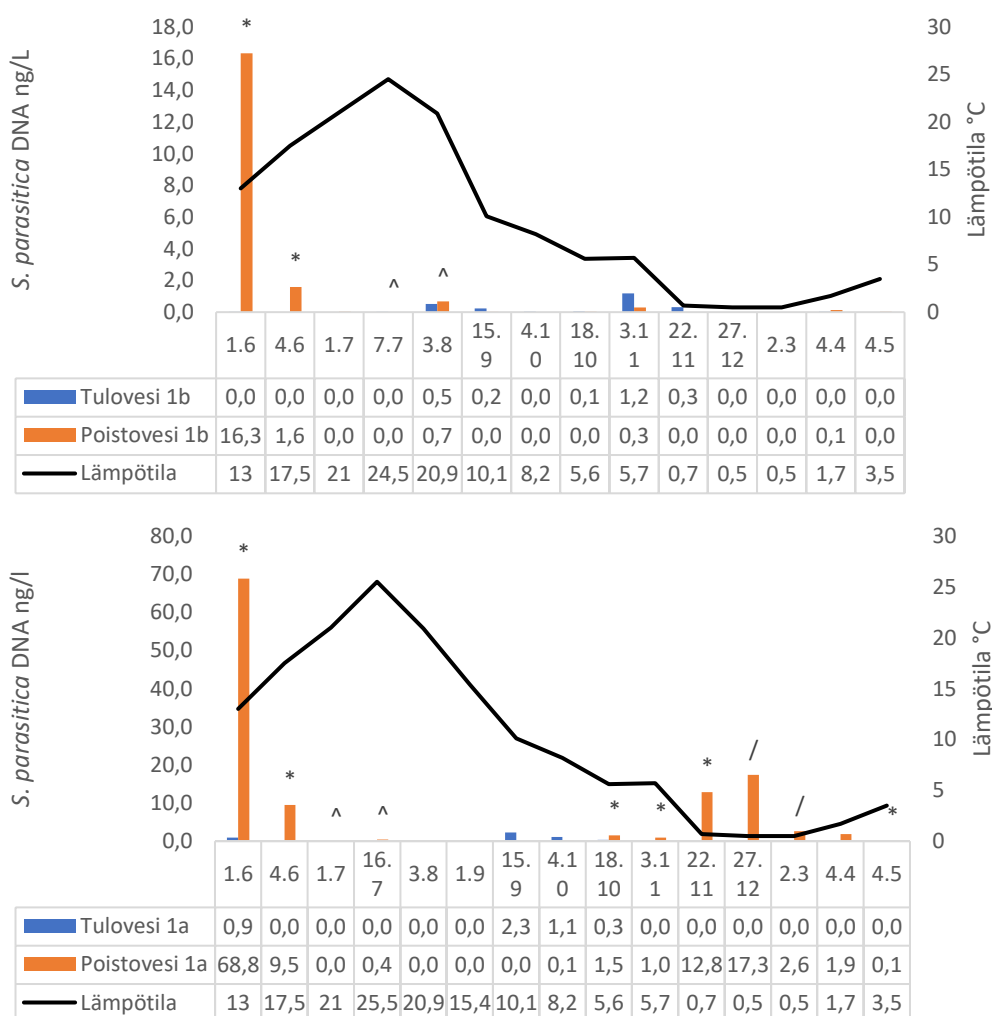
parasitica -määrän nousu vesihomeinfektion aikaan osaltaan vahvistaa käsitystä siitä, että *S. parasitica* lisääntyy tehokkaasti ja lisää tätä kautta infektiopainetta laitoksella. Aikaisemmissa tutkimuksissa vesihomeen määrän lisääntyminen vedessä sairaiden kalojen kautta on huomattu, mutta tuloveden *Saprolegnia* itiöiden määrän ei ole aikaisemmin huomattu vaikuttavan kalojen lohen mätimunien kuoritumistulokseen [8].

Kun tarkasteltiin kaikkien tutkimuksessa olleiden läpivirtauslaitosten tuloveden lämpötiloja silloin, kun kaloissa oli havaittu vesihomeinfektio, se vaihteli vuoden aikana ($k \pm SE$) $7,2 \pm 1,51$ °C ja $9,2 \pm 1,06$ °C silloin, kun vesihomeinfektioita tutkituissa altaissa ei havaittu. Lämpötila ero tulovedessä ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($p = 0,536$). Poistovedessä lämpötilan vaihtelu havaittujen vesihomeisten kalojen kanssa vaihteli $8,1 \pm 1,6$ °C ja silloin, kun vesihometta ei havaittu kaloissa veden lämpötila vaihteli $8,1 \pm 0,8$ °C, eli tilastollista merkitsevyyttä lämpötilalla ei havaittu olevan *S. parasitica* DNA:n esiintyvyyteen kaloissa.

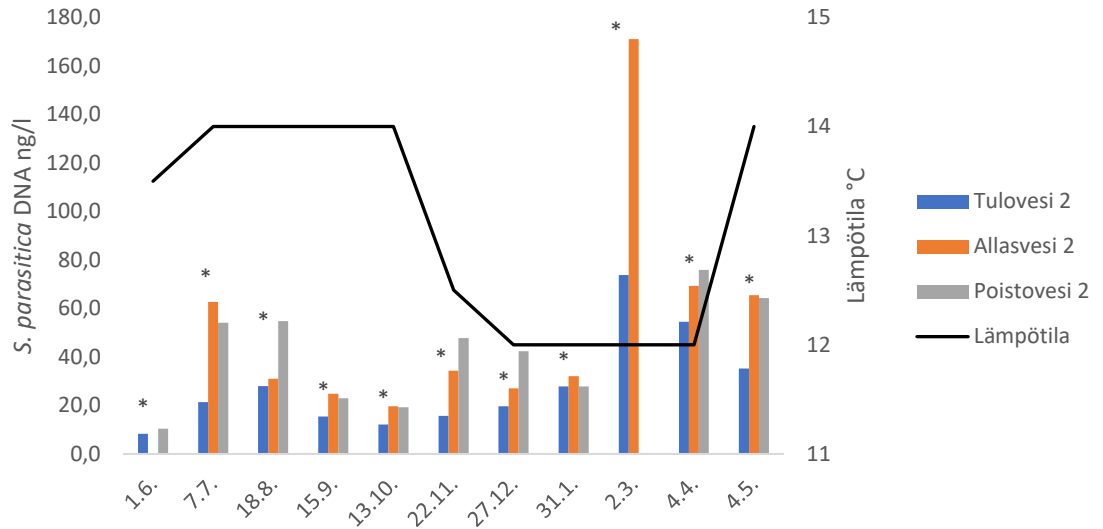
Liite 4. Kalanviljelylaitosten *S. parasitica* -määrät tulo- ja poistovesissä, sekä veden lämpötilan vaihtelu vuoden aikana

Ympärivuotiset vesinäytteet viideltä tutkimuksessa mukana olleelta laitokselta (laitokset 1, 2, 3, 4 ja 5; Taulukko 1.)

Altaassa 1 a esiintyi vesihomeinfektioita kesällä ja talvella, altaassa 1b havaittiin vesihomeinfektio kesäkuun alussa (kuva 3.). Verrattaessa vesihomeinfektion esiintyvyyttä vesihomeen määrään vedessä tuloveden vesihomemäärällä ei ollut vaikutusta siihen esiintyikö altaissa vesihomeinfektioita ($p=0,528$). *S. parasitica* DNA-määrä sen sijaan oli selkeästi korkeampi poistovedessä silloin kun vesihomeinfektioita esiintyi altaassa, verrattuna siihen, kun vesihomeinfektioita ei esiintynyt ($p=0,015$). Veden lämpötila ei korreloinut vesihomeen DNA:n määrään tulovedessä ($p=0,953$), eikä poistovedessä ($p=0,564$).

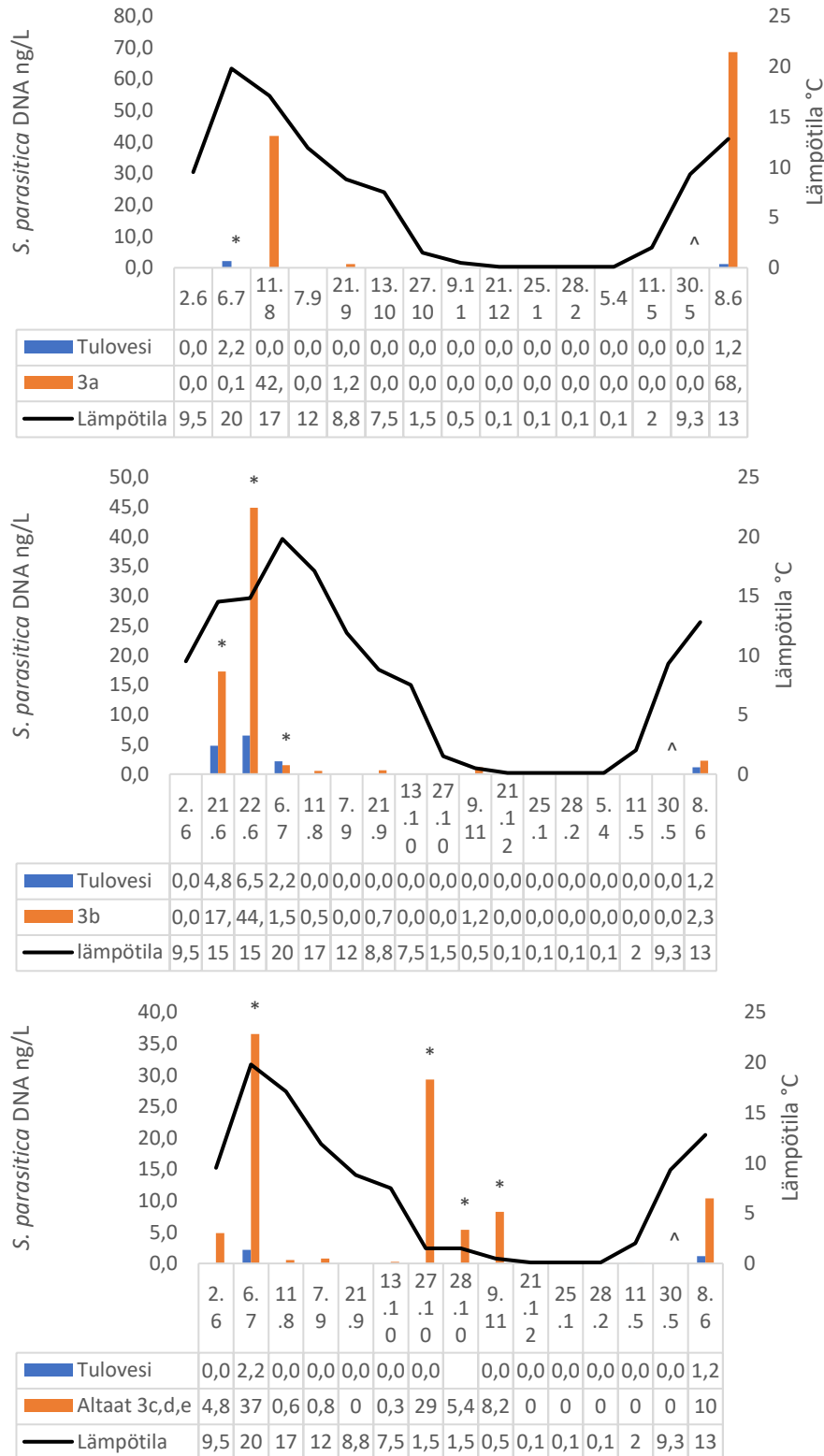


Kuva 3. Laitoksen 1. *S. parasitica* DNA-määrä (ng/l) kahden maa-altaan tulo- ja poistovedessä ja veden lämpötilan vaihtelu vuosina 2021-2022. *Vesihomeisia kaloja altaassa, ^ei kaloja altaassa. /allas jäätynyt.



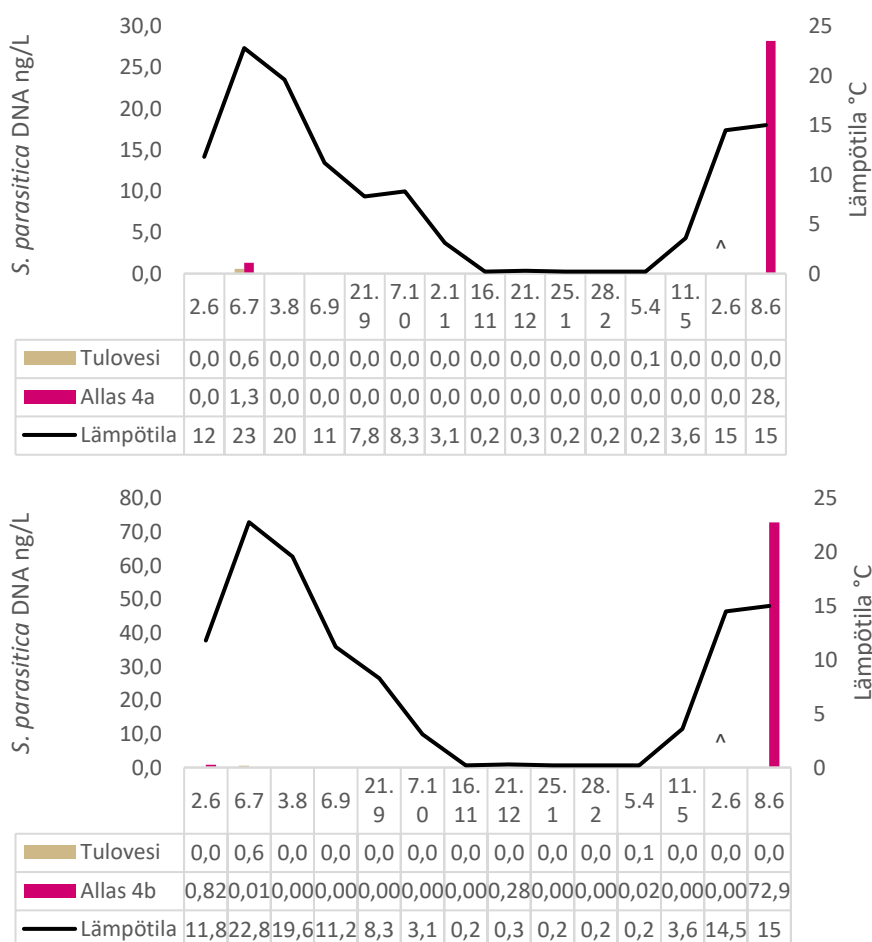
Kuva 4. Laitoksen 2. *S. parasitica* DNA-määrä tulo-, allas- ja poistovedessä sekä veden lämpötilan vaihtelu vuosina 2021-2022. *Vesihomeisia kaloja altaassa.

Laitoksella 2 havaittiin *S. parasitica* DNA:ta vuoden ympäri tulo-, allas, ja poistovedessä, sekä vesihomeisia kaloja. Laitoksen 2 *S. parasitica* DNA-määrä kierron tulevassa vedessä oli (ka±SE) 28,36±5,96 ng/l, altaassa 53,71±14,25 ng/l ja kierron poistovedessä 41,97±6,72 ng/l. Vaikka tulovedessä oli yksittäisiä näytteenottoja tarkasteltaessa vähemmän *S. parasitica* DNA:ta kuin allas- tai poistovedessä, keskiarvoa tarkasteltaessa ei tulo-, allas- ja poistoveden välillä ollut tilastollisesti merkitsevää eroa (p=0,183). Tämä tulos kertoo, että *S. parasitica* -itiöitä tavattiin kaikissa näytteenottopisteissä veden kierrossa ympäri vuoden laitoksella. Laitoksella 2 veden lämpötilan vaihtelu oli vähäistä vuoden aikana, eikä lämpötila korreloinut vedessä olevan *S. parasitica* DNA-määrän kanssa (p=0,094). Laitoksella 2 näytteenottopäivinä 1.6.2021-31.1.2022 kalojen päiväkuolleisuudet vaihtelivat kierrossa (ka±SE) 0,064±0,026 % ja vesinäytteenotto altaassa 0,057±0,025%, mutta ei korreloinut *S. parasitica* DNA-määrän kanssa tulovedessä (n=8, p=0,720), allasvedessä (n=7, p=0,830) tai poistovedessä (n=8, p=0,617).



Kuva 5. Laitoksen 3 *S. parasitica* DNA-määrät altaissa 3a ja 3b vuosina 2021-2022, sekä *S. parasitica* DNA-määrä altaassa 3c 2.6.2021, altaassa 3d 6.7.-13.10.2021 ja altaassa 3e 27.10.2021-8.6.2022 aikana, sekä veden lämpötila näytteenoton yhteydessä. *Vesihomeisia kaloja altaassa, ^ei kaloja altaassa.

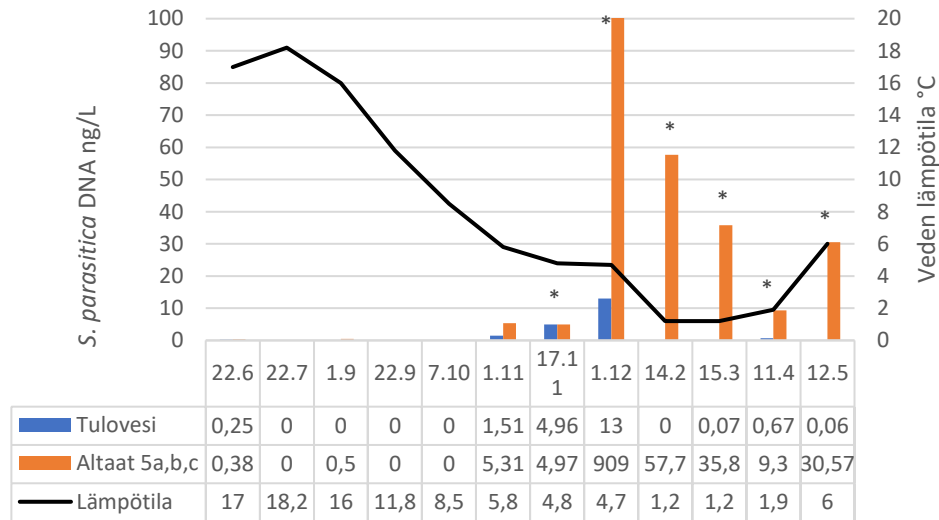
Laitoksen 3 altaissa 3a ja 3b esiintyi vesihomeinfektioita kaloissa pääasiassa kesällä. Laitoksella kuitenkin esiintyi yksittäisissä altaissa vesihomeinfektioita myös talven aikana (Kuva 5.). Kaikkien altaiden *S. parasitica* DNA-määrä korreloikin veden lämpötilan kanssa positiivisesti poistovesissä ($p < 0,001$), mutta ei tulovesissä ($p = 0,159$). Tämä tulos viittaa siihen, että *S. parasitica* lisääntyy kaloissa erityisesti lämpimän veden aikaan näissä olosuhteissa. Kun kaikkien altaiden tuloveden vesihomemääriä verrattiin vesihomeinfektion esiintymiseen, ei ollut tilastollista merkitsevyyttä tuloveden *S. parasitica* DNA-määrässä verrattuna siihen oliko altaassa vesihomeinfektio vai ei ($p = 0,064$). Poistovedessä *S. parasitica* DNA-määrä oli selkeästi kohonnut silloin kun vesihomeinfektio havaittiin kaloissa, verrattuna *S. parasitica* DNA määrään silloin kun vesihomeisia kaloja ei ollut altaassa ($p = 0,027$). Laitoksen 3 altaat olivat tyhjiällä kaloista ja puhdistettiin 30.5.2022, jonka jälkeen uusia kaloja tuotiin altaaseen. Uusien kalojen tuomisen jälkeisessä vesinäytteessä havaittiin kohonneita *S. parasitica* määriä sekä tulovedessä että poistovedessä (8.6.2022), mutta vesihomekaloja ei havaittu kyseisellä näytteenottohetkellä (Liite 6, kuva 10.).



Kuva 6. Laitoksen 4 altaiden *S. parasitica* DNA määrä tulo- ja poistovedessä ja veden lämpötilan vaihtelu vuosina 2021-2022. ^ei kaloja altaassa

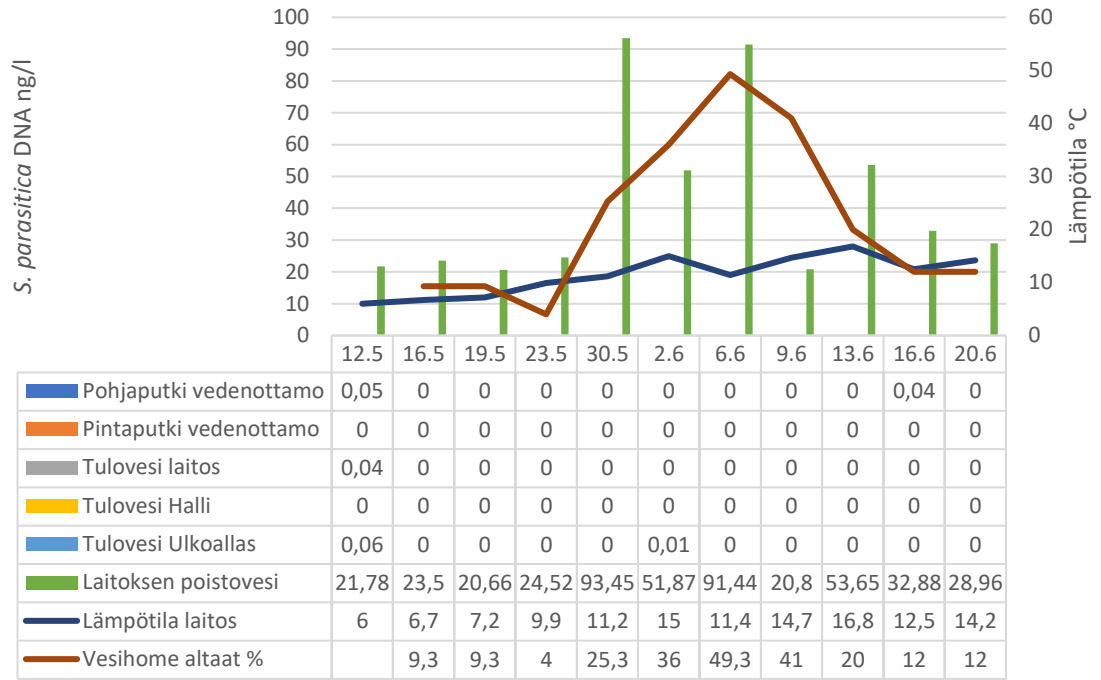
Laitoksella 4 seurattiin *S. parasitica* DNA-määriä kahdesta altaasta, joissa ei seurannan aikana esiintynyt vesihomeisia kaloja. Vedessä havaittiin *S. parasitica* DNA:ta varsinkin kesäisin, mutta DNA-määrä ei korreloinut tuloveden lämpötilan ($p = 0,072$), eikä poistoveden lämpötilan ($p = 0,120$) kanssa. Tutkitut altaat tyhjennettiin ja pestiin kesäkuun alussa ja

3.6.2022 altaisiin tuotiin uudet kalat, jonka jälkeen vesihometta havaittiin kummankin altaan vedessä, vaikka vesihomeisia kaloja ei näytteenottohetkellä havainnoitu. Yksittäisiä vesihomekaloja oli laitoksella esiintynyt kuitenkin myöhemmin 20.-28.6. välisenä aikana.



Kuva 7. Laitoksen 5 *S. parasitica* DNA-määrät tulo- ja poistovedessä altaassa 5a 22.6.-7.10.2021, 5b 1.11.2021-11.4.2022 ja 5c 12.5.2022 ja veden lämpötilä näytteenottohetkellä. *Vesihometta kaloissa.

Laitoksella 5 seurattiin *S. parasitica* DNA:n esiintymistä altaiden tulo- ja poistovesissä, joissa oli sekä *F. psychrophilum* -bakteeria vastaan rokotettuja ja rokottamattomia järvilohia (kts tarkemmin Vekki-hanke: <https://www.luke.fi/fi/projektit/vekki>). Vesihomeinfektioiden havaintojen yhteydessä ei tuloveden *S. parasitica* DNA-määrä eronnut tilastollisesti DNA-määrästä tulovedessä, kun vesihomeinfektioita ei havaittu ($p=0,189$), mutta poistovedessä *S. parasitica* -määrä oli tilastollisesti merkitsevästi korkeampi, silloin, kun vesihomeinfektioita kaloissa esiintyi ($p=0,025$). Tulovedessä ei ollut korrelaatiota *S. parasitica* DNA-määrässä verrattuna lämpötilaan ($p=0,198$). Sen sijaan lämpötilalla ja *S. parasitica* DNA:n määrällä oli selkeä negatiivinen korrelaatio ($p=0,001$), eli *S. parasitica* DNA:ta esiintyi poistovedessä eniten kylmän veden aikaan. Tämä oli täysin erilainen korrelaatio lämpötilan ja veden *S. parasitica* DNA-määrässä kuin laitoksella 3 ja vahvistaa käsitystä siitä, että *S. parasitica* esiintyy laitoksilla sekä vedessä että kaloissa niin lämpimän kuin kylmän veden yhteydessä.



Kuva 8. Laitoksen 5 vesinäytteiden *S. parasitica* DNA-määrät tarkasteltuna tuloveden viidestä eri näytteenotopisteestä ja poistovedestä kahdesti viikossa 12.5-20.6.2022. Veden lämpötila laitoksella näytteenottoajankohtina ja altaiden % -osuus, joissa todettu näytteenottohetkellä vesihome kaloissa.

Laitoksen 5 tulovesien *S. parasitica* DNA:ta seurattiin keväällä 2022 viidestä eri tuloveden näytteenotopisteestä ja poistovedestä. Tulovesissä havaittiin ensimmäisessä näytteenotossa (12.5.22) pieniä määriä *S. parasitica* DNA:ta pohjaputkessa vedenottamalla, laitoksen tulovedessä ja ulkoaltaan tulovedessä ja satunnaisesti 2.6. ulkoaltaan tulovedessä sekä 16.6. pohjaputkesta vedenottamolta otetussa vesinäytteessä. Laitoksen poistovedessä havaittiin jatkuvasti *S. parasitica* DNA:ta (Kuva 8). Tämä edelleen vahvistaa käsitystä siitä, että vesihome lisääntyy erittäin tehokkaasti kaloissa, ja muut tekijät kuin tuloveden *S. parasitica*-määrä vaikuttaa vesihomeen esiintymiseen laitoksen kaloissa, silloin kun laitoksen kaloissa on jo todettu vesihomeinfektio. Altaiden osuus, joissa vesihomeisia kaloja esiintyi laitoksella (%) eri näytteenotto ajankohtina, ei korreloinut tilastollisesti merkitsevästi veden lämpötilan kanssa ($p=0,07$). Vaikka tulosten perusteella poistovedessä vaikuttaisi olevan enemmän *S. parasitica* DNA:ta silloin kun suuremmassa prosenttiosuudessa kala-altaita havainnoitiin olevan vesihomeisia kaloja, tulos ei korreloinut tilastollisesti merkitsevästi ($p=0,095$) (Kuva 8). Veden *S. parasitica* DNA-määrän vaihteluun poistovedessä vaikutti vesihomeisten kalojen määrän lisäksi todennäköisesti myös käytetyt kylvetykset.

Liite 5. Muut patogeenit ja *S. parasitica*

Vesihomeisia kaloja tutkittiin vesihomeinfektioiden yhteydessä 11 kertaa. *S. parasitica* -vesihomeen lisäksi kaloista löytyi bakteereista *Flavobacterium psychrophilum* yhdesti, *Vibrio anguillarum* yhdesti, *Chryseobacterium chaponense* yhdesti ja *Iodobacter limnosediminis* seitsemän kertaa ja kahdessa tutkimuserässä ei spesifiä bakteeria löytynyt (Taulukko 2). Vesihomeen lisäksi kaloista löydettiin patologisissa tutkimuksissa ihovaurioita, joissa ei kasvanut näkyvää vesihometta, kahdeksassa tutkitussa erässä. Vain kolmessa kalaerässä ei selkeitä ihovaurioita, vesihomeen aiheuttamien ihovaurioiden lisäksi, löytynyt ja tällöin ei myöskään spesifiä bakteeria löytynyt (kaksi tutkimuserää) tai *I. limnosediminis* eristettiin munuaisesta (yksi tutkimuserä). Usein bakteeri eristettiin ihovaurioista (Taulukko 2, kuva 9).

Taulukko 2. Laitoksilta tutkitut kalanäytteet vesihomeinfektioiden yhteydessä ja vesihomeen, ihovaurioiden ja bakteerien esiintyminen tutkituissa kalanäytteissä

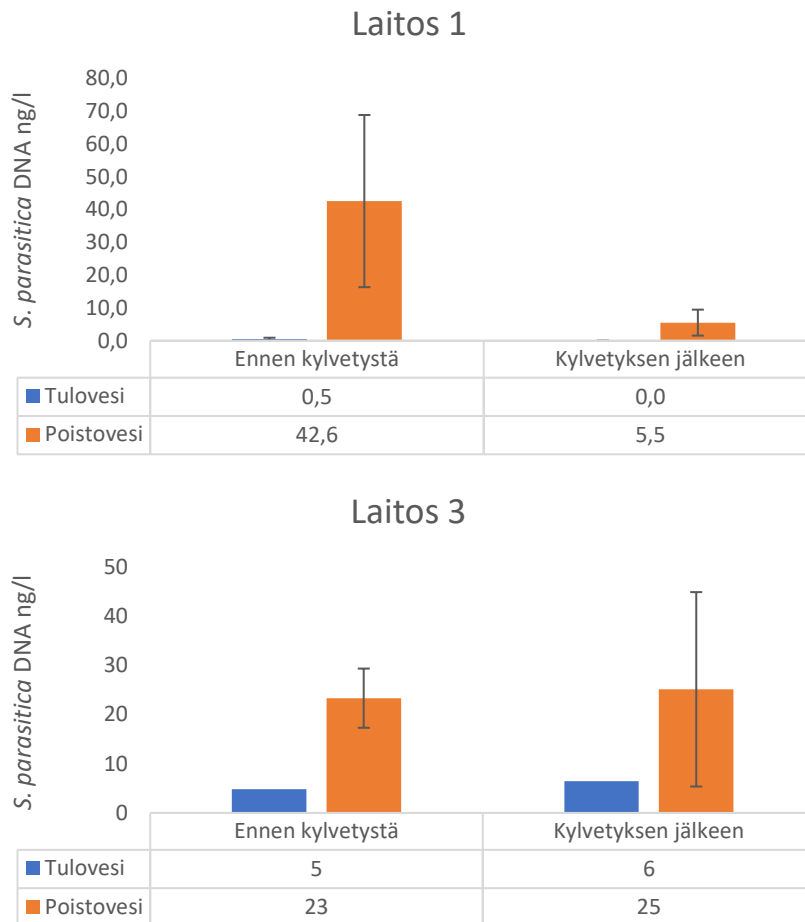
| Laitos | Näytteenotto pvm | Kalat, N | Kalalaji | Ka paino (g) | Vesihomeisia % | Ihovaurioita % | Bakteeri |
|--------|------------------|----------|-----------|--------------|----------------|----------------|--|
| 1 | 1.6.2021 | 5 | taimen | 190 | 100 | 0 | munuaisessa <i>I. limnosediminis</i> |
| 1 | 1.6.2021 | 2 | taimen | 131 | 100 | 50 | munuaisessa <i>I. limnosediminis</i> |
| 2 | 7.7.2021 | 4 | siika | 258 | 100 | 40 | munuaisessa <i>V. anguillarum</i> |
| 3 | 21.6.2021 | 7 | merilohi | 9 | 29 | 29 | ihovaurioissa <i>I. limnosediminis</i> |
| 3 | 6.7.2021 | 5 | merilohi | 13 | 80 | 0 | ei spesifiä |
| 3 | 27.10.2021 | 5 | merilohi | 35 | 100 | 40 | ihovaurioissa <i>F. psychrophilum</i> |
| 5 | 17.11.2021 | 5 | järvilohi | 141 | 100 | 0 | ei spesifiä |
| 5 | 1.12.2021 | 9 | järvilohi | 166 | 100 | 44 | ihovauriossa <i>I. limnosediminis</i> / <i>C. chaponense</i> |
| 5 | 12.5.2022 | 14 | järvilohi | 190 | 100 | 21 | kiduksilla <i>I. limnosediminis</i> |
| 5 | 19.5.2022 | 15 | järvilohi | 236 | 100 | 73 | ihovauriossa ja kiduksella <i>I. limnosediminis</i> |
| 5 | 31.5.2022 | 6 | järvilohi | 209 | 100 | 50 | ihovauriossa <i>I. limnosediminis</i> |



Kuva 9. Ihovaurio järvilohen päässä.

Liite 6. Vesihomeen estomenetelmät

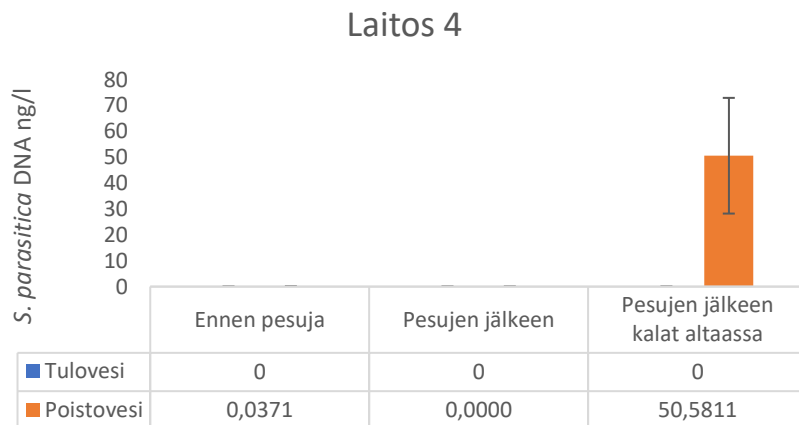
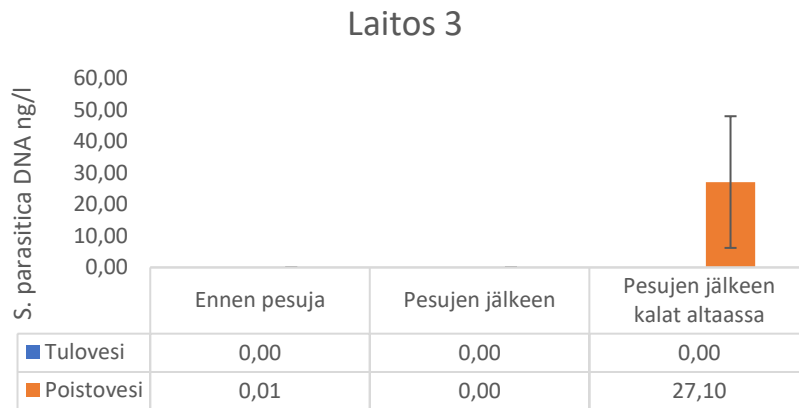
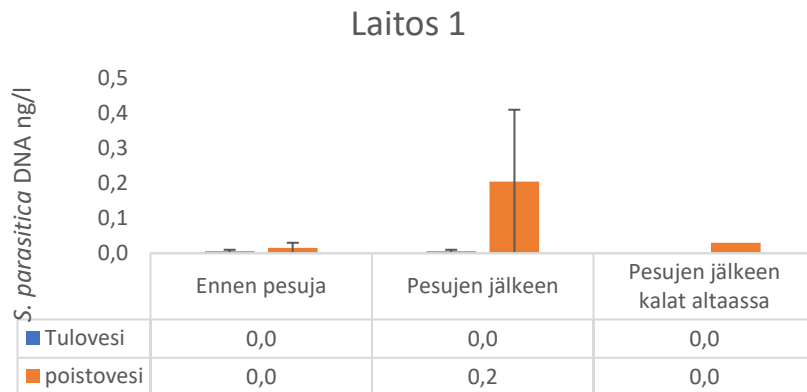
Kahdella laitoksella seurattiin vesihomeinfektioiden yhteydessä annettujen kylvytysten vaikutusta *S. parasitica* DNA:n määrään vedessä. Laitoksella 1 tulovedessä huomattiin pieni määrä ainoastaan ennen kylvetystä. Poistovedessä *S. parasitica* DNA väheni kylvytysten jälkeen, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($p=0,178$). Laitoksella 3 eroa ei ollut veden *S. parasitica* DNA-määrässä ennen ja jälkeen kylvytysten ($p=0,459$) (Kuva 10). Yksittäistä syytä siihen, miksi laitoksilla oli tällainen ero kylvytysten vaikutuksessa ei voi tämän tutkimuksen perusteella sanoa, sillä kalojen infektiostatus, veden parametrit, erilaiset kylvytysaineet ja niiden erilainen käyttö, sekä tuloveden *S. parasitica* -määrä erosivat laitosten välillä ja saattoivat vaikuttaa mitattuihin *S. parasitica* DNA-pitoisuuksiin eri laitoksilla.



Kuva 10. *S. parasitica* DNA-määrät tulovedessä ja poistovedessä ennen kylvytystä ja kylvytysten jälkeen. Laitos 1 = kahden altaan keskiarvo \pm keskihajonta, laitos 3 = kolmen altaan keskiarvo \pm keskihajonta.

Kolmella laitoksella tutkittiin altaiden tyhjennyksen ja pesujen vaikutusta vesihomeen määrään tulo- ja poistovedessä. Laitoksella 1 ei saatu tilastollisesti merkitseviä tuloksia, koska kahden tutkitun altaan vesinäytteissä havaittiin niin vähäisiä määriä *S. parasitica* DNA:ta jokaisella näytteenotolla (Kuva 11; Laitos 1). Laitoksella 3 (kolme allasta) ja 4 (kaksi allasta) ei ollut merkitsevää eroa ennen ja jälkeen altaiden pesujen, koska *S. parasitica* -määrät vedessä olivat alhaisia, mutta kun uudet kalat tuotiin altaisiin pesujen jälkeen,

vesihomeen määrä nousi tilastollisesti merkitsevästi poistovedessä laitoksella 3 ($p=0,018$) ja laitoksella 4 ($p=0,05$), mutta ei tulovedessä. Tämä tulos osoittaa selvästi, että vesihome siirtyi altaiden veteen kalojen mukana.



Kuva 11. *S. parasitica* DNA määrät tulovedessä ja altaan poistovedessä, kun vesinäytteet otettiin ennen pesua (kalat altaassa), kalat siirrettiin pois altaasta ja vesinäyte otettiin tyhjältä altaasta pesujen jälkeen ja kun kaloja oli taas altaassa. Laitos 1 = kahden altaan keskiarvo \pm keskihajonta, laitos 3 = kolmen altaan keskiarvo \pm keskihajonta, Laitos 4 = kahden altaan keskiarvo \pm keskihajonta.

Taulukkoon 3. on koottu yhteenveto tutkituista aineista, joita on käytetty vesihomeen estossa sekä laboratoriossa että laitosolosuhteissa. Tällä hetkellä vesihomeen estossa kaloille on eniten tutkimustietoa kylvetysaineista, joilla on yleinen mikrobeja tuhoava vaikutus (esim. formaliini, suola, vetyperoksidi, boorihappo, peretikkahappo). Spesifisempi vesihomeen estossa on esim. bronopoli, jonka tiedetään inhiboivan dehydrogenaasi-entsyymejä, mutta sille resistenssejä vesihomekantoja on jo löydetty [22].

Taulukko 3. Laboratoriossa ja laitosolosuhteissa tutkittuja aineita vesihomeen estossa lohikaloille ja niiden mätimunille. Osa taulukossa 3. luetelluista kemikaaleista on vain tutkimuskäytössä ja niitä ei eläinten lääkitsemislainsäädännön tai EU:n asetuksen 37/2010 mukaan kaikkia voi käyttää tuotantoeläimille. Aineiden pitoisuudet esitetty alkuperäisen lähteen mukaisesti.

| Kylvetysaine | <i>Saprolegnia</i> estossa käytetty MLC pitoisuus laboratoriossa | Vesihomeen estossa toiminut pitoisuus laitosolosuhteissa | Raportoituja sivuvaikutuksia ja /tai elintarviketurvallisuuden perusteella kielletyt | Lähteet |
|--------------------------------------|--|---|--|-------------------------|
| Suola | 20 g/l, 4 °C | Mäti: 30 g/l 15 min joka toinen päivä | Myrkyllisyys vaihtelee 3,5-150 g/l, riippuen ympäristöolosuhteista ja kalalajista | [14, 23-25, 42] |
| Vetyperoksidi | 5000 ppm | Mäti: 500 mg/l 30 min tai 1000 mg/l 15 min päivittäin. Kala: 25 mg/l huuhtelu | LC ₅₀ Kirjolohi: 2,38g/l 7°C ja 0,218g/l 22°C. mäti: 1000 µl/l | [4, 5, 17, 23, 26] |
| Boorihappo | 400 µg/ml - 0,7 g/l (0,8 g/l itiö) | Ruskuaispussi-poikanen: 0,5 g/l (jatkuva huuhtelu), Mäti: 0,2-1,4g/l (jatkuva huuhtelu) 1-4g/l (päivittäinen kylpy) | LC ₅₀ 1,59g/l (Tilapia) | [27-29] |
| Peretikkahappo | 500 ppm (Actidrox), 100 ppm (Detarox), 5 mg/l (Wolfasteril) | Lohen poikanen: 0,2 – 1 mg/l (VigorOX, päivittäinen huuhtelu, RAS-systeemi) | 0,2 – 1 mg/l päivittäiset huuhtelut vaikutti kasvuun | [4, 30, 31] |
| Bronopol (Pyceze) | 20 mg/l, (20 mg/l itiöt, 200 mg /l n. 96% hyyfi kuolleisuus biofilmissä) | Kala: 15-30 mg/l, 30 - 60 min päivittäinen kylvetys. Mäti: 30 -100 mg/l 30 min päivittäin. | Resistenttejä vesihomekantoja | [22, 32-35] |
| Formaliini (37% formaldehydi) | | Kala: 0,05 – 0,15 ml/l 60 min kylvetys päivittäin. Mäti: 0,5 – 1,5 ml/l joka toinen päivä. | LC ₅₀ kirjolohi 430 mg/l ja lohi 64 mg/l. Aiheuttaa kidesvaurioita. | [9, 14, 15, 17, 18, 36] |
| Kuparisulfaatti | MLC 5000 ppm, 400-600 mg/l, (1 mg/l ei itiöiden tuottoa) | Mäti: 30-50 mg/l huuhtelu päivittäin. Kuparikuitu 300g – 800g (esti homehtumista, | Kuolleisuus karpilla (Grass carp) nousi 1mg/l pitoisuudessa. Mädin kylvetyksen jälkeen poikasissa kuparijäämiä | [4, 28, 37, 38] |

| | | | | |
|--|---|--|---|-----------------|
| | | kuoriutumisprosentti n. 42%) | | |
| Jodoforit | | Mäti: 100 mg/l 30 min kylvetys | | [5] |
| Malakiittivihreä | 5 ppm, 0,8 – 1 µg/ml | Kala: 0,25 mg/l 15 min kylvetys 10 °C. | Teratogeeninen, mutageeninen ja syöpää aiheuttava. Ei hyväksytty käytettäväksi elintarviketuotantoeläimille | [4, 28, 39, 40] |
| Bentsoehappo | 250 ppm, 400-600 µg/ml | | Ei hyväksytty käytettäväksi elintarviketuotantoeläimille | [4, 28] |
| Propaanihappo / Propionihappo | 4ml/l 82 % hyyfi kuolleisuus biofilmissä | | Ei hyväksytty käytettäväksi elintarviketuotantoeläimille | [35] |
| Jodietikkahappo | 50 – 100 ppm (riipuen <i>Saprolegnia</i> lajista) | | Toksinen | [4] |
| Maitohappo | 500 – 1000 ppm (riipuen <i>Saprolegnia</i> lajista) | | | [4] |
| Oksaalihappo | 1000-5000 ppm (riipuen <i>Saprolegnia</i> lajista) | | | [4] |
| Viinihappo | > 5000 ppm | | | [4] |
| Natriumkarbonaatti | > 5000 ppm | | Ei hyväksytty käytettäväksi elintarviketuotantoeläimille | [4] |
| Pentakalium-bis(peroksimonosulfaatti)-bis(sulfaatti) ja useita muita (Virkon) | 1000 ppm | | Ei hyväksytty käytettäväksi elintarviketuotantoeläimille | [4] |
| Triklosaani | 4 -6 µg /ml | | Kirjolohti: 71,3 µg/l toksinen poikasille. Ei hyväksytty käytettäväksi elintarviketuotantoeläimille | [28, 41] |
| Acetohydroxamic acid | 600 – 800 µg/ml | | Ei hyväksytty käytettäväksi elintarviketuotantoeläimille | [28] |
| Sulfametaksotoli (antibiootti) | 800 µg/ml | | Resistenttiys | [28] |
| Kloramfenikoli (antibiootti) | 800 µg/ml | | Ei hyväksytty käytettäväksi elintarviketuotantoeläimillä | [28] |
| Glyseroli | >1000µg/ml | | | [28] |
| Albendatsoli (loislääke) | >1000µg/ml | | | [28] |
| Tiabendatsoli (loislääke, fungisidi) | >1000µg/ml | | | [28] |
| Atselaiinihappo | 800 µg/ml | | Ei hyväksytty käytettäväksi elintarviketuotantoeläimille | [28] |

MLC = Minimum Lethal Concentration eli pienin kuolettava konsentraatio (Tässä taulukossa *saprolegnia* hyyfile, jos ei muuta mainittu)

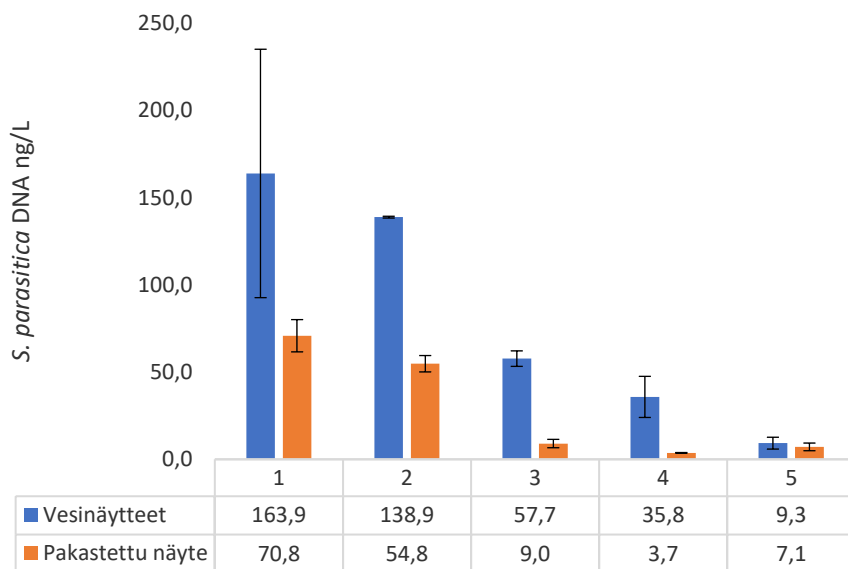
LC₅₀= Lethal Concentration 50 % eli pitoisuus joka aiheuttaa 50 % kuolleisuuden

Liite 7. Käytetyn eDNA menetelmän luotettavuuden varmistaminen ja kehittäminen

Tässä tutkimuksessa käytetty kvantitatiivinen qPCR-menetelmä, joka mittaa vedestä *S. parasitica* DNA:n määriä, on noninvasiivinen, eli kaloja vahingoittamaton, menetelmä *S. parasitica* -vesihome -määrien monitorointiin vesiviljelylaitoksilla. Menetelmän spesifisyys *S. parasitica* DNA:n toteamiseen vesinäytteistä tässä tutkimuksessa varmistettiin sekvensoimalla PCR-tuotteet kahdelta eri laitokselta otetusta kymmenestä poistovesinäytteestä. Kaikkien näytteiden sekvenssi oli identtinen *S. parasitica* -vesihomeen genomien ITS-alueeseen verrattuna, mikä varmistaa osaltaan, että PCR:n kvantitoima DNA vesinäytteissä oli *S. parasitica* DNA:ta.

Vedessä olevan DNA:n määrän analysoimiseksi mahdollisimman luotettavasti, tulisi vesinäyte saada laboratorioon suodatettavaksi vuorokauden kuluessa näytteenotosta. Tutkimuksen aikana huomattiin, että varsinkin pidemmillä matkoilla vesinäytteen logistiikka on erittäin työllistävää, kallista ja joskus jopa mahdotonta vuorokauden kuluessa. Tämän vuoksi testattiin alustavasti vesinäytteen pakastamista, jolloin kuljetuksella ei olisi niin kiire ja logistiikassa voitaisiin tehdä joustoja.

Kun kalanviljelylaitoksilta tutkittuja *S. parasitica*-positiivisia poistovesinäytteitä suodatettiin 24h kuluessa tai rinnakkainen vesinäyte pakastettiin ja säilytettiin useita päiviä -20 C° ja sulatettiin ennen suodatusta, huomattiin, että PCR:llä havaittu DNA-määrä väheni selvästi näytteestä pakastuksen vaikutuksesta, eikä ollut näin suoraan verrattavissa pakastamattomaan vesinäytteeseen, varsinkaan silloin kun näytteessä oli pieni määrä DNA:ta (Kuva 12.).



Kuva 12. *S. parasitica* DNA:n määrä kalanviljelylaitosten poistovesinäytteissä (vesinäytteet) ja samaan aikaan otetuissa pakastetuissa ja sulatetuissa poistovesinäytteissä (pakastettu näyte).

Toinen vaihtoehto logistiikan helpottamiseksi olisi suodattaa vesinäytteet kalanviljelylaitoksella. Tässä tutkimuksessa kokeiltiin eDNA-näytteenottoa laitoksella 5,

tulovesinäytteenottojen yhteydessä. eDNA-näytteenotossa käytettiin kannettavaa eDNA näytteenotinta (Smith-Root) ja 2 litraa vettä suodatettiin kertakäyttöisen, itsestään säilyvän 5 µm filtterin (Smith-Root) [20] läpi ja PCR-analyysi suoritettiin suodatimesta eristetystä DNA näytteestä, kuten laboratoriossa suodatettujen suodattimien PCR-analyysi. Tulosten perusteella havaittiin, että eDNA-näytteiden inhibition vuoksi tässä tutkimuksessa käytetty PCR-menetelmä tarvitsee validointia ennen kuin se soveltuu käytettäväksi paikan päällä tehtyyn eDNA-näytteenottoon.

Lähdeluettelo

1. van West P: *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* 2006, 20(3):99-104.
2. van den Berg A, Mclaggan D, Dieguez-Uribeond J, van West P: The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fungal Biology Reviews* 2013, 27(2):33-42.
3. Janhunen M, Koski P, Makkonen J: Vesihomeselvitys suomalaisilla kalanviljelylaitoksilla. In. http://www.kalankasvatus.fi/wp-content/uploads/2019/02/Vesihomeselvitys2018_hankkeen-loppuraportti_28.2.2019.pdf; 2019: 20.
4. Tedesco P, Fioravanti M, Galuppi R: In vitro activity of chemicals and commercial products against *Saprolegnia parasitica* and *Saprolegnia delica* strains. *Journal of Fish Diseases* 2019, 42(2):237-248.
5. Ali SE, Evensen Ø, Skaar I: Recent advances in the mitigation of *Saprolegnia* infections in freshwater fish and their eggs. In: *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*. Edited by A. M-V. Badajoz: Formatex Research Cente; 2015: 691-697.
6. Engblom C, Landor L, Wiklund T: *Saprolegnia* infections in Finnish fish farms, identification of disease agents. In. Turku: Åbo Akademi University; 2019: 8.
7. Korkea-aho T, Wiklund T, Engblom C, Vainikka A, Viljamaa-Dirks S: Detection and Quantification of the Oomycete *Saprolegnia parasitica* in Aquaculture Environments. *Microorganisms* 2022, 10(11):2186.
8. Thoen E, Evensen O, Skaar I: Factors influencing *Saprolegnia* spp. spore numbers in Norwegian salmon hatcheries. *Journal of Fish Diseases* 2016, 39(6):657-665.
9. Giesecker CM, Serfling SG, Reimschuessel R: Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 2006, 253(1):120-129.
10. Bly JE, Lawson LA, Dale DJ, Szalai AJ, Durburow RM, Clem LW: Winter saprolegniosis in channel catfish. *Diseases of Aquatic Organisms* 1992, 13(3):155-164.
11. Bruno DW, Stamps DJ: Saprolegniasis of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fry. *Journal of Fish Diseases* 1987, 10(6):513-517.
12. EU: Komission asetus (EU) N:o 37/2010 farmakologisesti vaikuttavista aineista ja niiden eläinperäisissä elintarvikkeissa esiintyvien jäämien enimmäismääriä koskevasta luokituksesta. In.; 2010.
13. EU: Komission täytäntöönpanoasetus (EU) 2020/1763, formaldehydin hyväksymisestä vanhana tehoaineena käytettäväksi biosidivalmisteissa valmisteryhmissä 2 ja 3.
14. Schreier TM, Rach JJ, Howe GE: Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. *Aquaculture* 1996, 140(4):323-331.
15. Tavares-Dias M: Toxicity, physiological, histopathological and antiparasitic effects of the formalin, a chemotherapeutic of fish aquaculture. *Aquaculture Research* 2021, 52(5):1803-1823.
16. Tedesco P, Beraldo P, Massimo M, Fioravanti ML, Volpatti D, Dirks R, Galuppi R: Comparative Therapeutic Effects of Natural Compounds Against *Saprolegnia* spp. (Oomycota) and *Amyloodinium ocellatum* (Dinophyceae). *Frontiers in Veterinary Science* 2020, 7.

17. Rach JJ, Redman S, Bast D, Gaikowski MP: Efficacy of Hydrogen Peroxide versus Formalin Treatments to Control Mortality Associated with Saprolegniasis on Lake Trout Eggs. *North American Journal of Aquaculture* 2005, 67(2):148-154.
18. Arndt RE, Wagner EJ, Routledge MD: Reducing or Withholding Hydrogen Peroxide Treatment during a Critical Stage of Rainbow Trout Development: Effects on Eyed Eggs, Hatch, Deformities, and Fungal Control. *North American Journal of Aquaculture* 2001, 63(2):161-166.
19. DiCocco A, May T, Crouse C, Marancik D, Phuntumart V, Ghosh S, Beligala GU, Redman N, Murray M, Fischer G *et al*: Reducing mortality associated with opportunistic infections in Atlantic salmon *Salmo salar* fry using hydrogen peroxide and peracetic acid. *Aquaculture Research* 2021, 52(7):3101-3109.
20. Thomas AC, Nguyen PL, Howard J, Goldberg CS: A self-preserving, partially biodegradable eDNA filter. *Methods in Ecology and Evolution* 2019, 10(8):1136-1141.
21. Tedesco P, Saraiva M, Sandoval-Sierra JV, Fioravanti ML, Morandi B, Dieguez-Uribeondo J, van West P, Galuppi R: Evaluation of Potential Transfer of the Pathogen *Saprolegnia parasitica* between Farmed Salmonids and Wild Fish. *Pathogens* 2021, 10(8):926.
22. Rezinciuc S, Sandoval-Sierra J-V, Diéguez-Uribeondo J: Molecular identification of a bronopol tolerant strain of *Saprolegnia australis* causing egg and fry mortality in farmed brown trout, *Salmo trutta*. *Fungal Biology* 2014, 118(7):591-600.
23. Novakov N, Mandić V, Karalović B, Vidović B, Stojanac N, Kovacević Z, Plavska N: Comparison of the Efficacy of Hydrogen Peroxide and Salt for Control of Fungal Infections on Brown Trout (*Salmo trutta*) Eggs. *Acta Scientiae Veterinariae* 2018, 46.
24. Edgell P, Lawseth D, McLean WE, Britton EW: The Use of Salt Solutions to Control Fungus (*Saprolegnia*) Infestations on Salmon Eggs. *The Progressive Fish-Culturist* 1993, 55(1):48-52.
25. Sformo TL, de la Bastide PY, LeBlanc J, Givens GH, Adams B, Seigle JC, Kunaknana SC, Moulton LL, Hintz WE: Temperature response and salt tolerance of the opportunistic pathogen *Saprolegnia parasitica*: Implications for the broad whitefish subsistence fishery. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 2021, 53(1):271-285.
26. Gaikowski MP, Rach JJ, Ramsay RT: Acute toxicity of hydrogen peroxide treatments to selected lifestages of cold-, cool-, and warmwater fish. *Aquaculture* 1999, 178(3):191-207.
27. Ali S, Thoen E, Evensen O, Skaar I: Boric Acid Inhibits Germination and Colonization of *Saprolegnia* Spores In Vitro and In Vivo. *Plos One* 2014, 9(4).
28. Kumar S, Mandal RS, Bulone V, Srivastava V: Identification of Growth Inhibitors of the Fish Pathogen *Saprolegnia parasitica* Using in silico Subtractive Proteomics, Computational Modeling, and Biochemical Validation. *Frontiers in Microbiology* 2020, 11(2533).
29. Ali SE, Gamil AAA, Skaar I, Evensen Ø, Charo-Karisa H: Efficacy and safety of boric acid as a preventive treatment against *Saprolegnia* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Scientific Reports* 2019, 9(1):18013.
30. Marchand P-A, Phan T-M, Straus DL, Farmer BD, Stüber A, Meinelt T: Reduction of in vitro growth in *Flavobacterium columnare* and *Saprolegnia parasitica* by products containing peracetic acid. *Aquaculture Research* 2012, 43(12):1861-1866.
31. Good C, Davidson J, Straus DL, Harper S, Marancik D, Welch T, Peterson B, Pedersen LF, Lepine C, Redman N: Assessing peracetic acid for controlling post-vaccination *Saprolegnia* spp.-associated mortality in juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* in freshwater recirculation aquaculture systems. *Aquaculture Research* 2020, 51(6):2624-2627.
32. Pottinger TG, Day JG: A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. *Diseases of Aquatic Organisms* 1999, 36(2): 129-141.
33. Branson E: Efficacy of bronopol against infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with the fungus *Saprolegnia* species. *Veterinary Record* 2002, 151(18):539-541.
34. Oono H, Hatai K, Fau - Miura M, Miura M, Fau - Tuchida N, Tuchida N, Fau - Kiryu T, Kiryu T: The use of bronopol to control fungal infection in rainbow trout eggs. *Biocontrol Science*, 12(2):55-57.

35. Ali SE, Songe MM, Skaar I: Colorimetric assay for the in vitro evaluation of Saprolegnia biofilm inhibitors. *Journal of Fish Diseases* 2019, 42(8):1119-1124.
36. Barnes M, Soupier C: Evaluation of Formalin and Hydrogen Peroxide Treatment Regimes on Rainbow Trout Eyed Eggs. *North American Journal of Aquaculture* 2007, 69:5-10.
37. Sun Q, Hu K, Yang X-L: The Efficacy of Copper Sulfate in Controlling Infection of *Saprolegnia parasitica*. *Journal of the World Aquaculture Society* 2014, 45(2):220-225.
38. Skyttä S, Kääriä R: Vesihomeen ehkäisy mädinhaudonnassa kuparikuidulla ja kuparisulfaatilla. In.: Turun Ammattikorkeakoulu; 2012: 32.
39. Srivastava S, Sinha R, Fau - Roy D, Roy D: Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicology* 2004, 66(3):319-329.
40. Willoughby LG, Roberts RJ: Towards strategic use of fungicides against *Saprolegnia parasitica* in salmonid fish hatcheries. *Journal of Fish Diseases* 1992, 15(1):1-13.
41. Orvos DR, Versteeg DJ, Inauen J, Capdevielle M, Rothenstein A, Cunningham V: Aquatic toxicity of triclosan. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2002, 21(7):1338-1349.
42. Tavares-Dias, M. Toxicity, physiological, histopathological, handling, growth and antiparasitic effects of the sodium chloride (salt) in the freshwater fish aquaculture. *Aquaculture Research* 2022, 53:715– 734.