



Loppuraportti 29.3.2011

R.RUTTO! TÄNNE EI OLE ASIAA!

Rapuruton torjunta ravunviljelylaitoksen vesityksessä

Pohjois-Savon ELY –keskuksen rahoittama hanke
Pvm 20.8.2010 Dnro 2010/3561/2008 Hankenro 0822017

Tämä työ on omistettu haapavetisen ravunviljelijän ja elämäntaiteilijan Eino Sepän muistolle



Japo Jussila, Jenny Makkonen ja Harri Kokko

Biotieteiden laitos, Itä-Suomen yliopisto ja Raputietokeskus

SISÄLTÖ

1	YHTEENVETO	3
2	JOHDANTO.....	3
3	MENETELMIEN KUVAUS	3
3.1	Yleiset koejärjestelyt	3
3.2	Ravut.....	3
3.3	Rapurutto.....	4
3.4	Rapuruttoitoiden tuottaminen	4
3.5	Rapuruttoitoiden käsittelyt	4
3.6	Altistusjärjestelmä	4
3.7	Altistusolosuhteet.....	5
3.8	PCR –analyysit.....	5
3.9	Desinfioidussa tarvittava PAA-pitoisuus.....	6
4	TYÖT JA TULOKSET	6
4.1	Suodatus	6
4.2	Peretikkahappo.....	7
4.2.1	Desinfioidussa tarvittava PAA -pitoisuus.....	7
4.2.2	PAA –käsittely desinfiointimenetelmänä	8
4.3	Peretikkahapon vaikutus veteen ja rapuihin.....	9
4.3.1	Koejärjestelyt.....	9
4.3.2	PAA –käsittely ja veden pH muutokset	9
4.3.3	PAA-käsittely ja jokiravut.....	11
4.4	Altistusryhmien jokirapujen PCR –analyysit.....	11
5	TULOVESITYKSEN PUHDISTUSMALLI	11
6	HANKKEEN YLLÄTTÄVÄT OPETUKSET	12

1 YHTEENVETO

Tämän hankkeen tarkoituksena oli kehittää ja testata peretikkahapon (PAA) käyttöön ja mekaaniseen suodatukseen perustuvia menetelmiä rapuruttoitoiden torjunnassa. Molemmilla testatuilla menetelmillä, absoluuttisella suodattimella (5 µm) ja peretikkahappokäsittelyllä voitiin poistaa tai tuhota infektiota levittävät itiöt vedestä. Rapuruttoitiot tappava PAA –pitoisuus oli mikrobiologisissa kokeissa 10 ppm ja rapuruttoaltistuskokeessa todettiin että tämä pitoisuus tuhoaa infektiiviset rapuruttoitiot.

Rapurutolle (Psi –tyyppi) altistetussa positiivikontrolleissa jokirapujen kuolleisuus oli ensimmäisessä sarjassa 100 % (17 vrk:n kuluttua) ja toisessa sarjassa 89 % (45 vrk:n kuluttua). Jokirapujen elossasäilyvyys oli PAA –käsittelyryhmässä samansuuruinen kuin altistamattomassa negatiivikontrolliryhmässä. Desinfiointiin tarvittava PAA –pitoisuus, 10 ppm, ei nostanut jokirapujen kuolleisuutta, jos viive ennen desinfioidun veden lisäämistä jokirapujen elinympäristöön oli pidempi kuin neljä tuntia. PAA –liuoksen lisääminen jokiravun elinympäristöön laski veden happamuutta noin 0.5 pH –yksikköä puolen tunnin aikana, mikäli viive PAA –käsittelyn veden lisäämisessä oli pidempi kuin yksi tunti ei PAA:n vaikutus veden happamuuteen ollut merkittävä.

2 JOHDANTO

Ravunviljelylaitoksia on perinteisesti neuvottu ottamaan tulovesityksen pohjavedestä rapurutoriskin minimoimiseksi, mikä on rajoittanut sekä laitosten sijoittumista että kokoa. Pintaveden käyttö on voinut olla mahdollinen vain jos käytössä on ollut hiekkasuodatin. Myös kalanviljelylaitoksilla on tarvetta veden puhdistamiseen taudinaiheuttajista, erityisesti istukkaiden kuljetukseen käytetyn veden osalta. Muutkin kalanviljelyyn liittyvät rutiinit hyötyvät kehittyneistä desinfiointimenetelmistä.

Tämän hankkeen tarkoituksena oli kehittää ja testata peretikkahapon (PAA) käyttöön ja mekaaniseen suodatukseen perustuvia menetelmiä erityisesti ravunviljelylaitosten, mutta myös kalanviljelylaitosten, tarpeisiin. Molemmat menetelmät osoittautuivat menestyksekkäiksi rapuruttoitoiden torjunnassa. Tässä raportissa esittelemme hankkeen tulokset ja periaatteen molempien menetelmien käytännön sovelluksesta.

Hankkeella oli EKTR –rahoitus, jonka myönsi Pohjois-Savon ELY –keskus vuonna 2008. Hankkeen käytännön työt tehtiin vuosina 2009-10.

3 MENETELMIEN KUVAUS

3.1 Yleiset koejärjestelyt

Kokeet tehtiin Itä-Suomen yliopiston Biotieteiden laitoksella, Kuopiossa. Jokiravut altistettiin rapuruttoitioille erityisesti tätä varten rakennetussa infektiolaboratoriossa ja kokeen kesto määräytyi jokirapujen kuolevuuden mukaan. Altistuksissa oli kolme eri jokirapu ryhmää: rapuruttoitioille altistetut, rapuruttoitoiden desinfiointikäsittely ja altistamaton puhdas kontrolli. Tarkoituksena oli seurata altistuslaboratoriossa rapujen selviämistä niin kauan, että rapurutolle altistetun ryhmän ravut olivat kuolleet. Kokeen ensimmäisen vaiheen jälkeen (kaikki rapurutolle altistetut kontrolliryhmän jokiravut olivat kuolleet), jokiravut siirrettiin kalatutkimusyksikköön jälkiseurantaan, jossa seurattiin päivittäin jokirapujen kuolevuutta sekä rapuruton mahdollisesti aiheuttamaa oirehtimista (selkäkilven rapsuttelu ja muu poikkeava käyttäytyminen).

3.2 Ravut

Tutkimuksessa käytettiin kolmea jokirapukantaa: luonnonkanta Rytken järvestä sekä viljellyt kannat YLämsä; Yrjö Lämsä, Kiuruvesi ja ESeppä; Eino Seppä, Haapajärvi. Ravut olivat sukukypsiä, kooltaan 7-10

cm. Rapuja säilytettiin ISY:n kalatutkimusyksikössä altistusten välisenä aikana eristyksessä, kukin populaatio ja altistusryhmä erillään.

3.3 Rapurutto

Tutkimuksen rapuruttoaltistuksissa käytettiin Karjalohjan Puujärven täpläravuista vuonna 2003 eristettyä Psi-tyyppin rapuruttoa (UEF8866-2), jota on ylläpidetty ISY:n Biotieteiden laitoksella. Tämä rapuruttokanta on kokeissa todettu erittäin virulentiksi ja jokirapujen kuolevuus on yleensä alkanut viikon kuluessa ja johtanut koko altistusryhmän kuolemaan kahden viikon kuluessa altistuksen aloittamisesta.

3.4 Rapuruttoitiöiden tuottaminen

Rapuruttoitiöiden tuottamista varten PG1 –maljalta leikattiin rihmasto kolme halkaisijaltaan n. 4mm² palaa PG1 –kasvatusliuokseen (45ml kasvatusliuosta 50ml:n sterilissä muoviputkessa). Kasvatuksia tehtiin yhtä koetta varten 24 kpl, jotta käytetty itiömäärä saatiin mahdollisimman suureksi. Rihmasto kasvatettiin huoneenlämmössä (+20±2°C) viikon ajan. Tämän jälkeen rihmasto poistettiin putkesta ja leikattiin petrimaljalla palasiksi. Leikattu rihmasto siirrettiin 250mln erlenmeyer-pulloon, jossa oli 150ml PG1-kasvatusliuosta ja kasvatusta jatkettiin huoneenlämmössä vielä toinen viikko.

Kasvatettu rihmasto eristettiin ja siirrettiin kasvatusliuoksesta steriiliin sideharson ja suppilon avulla 1L erlenmeyer-pulloon, jossa 800ml steriloitua järvivettä (suodatettu ja autoklavoitu, Kallaveden vesi). Rihmasto inkuboitiin ravistelijassa huoneenlämmössä 1 tunnin ajan. Järvivesi vaihdettiin tunnin välein yhteensä neljä kertaa (inkubaatio kuten edellä). Tämän jälkeen rihmasto jätettiin neljanteen huuhteluveteen (20h inkubaatio ravistelijassa, +18°C). Tämän jälkeen rihmastot suodatettiin pois ja itiöliuokset yhdistettiin yhteen astiaan ja itiöpitoisuus arvioitiin liuoksesta Bürkerin laskentakammion avulla. Rapurutolle altistetun kontrolliryhmän altistusjärjestelmässä lopullinen rapuruttoitiöpitoisuus oli suodatuskokeessa 1200 itiötä mL⁻¹ ja PAA-kokeessa 2 000 itiötä mL⁻¹.

3.5 Rapuruttoitiöiden käsittelyt

Suodatusryhmän rapuruttoitiöillä rikastettu vesi (9L) suodatettiin 5µm absoluuttisella suodattimella (Pleatflow II, valmistaja Dominic Hunter Technologies Ltd.) ennen veden lisäystä altistusjärjestelmään. Kontrolliryhmän altistusjärjestelmään lisättiin 9L steriloitua järvivettä, joka oli käsitelty rapuruttoitiön lisäystä lukuunottamatta samalla tavalla kuin altistusryhmän vesilisäys.

Peretikkahappokokeessa rapuruttoitiöillä rikastettu vesi (9L) käsiteltiin 10ppm PAA-liuoksella tunnin ajan ja reaktion lopettamiseksi liuokseen lisättiin katalaasientsyymiä ja ilmastus ennen veden lisäystä 24 tunnin viiveellä altistusjärjestelmään. Kontrolliryhmän altistusjärjestelmään lisättiin 9L steriloitua järvivettä, joka oli käsitelty rapuruttoitiön lisäystä lukuunottamatta samalla tavalla kuin altistusryhmän vesilisäys.

Altistuskokeiden alkaessa, juuri ennen vesilisäystä altistuskammioihin, altaiden vedenkierto pysäytettiin n. 16h ajaksi, jotta rapuruttoitiöt ehtivät lähteä vesilisäyksen jälkeen uudestaan uimaan ja hakeutumaan rapujen luo siirrosta ja tärinästä aiheutuneen kapseloitumisen jälkeen.

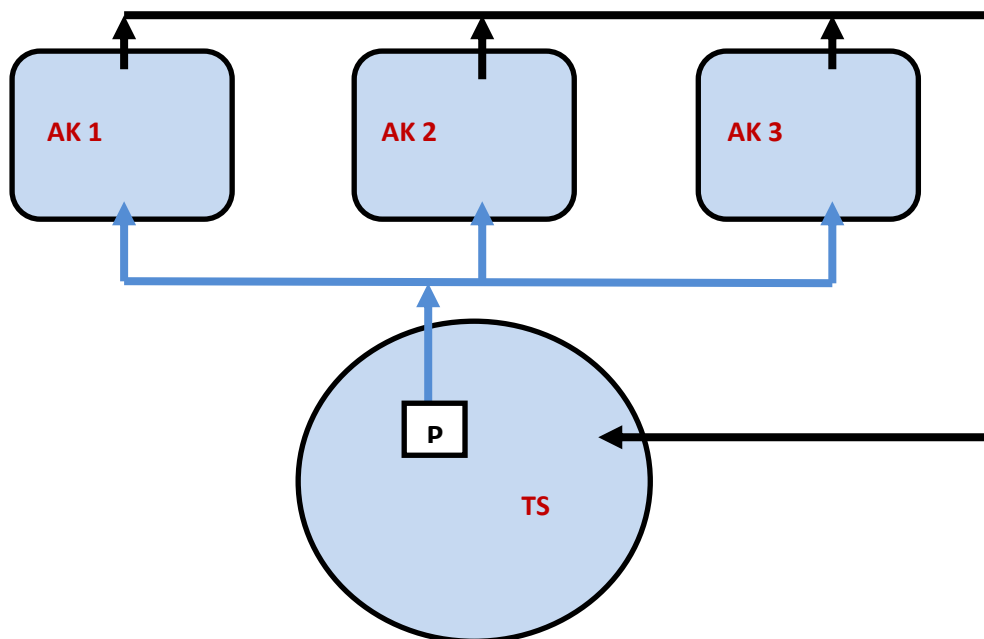
3.6 Altistusjärjestelmä

Altistuskokeet tehtiin erityisessä rapuruttoaltistukseen suunnitellussa laboratoriossa (RapuLatorio) vuosina 2009 ja 2010. Allasjärjestelmissä on kolme altistuskammiota (8L) yhdistettynä tasaussaaviin (30L), jossa ilmastus ja pumppu. Allasjärjestelmän vedenkierto on jatkuva (0,75L/min kukin altistuskammio), mutta kukin kolmesta altistuskammioista voidaan eristää järjestelmästä (kuva 1). Näitä allasjärjestelmiä oli käytössä kaikkiaan yhdeksän.

Sekä altistuskammioissa että tasaussaavissa oli tiivis kansi altistusten aikana. Kussakin altistusjärjestelmässä oli omat erilliset työvälineet, jotta ruttoitiöiden siirtymä voitiin välttää.

Jokainen altistuskammio on jaettu reiällisellä muoviverkolla neljään osastoon, joihin voidaan sijoittaa neljä rapua ja yhteen osajärjestelmän osaan siten 12 rapua. Tässä kokeessa kutakin eri altistusta varten oli kolme osajärjestelmää. Koemallina oli siis 3 allasjärjestelmää x 12 jokirapua = 36 jokirapua per altistus. Tällä järjestelyllä saatiin tilastollisesti ja tutkimuksellisesti riittävä määrä erilaisia altistuksia sekä toistoja.

Altistusjärjestelmät tarkistettiin vähintään kerran vuorokaudessa (ma-pe vähintään 2x, la-su vähintään 1x) ja havainnot kirjattiin. Kuolleet jokiravut poistettiin ja tilanne kirjattiin siten yleensä alle 12 tunnin kuluessa, viikonloppuisin vuorokauden kuluessa. Rapujen kuoltua ne pakastettiin yksittäin minigrip-pusseihin myöhempiä PCR-analyseja varten.



Kuva 1. RapuLatorion allasjärjestelmä. AK1, 2 ja 3 ovat altistuskammiot (8L), P on pumppu, siniset nuolet kuvaavat vesikiertoa (TS) tasaussaavista (30L) altistuskammioihin, mustat nuolet kuvaavat vesikiertoa altistuskammioista tasaussaaviin.

3.7 Altistusolosuhteet

Altistusten aikana altistusjärjestelmässä oli jatkuva vedenkierto. Altistusten aikana seurattiin säännöllisesti veden lämpötilaa, happipitoisuutta ja veden pH:ta. Altistusjärjestelmän veden lämpötila pysyi vakiona ilman lämpötilan mukaisesti ja vaihteli kokeiden aikana +16,5 – 17,5°C välillä. Altistusjärjestelmän veden happipitoisuus oli hyvä ja hapen kyllästys oli yli 70% altistusten aikana.

3.8 PCR –analyysit

Ravuista leikattiin kudospätkiksi kolme palaa pyrstön kärjestä (kaksi uropodia ja telson = pyrstönäyte) tai jalkanivelestä (jalkanäyte). Kudospalat hajotettiin FastPrep -laitteessa keraamisen kuulun ja steriilin hiekan kanssa (ravistelu 2x 30 s täydellä teholla). DNA eristettiin hienonetusta kudoksesta DNA E.Z.N.A. Insect DNA Isolation kitillä (Omega Bio-Tek). Eristetyn DNA:n määrä ja laatu mitattiin NanoDrop –spektrofotometrillä (Thermo Fisher Scientific). PCR-reaktioon pipetoitiin 1 ng näyte-DNA:ta, 2 mM

magnesiumkloridia, 1 mM dNTP-seosta, 1 U Maxima Hot Start *Taq* PCR-entsyymiä, 1x määrä Maxima Hot Start *Taq* PCR -puskuria (Fermentas) ja 10 pM molempia alukkeita (AAF: 5'- ATG TTC TTC GGG ACG ACC -3' ja AAR: 5'-GAC GGC TAA GTT TAT CAG TAT GTT -3'), jotka monistavat n. 100 emäsparin mittaista PCR-tuotetta rapuruton ITS1-alueelta. Reaktioseos täydennettiin 25 µl:n tilavuuteen steriilillä vedellä ja näytteet siirrettiin PCR-laitteeseen (PTC-200, MJ Research), jossa ohjelma oli 95 °C 4 min, 35x (95 °C 30 s, 54 °C 60 s, 72 °C 90 s) ja 72 °C 7 min. PCR-reaktion jälkeen näytteet ajettiin ja analysoitiin agarosigeelielektroforeesilla (1,5 % geeli, 0,5 µg/ml EtBr), näin tarkistettiin mahdollinen rapurutto spesifinen 100 ep:n kokoisen monistustuotteen olemassaolo, joka merkitsi rapurutto-DNA:n läsnäoloa kyseisessä näytteessä.

3.9 Desinfioinnissa tarvittava PAA-pitoisuus

Peretikkahapon (PAA) tehokkuus rapuruton torjunnassa testattiin rapuruttoitiöihin ensin laboratorioissa sekä neste- että maljaviljelyssä. Laboratoriokokeissa testatut pitoisuudet: 0.01, 0.1, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 ja 10.0 mg/l PAA:ta. Laboratoriotestejä varten rapuruttorihmasto leikattiin yksi n. 4 mm² halkaisijaltaan oleva pala 2 mlaan PG1 -kasvatusliuosta 12 -kuoppalevyllä. Rihmaston annettiin kasvaa huoneenlämmössä (+20±2°C) 3 vrk. Tämän jälkeen rihmasto huuhdeltiin neljä kertaa 2mllla steriloitua järvivettä ja jätettiin viimeiseen huuhteluveteen. Saavutettu itiöpitoisuus määritettiin seuraavana päivänä Bürkerin laskentakammioilla.

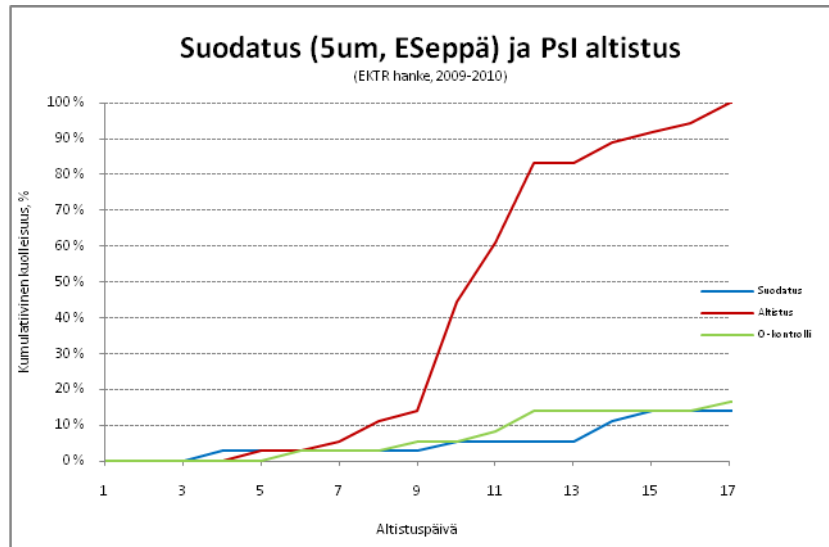
Itiöitä käsiteltiin eri pitoisuuksilla PAA:ta yhden tunnin ajan. Käsittelyt tehtiin 12-kuoppalevyllä 2.0 ml:n tilavuudessa. Käsittelyajan jälkeen jokaisesta kuopasta pipetoitiin 0,5 ml käsiteltyä itiöliuosta kolmelle rinnakkaiselle PG1-maljalle, neste levitettiin maljan pinnalle mahdollisimman tasaisesti. Laskennallisesti jokaiselle maljalle pipetoitiin tässä kokeessa 69 000 rapuruttoitiötä. Loppuosaa käsittelystä itiöliuoksesta seuranttiin mahdollisten uimaitiöiden varalta. Kontrolleina kokeessa oli negatiivikontrolli, jossa itiöitä keitettiin + 100 °C, 1 min ja positiivikontrolli, jossa maljattiin käsittelemättömiä itiöitä. Maljoja seurattiin päivittäin 16 vrk:n ajan ja itäneiden itiöiden määrä maljoilla laskettiin.

Toinen koesarja toteutettiin lähes vastaavalla koejärjestelyllä, lukuunottamatta sitä että tässä kokeessa PAA-käsittely pysäytettiin lisäämällä kuoppalevyn kuoppiin 10-kertaista PG1-kasvatusliuosta. Käsittelyt ja sen jälkeiset kasvatukset ja seuranta tehtiin kahdessa rinnakkaisessa kuoppalevyn kuopassa. Tässä kokeessa yhdessä kuoppalevyn kuopassa oli laskennallisesti 348 000 itiötä, joiden itämistä seurattiin 19 vrk:n ajan.

4 TYÖT JA TULOKSET

4.1 Suodatus

Mekaaninen 5µm suodatus poisti vedestä kaikki infektiokykyiset rapuruttoitiöt ja itiöillä rikastetulle suodatetulle vedelle altistetut ESeppä kannan jokiravut selvisivät 17vrkn altistusajasta hengissä yhtä hyvin kuin kontrolliryhmän jokiravut (kuva 2). Tässä kokeessa kaikki Psi -tyypin rapurutolle altistetut jokiravut kuolivat. Altistusryhmän kuolleisuus alkoi viidennen altispäivän jälkeen ja nousi jyrkästi reilun viikon kuluttua altistuksen aloittamisesta. Ero altistetun ryhmän ja suodatus sekä kontrolliryhmän elossasäilyvyyden välillä on tilastollisesti merkitsevä (Mantell-Cox, $p < 0.001$). Suodatusryhmän elossasäilyvyys oli yhtä hyvä kuin negatiivikontrolliryhmän.



Kuva 2. Suodatuskokeen jokirapuryhmien kuolevuus altistuksen aikana. Kokeessa käytettiin ESeppä jokirapuja. Ryhmien selitykset: Absoluuttinen suodatus (5µm); Altistus, vedessä rapuruttoitaitä; O – kontrolli, puhdasta luonnonvettä.

Altistuskokeen jälkeen jokiravut siirrettiin ISY:n kalantutkimusyksikköön, talvisiin oloihin (luonnon valorytmi ja vedenlämpö noin +6°C) 18.11.2009. Kumpikin tutkimusryhmä, altistetut ja kontrolli, pidettiin erillään omilla altaissaan. Elossäilyvyys tämän talvisäilytyksen aikana on yhdeksän viikon jälkeen suodatusryhmän ravuilla 81 % ja kontrolliravuilla 71 % (taulukko 1).

Taulukko 1. Suodatuskokeen jälkeen rapujen kuolevuus talvioloja mukailevan säilytyksen aikana.

	7 vko	9 vko
Suodatusryhmän ravut	16 %	19 %
Kontrolliryhmän ravut	24 %	29 %

4.2 Peretikkahappo

4.2.1 Desinfioidussa tarvittava PAA -pitoisuus

Peretikkahapon (PAA) tehokkuus rapuruton torjunnassa testattiin ensin laboratorioissa sekä neste- että maljaviljelyssä. Laboratoriokokeissa mitattiin eri PAA –pitoisuuksien vaikutusta rapuruton kasvuun ja itämisen alkamisen alkamisajankohtaan.

Mikrobiologisissa testeissä todettiin, että 10 ppm PAA –pitoisuus estää rapuruton itämisen sekä neste- että maljakasvatuksissa (taulukko 2). Jo 2 ppmn PAA –pitoisuus pidensi rapuruton itämisaikaa maljoilla (ero tilastollisesti merkitsevä, Mann-Whitney, $p < 0.05$). Nestekasvatuksessa itämisaika pidentyi vasta PAA –pitoisuudella 6 ppm, joten näiden tuloksen perusteella valitsimme altistuskokeissa testattavaksi PAA –pitoisuudeksi 10 ppm.

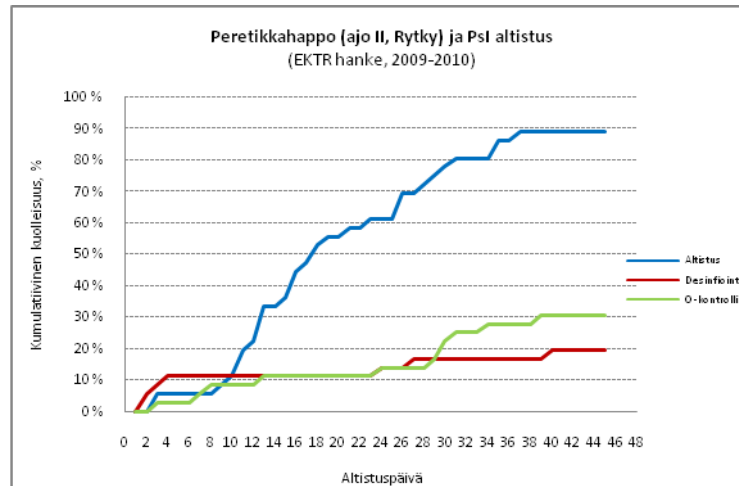
Taulukko 2. Peretikkahapon pitoisuuden vaikutus rapuruton itämisaikaan (vrk) nestekasvatuksessa ja maljoilla. A, B ja C ovat rinnakkaisia testejä. Positiivikontrollissa käsittelemättömiä rapuruttoitiötä, negatiivikontrollissa itiötä lämmitetty 100 °C minuutin ajan.

PAA –pitoisuus (mg/l)	Itämisaika (vrk)				
	Nestekasvatus		Maljat		
	A	B	A	B	C
Positiivinen kontrolli	1	1	1	1	1
0,01	1	1	1	1	1
0,1	1	1	1	1	1
1,0	1	1	1	1	1
2,0	1	1	5	5	5
4,0	1	1	6	—	6
6,0	5	19	5	—	5
8,0	—	—	12	—	—
10,0	—	—	—	—	—
Negatiivinen kontrolli	—	—	—	—	—

4.2.2 PAA –käsittely desinfiointimenetelmänä

Altistuskokeessa peretikkahapolla käsitellyille rapuruttoitiöille altistettujen jokirapujen kuolleisuus oli hieman alhaisempi kuin kontrolliryhmän jokirapujen (kuva 3). Ero kuolevuudessa tulee esille erityisesti kolmen viikon jälkeen. Altistuskokeessa kuoli 89 % Psi –tyypin rapurutolle altistetuista jokiravuista 47 vrkn aikana. Kuolevuus alkoi altistusryhmässä noin viikon kuluttua altistuskokeen aloittamisesta ja jatkui hitaan tasaisena koko kokeen 47 vrkn keston ajan. Ero altistetun ryhmän ja PAA-käsittelyn sekä kontrolliryhmän elossa säilyvyyden välillä on tilastollisesti merkitsevä (Mantell-Cox, $p < 0.001$). PAA-käsittelyn ryhmän elossa säilyvyys oli paras.

Heti altistuskokeen aluksi kuoli muutama jokirapu kustakin koeryhmästä. Sekä PAA-käsittelyryhmässä että kontrolliryhmässä alkoi kuolevuus lisääntyä hieman reilun kolmen viikon koejakson jälkeen ja erityisesti kontrolliryhmän kuolevuuden lisääntyminen on pantava merkille.



Kuva 3. Peretikkahappokokeen (PAA) jokirapujen kuolevuus altistuksen aikana. Kokeessa käytettiin Rytkyen jokirapuja. Ryhmien selitykset: Desinfiointi: PAA-käsittely (10 PPM); Altistus, vedessä rapuruttoitioita; O – kontrolli, suodatettua luonnonvettä.

Altistuskokeen jälkeen jokiravut siirrettiin ISY:n kalantutkimusyksikköön, talvisiin oloihin (luonnon valorytmi ja vedenlämpö noin +6°C) 11.1.2010. Kumpikin tutkimusryhmä, PAA -ryhmä ja kontrolli, pidettiin erillään omilla altaissaan. Elossasäilyvyys tämän talvisäilytyksen aikana on yhdeksän viikon jälkeen PAA –ryhmän ravuilla 96% ja kontrolliravuilla 88% (taulukko 3). PAA –ryhmän jokirapujen elossasäilyvyys oli selvästi korkeampi, ero 8%, kuin kontrolliryhmän jokiravuilla. Samansuuntainen ero havaittiin jo altistuskokeen aikana.

Taulukko 3. PAA –käsittelyn jälkeen rapujen kuolevuus talvioloja mukailevan säilytyksen aikana.

	9 vko
PAA –käsittelyryhmän ravut	4%
Kontrolliryhmän ravut	12%

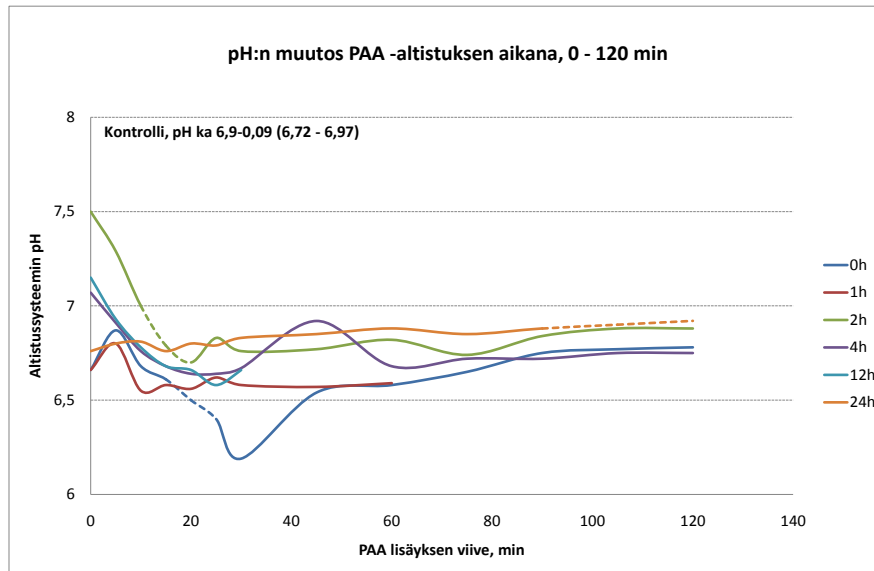
4.3 Peretikkahapon vaikutus veteen ja rapuihin

4.3.1 Koejärjestelyt

Testasimme PAA –liuoksen (10 ppm) vaikutusta veden happamuuteen (pH) altistuskammiossa lisäämällä PAA:ta eri allasjärjestelmän alasaaveihin ja käynnistämällä pumpput eri aikaviiveellä (0, 1, 2, 4, 12, 24 tuntia). Altistuskammion veden pH mitattiin ensimmäisen puolen tunnin (0 – 30 minuuttia) aikana 5 minuutin välein, seuraavan tunnin aikana (30 – 90 minuuttia) 15 minuutin välein ja kahden tunnin kohdalla. Tämän jälkeen veden pH:ta mitattiin päivittäin kahden viikon ajan. Jokirapujen käyttäytymistä ja kuolevuutta seurattiin päivittäin kahden viikon ajan.

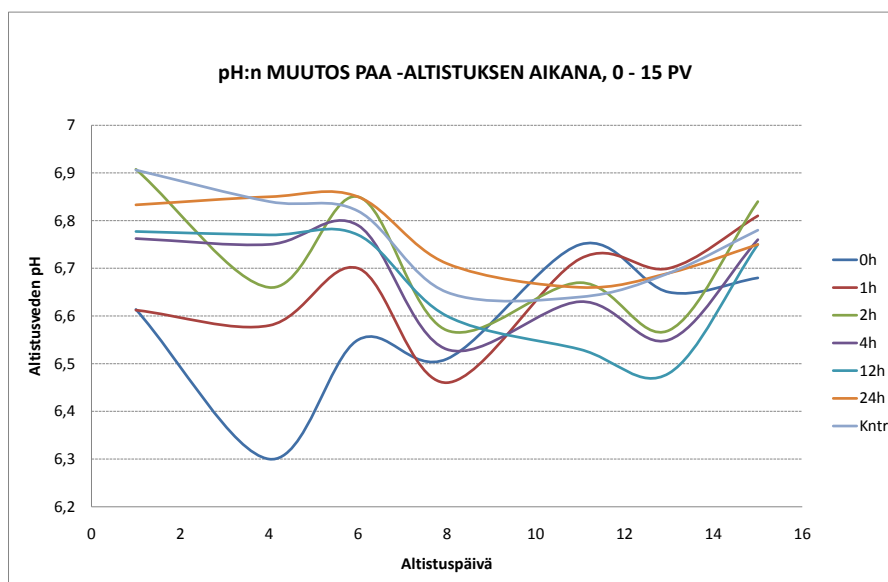
4.3.2 PAA –käsittely ja veden pH muutokset

Ensimmäisen kahden tunnin aikana veden happamuus laski keskimäärin yhden pH yksikön 2, 4 ja 12 tunnin viiveryhmissä ja noin puoli pH –astetta 0, 1 ja 24 tunnin ryhmissä ensimmäisten 20 minuutin aikana (kuva 4). Tämän jälkeen jokaisen ryhmän veden pH asettui 6.6 – 6.9 välillä ja vaihtelu oli vain vähäistä. Kontrolliryhmän veden pH vaihteli välillä 6,72 – 6,97.



Kuva 4. PAA –liuoksen (10 ppm), vaikutus veden happamuuteen lisäystä seuraavien 120 minuutin aikana eri lisäysviiveillä.

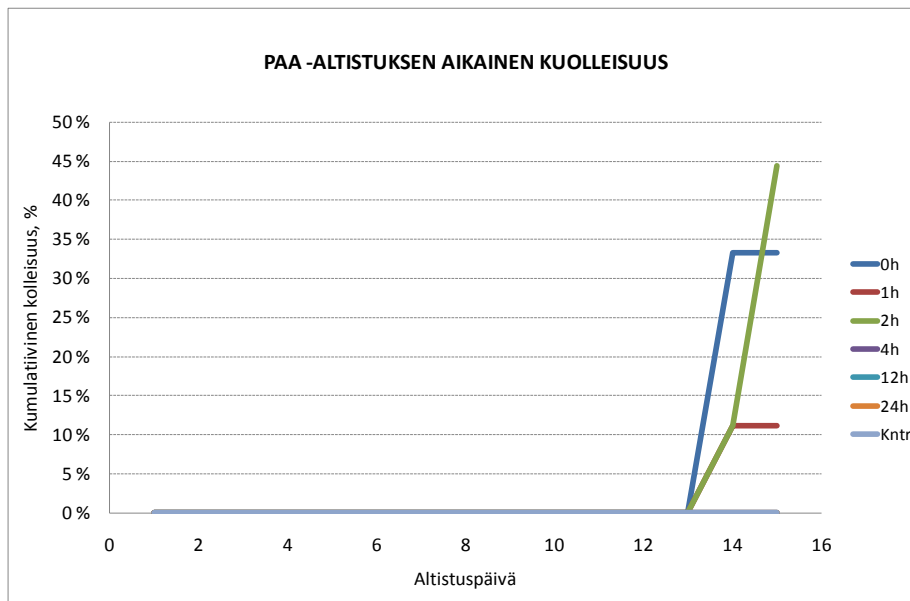
Altistusryhmien veden pH vaihteli kahden viikon aikana 6.3 – 6,9 siten, että vuorokautinen pH vaihtelu oli suurimmillaan hieman runsaat 0,1 pH astetta (kuva 5). Happamuuden vaihtelu oli samankaltaisessa rytmissä kaikissa altistusryhmissä, myös kontrolliryhmässä. Syytä vaihteluun ei selvitetty, mutta se lienee altistusjärjestelmään syntyneen yksinkertaisen ekosysteemin tuottaman vaihtelun ja käytetyn mittausjärjestelmän yhteisvaikutusta.



Kuva 5. PAA –liuoksen (10 ppm), vaikutus veden hapamuuteen lisäystä seuraavien 14 vuorokauden aikana eri lisäysviivein.

4.3.3 PAA-käsittely ja jokiravut

Jokiravut selvisivät hengissä kahden viikon ajan PAA –lisäyksestä, kun viive PAA –käsittelyn veden lisäämisessä oli vähintään neljä tuntia (kuva 6). Kuolleisuus lisääntyi 0, 1 ja 2 tunnin altistusryhmissä 13 vuorokauden kohdalla ja saavutti 40 % tason (kahden tunnin viiveen altistusryhmä). Tämän perusteella näyttää siltä, että yli neljän tunnin viive riittää PAA:n biologiseen hajoamiseen ja sen myrkyllisyyden häviämiseen. Tämän lisäksi on todettava, että esikokeessa totesimme täpläravun (n=1) kestävänsä suoran 10 ppm PAA-lisäyksen ilman merkittäviä oireita tai kuolevuutta.



Kuva 6. PAA-liuoksen (10 ppm), vaikutus jokirapujen kuolleisuuteen lisäystä seuraavien 14 vuorokauden aikana. Eri tuntimäärät kuvaavat peretikkahappokäsittelyn jälkeistä viivettä ennen käsitellyn veden laskemista rapualtaisiin.

4.4 Altistusryhmien jokirapujen PCR –analyysit

Jokaisen altistusryhmän jokiravuilta otettiin kudospätkät altistuksen jälkeen rapuruttostatuksen tarkistamiseksi. Kaikki desinfiointiryhmien (5µm suodatus ja PAA –ryhmä) sekä kontrolliryhmien kuolleet jokiravut tutkittiin ja rapurutolle altistetusta ryhmästä otettiin 10 jokiravun otos.

PCR –analyysin perusteella sekä desinfiointiryhmien että kontrolliryhmien altistuksen aikana kuolleet jokiravut eivät olleet rapuruton infektoimia kummassakin altistuskokeessa, toisin sanoen ne kuolivat muista syistä kuin rapuruttoinfektion vuoksi. Rapurutolle altitetuista jokiravuista todettiin 5µm suodatuskokeessa 80% ja PAA-käsittelyssä 90% rapuruttoinfektio. Myöhemmin nämä näytesarjat analysoitiin myös kvantitatiivisella PCR-menetelmällä, jolla infektiota todettiin 100 %ssa rapurutolle altitetun ryhmän rapuja.

5 TULOVESITYKSEN PUHDISTUSMALLI

Vesiviljelylaitosten tulovesityksen desinfiointi onnistuu menetelmillä, joissa

1. käytetään peretikkahappoa (PAA) pitoisuudella 10 ppm ja viipymä desinfiointialtaassa tai -lammikossa on noin vuorokausi.
2. käytetään hiukkassuodatinta joka suodattaa vedestä 5µm suuremmat partikkelit. Kyseeseen voi tulla vaihdettavalla suodattimella varustettu järjestelmä tai tangentialisuodatin, jota huuhdellaan

tasaisin väliajoin. Suodatusjärjestelmä vaatii veden esisuodatuksen, karkea suodatus noin 1000 µm sekä hienempi 50 – 100 µm, yhdistelmänä, jotta suodatus voi olla jatkuvaa ja tehokasta.

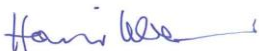
3. veden desinfiointia voi suositella myös istukasten kuljetusveden käsittelyyn, sillä erityisesti kalanistukkaiden mukana voi siirtyä myös taudinaiheuttajia. Erityisen varovainen on syytä olla, mikäli samassa vesistössä on täplärapuja tai rapuruton siirtämisen riski on olemassa.

6 HANKKEEN YLLÄTTÄVÄT OPETUKSET

PAA –altistuskokeessa Psl –tyypin rapurutolle altistetuista jokiravuista 11,1% (4 jokirapua 36:sta) selvisi altistuksesta. Jokiravut olivat altistussysteemissä noin 7 viikkoa, jonka jälkeen erilaisissa stressaavissa oloissa vaihtelevassa lämpötilassa usean kuukauden ajan, sillä jo aiemmin esitellyn talvikauden jälkeen nämä ravut tuotiin vielä lämpimään jatkoaltistukseen (vrt. kappale 4.2.2). On ilmeistä, että nämä yksilöt kestivät Psl –tyypin rapuruttoaltistuksen. Jokirapujen rapuruton kestävyyttä on syytä tarkastella lähemmin, niin kuin jo tehdään muutamassa kotimaisessa hankkeessa (ISY ja Evira).

Itä-Suomen yliopistossa käytössä oleva altistusjärjestelmä, jossa ympäristössä tämäkin tutkimus on tehty, on osoittautunut menestyksekkääksi erilaisissa rapuruttotutkimuksissa. Järjestelmä on vapaasti kopioitavissa muihin vastaaviin tutkimuksiin ja tutkimuslaitoksiin.

Kuopio, 29.3.11



Harri Kokko

hankkeen vastuullinen johtaja



Japo Jussila

rapututkija