



Euroopa Liit
Euroopa Merendus- ja Kalandusfond

Eesti Maaülikool

Lääne- ja Pärnumaa rannikult püütud meriforellide (*Salmo trutta morpha trutta*) parasitoloogiline uuring

Töövõtulepingu nr. 10-1/MI/5513
lõpparuanne

Tartu, 2020

Sisukord

1 Sissejuhatus	3
2 Meriforell.....	5
2.1 Meriforelli bioloogia	5
3 Kalapüük Lääne- ja Pärnumaa rannikumeres.....	8
4 Meriforelli haigused ja parasiidid.....	9
4.1 Proliferatiivne neeruhaigus.....	9
4.2 <i>Eubothrium crassum</i>	12
4.3 Parasitaarsed koinfektsioonid.....	14
5 Materjal ja metoodika.....	15
5.1 Proovide kogumine.....	15
5.1.1 Proovide kogumine rannakalurite ning harrastuskalastajate poolt	15
5.2 Kalade parasitoloogiline uurimine.....	17
5.2.1 Proliferatiivne neeruhaigus.....	17
5.2.2 Sooleparasiidid	19
5.3 Katseline kalade vanuse määramine otoliitide värvimismeetodiga	20
5.4 Statistiline andmetöötlus	22
6 Tulemused	22
6.1 Uuritud kalade iseloomustus	22
6.2 Parasiitusside arvukuse analüüs	24
6.3 Proliferatiivse neeruhaiguse esinemise analüüs	26
6.4 Püügipiirkondade vaheline võrdlus	29
Kasutatud kirjandus	31

1 Sissejuhatus

Meriforell ehk iherus (*Salmo trutta morpha trutta*) on ihaldatud püügiobjekt nii harrastuskalastajatele kui ka kutselistele kaluritele. Meriforell on anadroomse rändega siirdekala, kes elab täiskasvanuna meres ja siirdub jõkke kudemiseks. Kõige rohkem on forelli jaoks sobivaid kudejõgesid ning ojasid Põhja-Eesti rannikul. See loob eeldused, et antud piirkonna meriforelli arvukus on kõrge. Suur osa meriforelli püügist Eesti rannikumeres toimub selles piirkonnas. Samuti asuvad mitmed meriforelli kudejõed ning ojad Läänemaal ja Pärnumaal. Kuigi meriforelli püük ei oma antud piirkondades rannakalandusele nii suurt tähtsust, võib forelli arvukuse tõusu ning levila laienemisega olukord muutuda (näiteks Kasari ning Pärnu jõgikonnad).

Täiskasvanud meriforellidel on kirjeldatud paelussi *Eubothrium crassum* esinemist eelmise kümnendi keskel (Merilo 2005) ning viimastel aastatel 2016 -2018 P. Päkk ja M. Lauringson. Samuti on viimasel ajal uurinud proliferatiivse neeruhaiguse (PKD) esinemist forelli noorjärkudel A. Vasemägi ja kudekaladel M. Lauringson. Selleks, et mõista kas ja kuidas need parasiidid täiskasvanud meriforellide ja nende järglaste tervist mõjutavad on tarvis teha erinevaid uuringuid.

Käesoleva töö eesmärgiks on jätkata eelmiste aastate uuringuid sooleparasiitide ning proliferatiivse neeruhaiguse esinemisest Eesti rannikumerest püütud lõhilastel, fookusega Lääne- ja Pärnumaa rannikumererele.

Töös kasutatud materjal koguti kutseliste kalurite ja harrastuskalameeste abiga 2017. aasta augustist 2019. aasta novembrini Lääne-Eesti ja Pärnumaa rannikumerest püütud kaladelt. Pärast püüki fikseeriti kalade mõõdud ning nad lahati. Kogutud materjal töötati läbi Tartus, Eesti Maaülikooli VLI vesiviljeluse õppetooli ja PKI laboratooriumis. Uurimustöös käigus saadud andmed analüüsiti statistiliselt.

Kalaproovide kogumist, kalade patobioloogilist uurimist, andmebaasi koostamist ja kalaproovide transportimist Tartusse korraldasid Eesti Maaülikooli töötajad Magnus Lauringson ning Priit Päkk.

Töö kavandas ja aruande koostas Priit Päkk. Kalade laboratoorsed uuringud ja statistilise analüüsi tegi Magnus Lauringson. Kalade vanuse määramise metoodikat kasutas Taigor Veevo juhendas Maidu Silm. Geneetiliste analüüside tegemisel aitasid kaasa Kerli Haugjärv ja Riho Gross. PKD leviku kohta koondas andmed Anti Vasemägi.

Eesti rannikumere eri püügipiirkondade vahelise lõpliku võrdleva ülevaate saab anda siis kui on saadud tänasest suurem valim ja on kirjeldatud ka Saare- ja Hiiumaa rannikult püütud kalade seisundit ja parasitoloogilist olukorda.

Töös osalenud tänavad kõiki proovide kogumisel abiks olnud rannakalureid. Avatud koostöö eest täname Harald Kalmetit ja Raio Piiraja, seda panuse eest uuritava materjali kogumisse.

Töö kavandaja tänab TÜ Eesti Mereinstituudi direktorit Markus Vetemaad ja Kalanduse teabekeskuse juhti Toomas Armulikku usalduse ning mõistva suhtumise eest.

2 Meriforell

Meriforell ehk iherus (*Salmo trutta morpha trutta*) on lõheliste seltsi, lõhelaste sugukonda kuuluv röövkala. Tegu on forelli (*Salmo trutta*) anadroomse vormiga, kes elab täiskasvanuna meres ning käib jões kudemas. Meriforell koorub jões, kust rändab merre ning toitub seal suguküpsuse saavutamiseni (Kangur 2009). Forellide rühma põhivormiks peetakse kirjanduse andmetel meriforelli. Meriforelli alamvormid – jõeforell (*Salmo trutta morpha fario*) ja järveforell (*Salmo trutta morpha lacustris*) on välja kujunenud hiljuti, viimasel jääajal. Oletatakse, et ka enne viimast jääaega sigis meriforell magevees (Rannak jt 1983).

2.1 Meriforelli bioloogia

Eesti rannakalanduses on meriforell (*Salmo trutta*) oluline püügiobjekt, seda nii kutselistele kaluritele kui ka harrastuspüüdjatele. Meriforelli ei leidu meie rannikuvetes massiliselt, kuid kaluritele teeb antud liigi väärtuslikuks tema kõrgem müügihind võrreldes näiteks räime või ahvenaga. Suurimad saagid saadakse Eestis Soome lahest, teistest piirkondadest on püügikogused tagasihoidlikumad. Soome lahe suuremaid saake saab seletada sellega, et sinna suubuvad ka Eesti parimad forelli kudejõed, mis tagavad kõrgema loodusliku taastootmise. Oluliselt avaldab mõju ka (meri)forelli asustamine Soome lahte ning sinna suubuvatesse jõgedesse. Forelli asustamisega tegelevad või on lähiminevikus tegelenud nii Soome, Eesti kui ka Venemaa. Eestis asustati viimati meriforelli 2017. aastal. Asustamise mahud on Soome poolel palju suuremad kui Eestis ja Venemaal. Asustamisega tegelevad aktiivselt ka meie lõunanaabrid Läti ja Leedu (EMI 2019).

Anadroomse siirdekalana koeb meriforell sügisel merre suubuvates vooluveekogudes, kus on tingimused sigimiseks ning marja ja noorkala arenemiseks. Eestis leidub kõige rohkem selliseid jõgesid Soome lahe vesikonnas, kus asub teadaolevalt 45 kudejõge (populatsiooni), millest 38 on metsikud populatsioonid (ICES 2013). Meriforell koeb edukalt ka Liivi lahte suubuvates vooluveekogudes, aga samuti Saaremaa ning Hiiumaa loode- ja põhjarannikul (Kangur 2009). Meriforelli eduka sigimise esimeseks tingimuseks on kudealade kättesaadavus. Mitmetel jõgedel on inimtekkelised rändetõkked ja looduslikud tõkked koprapaisude näol. Noorjärede tihedused väikestes ojades on sõltuvuses aastaajast. Forelli taastootmispotentsiaal Pärnumaal on vähese madalvee aegse vooluhulga tõttu mõneski jões suhteliselt madal (Järvekülg jt 2015).

Teine eduka sigimise tingimus on seotud vee voolukiiruse ja kudekoha sügavusega. Meriforell valib võimalusel sigimise paigana alati koha, kus voolukiirus 60% sügavusel veesambas on vähemalt 15 cm/s, kuid ei ületa emaskala kahte kehapiikkust sekundis. See on tähtis, kuna

viljastatud ning põhjasubstraadiga kaetud mari vajab pidevalt voolavat hapnikurikast vett. Tavaliselt paiknevad kudepesad asukohas, kus aeglase vooluga jõelõik (võrendik) läheb üle kärestikuks, sest seal hakkab voolukiirus äkiliselt tõusma. Kuigi meriforellid on võimelised kudema ka madalas vees, kus nende seljad on veest väljas, eelistavad nad siiski sügavamat vett (Kangur 2009).

Kolmandaks vajab meriforell kudemiseks kindla läbimõõduga peamiselt kruusast koosnevat substraati. Ideaalseks peetakse 2-3 cm läbimõõduga kruusa, peenefraktsioonilist setet ei tohi selles olla üle 15% (Kangur 2009).

Kuderänne algab sobiva veeseisu korral paljudesse suurematesse jõgedesse juba suveperioodil, väiksematesse jõgedesse ja ojadesse siirdub meriforell suve lõpus või sügisel, kuna seal on ka veetemperatuuri kõikumised suuremad (Rannak jt 1983). Meriforelli jõkke siirdumist soodustavad tugevad meretuuled ning veetaset tõstvad sademed. Peale tuulte vaibumist ning jõgedest voolava magevee osakaalu tõusmist rannikuvees siirduvad kalad jõkke, seega orienteerumiseks saadakse signaale merevee soolsusemuutusest. Juhul kui veetase langeb alla kriitilise piiri, kuderänne katkeb (Rannak jt 1983).

Sigimine algab oktoobris-novembris, kui veetemperatuur jões on langenud 5-6 kraadini. Massiline kudemine toimub 3-4 kraadise veetemperatuuri juures. Emaskala valib kudemiseks kruusase kiirevoolulise paiga, kuhu kaevab pesalohu (Rannak jt 1983). Peale esimese pesalohu kaevamist teeb emaskala sellest ülesvoolu veel ühe lohu, millest väljakaevatud materjaliga kaetakse viljastatud mari. Nii moodustub pesakühm. Pesalohk on ovaalse kujuga, umbes 3,5 korda emaskalast pikem ning laiusega 0,3-0,6 kehapikkust. Marja substraati matmise sügavus varieerub sõltuvalt kala suurusest 0,3 kehapikkust 70 cm kalade puhul (Kangur 2009).

Meriforellid saavutavad suguküpsuse üldjuhul peale kolme meres veedetud eluaastat. Paljudes jõgedes saavutavad 30-40% isastest noorkaladest suguküpsuse juba kahe-või kolmesuviselt enne merre siirdumist. Lisaks sellele on dokumenteeritud, et mõned neist kaladest merre ei laskugi, vaid jäävad jõkke elama. Sama seaduspära kehtib ilmselt ka emaste forellide kohta (Kangur jt 2003).

Noorkalade ehk tähnikute kasvualaks on kärestike ümbrused, kus asuvad ka koelmud (Rannak jt 1983). Elupaigana eelistavad noored forellid üle 20 cm sügavust vett ning voolukiirust kuni 25 cm/s (Kangur 2009). Asustustihedus võib jõeti olla väga erinev, jäädes ühe kuni rohkem kui 100 isendini 100 m² kohta (Rannak jt 1983).

Meriforelli tähnikute toidubaas moodustub suures osas amfibiootiliste putukate vastsetest, nagu näiteks surusääsklaste, ehimestiivaliste ning ühepäevikuliste vastsed. Samuti on tähtsal kohal kirpvähilised, väikesed limused ning aerjalgsed (Rannak jt 1983).

Kalade kasvukiirust mõjutab veetemperatuur. Optimaalseim veetemperatuur on 13-14° C, alla 4° C vees on kasv väga aeglane. Kalad lakkavad toitumast, kui veetemperatuur on üle 19° C, letaalseks piiriks on 21° C veetemperatuur. Hapnikusisalduse alampiir on 5,0-5,5 mg/l, parimaks loetakse vähemalt 80% küllastust (Kangur 2009).

Meriforelli tähnikud laskuvad merre pärast 1-4 aastast jões kasvamist, kõige arvukam merre laskumine toimub kaheaastaselt. Noorkalad on jões viibides tumedad, laskumisel muutub nende värvus hõbedaseks, nagu on iseloomulik täiskasvanud kaladele. Merre siirdumise eel toimub tähnikute muutumine laskujateks – lisaks värvitooni muutusele läheb keha saledamaks, sabauim ning selle sälk suuremaks, mis on ettevalmistav faas mereeluks. Laskumine leiab aset tavaliselt aprilli lõpust juuni teise pooleni ning toimub üldiselt öisel ajal, kõrgperioodil ka päeval (Rannak jt 1983).

Suurema osa elust veedavad täiskasvanud meriforellid meres. Kuigi enamik Soome lahe meriforellidest sooritab lühikesi, kuni 80 km pikkuseid toitumisrändeid, võivad mõned isendid sattuda isegi kuni 500 km kaugusele kodujõest. On tõendatud, et Läänemeres esineb kahe toitumisrände tüübiga meriforelle: 1) pika toitumisrändega ning 2) paikne vorm. Paikne vorm asustab kirjanduse andmetel Läänemere põhja- ja lõunaosa, pikema toitumisrändega populatsioonid pärinevad peamiselt Rootsi ranniku jõgedest (Rannak jt 1983). Laskunud tähnik hakkab meres aktiivselt toituma ning kasvab tempokalt. Meriforelli kõige tavalisemaks toiduobjektiks Läänemeres on räim ja kilu (Rannak jt 1983).

Täiskasvanud meriforell on korduvkudeja (Rannak jt 1983). Kuigi kirjanduse andmetel koeb enamik meriforellidest oma lühikesest toitumis- ja sigimiserändest tulenevalt igal aastal (Rannak jt 1983), siis harrastuskalastajate andmetele tabatakse suurel hulgal täiskasvanud meriforelle, kes ei ole kuderändele läinud. Samuti on paljud talvel püütud kalad heas toitumuses ning ilma tunnusteta, mis viitaksid äsjasele kudemisele nagu kuderändelt tulija iseloomulik tume värvus, halb toitumus, kinnine soomus jne. Suguküpseks saab meriforell peale merre laskumist paari aastaga. Üldiselt siirduvad kolmandal eluaastal merre laskunud kalad kudema peale kaheaastast meres viibimist, aasta varem laskunud kalad peale kolmeaastast mereelu (Rannak jt 1983). Täiskasvanud meriforellid koevad üldiselt oma sünnijões, selle ülesleidmiseks on kaladel kasutada haistmismeel ning lõhnamälu. Kodujõgi leitakse üles kudepaigast merre kandunud

lõhnade komplekti abil, kus kaltsiumi- ning teiste ionide kõrval on tähtsaks indikaatoriks ka kohalikku biotoopi iseloomustavad bioloogilised lõhnad (Rannak jt 1983).

3 Kalapüük Lääne- ja Pärnumaa rannikumeres

Meriforelli saagid koosnevad nii looduslikest kui ka asutatud kaladest. Nii looduslikud kui asustatud kalad pärinevad omakorda mitmetest erinevatest allikatest, vastavalt kas siis erinevatest jõgedest-ojadest või kasvandustest. Nagu eelpool mainitud, paiknevad parimad meriforelli kudejõed Põhja-Eestis ning kõige vähem suubub sellised Väinamerre, kus ka kalurite saagid on reeglina kõige väiksemad (Eesti kalamajandus 2018, 2019).

Iherusel on teatud tähtsus nii harrastus- kui ka töönduspüügis. (Kalakasvatuse taastootmise... 2017) Näiteks 2016. aastal püüti 27,2 tonni meriforelli, 1999. aastal 9,7 tonni (Lõhe ja meriforelli... 2017). Viimase viieteistkümne aastaga on saagikus tõusnud rohkem kui poole võrra. Lisaks on meriforell ka piiriülese tähtsusega liik, näiteks 14-15% Eesti põhjarannikult pärit meriforellist püütakse välja Soome lahe põhjarannikult. (Koljonen jt. 2014)

Läänemaa meriforelli varudele on positiivselt mõjunud Öngu kalakasvatuse taastoodetud kalade asustamine. Alates 1993. aastast on meriforelli noorjärke asustatud nii Hiiumaa rannikumerre, Öngu jõkke, Vanajõe jõkke ning 2002. aastast ka Läänemaa jõgedesse. Ebastabiilsete olude tõttu Hiiumaa jõgedes ning konkurentsi vältimiseks loodusliku populatsiooniga on kala asustatud ka rannikumerre. Öngu kasvandus on kasutanud meriforelli paljundamiseks peamiselt Öngu ojast püütud sugukalu, suur osa neist on vastavalt märgistusele sama kasvanduse päritoluga (Kalade taastootmise... 2012). Kuigi Öngu kalakasvatus lõpetas tegevuse 2014. aastal ning prognooside põhjal peaks Hiiu- ning Saaremaa saagid olema langustrendis, on viimastel aastatel antud regioonist saadud rekordilisi forellisaake (Lõhe ja meriforelli... 2017).

Kalade saak Pärnu rannikumeres kõigub liigiti. Tartu Ülikooli Eesti mereinstituudi ihtüoloogi Heli Shpilevi andmetel püüdsid kutselised kalurid Pärnu rannikumerest 2019 aasta jaanuarist 1. novembrini kalu enam-vähem sama palju kui eelmisel aastal, aga liigiti erinevad kalakogused kahe aasta võrdluses kohati silmatorkavalt, nagu nähtub veterinaar- ja toiduameti kutselise kalapüügi registrist. Omaette pakub huvi lõhe olukord, kuivõrd lõhe saagikus oli langenud Läänemeres kriitilise piirini, mistõttu on juba aastaid inkubeeritud ja üles kasvatatud lõhe noorkalu ning neid asustatud Läänemere suubuvaisse lõhedele kudemiseks sobivasse jõgedesse, kust need merre laskuvad, et hiljem suguküpsetena jõgedesse tagasi kudema ujuda.

Pärnu jõkke on eri aastatel asustatud kokku sadu tuhandeid Põlula kalakasvanduses koorunud väikesi lõhekalu ja näib, et selle vääriskala kari hakkab näitama Pärnumaa rannikuveteski kosumismärke. Lõhet sattus kalurite püünistesse kahel järjestikusel aastal Pärnu rannavetes enamvähem ühepalju, umbes pool tonni. “Lõhe läheb ilusti Pärnu jõge mööda ülesvoolu kudema,” tähendas. H. Shpilev Pärnu Postimehele (T. Kann, 2019). “Meie katsepüükides on olnud ligikaudu 20 kiloseid isendeid, kusjuures 90 protsenti või rohkemgi meie kätest läbi käinud lõhedest on olnud märgistatud, mis tähendab, et nad on pärit kalakasvanduse asustusmaterjali hulgast“ ütles H. Shpilev. Shpilevi andmetel käivad katseliselt püütud lõhed kalauurijate käte vahelt läbi sõna otseses mõttes, sest mitte ühtegi neist ei ole surmatud, vaid kõik isendid on jõkke tagasi lastud. Kaluritelt saadud info põhjal satub meriforell nende püünistesse harva (Pärnu Postimees 2019).

Läänemere rannapüügis oli meriforelli saak 2018 aastal 16,29 tonni mille osakaal kogusaagist oli 0,2%. Saagi väärtus sellel ajal oli ca 116,85 tuhat eurot. Keskmise esmakokkuostu hind sel perioodil oli 7,17 EUR / kg. Meriforelli saak 2018 aastal oli Liivi lahest (va Pärnu laht) 1239 kg ning Pärnu lahest 340 kg (Eesti kalamajandus 2018).

Pärnumaa kalurite ja harrastuspüüdjate huvi müüa kala teadusuuringuks oli mõlemal aastal üsna leige, mistõttu on antud uuringus andmed vaid 2019 aastal saadud kaladelt. Samuti takistas forellide püüki väga heitlik sügisene ilmastik ja muutunud olud Pärnu sadama akvatooriumis (otsekontaktid).

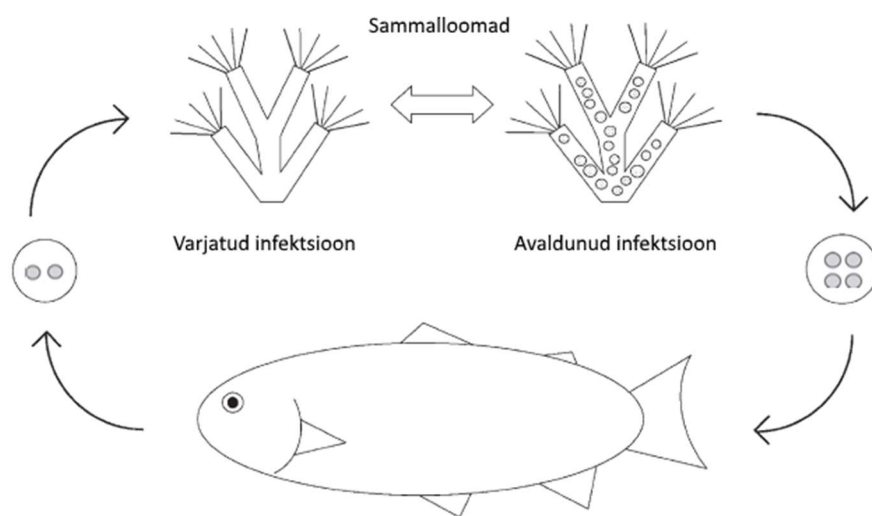
4 Meriforelli haigused ja parasiidid

4.1 Proliferatiivne neeruhaigus

Proliferatiivne neeruhaigus (PKD – *proliferative kidney disease*) on parasitoloogiline haigus, mis ohustab lõhilasi nii Euroopas kui ka Põhja-Ameerikas (Feist jt. 2002). Proliferatiivse neeruhaiguse haigustekitajaks on limaeosloom *Tetracapsuloides bryosalmonae*, mille vaheperemeheks on magevee sammalloomad (Okamura jt. 2011) perekondadest *Plumatella* ja *Fredericella* (Okamura & Wood 2002). Sammalloomad eritavad veekeskkonna haigustekitajaga spoore, millega noorkalad tabanduvad läbi lõpuste (Morris jt. 2000, Grabner & El-Matbouli 2010) või läbi epiteelkoe (Longshaw jt. 2002). PKD on suureks ohuks forelli noorjärkudele (Dash & Vasemägi 2014), haigustekitajad jõuavad väliskeskkonnast kala

neerudesse, kus need hakkavad paljunema (proliferatsioon) (Feist jt. 2001). Märkideks kala haigestumisest on tumenenud keha värvus, kõhu suurenemine, paisunud neerud ning intensiivne aneemia (Hedrick jt. 1993). PKD esinemisele ning arvukusele mõjub positiivselt veetemperatuuride tõusmine (Dash & Vasemägi 2014), samuti on leitud, et eutrofeerumine võib haiguspuhangute puhkemisele kaasa aidata (Hartikainen jt. 2009). PKD haiguspuhangud tekivad tavaliselt suvisel ajal või varasügisel, siis kui veetemperatuur on üle 15 kraadi (Ferguson & Ball 1979). Kuigi PKD patobioloogiat on põhjalikult uuritud, ei ole palju kirjeldatud PKD levikumustreid ning esinemist lõpp-peremehes erinevates elutsükli etappides (Dash & Vasemägi 2014). Proliferatiivset neeruhaigust on esimest korda kirjeldatud 20. Sajandi alguses ning selle põhjustajana identifitseeriti limaeoslased 25 aastat tagasi (Kent & Hedrick, 1985). 1999 aastal avastati, et üheks peremeheks on magevee sammalloomad (Anderson jt. 1999). Ühtlasi määrati haigustekitaja ning identifitseeriti uus limaeosloomade klass (*Malacosporea*) (Canning jt. 2000), mis parasiteerivad magevee sammalloomades. Limaeosloomad on selgroogsete ja selgrootute endoparasiidid. Mõned neist on äärmiselt patogeensed kaladele, põhjustades muutusi kostruktuuris ning mitmeid haigusi, nagu näiteks pöörlemistõbi ja keratomükoos (Feist & Longshaw, 2006). Sammalloomade identifitseerimine haigustekitaja ühe peremehena on aidanud paremini mõista *T. bryosalmonae* elutsükli. Magevee sammalloomad on bencilised, koloniaalsed filtreerijad, kes paljunevad pungumise teel. *T. bryosalmonae* seondub esmalt ainuraksena sammallooma kehaõõnsusesse, see on infektsiooni varjatud faas. Edasise avaldunud infektsiooni käigus arenevad hulkraksed, kuni 350 µm läbimõõduga eoskotid, mis prolifereeruvad sammallooma kehaõõnsuses (Morris & Adams, 2007). Eoskottides tekivad läbi meioosi kuni 20 µm läbimõõduga spoorid (Canning jt. 2000), mis koosnevad kahest amöboidsest rakust ning neljast polaarsest kapslist. Üks 350 µm eoskott kannab endas 2800 kuni 4000 spoori (Martin jt. 1997).

Sammalloomade poolt vette väljutatud spoorid kinnituvad kalade lõpuste või naha külge ning tungivad amööbsete rakkudena koe vaskulaarsüsteemi (Longshaw jt. 2002), mille kaudu jõuavad neerudesse, kuid võivad prolifereeruda ka teistes organites. Sporogoonia tulemusel paljunevad veres haigustekitaja rakud enne neerukoes prolifereerumist, sporogoonia jätkub ka neerudes, kutsudes esile põletikulise reaktsiooni ning neerukoe kahjustuse (Feist & Longshaw, 2006). Neerukoes arenevad spoorid pseudoplasmas edasi, koosnedes ühest amööbsest rakust ning kahest polaarkapslist (Morris & Adams, 2008), jõuavad spoorid läbi uriini jälle väliskeskkonda (De Kinkelin jt. 2004), olles võimelised sammalloomi tabandama (Grabner & El-Matbouli, 2008). *T. bryosalmonae* elutsükli kirjeldab joonis 3.



Joonis 1:

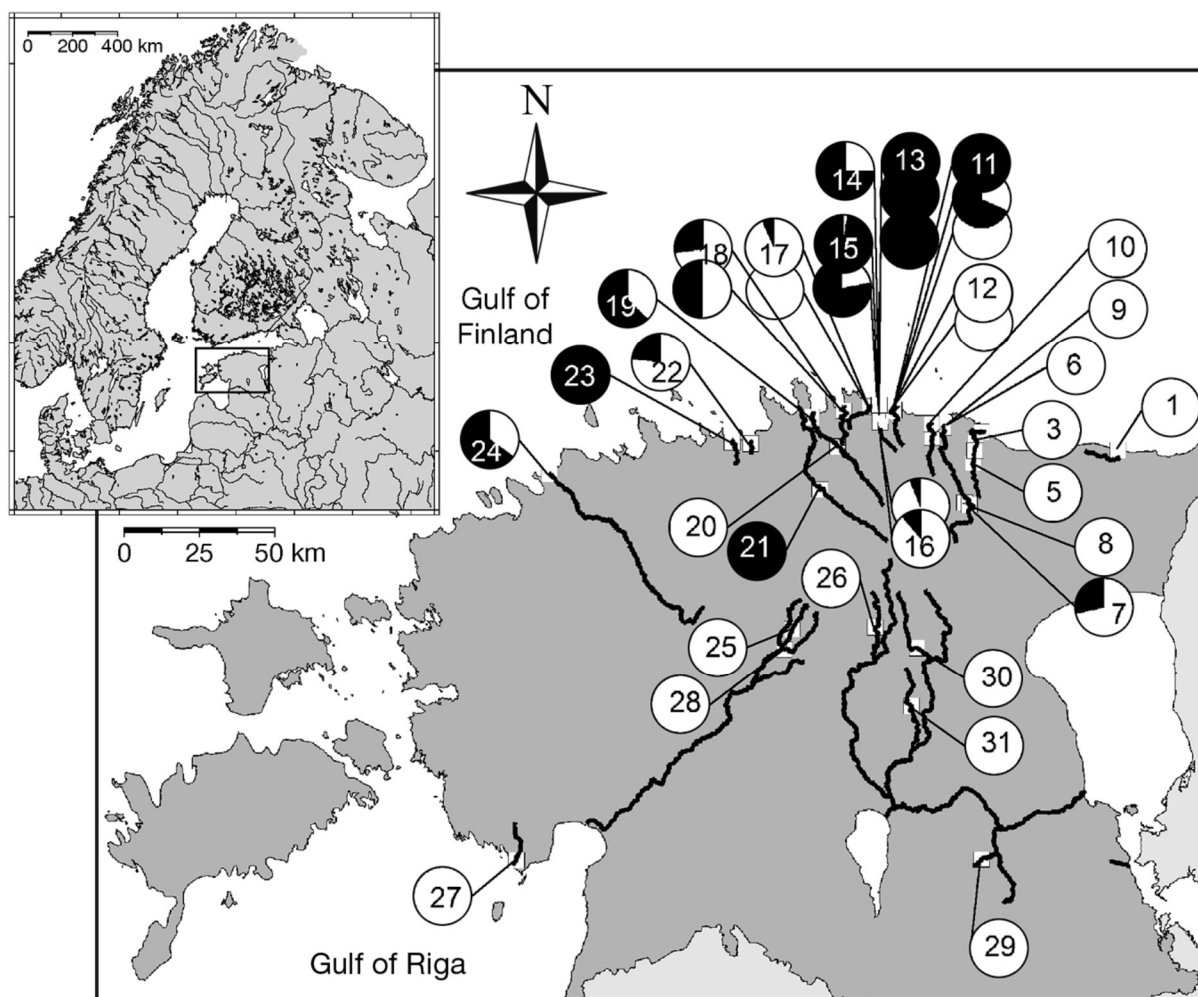
T. bryosalmonae
elutsükkel. Kala
 poolt väljutatud kahe
 polaarkapsliga
 spooriga tabandub
 sammalloom.
 Varjatud infektsiooni
 käigus jõuab
 haigustekitaja spoor

sammallooma kehaõõnsusse, kus avaldunud infektsiooni käigus prolifereerub. Eoskottides tekivad nelja polaarkapsli ning kahe amöboidse rakuga spoorid, mis väljutatakse vette ning läbi lõpuste ja epiteelkoe kala vereringesse jõuavad. Neerukoes tekivad sporogoonia käigus uued, kahe polaarkapsli ning ühe amöboidse rakuga spoorid, mis uriiniga vette väljutatakse (Okamura jt. 2011).

Tänu parasiidi arengule tekkiva proliferatiivse ja põletikulise immuunvastuse tõttu, tekib peremeesorganismis neerude ning põrna hüperplaasia (Hedrick jt. 1993), ehk limaskestast paksenemine. Kuna peremeesorganismi immuunvastus on alla surutud madalal temperatuuril (Le Morvan jt. 1998), on PKD arenemine sõltuvuses temperatuurist. PKD puhangu ajal on immuunsüsteemi reguleerivate tsütokiinide produktsioon madal ning ühtlasi toimuvad patoloogilised muutused neerukoes – lümfotsüütide arvu suurenemine, granulamatoossed haiguskolded ning neerude atroofia (Chilmonczyk jt. 2002). Lisaks on pärsitud granulotsüütide aktiivsus, mistõttu tõuseb bakteriaalhaigustesse nakatumise oht (Chilmonczyk jt. 2002), seda eriti veetemperatuuride tõustes, mil suureneb ka teiste patogeenidega tabandumine (Okamura jt. 2011). Siiski näitavad vikerforellidega teostatud laborikatsed, et PKD infektsioon võib olla letaalne ka ilma teiste haigustekitajateta, seega võib *T. bryosalmonae* ka iseseisvalt kala surma põhjustada (Bettge jt. 2009).

PKD esinemist Eesti forellipopulatsioonides on viimastel aastatel uurinud prof. Anti Vasemägi uurimisrühm. 2009-2012 aastatel teostatud katsepüükide käigus uuriti 20 Eesti rannikujõe populatsioone, millest PKD leiti kümnes jões. Uuringu käigus püüti ja analüüsiti 984 forelli, peamiselt 0+ ja 1+ vanuserühmadest. PKD positiivsed olid 524 kala (53,25%) ning kümme

jõge (Joonis 4). Samuti leiti, et uuritud jõgedes oli *T. bryosalmonae* vaheperemeheks sammalloom *Plumatella fungiosa* (Dash & Vasemägi 2014).



Joonis 2: *T. bryosalmonae* geograafiline levik ning tabandumise määr Soome lahe meriforellipopulatsioonides 0+ kalade näitel. Must ja valge osa sektordiagrammis näitavad tabandunud ja tabandumata kalade suhet, osaliselt kattuvad diagrammid viitavad kordusproovidele samas asukohas. 1 – Pühajõgi, 2/3/4/5 – Pada jõgi, 6/7/8 – Kunda jõgi, 9/10 – Toolse jõgi, 11/12 – Vainupea jõgi, 13/14/15/16 – Mustoja jõgi, 17 – Altja jõgi, 18 – Võsu jõgi, 19/20 – Loobu jõgi, 21 – Valgejõgi, 22 – Kuusalu oja, 23 – Valkla oja, 24 – Keila jõgi, 25 – Vodja jõgi, 26 – Preedi jõgi, 27 – Männiku oja, 28 – Esna jõgi, 29 – Tatra jõgi, 30 – Onga jõgi, 31 – Kaave jõgi.

4.2 *Eubothrium crassum*

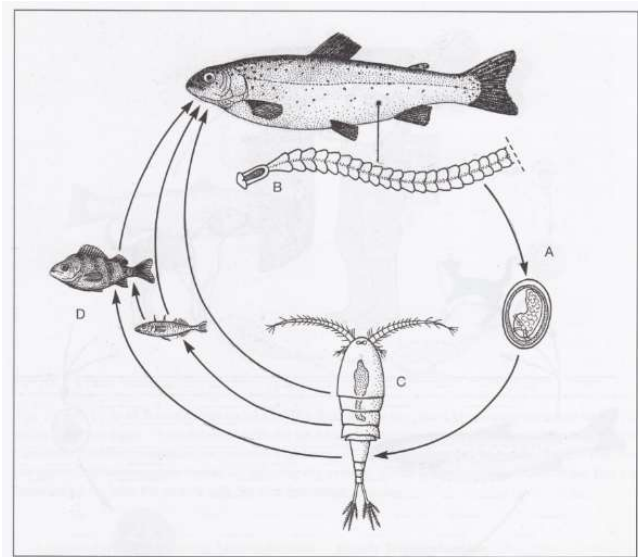
Eubothrium crassum on paelussiliik, mis parasiteerib lõhelistel perekonnast *Salmo* ning tegemist on ühe levinuma tsestoodiga forellide soolestikes (Kennedy, 1978). Kala tabandub parasiidiga, toitudes aerjalgsetest vaheperemeestest. *E. crassum* elab nii merevee- kui ka

mageveelõheliste soolestikes, paiknedes täpsemalt püloorilistes ripikutes (Mitchell 1993). Lõhelised on *E. crassumi* lõpp-peremeesteks ning parasiit on ohtlik ainult kaladele. Inimest ning teisi püsisoojaseid organisme uss ei ohusta, pigem on kala puhastamisel probleem esteetiliselt laadi (Merilo 2005).

Täiskasvanud paelussid vabastavad kala soolestikku tuhandeid mune, mis väljutatakse koos ekskrementidega väliskeskkonda. Munad sisaldavad juba väljaarenenud embrüot. Vees olles ujuvad need vabalt ringi, kuni süüakse ära aerjalgsete vähkide poolt või satuvad otse peremeesorganismi. Aerjalgsed vähid on *E. crassumi* esimeseks ja võimalik, et ka ainukeseks vaheperemeheks (Mitchell 1993). Vaheperemehe areneb munast vastne ehk plerotserkoid. Lõpp-peremees nakatub otse vaheperemeest (aerjalgset vähki) süües või läbi teise vaheperemehe. Viimasel juhul toitub paelussi vastsetega nakatunud aerjalgsest näiteks räim, kelle abil jõuab *E. crassum* meriforelli. Lõpp-peremehe kinnitub vastne püloorilise ripiku seina külge, kus areneb täiskasvanuks (Mitchell 1993).

Kirjanduse andmetel on kirjeldatud 3 *Eubothrium crassumi* vormi: mageveevorm, mis parasiteerib ainult forellil (*Salmo trutta*) ning kaks soolase vee vormi, mis parasiteerivad lõhel (*Salmo salar*) Põhja-Atlandi regioonis (Bristow & Berland, 1991). Anadroomne meriforell võib *E. crassum* -iga tabanduda nii mage- kui merevees. Samuti on täheldatud, et samaaegselt võib meriforellide soolestikus elada nii paelussi mage- kui ka mereveevorm. Siiski on leitud, et paelussi mageveevorm ei suuda meriforelli soolestikus suguküpseks areneda (Mitchell 1993). Meres tabandub kala parasiitussiga mitmel moel.

Kuna räime vastsete toidus on valdavaks liigiks aerjalgne *Eurytemora affinis* (Arula 2012), võib suure tõenäosusega meriforell parasiidiga nakatuda oma peamist toiduobjekti, so. räime, tarbides. Samuti võivad laskujad nakatuda merevett juues (osmoregulatsioon) (Mitchell 1993). *E. crassumi* infektsioon ei ole lõpp-peremehele surmav, siiski võib suur paelusside hulk soolestikus pidurdada kala kasvu ning arengut (Merilo 2005). Kirjanduse andmetel on suurimaks leitud tsestoodide koguseks ühe forelli soolestikus olnud 1700 isendit. Arvukuseks, mis avaldab tõsist mõju kala konditsioonile, loetakse keskmiselt 500 isendit (Mitchell jt 1993).



Joonis 3: *Eubothrium crassumi* arengutsükkel. Kalade seedetraktis vabaneb vette tuhandeid paelussi mune (A, B), kus need süüakse ära aerjalgsete vähkide poolt (C). Vaheperemees satub otse või läbi teise vaheperemehe lõpp-peremehe organismi (D) (Buchmann jt. 2009)

Uuringud *E. crassum*’i mõjust peremeesorganismile on näidanud, et lisaks tüsedusindeksi vähenemisele väheneb ka punavereliblede arv ning hemoglobiinitase. Mida suurem on täiskasvanud paelusside arv peremeesorganismis, seda suurem on hemosideriini (rauda sisaldav pigment kudedes) tase. Sellised muutused viitavad hemolüütilisele aneemiale ehk kehvveresusele. Juhul kui peremehe püloorilistes ripikutes on suur hulk täiskasvanud paelusse, võib invasioon soolesulguse tagajärjel lõppeda kala surmaga (Mitchell 1993). Muudatused verestruktuuris võivad mõjutada kala konditsiooni, peamiselt raua ladestumine vereringes toob kaasa tüsedusindeksi languse (Bristow & Berland, 1991).

4.3 Parasitaarsed koinfektsioonid

Parasiidid esinevad sageli oma peremehega dünaamilises tasakaalus, kus parasiidi või parasiitide negatiivne mõju peremehele ei ole märgatav. Muutused keskkonnas võivad seejuures põhjustada selle tasakaalu muutumist, mille tulemusel tekivad haiguspuhangud (Mohamed jt. 2016). Seejuures võib erinevate parasiitide üheaegne eksisteerimine peremeesorganismis tekitada koinfektsioone, või parasiitide vahelist antagonismi. Tüüpiliselt mõjuvad koinfektsioonid konkureerivatele parasiitidele pärssivalt, seda peremehe piiratud ressursside tõttu või otsese omavahelise konkurentsi tulemusel peremeesorganismis. Samuti võib üks parasiit kutsuda peremeesorganismis esile immuunvastuse, mis pärsib teise parasiidi elutegevust. Koinfektsiooni geneetilise heterogeensuse kasvades tõuseb ka surve peremehe

immuunsüsteemile (Klemme jt. 2016), mistõttu langeb immuunsüsteemi efektiivsus peremeest kaitsta ning tõuseb vajadus ressurside järele (Jokela jt. 2000). Peremehe suurem ressursitarve ning nõrgem immuunvastus võivad koinfektsioonis parasiteerivate parasiitide elutegevusele soodsates tingimustes ka positiivselt mõjuda. Selle tulemusel võib tekkida olukord, kus parasiitide negatiivne mõju *per capita* tõuseb ning koinfektsioon on edukam. Olenevalt erinevate parasiidi genotüüpide sarnasusest, võib ideaalolukorras nendevaheline suhe muutuda ka mutualistlikuks (Buckling & Brockhurst 2008).

T. bryosalmonae infektsiooni forellidel on uuritud võrdluses samaaegse ümarussi *Raphidascaris acus* tabandumisega. Leiti, et proliferatiivsest neeruhaigusest paranemine oli mõjutatud ümarusside vastsete olemasolust peremeesorganismis. Forellid ilma *R. acuse* vastseteta suutsid neeruhaiguse mõjudest täielikult paraneda kuid parasitaarse koinfektsiooniga forellide neeruhaigus muutus krooniliseks (Schmidt-Posthaus jt. 2013).

On leitud, et parasiitidega nakatumine võib tõsta ka bakteriaalhaigustesse nakatumise tõenäosust, samuti võivad parasiidid bakteriaalhaigusi edasi kanda (Holzer jt. 2005). Parasitaarhaiguse esinemisel on organism teiste patogeenide suhtes palju vastuvõtlikum ning samuti on tõenäolisem, et haiguste kulg on organismile letaalne (Bowers jt. 2000).

5 Materjal ja metoodika

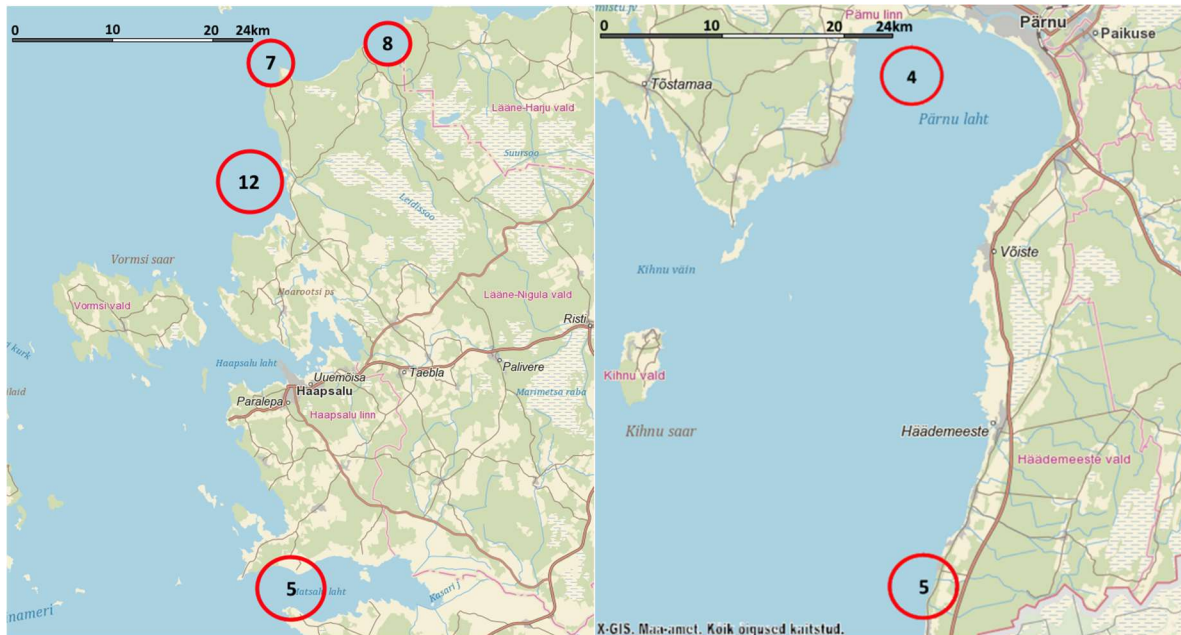
5.1 Proovide kogumine

Meriforellidelt proovide kogumine algas eelnenud uuringu raames 2017. a. jaanuaris ning kestis 2019. a. novembrini. Selle perioodi jooksul aitasid meriforellidelt proove koguda kutselised rannakalurid Lääne- ja Pärnumaa regioonidest. Proove koguti Läänemaa regioonis Keibu lahest, Põõsaspealt, Hara lahest ning Matsalu lahest ning Pärnumaa regioonis Pärnu lahest ning Häädemeeste ümbrusest. Uuringu raames koguti proovid 35-lt Läänemaa rannikult püütud meriforellilt ning 9-lt Pärnumaa meriforellilt (Joonis 6). Lisaks panustasid põhjaranniku kalurid 43 uue proovikomplektiga. Neilt saadud tulemused on lisatud täienduseks varasemasse põhjaranniku andmebaasi mis vajab eraldi töötlemist hiljem.

5.1.1 Proovide kogumine rannakalurite poolt

2017 – 2019 osalesid proovide kogumisel kutselised kalurid. Euroopa Merendus- ja Kalandusfondi rakenduskava 2014-2020 meetme 1.3 "Teadlaste ja kalurite koostöötoetus" raames finantseriti käesolevat uurimustööd kaluritelt kalade ostmiseks ning töövahendite soetamiseks ja laboriuuringte käigus tekkinud kulude katteks. Püütud kalad külmutati värskelt

-20 kraadi juures. Kokku koguti kalurite ning harrastuskalastajate abiga kalu Keibu lahest, Põõsaspea Neemelt, Hara lahest ning Matsalu lahest. Eri aegadel koguti kalad kaluritelt kokku ning transporditi termokastis Eesti Maaülikooli VLI vesiviljeluse õppetooli laborisse edasiseks uurimiseks. Uurimise eel võeti sügavkülmutatud kalad +4°C juurde sulama. Üles sulanud meriforellid/lõhed kaaluti ning mõõdeti täispikkus ja standardpikkus. Järgnevalt eraldati siseorganid, millest võeti võimalusel *Eppendorfi* tuubi sapiproov. Kuna tegu oli suures osas kuderändel olevate kaladega, kaaluti eraldi ka gonaadid. Kõhuäärest eraldati 2 cm pikkune riba, mis asetati koos sapiprooviga grippkotti, kott märgistati vastava kala näitajate ning proovi numbriga. Skalpelliga eraldati neerude esimesest ning tagumisest osast 1 cm pikkune lõik, need asetati 96% etanooliga täidetud *Falconi* tuubidesse, tuubid märgistati vastavalt neeru asetusele „E“ ning „T“ (esimene ning tagumine). Esimese ning tagumise neeruproovi võtmise vahepeal puhastati nuga etanooliga. Järgnevalt eemaldati kalalt pea, mis pandi koos vastava märgistusega eraldi grippkotti. Lihakehale tehti parasiitide esinemise kindlaks tegemiseks visuaalne ülevaatus. Forellide siseorganeid eraldi ei konserveeritud ja sooleparasiitide loendamine jätkus vahetult peale muu materjali eraldamist. Proovide võtmisest üle jäänud lihakehad hoiti VLI Suurloomakliiniku külmikus ja seejärel utiliseeriti AS Vireen.



Joonis 4: Uuringu jaoks püütud meriforellide püügikohad Lääne- ja Pärnumaal. Punane ring tähistab püügipiirkonda ning arv näitab kalade arvu antud piirkonnas (EMÜ).

5.2 Kalade parasitoloogiline uurimine

5.2.1 Proliferatiivne neeruhaigus

Proliferatiivse neeruhaiguse (PKD – *proliferate kidney disease*) analüüsid viidi läbi EMÜ vesiviljeluse õppetooli kalageneetika laboris. See koosnes meriforelli neerukoest DNA eraldamisest, DNA fragmentide paljundamisest multipleks polümeraasahelreaktsiooni abil (PCR - *polymerase chain reaction*) ning PKDga tabandumise hindamisest geelelektroforeesiga. DNA amplifitseerimisel kasutati *T. bryosalmonae* ning lõhe- ja forellispetsiifilisi praimereid (Dash & Vasemägi, 2014).

DNA eraldamiseks kasutati kahte erinevat meetodit: 1) QIAcube® HT DNA puhastamise robotit (QIAGEN, Saksamaa), kasutades selleks QIAamp 96 DNA QIAcube HT kitti (QIAGEN, Saksamaa) ja 2) NucleoSpin Tissue kitti (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) ning sellega kaasas olevat DNA eraldamise protokollit.

Järgmisena mõlemast meetodist lühidalt:

1) Robotiväliselt teostati proovide inkubatsioon vastavalt kiti protokollile. Neerukoest lõigati väikesed (1-2 mm läbimõõduga) tükid, mis üleliigsest etanoolist kuivatati ning seejärel lisati igale proovile 180 µl ATL lüüsipuhvrit (ATL – *tissue lysis buffer*) ja 20 µl proteinaas K ensüümi lahust (20 mg/ml). Peale proovide korralikku segamist inkubeeriti neid üleöö 56°C juures. Järgmisel päeval tsentrifuugiti lüüsunud proove 5 minutit 11 000g juures ning kanti robotisse. Seejärel lisati proovidele 100 µl lüüsipuhvrit VXL ja inkubeeriti toatemperatuuril 1 minut. Pärast lüüsumist toimus DNA sadestamine 350 µl ACB puhvriga, millele oli eelnevalt lisatud isopropanooli. Siis tõsteti proovid filterplaadile, kus toimus DNA sidumine filtriga (vaakum 5 min 35 kPa). Järgmiseks DNA puhastati 600 µl pesupuhvri AW1ga (vaakum 2 min 35 kPa), 600 µl pesupuhvri AW2ga (vaakum 1 min 35 kPa) ning 600 µl 96% etanooliga (vaakum 30 sek 35 kPa). Seejärel kuivatati filterplaat vaakumiga: 1 min 55 kPa ja 2 min 35 kPa. Lõpetuseks lahustatakse filterplaadi filtrile seondunud DNA 100 µl AE (10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) ja 15 µl TopElute puhvril (inkubatsioon 2 minutit ja seejärel vaakum 8 minutit 70 kPa juures) ning proovid säilitati -20°C juures.

2) Igale koeproovile lisati 180 µl lüüsipuhvrit T1 ja 25 µl proteiinaas K ensüümi lahust. Seejärel inkubeeriti proove 56°C juures kaks kuni kolm tundi koeproovide täieliku lahustumiseni. Tähtis on proove iga poole tunni tagant korralikult segada. Siis lisati proovidele 200 µl lüüsipuhvrit

B3 ning inkubeeriti 10 minutit 70°C juures. Pärast lüüsumist tsentrifuugiti proove 5 minutit (12 000 g) ning supernatant valati uude tuubi. DNA sadestamiseks lisati 210 µl etanooli (96%) ja loksutati tugevalt. Seejärel toimus DNA sidumine filtriga, kus saadud segu kanti NucleoSpin Tissue filtertuubi, mida tsentrifuugiti üks minut (11 000 g). Järgmiseks puhastati DNAd 500 µl pesupuhvri BWga ning 600 µl pesupuhvri B5ga (mõlemal korral tsentrifuugiti proove ühe minuti jooksul 11 000 g juures). Lõpetuseks lahustatakse filtertuubi filtrile sadestatud DNA 100 µl 70°C BE puhvril (5 mM Tris*HCl, pH 8.5) ning säilitati -20°C juures. DNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni mõõdeti spektrofotomeetriselt, kasutades NanoDrop 2000 (Thermo scientific, USA).

DNA amplifitseerimisel kasutati kahte komplekti *T. bryosalmonae* ning lõhe- ja forellispetsiifilisi praimereid. PKX3F ja PKX4F (Kent jt. 1998) praimeritega amplifitseeriti 298 aluspaari ulatuses *T. bryosalmonae* 18s rRNA geeni. PKD 166F ja PKD166R (Grabner & El-Matbouli 2009) praimeritega amplifitseeriti 166 aluspaari pikkune fragment *T. bryosalmonae* 18s rRNA geenist. PKD 166F ja PKX4R praimerid amplifitseerisid kombineeritult pikema, 756 aluspaari pikkuse fragmendi 18S rRNA geenist. Indel 183F ja 183R praimerid disainiti algselt Atlandi lõhe (*Salmo salar*) jaoks, aga need toimivad edukalt ka forelli (*Salmo trutta*) genoomi amplifitseerimiseks. (Dash & Vasemägi, 2014). Praimerite järjestused on kirjeldatud tabelis 1.

Tabel 1: Praimerite järjestused ja lõppkontsentratsioonid ühes reaktsioonis

Praimer	Praimeri järjestus 5'→3'
PKX3F	5'-CTA AGT ACA TAC TTC GGT AGA-3'
PKX4R	5'-CCG TTA CAA CCT TGT TAG GAA-3'
PKD 166F	5'-TGT CGA TTG GAC ACT GCA TG-3'
PKD 166R	5'-ACG TCC GCA AAC CAG CT-3'
Indel 183F	5'-GCC CAA AAT GTA CAG GCA AT-3'
Indel 183R	5'-GAT TCT CAT GTT AGC CGT CCA-3'

Meriforelli neeruproovidest tuvastati PKD haigustekitaja geneetiliselt multiplekse PCRi reaktsiooni abil, kasutades Biometra Tprofessional TProfessional termotsüklerit. Iga PCRi

reaktsioon (6 µl) koosnes järgmistest komponentidest: 20-100 ng DNA-d, 2x multiplex PCR master mis (Qiagen), ning päri- ja vastassuunaliste praimerite segu. DNA amplifitseerimiseks kasutati järgmist temperatuuriprofiili:

- algne denaturatsioon 15 minutit 95 °C
- 36 tsüklit: denaturatsioon 30 sekundit 94 °C, praimerite seondumine 90 sekundit 60 °C praimerite ekstensioon ja uute ahelate süntees 60 sekundit 72 °C
- lõplik ekstensioon 5 minutit 72°C.

PCRi produktide visualiseerimiseks elektroforeesiti reaktsioone ~60 minutit 100V pinge juures 2% agarosgeelil , millele oli lisatud etiidiumbromiid (EtBr). EtBr seondub DNA, RNA ja valkudega ning muudab need nähtavaks ultraviolettkiirguse all. Fragmentide pikkuse määramiseks kasutati igal geelil GeneRuler 100 bp DNA Ladderit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Fragmendimustrite fotografeerimiseks kasutati videodokumentatsioonisüsteemi UVItec FireReader (UVItec Limited).

5.2.2 Sooleparasiidid

Paelusside esinemise määramiseks võeti 4 °C juures sulanud siseorganid või terve kala ning avati skalpelli ning kääridega magu ja soolestik (joonis 5). Kuna suur osa paelussidest paiknes lukutiripikutes, eemaldati need ükshaaval või kimbuna ning loendati. Järgnevalt asetati paelussid edasiste uuringute tarbeks etanooliga täidetud *Falconi* tuubidesse (joonis 6)



Joonis 5: Paelussid meriforelli soolestikus (EMÜ)



Joonis 6: Paelussid *Falconi* tuubis (EMÜ)

Saadud tulemused kanti ihtüopatoloogilise uuringu kaartidele millele kirjutati proovi number, kala püügikoht, kala liik, täiskaal, gonaadi kaal (kuderändel kalade puhul) püügikuupäev, kala pikkus ning sugu. Parasiitide lahtrisse kirjutati leitud parasiitide arv ning paiknemine.

Falconi tuubides ning etanoolis säilitatud paelusside liik määrati mikroskoobivaatlusel. Parasiitusside liik määrati paelussi morfoloogiliste tunnuste alusel.

5.3. Katseline kalade vanuse määramine otoliitide värvimismeetodiga

Selle ja varasemate uuringute kaugem eesmärk on andmebaasi loomine selleks, et saadud informatsiooni põhjal prognoosida patogeenide võimalikku negatiivset mõju eri vanuses meriforellide tervisele, arvukusele ning kudepaikade kvaliteedile. Selle eesmärgi täitmiseks tehti esimene katseline vanuse määramine sagitaaltasandil lihvitud otoliitide värvimise järel. Seda meetodikat on edukalt kasutatud EMÜs angerjate vanuse määramisel (M. Silm otsekontakt).

Otoliidid on paarilised kaltsifitseerunud struktuurid (kuulmekivikesed) luukalade sisekõrvas. Nad on kaladele eelkõige vajalikud kuulmiseks ning tasakaalu hoidmiseks. Ajalooliselt on neid

kalabioloogide poolt kasutatud kalade vanuse määramiseks. Nimelt kasvavad nad parasvöötme kaladel sfääriliselt analoogselt puu kasvurõngastele, kus suurem kasv toimub suvel ning väiksem talvel. Otoliidid kasvavad pidevalt ning analüüsides otoliidist vastavat piirkonda, on võimalik eristada konkreetseid veekogusid, kus kala on teatud hetkel oma eluajal viibinud (nt sünniveekogu) (Rohtla jt. 2019).

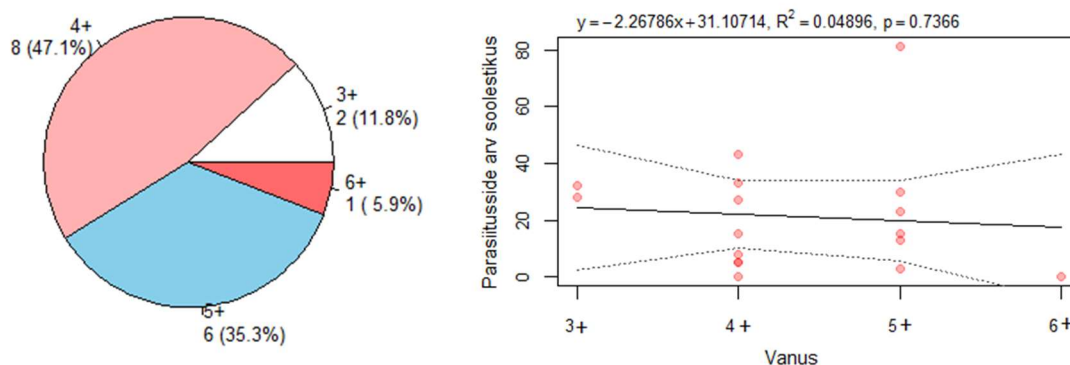
Vanuse määramiseks võeti 17 uurimiseks sobivalt kalalt kahest 1 otoliit ning paigutati need puhastatult ja kuivalt *Eppendorfi* tuubi, mille peale märgiti kala unikaalse ID (näiteks 45/19, kus 45 tähistab kala järjekorranumbrit ja 19 aastat, millal kala sai kogutud). Peale otoliitide kohumist liikusid need silikoonvormi ning valmistati liim nende fikseerimiseks. Liim koosnes kahest koostisosast: EPO valuvaik ja EPO kõvendi. Ühele vormile mahub maksimaalselt 24 otoliiti ehk tuleb valmistada vastav liimi kogus – 10g vaiku, 3,7g kõvendit. Järgnes 48-tunnine kuivamise aeg.

Peale liimi kõvastumist valiti sobivad liivapaberid otoliite lihvimiseks ja hilisemaks poleerimiseks. Otoliidid lihviti sagitaaltasandil. Selles protsessis kasutati lihvimis-poleerimismasinat Metkon FORCIPOL 1V Grinder-Polisher. Esimesena kasutati P1000 liivapaberit, millega lihviti maha peamise liimi kiht. Kui otoliit liimi seest paistma hakkas, vahetati liivapaber ja asendati vana P2500 peale ning lihviti ettevaatlikult kuni otoliidi tuumani. Viimasena kasutati liivapaberit P4000, millega poleeriti otoliidi pealmist kihti. Protsessi korrati kuni kõik otoliidid said tuumani lihvitud ja poleeritud.

Lihvimisele järgnes otoliitide värvimiseks ette valmistamine. Esmalt liimiti otoliidid Loctite Super Attack liimiga katseklaasile ning jäeti ööseks kuivama. Järgmiseks valmistati Neutral Red värvilahuse, milleks kaaluti 2,5g värvpulbrit, 30 ml destilleeritud vett ja 0,15 ml 99,9% äädikhapet. Ainete segu homogeniseeriti hoolikalt. Värvimise käigus kasutati kolme petritassi erinevate lahustega: esimeses 1% soolhapet (HCl), teises värvilahust ning kolmandas destilleeritud vesi. Otoliiitide värvimine koosnes viiest etapist: 1) katseklaas koos otoliitidega leotati 15 sekundit 1% soolhappes, 2) otoliidid kuivatati suruõhuga, 3) leotati 1 minut ja 45 sekundit värvilahuses (aegajalt segades, et värv oleks ühtlasem), 4) otoliidid loputati destilleeritud vees, 5) kuivatati suruõhuga.

Kala vanuse määramiseks kasutati Nikon Eclipse 50i mikroskoopi 10 x 0.25, 20 x 0.40 ja 40 x 0.65 suurendustega. Läbi mikroskoobi 40X suurenduse oli otoliidilt võimalik lugeda kasvuringe (aastaringe), mille tõi esile punakas värvus. Andmed on esitatud joonisel 9.

Kasutatud metoodikat võib pidada heaks aga leiame, et paremate tulemuste saamiseks (lugemise hõlbustamiseks) peame värvimise osa metoodikas täiustama.



Joonis 7. Kalade vanuseline jaotamine ja parasiitide arv invadeeritud kaladel.

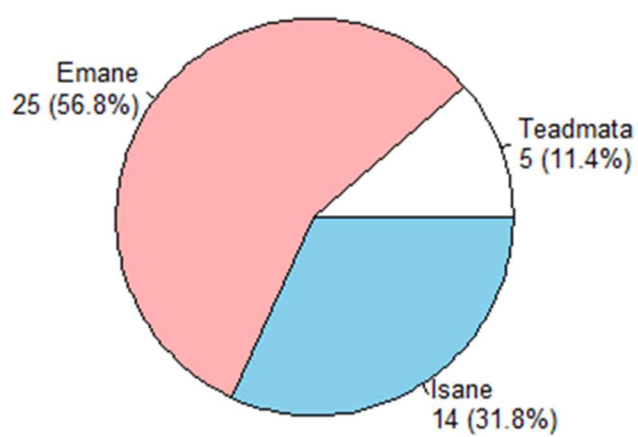
5.4 Statistiline andmetöötlus

Parasiitusside arvu soolestikus ning jaotust sõltuvalt kala soost analüüsiti Wilcoxon'i testiga. Parasiitusside arvukuse sõltuvust kala kaalust, täispikkusest, tüsedusindeksist ning vanusest analüüsiti lineaarse regressioonvõrrandiga. Proliferatiivse neeruhaiguse positiivsete ja negatiivsete kalade keskmisi pikkusi ja kaale võrreldi t-testiga. Proliferatiivse neeruhaiguse esinemissageduse sõltuvust kala soost testiti χ^2 -testiga. Parasiitusside arvu sõltuvalt regioonist analüüsiti Wilcoxon'i testiga ning proliferatiivse neeruhaiguse tekitaja esinemist sõltuvalt regioonist χ^2 -testiga.

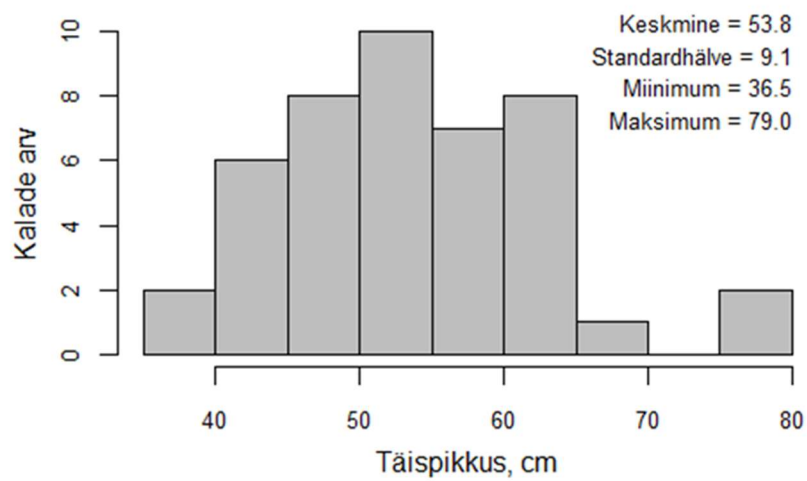
6 Tulemused

6.1 Uuritud kalade iseloomustus

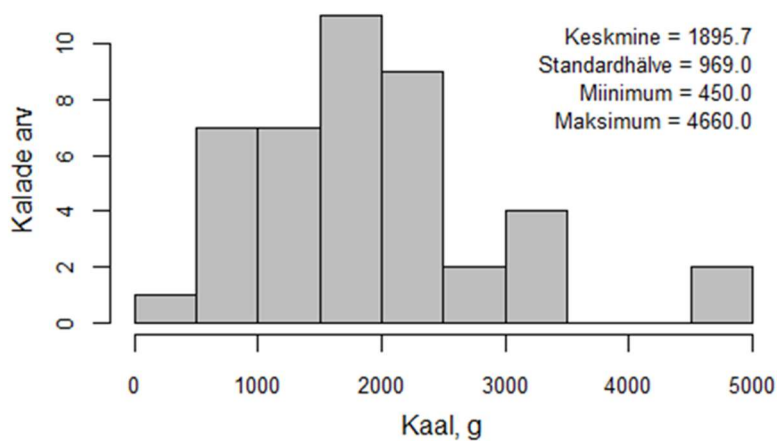
Kalade sooline jaotus on esitatud joonisel 8 ning pikkuste ja kaalude jaotus joonistel 11 ja 12.



Joonis 8. Uuritud kalade sooline jaotus.



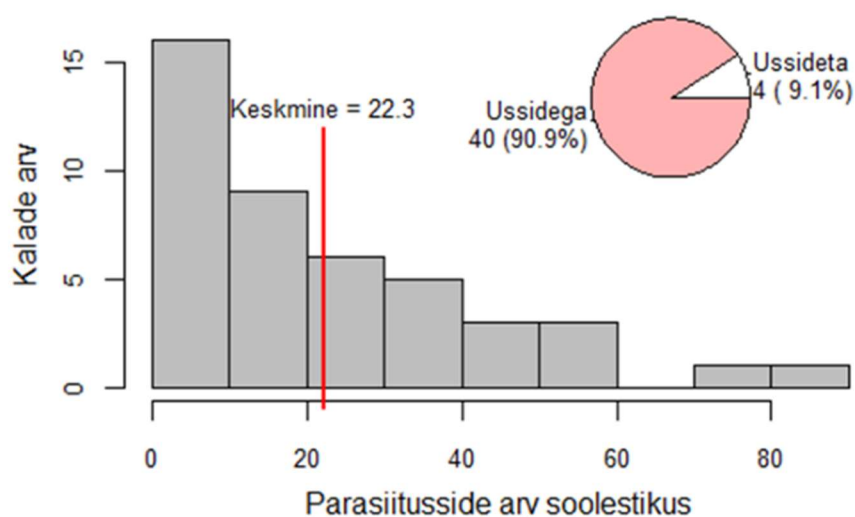
Joonis 9. Uuritud kalade täispikkuse jaotus ja olulisemad arvnäitajad.



Joonis 10. Uuritud kalade kaalu jaotus ja olulisemad arvnäitajad.

6.2 Parasiitusside arvukuse analüüs

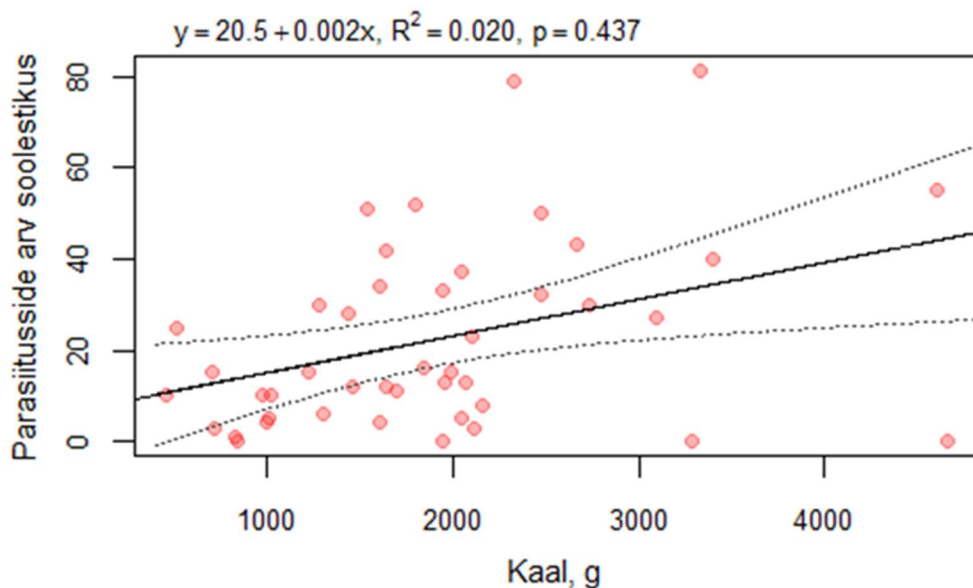
Parasiitusse esines 40-1 kalal (90.9% kõigist uuritud kaladest), kusjuures keskmine parasiitusside arv kala kohta oli 22.3 (keskmine üksnes parasiitussidega kaladel 24.6), mediaan 15.5 ja maksimum 81 ussi (Joonis 11).



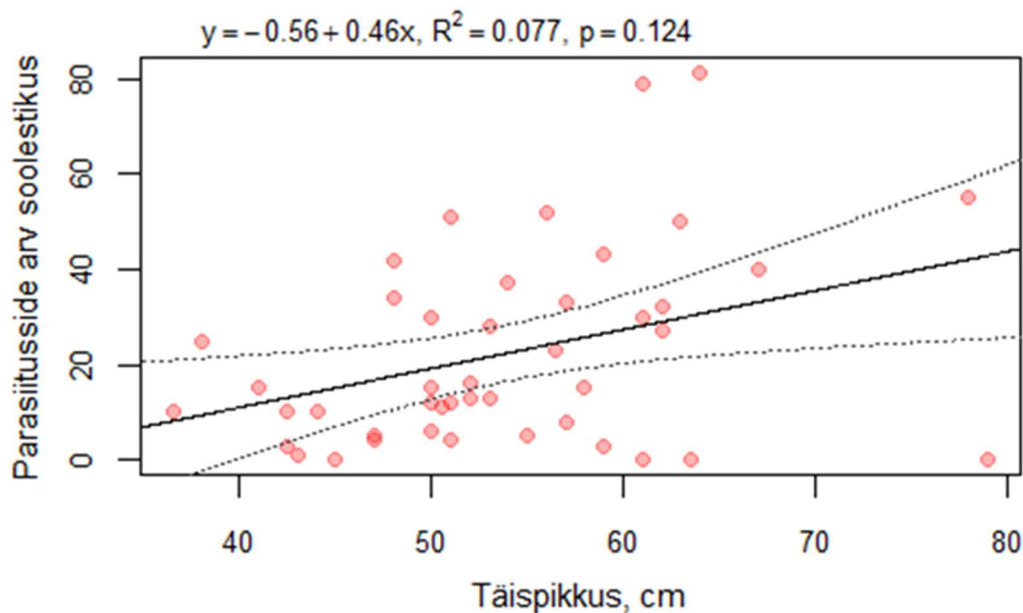
Joonis 11. Parasiitusside arvu jaotus uuritud kaladel

Parasiitusside arv soolestikus sõltuvalt kala kaalust, pikkusest, tusedusindeksist on esitatud joonistel 14-16. Kala mõõtmete ja usside arvu vahel esines nõrk positiivne seos - mida suurem

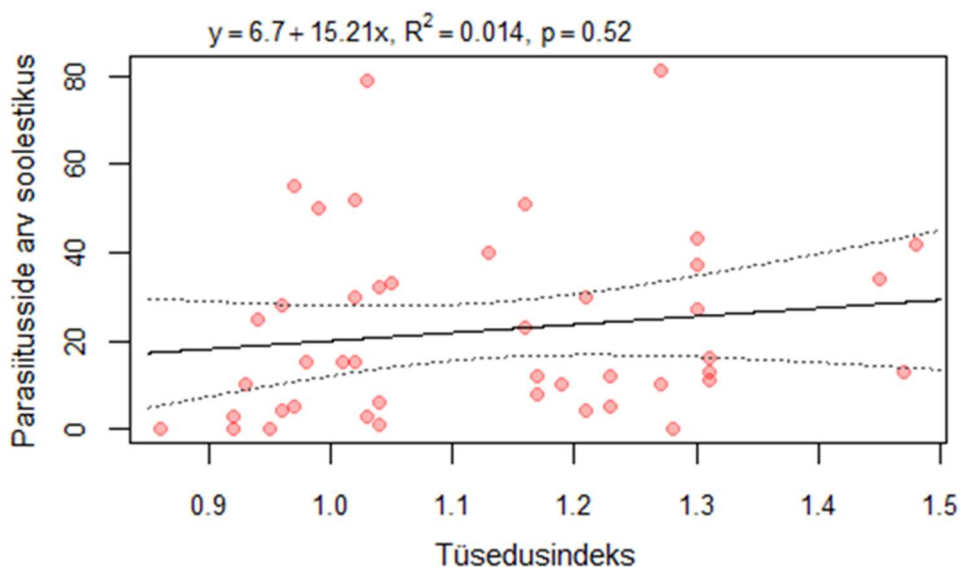
oli kala, seda rohkem tal keskmiselt usse esines. Siiski ei osutunud need seosed statistiliselt oluliseks ($p > 0,05$)



Joonis 12. Parasiitusside arv soolestikus sõltuvalt kala kaalust (iga kala on märgitud eraldi punktiga, pidev joon märgib lineaarse regressioonivõrrandi graafikut koos 95%-lise usaldusintervalliga, arvuliselt on esitatud regressioonivõrrand ning R^2 ja p -väärtused).



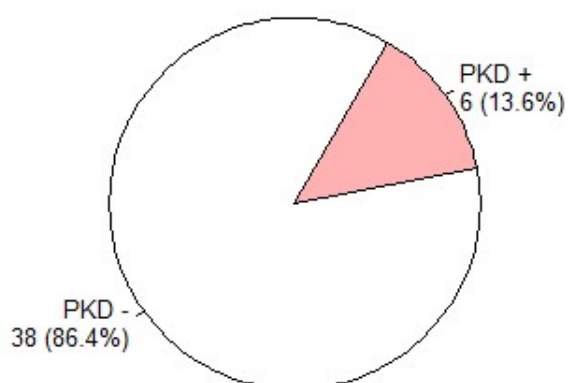
Joonis 13. Parasiitusside arv soolestikus sõltuvalt kala täispikkusest (iga kala on märgitud eraldi punktiga, pidev joon märgib lineaarse regressioonivõrrandi graafikut koos 95%-lise usaldusintervalliga, arvuliselt on esitatud regressioonivõrrand ning R^2 ja p -väärtused).



Joonis 14. Parasiitusside arv soolestikus sõltuvalt kala tüsedusindeksi väärtusest (iga kala on märgitud eraldi punktiga, pidev joon märgib lineaarse regressioonivõrrandi graafikut koos 95%-lise usaldusintervalliga, arvuliselt on esitatud regressioonivõrrand ning R² ja p-väärtused).

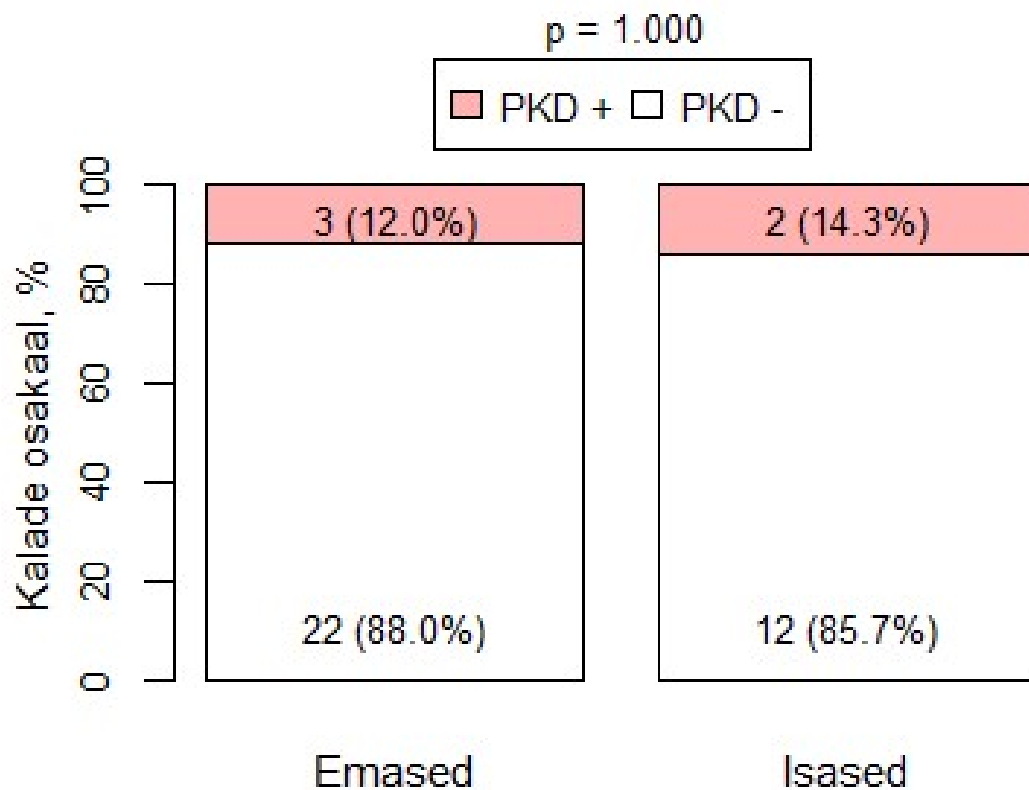
6.3 Proliferatiivse neeruhaiguse esinemise analüüs

Proliferatiivne neeruhaigus esines kuuel kalal, so 13,6%-l kõigist kaladest (Joonis 15), seejuures oli kõigil proliferatiivse neeruhaigusega kaladel tabandunud üksnes neeru tagumine osa.



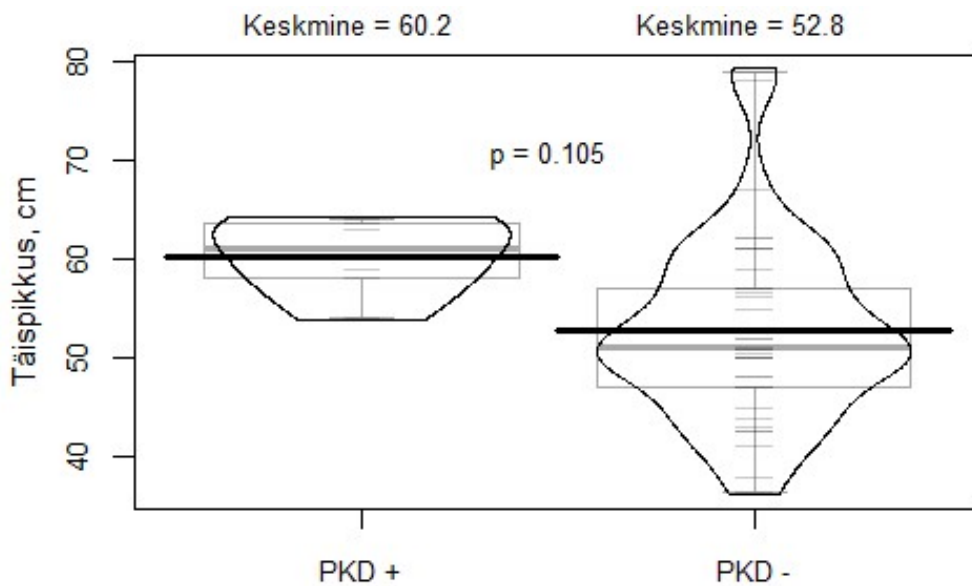
Joonis 15. Proliferatiivse neeruhaigusega (PKD +) ja ilma (PKD -) kalade osakaal.

Sugude lõikes esines haigust nii isastel kui ka emastel kaladel praktiliselt ühepalju (vastavalt 14,3% ja 12%, $p = 1,000$ (joonis 16)).

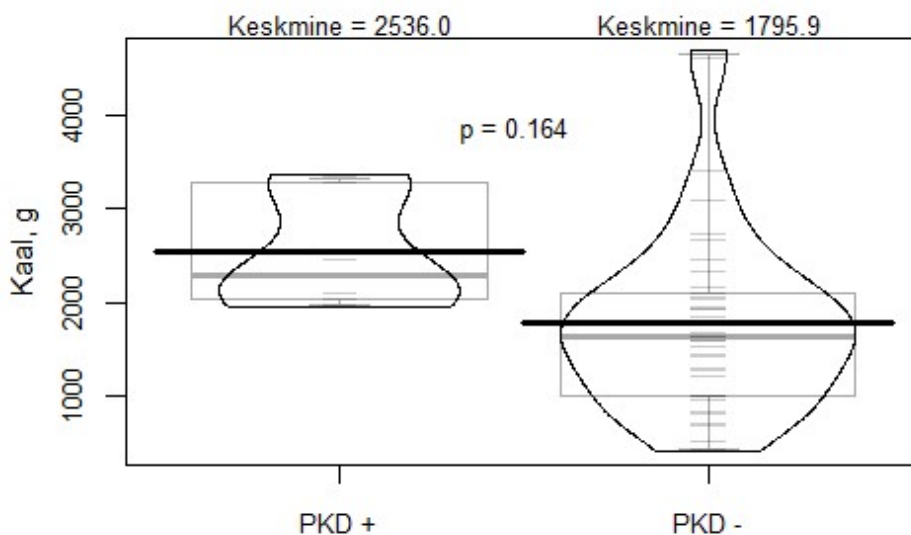


Joonis 16. Proliferatiivse neeruhaigusega (PKD +) ja ilma (PKD -) kalade osakaal sõltuvalt soost, p -väärtus näitab sugude vahelise erinevuse statistilist olulist (χ^2 -test).

Proliferatiivse neeruhaigusega kalad olid keskmiselt pisut suuremad kui terved kalad, aga täispikkuse ja kaalu puhul ei osutunud erinevused statistiliselt olulisteks (kõik $p > 0,05$; Joonised 19 ja 20).



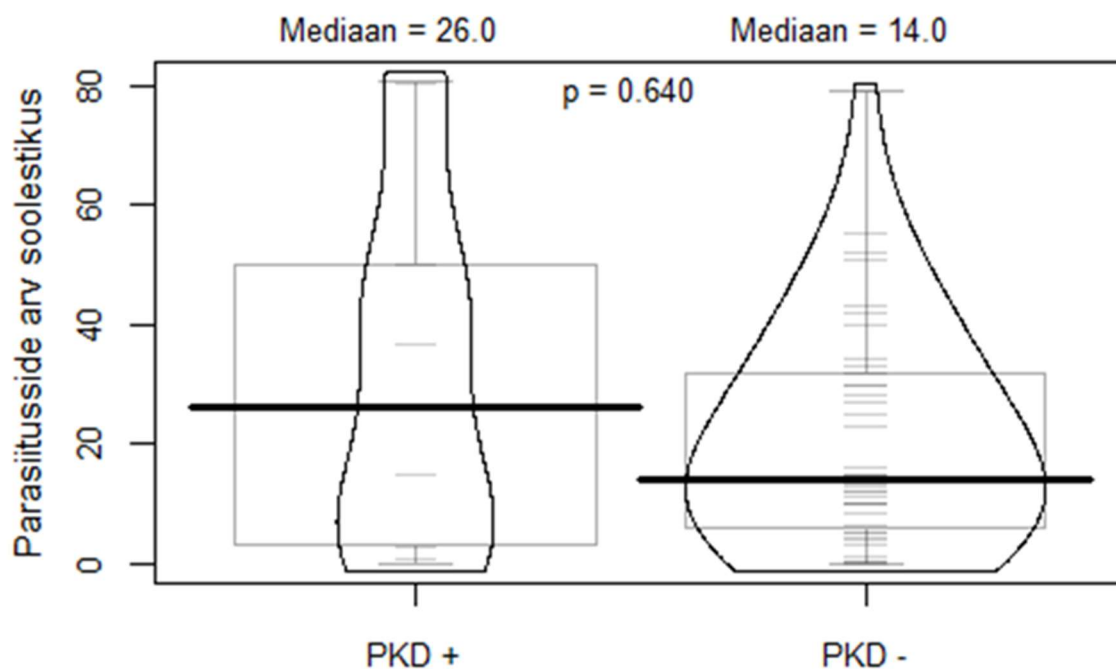
Joonis 17. Proliferatiivse neeruhaigusega (PKD +) ja ilma (PKD -) kalade pikkuse jaotus. Väikesed horisontaalsed kriipsud tähistavad üksikuid kalu, taustal olev hall ristkülik märgib ala, kuhu jäävad keskmised 50% kaladest (kvartiilide vahe), hall tugev joon näitab mediaani ja must tugev joon koos joonise kohal olevate arvvaartustega esitab keskmist pikkust, p-väärtus näitab gruppide vahelise erinevuse statistilist olulist (t-test).



Joonis 18. Proliferatiivse neeruhaigusega (PKD +) ja ilma (PKD -) kalade kaalu jaotus. Väikesed horisontaalsed kriipsud tähistavad üksikuid kalu, taustal olev hall ristkülik märgib ala, kuhu jäävad keskmised 50% kaladest (kvartiilide vahe), hall tugev joon näitab mediaani ja

must tugev joon koos joonise kohal olevate arvväärtustega esitab keskmist kaalu, p-väärtus näitab gruppide vahelise erinevuse statistilist olulist (t-test).

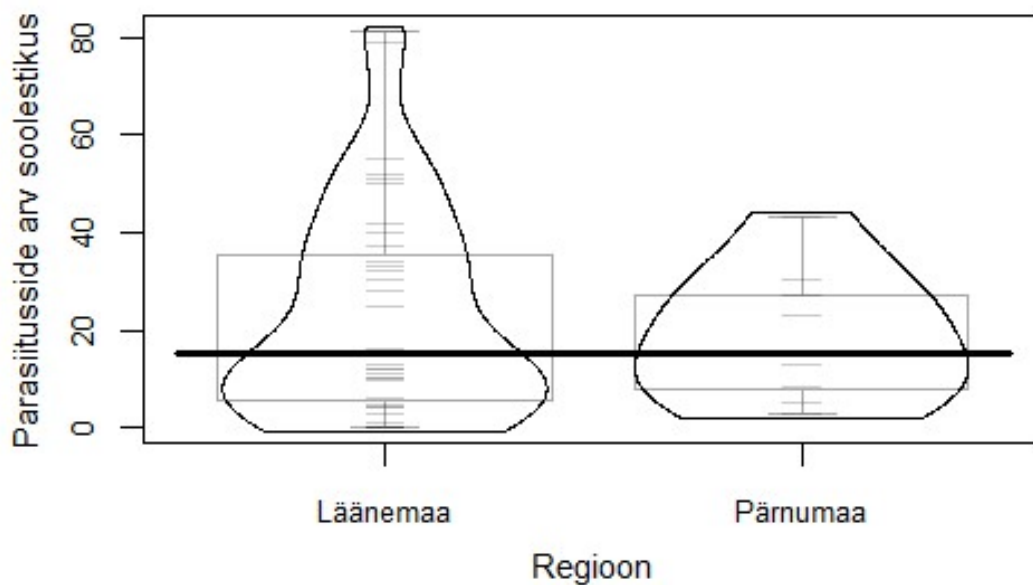
Jooniselt 19 ilmneb, et kuigi proliferatiivse neeruhaigusega kaladel on parasiitussesse enam kui neeruhaiguseeta kaladel, ei ole see erinevus statistiliselt oluline ($p = 0,640$) ja väikese usside arvuga kalu leidub nii neerutabandusega kui ka tervete hulgas.



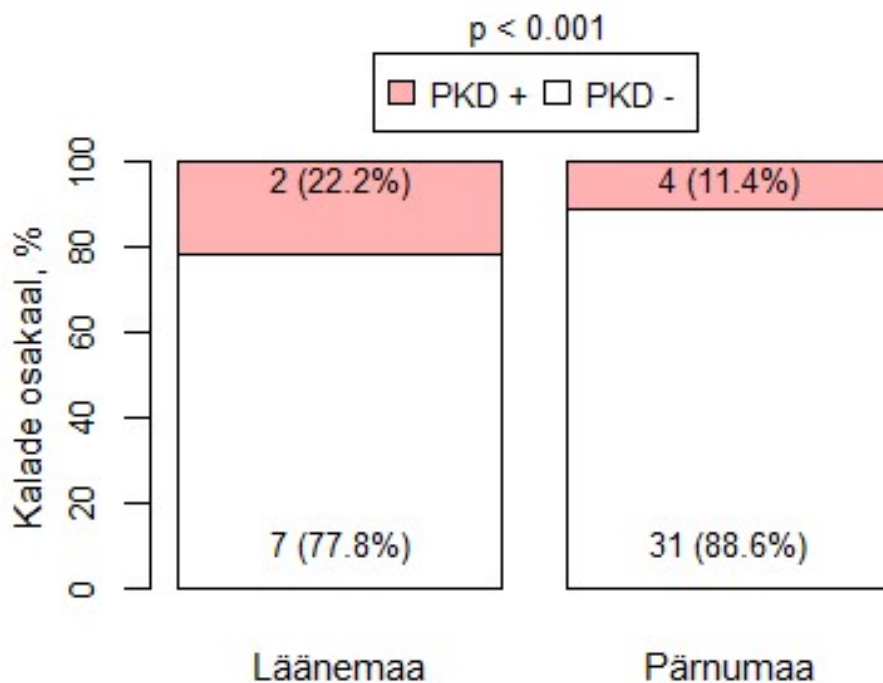
Joonis 19. Parasiitusside arv soolestikus proliferatiivne neeruhaigusega (PKD +) ja ilma (PKD -) kaladel. Väikesed horisontaalsed kriipsud tähistavad üksikuid kalu, taustal olev hall ristkülik märgib ala, kuhu jäävad keskmised 50% kaladest (kvartiilide vahe), must tugev joon koos joonise kohal olevate arvväärtustega esitab parasiitusside arvu mediaani ja p-väärtus näitab gruppide vahelise erinevuse statistilist olulist (Wilcoxon test).

6.4 Püügipiirkondade vaheline võrdlus

Joonised 19 ja 20 võrdlevad Läänemaa ja Pärnumaa forellide tabandumist sooleparasiitide ning proliferatiivse neeruhaiguse tekitajaga. Analüüsist selgub, et parasiitussidega tabandumine kahe regiooni vahel oli võrdne (mediaan 15 ussi). Proliferatiivse neeruhaigusega kalade osakaal oli seejuures Läänemaal märkimisväärselt väiksem ning see seos oli ka statistiliselt oluline. Samas oli proliferatiivse neeruhaigusega kalade osakaal kogu valimis madal.



Joonis 19. Parasiitusside arv soolestikus sõltuvalt kalade püügiregioonist. Väikesed horisontaalsed kriipsud tähistavad üksikuid kalu, taustal olev hall riskülik märgib ala, kuhu jäävad keskmised 50% kaladest (kvartiilide vahe), must tugev joon koos joonise kohal olevate arvvaartustega esitab parasiitusside arvu mediaani.



Joonis 20. Proliferatiivse neeruhaigusega (PKD +) ja ilma (PKD -) kalade osakaal olenevalt püügiregioonist, p-väärtus näitab regioonide vahelise erinevuse statistilist olulist (χ^2 -test).

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Arula, T. (2012) Ecology of early life-history stages of herring *Clupea harengus* membras in the northeastern Baltic Sea, Tartu: University of Tartu Press, 65 lk.
2. Buchmann, K., Bresciani, J., Pedersen, K., Ariel, E., Dalsgaard, I., Madsen, L. (2009). Fish Diseases: An Introduction, Frederiksberg: Biofolia, 131 lk.
3. Kangur, M. (2009) Meriforelli raamat, Tallinn: Kalastaja Raamat. 160 lk.
4. Kangur, M., Paaver, T., Drevs, T., Turovski, A. (2003). Fishes of Estonia. Tallinn. 416 lk.
5. Merilo, Z. (2005). SININE RIST Parasiidid lõheliste kõhuõõnes. - Ajakiri Kalastaja. Nr. 37, lk 37 - 39.
6. Mitchell, C., G. (1993). Eubothrium. - 14. number of Aquaculture information series, lk 1-5.
7. Rannak, L., Arman, J., Kangur, M. (1983). Lõhe ja meriforell. Tallinn: Valgus. 152 lk.
8. Saksvik, M., Nilsen, F., Nylund, A., Berland, B. (2001) Effect of marine Eubothrium sp. (Cestoda: Pseudophyllidea) on the growth of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. - Journal of Fish Diseases. Vol. 24, pp. 111-119
9. Bristow, G. and Berland, B. (1991). The effect of long term, low level Eubothrium sp. (Cestoda: Pseudophyllidea) infection on growth in farmed salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 98(4), pp.325-330.
10. Feist, S., Peeler, E., Gardiner, R., Smith, E. and Longshaw, M. (2002). Proliferative kidney disease and renal myxosporidiosis in juvenile salmonids from rivers in England and Wales. *Journal of Fish Diseases*, 25(8), pp.451-458.
11. OKAMURA, B., HARTIKAINEN, H., SCHMIDT-POSTHAUS, H. and WAHLI, T. (2011). Life cycle complexity, environmental change and the emerging status of salmonid proliferative kidney disease. *Freshwater Biology*, 56(4), pp.735-753.
12. Okamura, B. and Wood, T. (2002). Bryozoans as hosts for *Tetracapsula bryosalmonae*, the PKX organism. *Journal of Fish Diseases*, 25(8), pp.469-475.
13. Morris, D., Adams, A. and Richards, R. (2000). In situ hybridisation identifies the gill as a portal of entry for PKX (Phylum Myxozoa), the causative agent of proliferative kidney disease in salmonids. *Parasitology Research*, 86(12), pp.950-956.
14. Grabner, D. and El-Matbouli, M. (2010). *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) portal of entry into the fish host. *Diseases of Aquatic Organisms*, 90(3), pp.197-206.

15. Longshaw M., LeDeuff R.M., Harris A.F. & Feist S.W. (2002) Development of Proliferative Kidney Disease (PKD) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, following short-term exposure to *Tetracapsula bryosalmonae* infected bryozoans. *Journal of Fish Diseases*, 25, 443–449.
16. Dash, M. and Vasemägi, A. (2014). Proliferative kidney disease (PKD) agent *Tetracapsuloides bryosalmonae* in brown trout populations in Estonia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 109(2), pp.139-148.
17. Feist, S., Longshaw, M., Canning, E. and Okamura, B. (2001). Induction of proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* via the bryozoan *Fredericella sultana* infected with *Tetracapsula bryosalmonae*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45, pp.61-68.
18. Hedrick, R., MacConnell, E. and de Kinkelin, P. (1993). Proliferative kidney disease of salmonid fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, pp.277-290.
19. Tops S., Hartikainen H. & Okamura B. (2009) The effects of infection by *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) and temperature on *Fredericella sultana* (Bryozoa). *International Journal for Parasitology*, 39, 1003–1010.
20. FERGUSON, H. and BALL, H. (1979). Epidemiological aspects of proliferative kidney disease amongst rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson in Northern Ireland. *Journal of Fish Diseases*, 2(3), pp.219-225.
21. Kent M.L. & Hedrick R.P. (1985) PKX, the causative agent of Proliferative Kidney Disease (PKD) in Pacific salmonid fishes and its affinities with the Myxozoa. *Journal of Parasitology*, 32, pp.254–260.
22. ANDERSON, C., CANNING, E. and OKAMURA, B. (1999). Molecular data implicate bryozoans as hosts for PKX (Phylum Myxozoa) and identify a clade of bryozoan parasites within the Myxozoa. *Parasitology*, 119(6), pp.555-561.
23. CANNING, E., CURRY, A., FEIST, S., LONGSHAW, M. and OKAMURA, B. (2000). A New Class and Order of Myxozoans to Accommodate Parasites of Bryozoans with Ultrastructural Observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX Organism). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(5), pp.456-468.
24. Feist S.W. & Longshaw M. (2006) The Phylum Myxozoa. In: *Fish Diseases and Disorders Vol. 1.* (Ed P.T.K.Woo), pp. 230–296. CABI. Publishing, Wallingford,UK.
25. Morris, D. and Adams, A. (2007). Sacculogenesis and sporogony of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) within the bryozoan host *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata). *Parasitology Research*, 100(5), pp.983-992.

26. Martin, I., Dozin, B., Quarto, R., Cancedda, R. and Beltrame, F. (1997). Computer-based technique for cell aggregation analysis and cell aggregation in in vitro chondrogenesis. *Cytometry*, 28(2), pp.141-146.
27. MORRIS, D. and ADAMS, A. (2008). Sporogony of *Tetracapsuloides bryosalmonae* in the brown trout *Salmo trutta* and the role of the tertiary cell during the vertebrate phase of myxozoan life cycles. *Parasitology*, 135(09).
28. De Kinkelin, P., Okamura, B., Hedrick, R. and Baxa, D. (2004). Malacosporean-like spores in urine of rainbow trout react with antibody and DNA probes to *Tetracapsuloides bryosalmonae*. *Parasitology Research*, 92(1), pp.81-88.
29. Grabner, D. and El-Matbouli, M. (2008). Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) to *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata) by various fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 79, pp.133-139.
30. Le Morvan C., Troutaud D. & Deschaux P. (1998) Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *Journal of Experimental Biology*, 201, pp. 165–168.
31. Chilmonczyk S., Monge D. & de Kinkelin P. (2002) Proliferative kidney disease: cellular aspects of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), response to parasitic infection. *Journal of Fish Diseases*, 25, pp.217–226.
32. Bettge K., Wahli T., Segner H. & Schmidt-Posthaus H. (2009) Proliferative kidney disease in rainbow trout: time- and temperature-related renal pathology and parasite distribution. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83, pp.67–76.
33. Kotob, M., Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Abdelzaher, M. and El-Matbouli, M. (2016). The impact of co-infections on fish: a review. *Veterinary Research*, 47(1).
34. Klemme, I., Louhi, K. and Karvonen, A. (2016). Host infection history modifies co-infection success of multiple parasite genotypes. *Journal of Animal Ecology*, 85(2), pp.591-597.
35. Schmidt-Posthaus, H., Steiner, P., Müller, B. and Casanova-Nakayama, A. (2013). Complex interaction between proliferative kidney disease, water temperature and concurrent nematode infection in brown trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, 104(1), pp.23-34.
36. HOLZER, A., SOMMERVILLE, C. and WOOTTEN, R. (2005). Molecular studies on the seasonal occurrence and development of five myxozoans in farmed *Salmo trutta* L. *Parasitology*, 132(02), p.193.

37. Bowers, J., Mustafa, A., Speare, D., Conboy, G., Brimacombe, M., Sims, D. and Burka, J. (2000). The physiological response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to a single experimental challenge with sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*. *Journal of Fish Diseases*, 23(3), pp.165-172.
38. Kennedy, C.R. 1978a. Studies on the biology of *Eubothrium salvelini* and *E. crassum* in resident and migratory *Salvelinus alpinus* and *Salmo trutta* and *S. salar* in North Norway and the islands of Spitsbergen and Jan Mayen. *J. Fish Biology*. 12:147–162.
39. ICES 2013. Report of the Baltic Salmon and Trout Assessment Working Group 2013 (WGBAST), 3 – 12 April, Tallinn, Estonia. – ICES CM 2013/ACOM:08.
40. Kalakasvatusliku taastootmise raames Eesti vetesse asustatud kalade andmestik (2016). Keskkonnaministeerium
http://www.envir.ee/sites/default/files/lisa_1_asustamise_tabelid_tegevuskavale.pdf
(20.04.2018)
41. Kalade taastootmise alased uuringud, 2012. aasta aruanne. (2013). Tartu: Eesti Maaülikooli Veterinaarmeditsiini ja Loomakasvatuse Instituudi Kalakasvatuse osakond.
http://www.envir.ee/sites/default/files/2012_kalade_taastootmise_lepingu_aruanne_l6plik_0.pdf (20.04.2018)
42. KALAKASVATUSLIKU TAASTOOTMISE TEGEVUSKAVA 2017 – 2019, perspektiiviga kuni 2023. (2017). Tartu.
http://www.envir.ee/sites/default/files/kalakasvatusliku_taastootmise_tegevuskava_2017-2019.pdf (20.04.2018)
43. Kent ML, Khattra J, Hervio DML, Devlin RH (1998) Ribosomal DNA sequence analysis of isolates of the PKX myxo - sporean and their relationship to members of the genus *Sphaerospora*. *Journal of Aquatic Animal Health* 10: 12–21
44. Pärnu Postimees „Kalasaak Pärnu rannikumeres kõigub liigiti – Uudised“ Tõnu Kann / https://parnu.postimees.ee/6831028/kalasaak-parnu-rannikumeres-koigub-liigiti?fbclid=IwAR2pssBvw7ZkvcvWJwN_mq45IKFWOHPZS7CPA0rq... (2019).
45. Järvekülg R. jt. Eesti meriforelli kudejõgede taastootmispotentsiaali hindamine. Töövõtulepingu nr 4-1.1/14/299 aruanne (2015).
46. Rohtla M. jt. MERIFORELLI SAAKIDE PÄRITOLULINE STRUKTUUR EESTI RANNIKUMERES (Euroopa Merendus- ja Kalandusfondi rakenduskava 2014-2020 meetme 1.3 "Teadlaste ja kalurite koostöötoetus" lõpparuanne“ (2019).
47. Armulik, T ja Sirp, S. (2019). Eesti kalamajandus 2018. Kalanduse teabekeskus.