

**EKTR –hanke, Dnro 2436/3561/09 (30.3.2010)
loppuraportti, työt ja tulokset**

ULTRAÄÄNI vs. TAUDINAIHEUTTAJA

Taudinaiheuttajien inaktivaatio ultraäänilaitteella vesiviljelyssä



Kuopio, torstai, 16. elokuuta 2012

Japo Jussila, Jouni Heikkinen, Harri Kokko, Jenny Makkonen, Biotieteiden laitos (Itä-Suomen yliopisto)

Tero Karjalainen ja Jarkko Leskinen, Fysiikan laitos (Itä-Suomen yliopisto)

Yrjö Lankinen, Savon Taimen Oy



Sisällysluettelo

Johdanto ja tiivistelmä	2
1 Työt	2
1.1 LG Sound ultraäänilaite.....	2
1.2 Ultraäänikokeet fysiikan laitoksella	3
1.2.1 Ultraäänianturi.....	3
1.2.2 Ultraäänikäsittelyt.....	3
1.3 Peretikkahappo (PAA) ja vesihome.....	4
2 Tulokset.....	4
2.1 LG Sound ultraäänilaite.....	4
2.2 Ultraäänikokeet fysiikan laitoksella	4
2.3 Peretikkahappo (PAA) ja vesihome.....	5
3 Aikataulu	5
4 Pohdinta.....	6

Johdanto ja tiivistelmä

Pohjois-Savon ELY päätöksellä dnro 2436/3561/09 (30.3.2010) rahoitettu hanke *Ultraääni vs. Taudinaiheuttaja – Ultraääni taudinaiheuttajien inaktiiviossa* kalanviljelyssä saatettiin monenkirjavien vaiheiden jälkeen loppuun kesällä 2012. Hankkeen aikana testattiin alkuperäisen idean mukaisesti LG Sound ultraäänilaitetta käytännön mädinhautontatilanteessa, jonka lisäksi testattiin myös peretikkahapon vaikutusta vesihomeen itiön itämiseen sekä selvitettiin muiden kuin LG Sound kokeessa käytettyjen ultraääniasetusten vaikutusta vesihomeen itiön tarttumiskykyyn ja itiöimiseen yhteistyössä Itä-Suomen yliopiston fysiikan laitoksen kanssa.

Hankkeen töiden perusteella voitiin päätellä, että LG Sound ultraäänilaitte ei suojaa kirjolohen mädinhautontaa keinollisissa olosuhteissa vesihomeinfektiota vastaan. Saimme kuitenkin jatkokokeissa selvitettyä, että ultraäänellä on pientä estovaikutusta vesihomeinfektion kehittymiseen. Myös peretikkahappoa (PAA) voidaan käyttää vesihomeen torjunnassa samantapaisesti kuin olemme jo aiemmin todenneet peretikkahapon inaktivoivan rapuruton.

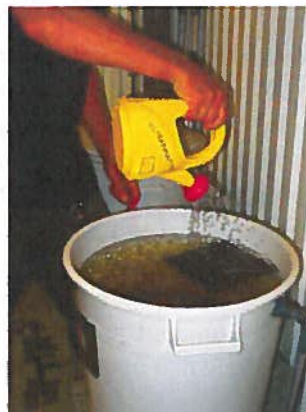
Seuraavassa esittelemme hankkeen aikana tehdyt työt, niiden tulokset sekä pohdimme tulosten suoria sovelluksia ja mahdollisuuksia kehittää testattuja menetelmiä edelleen.

1 Työt

1.1 LG Sound ultraäänilaitte

LG Sound ultraäänilaitetta (LG Sonic® XXL_{PLUS}, www.lgsonic.com) testattiin kahdessa mädinhautontakokeessa kirjolohen mädinhautontaan aikaisen vesihomeinfektion torjunnassa. Kokeet tehtiin Itä-Suomen yliopiston kalantutkimusyksikön hautontahuoneessa. Koe toistettiin kahdesti. Koejärjestely oli seuraava kummassakin kokeessa

1. Kokeessa oli kolme ryhmää: LG Sound, formaliini ja kontrolli
 - a. LG Sound ryhmälle annettiin jatkuvaa ultraäänikäsitelyä lukuunottamatta lyhyitä pauseja mätiasettien kuvauksen aikana.
 - b. Formaliiniryhmää kylvetettiin päivittäin 15 minuutin ajan 500 ppm pitoisuudella laskettuna saavin 18 l vesitilavuuteen. Kylvetyksen ajaksi vedenkierto oli suljettu. Formaliini annosteltiin varovasti erityisellä desinfiointiannostimella (kuva 1) valuttamalla veden pinnalla kelluvan reikälevyn päälle, mätää häiritsemättä.
 - c. Kontrolliryhmän mätää haudottiin ilman käsittelyä.
2. Kussakin käsittelyryhmässä mäti haudottiin neljällä aseptilla (100 cm²), joissa oli mätimunia korkeintaan yhdessä kerroksessa. Mätiasetit olivat 30 l vesisaavin pohjalle asetetun reikätasen päällä. Saaveissa oli tiiviit kannet päällä muulloin kuin käsittelyjen aikana (kuva 2).
3. Kuhunkin hautontasaaviin johdettiin erillinen vesitys pohjankautta yhteisestä vesilähteestä ja virtaus säädettiin samansuuruisiksi kullekin ryhmälle. Tuore vesi johdettiin saavin pohjalle, ylimääräinen vesi poistui ylivuotona saavin yläosasta. Vesi otettiin hiekkasuodattimen läpi Kallaveden Savilahdesta.



Kuva 1. Formaliinin annostelu verokkir ryhmän mädinhautontasaaviin.



Kuva 2. LG Sound ultraäänilaitte mädinhautontasaavissa.

Kokeen aikana seurattiin haudontaveden lämpötilaa, virtauksen määrää, mädin kehittymistä ja vesihomeinfektion kehittymistä. Kunkin käsittelyryhmän mätiasetit kuvattiin kahdesti viikossa vesihomeinfektion kehittymisen määrittämiseksi.

1.2 Ultraäänikokeet fysiikan laitoksella

1.2.1 Ultraäänianturi

Ultraäänianturi oli rakennettu kahdesta PZT-materiaalista (Ferroperm, Tanska) ympyränmuotoisesta, tasomaisesta ultraäänielementistä (elementtien halkaisija 25 mm). Anturielementtien sähköakustinen hyötysuhde ja tarvittavat akustiset ulostulotehot määritettiin ennen kokeita säteilypainemittauksen avulla. Ultraäänianturi oli upotettuna vesitankkiin, jonka veden lämpötila jäähdytettiin ja ylläpidettiin 15 ± 0.5 °C ulkoisen jäähdytynyksikön (Lauda RA120, Saksa) ja vesipumpun avulla. Sähköinen ajosignaali ultraäänielementeille tuotettiin erillisillä tietokoneohjatuilla aaltomuotogeneraattoreilla (Agilent 33120A, Yhdysvallat) sekä RF-vahvistimilla (ENI 240L, Yhdysvallat).

1.2.2 Ultraäänikäsittelyt

1.2.2.1 Vaikuttavan paineen ja aallonpituuden haarukointi

Itiösuspensio sijoitettiin nelikuoppaiselle solukasvatuslevylle vesitankissa olevaan erilliseen, ultraäänianturin yläpuolelle asetettuun telineeseen. Suspension määrä per kuoppa oli tarkalleen 5 ml. Osittain veteen upotetun kasvatuslevyn pohja oli reilusti kontaktissa vesitankin veden kanssa. Tällä varmistettiin maljan hyvä akustinen kytkeytyminen ja optimaalinen ultraäänien siirtyminen itiösuspensioon. Telineen avulla ultraäänikenttä myös saatiin keskitettyä tarkasti levyn kahteen, yhtäaikaaisesti käsiteltävään kohdekuoppaan. UÄ-anturin pinnan ja maljan pohjan välinen etäisyys oli noin 100 mm. Kontrollikasvustot kokivat vastaavat olosuhteet samassa vesitankissa kuin ultraäänikäsiteltävät kasvustot paitsi ultraäänialtistusta. Käsittelyn jälkeen levyt siirrettiin huoneenlämpöön odottamaan analyysia tai seuraava käsittelyä.

Ultraäänikäsittelyssä taajuutena oli 1.035 MHz. Kokeiden ensimmäisessä osassa ultraäänikäsittelyn kesto oli 5 minuuttia ja kutakin kasvustoa käsiteltiin kerran. Käsittelyjä tehtiin käyttäen useita eri pulssisekvenssejä ($n=4$) ja tehon arvoja ($n=7$).

Vesihomeen itiön tarttumis- ja kasvualustana käytettiin autoklavoitua hampunsiementä (www.finola.com/hamppu_suomi.html), joka on todettu käyttökelpoiseksi vesihomeen tarttumista ja infektointikykyä selvittäessä. Hampunsiemen lisättiin nelikuoppalevyn itiösuspensioon ja se oli mukana ultraäänikäsittelyjen aikana.

Tässä vaiheessa tehtiin kaksi eri käsittelykertaa, kummassakin yhteensä 24 erilaista käsittelyä (Liite 1, taulukot) nelikuoppalevyillä. Ensimmäisellä käsittelykerralla vesihomeen kasvua tarkasteltiin 48 ja 72 tunnin kuluttua käsittelyn alkamisesta. Tämä aika todettiin turhan pitkäksi ja toisessa käsittelyssä tarkasteluajana olivat 24 ja 48 tuntia käsittelyn loppumisesta.

1.2.2.2 Vaikuttavan paineen ja aallonpituuden testaus eri käsittelyajoilla ja toistoilla

Kokeen toisessa osassa edellisessä osiossa tehoa osoittanutta käsittely-yhdistelmää testattiin siten, että 5 minuutin käsittelyä toistettiin 1, 2, 4, 8 tai 48 kertaa 30 minuutin välein ja ultraääniasetuksina käytettiin ensimmäisen osan perusteella valittua sekvenssiä ja tehoa. Arvioitu sähköinen teho per ultraäänielementti oli tällöin 4.5 W.

Edellisen kokeesta saatujen tulosten perusteella suunniteltiin koe, jossa ultraäänikäsittelyn toistamisen vaikutusta tutkittiin vesihomeen uimaitiöiden torjunnassa. Uimaitiösuspensiolle (tuhansia uimaitiöitä/ml) toteutettiin viiden minuutin ultraäänikäsittely puolen tunnin välein. Vesihomeen kasvua havainnoitiin itiösuspensioon lisätyn hampunsiemenen avulla, jonka pinnalle vesihomekasvusto kas-

vaa nopeasti. Kasvuston kehittymistä havainnoitiin kuvaamalla itiösuspensioliuosmaljat päivittäin. Vesihomeen tartunta- ja kasvualustana käytettiin autoklavoitua hampunsiementä.

1.3 Peretikkahappo (PAA) ja vesihome

Peretikkahapon (PAA) tehokkuus vesihomeen itämisen estämisessä testattiin vesihomeitiöihin laboratorioissa nesteviljelyssä. Sovelsimme menetelmää, jota käytettiin haarukoitaessa rapuruton inaktiivointiin tarvittavaa PAA –pitoisuutta (Jussila ja muut 2011). Laboratoriokokeissa testatut pitoisuudet: 0.01, 0.1, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 ja 10.0, 12.5 ja 15.0 mg/l PAA:ta. Laboratoriotestejä varten PG1-maljalta leikattiin vesihomerihmastoja yksi n. 4 mm² halkaisijaltaan oleva pala 2 ml PG1-kasvatusliuosta 12-kuoppalevyllä. Rihmaston annettiin kasvaa +15°C lämmössä 2 vrk. Tämän jälkeen rihmasto huuhdeltiin neljä kertaa 2ml:lla steriloitua järvivettä ja se jätettiin viimeiseen huuhteluveteen. Saavutettu vesihomeitiöpitoisuus määritettiin seuraavana päivänä Bürkerin laskentakammiolla. Vesihomeitiöitä oli laskennallisesti jokaisessa kuoppalevyn kuopassa $4,5 \times 10^6$ kappaletta.

Itiöitä käsiteltiin eri pitoisuuksilla PAA:ta yhden tunnin ajan. Käsittelyt tehtiin 12-kuoppalevyllä 1.0 ml tilavuudessa. PAA-käsittely pysäytettiin lisäämällä kuoppalevyn kuoppiin 1.0 ml 2-kertaista PG1-kasvatusliuosta. Kontrolleina kokeessa oli negatiivikontrolli, jossa itiöitä keitettiin + 100 °C 4 min ja positiivikontrolli, jossa maljattiin käsittelemättömiä itiöitä. Vesihomeitiöiden itämistä kuoppalevyn kuopissa seurattiin päivittäin 12 vrk ajan.

2 Tulokset

2.1 LG Sound ultraäänilaitte

LG Sound ultraäänilaitteella ei havaittu merkittävää estävää vaikutusta kirjolohen mädin vesihomeinfektion kehittymiseen verrattuna käsittelemättömään kontrolliryhmään. Käsittelyn alussa näytti siltä, että LG Sound ryhmän mädissä olisi infektio kehittynyt hitaammin mutta kokeen edistyessä eroa ei enää pystynyt havaitsemaan ja hautomisajan päätyttyä mädin saavutettua silmäpisteasteen oli kummassakin kokeessa koko LG Sound ryhmän mätisatsi vesihomeen infektoimaa tai mäti oli kuollut. Formaliiniryhmän mäti kehittyi silmäpisteasteelle ja mädin homehtuminen oli vähäistä.

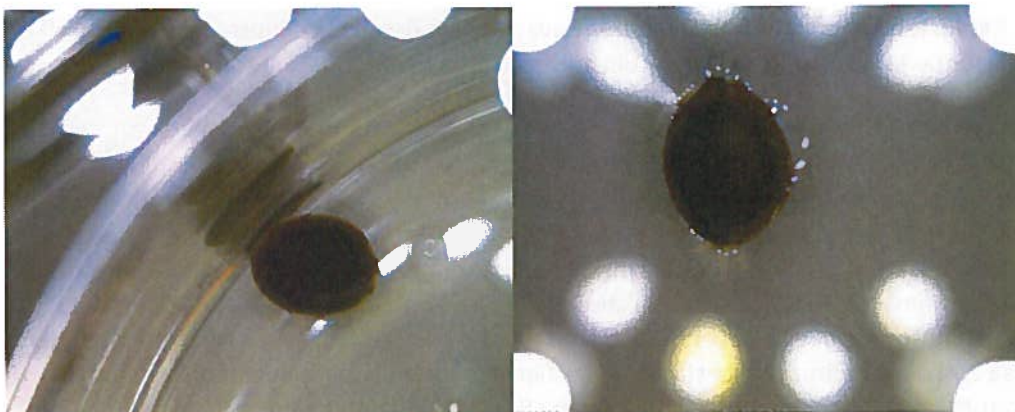
2.2 Ultraäänikokeet fysiikan laitoksella

Ensimmäisessä ultraäänialtistuksessa havaittiin että tietyt käsittelyt vaikuttivat hidastavasti vesihomeen kasvuun mutta eivät täysin estäneet sitä 24, 48 ja 72 tunnin tarkastelussa (taulukko liitteessä 1). Näitä kasvu hidastavia käsittelyjä testattiin lähemmin koejärjestelyssä, jossa käytettiin eri toisto-aikoja ja käsittelypituuksia. Tutkituista yhdistelmistä jatkuva käsittely 48 tunnin ajan esti vesihomeen kasvun hampunsiemenen pinnalla (Taulukko 1). Tässäkin tapauksessa vesihome alkoi kasvamaan käsittelyn lopettamisen jälkeen ja kasvustoa oli selvästi havaittavissa vuorokausi käsittelyn lopettamisen jälkeen (Kuva 1).

Taulukko 1. Toistetun ultraäänialtistuksen vaikutus vesihomeen uimaitiöiden selviytymiseen ja kasvuun hampunsiemenen pinnalla.

Käsittelyaika	UÄ-käsittelyjen lkm	Vaikutus
0 min	0	Ei estovaikutusta
30 min	1	Ei estovaikutusta
60 min	2	Ei estovaikutusta
120 min	4	Ei estovaikutusta
240 min	8	Ei estovaikutusta
24 h	48	Esti vesihomeen kasvun käsittelyn aikana. ¹

¹=Vuorokausi käsittelyn jälkeen vesihomekasvusto on havaittavissa.



Kuva 2. Toistetun ultraäänialistuksen vaikutukset *Saprolegnia*-uimaitiöiden selviytymiseen. Testattu 24 h ajan toistettu ultraäänikäsitteily (5 min käsittely puolen tunnin välein) on estänyt vesihomeen kasvun hampunsiemen pinnalla (vasemmanpuoleisessa kuvassa). Kontrollissa on havaittavissa selvä rihmasto sekä hampun siemenen pinnalla (oikeanpuoleinen kuva).

2.3 Peretikkahappo (PAA) ja vesihome

Maljakokeessa havaittiin, että PAA hidastaa vesihomeen itämistä jo 4 mg/l pitoisuudessa (Taulukko 3) ja itäminen estyy täydellisesti kun PAA pitoisuus on 8 mg/l. Mikäli PAA pitoisuus on >2 mg/l, vesihomeen itäminen estyi kahdessa kolmesta rinnakkaisesta, mutta tätä pitoisuutta ei voi pitää riittävänä suoraan käytännön tilanteeseen sovellettavaksi.

Taulukko 3. Peretikkahapon (PAA) vaikutus vesihomeen itiöiden itämiseen.

PAA:n pitoisuus, mg/l	Itämisaika, vrk, rinnakkaiset näytteet		
	A	B	C
Positiivikontrolli ¹	1	1	1
0,01	1	1	1
0,10	1	1	1
1,00	1	1	1
2,00	1	1	1
4,00	-	-	2
6,00	3	-	-
8,00	-	-	-
10,00	-	-	-
12,50	-	-	-
15,00	-	-	-
Negatiivikontrolli ²	-	-	-

¹Käsitlemättömiä itiöitä

²Keitettyjä itiöitä (4 min, 100 °C)

3 Aikataulu

Hankkeen aikataulu venyi merkittävästi alkuperäisestä suunnitelmasta. Syynä aikataulun venymiseen oli että LG Ultra sound laitteella oli odotettua selvästi heikompi teho. Tästä syystä jouduimme miettimään hankkeen painopistettä uudelleen ja onneksi pystyimme neuvottelemaan fysiikan laitoksen kanssa mahdollisuudesta testata ultraääntä ja erilaisia allonpituuksia sekä käsittelyjä laajemmin. Aikataulujen yhteensovittaminen tässä uudessa tilanteessa pitkitti hanketta.

Päätimme myös testata peretikkahapon (PAA) vaikutusta vesihomeen inaktivaatiossa maljakokein, joita emme myöskään olleet sisällyttäneet alkuperäiseen hankesuunnitelmaan. Tämäkin vaati järjestelyjä.

Kävimme suullisia neuvonpitoja Timo Takkusen (Pohjois-Savon ELY-keskus) ennen hankesuunnitelman muutoksia. Haimme kirjallisesti jatkoajan hankkeen niille työosioille, jotka katsottiin neuvonpitoissa soveliaiksi.

4 Pohdinta

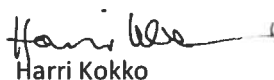
Hankkeen tulosten perusteella on selvää, että LG Sonic ei testatussa muodossa sovellu vesihomeen torjuntaan kirjolohenalan mädin haudonnan aikana. Hankkeen ensisijainen päämäärä, kaupallisen laitteen tehon todistaminen ja soveltaminen uudessa sovelluksessa jäi siten saavuttamatta. Havaitsimme kuitenkin, että ultraäänellä voidaan estää vesihomeen kasvu hampunsiemenen pinnalla laboratorio-oloissa, joka osoittaa, että ultraäänellä on mahdollista vaikuttaa vesihomeen kasvuun ja kykyyn tarttua biologisen materiaalin pintaan.

Osoitimme, että vesihomeen kasvu voidaan estää elatusaineessa maljakokeessa jo yli 2 mg/L pitoisuudella ja kasvu estyy kokonaan 8 mg/L pitoisuudessa. Nämä pitoisuudet ovat tosin selvästi korkeammat kuin on todettu kaloille haitattomiksi pitkäaikaisessa altistuksessa.

Emme valitettavasti löytäneet suoraa ultraäänen sovellusta kalan mädinhaudonnan aikaisen vesihometartunnan estämiseksi. Tehdyt kokeet antavat kuitenkin vinkkejä siitä, että ultraäänellä voi olla mahdollista estää vesihometartunta. Varsinaisen menetelmän kuvaaminen vaatii kuitenkin lisätutkimuksia.



Japo Jussila
dosentti
rapubiologi



Harri Kokko
hankkeen johtaja
kasvibiologi

Lähteitä

Jussila, J., Makkonen, J., Kokko, H. 2011: Peracetic acid (PAA) treatment is an effective disinfectant against crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) spores in aquaculture. *Aquaculture* 320 (1-2): 37-42
(doi:10.1016/j.aquaculture.2011.08.008).

LIITE 1 (sivu 1/4).

Ensimmäisen fysiikan laitoksella tehdyn koejärjestelyn tulokset. Taulukon selitykset: käsittely on ultraäänikäsit-
telyn nro, rinnakkaiset nelikuoppalevyn kaksi rinnakkaisuoppaa. Käsittelyn vaikutusta kuvattiin seuraavilla
muuttujilla: kasvun runsaus (0 = ei kasvua, 1 = vähäinen kasvu, 2 = runsas kasvu (hyyfi ei kuitenkaan ylety kuop-
pan reunaan asti) ja 3 = erittäin runsas kasvu (hyyfi ulottuu kuopan reunaan asti) sekä hyyfin laatu (a = ohut
hyyfi ja b = paksu, selvästi erottuva hyyfi). Taulukoissa on keltaistettu ne käsittelyt, joissa havaittiin yleisistä
linjasta poikkeavaa, parempaa estovaikutusta.

KOE-ERÄ I, 48h

Käsittely	Rinnakkaiset		Rinnakkaiset	
	A	B	C	D
1	2b	2a	2a	2a
2	3a	2b	3a	2a
3	3a	2a	2b	2a
4	2a	2a	2a	2a
5	2b	2b	2b	2a
6	2a	2b	2b	2b
7	2b	2a	2b	2b
8	3a	2a	3a	2b
9	2a	2b	2a	2b
10	2a	2a	3a	3b
11	2a	2b	2a	2a
12	2a	2b	2a	2b
13	2a	2a	2a	2a
14	2a	2a	2b	2b
15	2b	2b	2b	2a
16	2a	2b	2a	2b
17	2a	2b	2a	2b
18	2b	2b	2a	2a
19	2a	2b	2a	2a
20	2b	2b	2b	2b
21	2b	2b	2b	2b
22	2a	2a	1a	2a
23	2b	2b	2a	2b
24	2b	2a	2a	2a

LIITE 1 (sivu 2/4).

KOE-ERÄ I, 72h

Käsittely	Rinnakkaiset		Rinnakkaiset	
	A	B	C	D
1	3b	3a	3a	3a
2	3a	3b	3a	3b
3	3a	3a	3b	3a
4	3b	3b	3a	3b
5	3b	3b	3b	3b
6	3b	3b	2b	2b
7	3b	3a	3b	3b
8	3b	3b	3b	3b
9	3a	3b	3a	3b
10	3b	3a	3a	3b
11	3b	3b	3b	3a
12	3a	3b	3b	3b
13	3a	3a	3a	3a
14	3b	3b	3b	3b
15	3b	3b	3b	3b
16	2b	2b	2b	2b
17	3a	3b	3a	3b
18	3b	3b	3a	3a
19	3a	3b	3a	3a
20	3b	3b	3b	3b
21	3b	3b	3b	3b
22	3a	3a	3a	3b
23	2b	3b	2a	2b
24	3b	3a	3a	3a

LIITE 1 (sivu 3/4).

KOE-ERÄ II, 24h

Käsittely	Rinnakkaiset		Rinnakkaiset	
	A	B	C	D
1	2a	2a	2a	2a
2	3a	3a	2a	2a
3	3a	3a	2a	2a
4	3a	3a	2a	3a
5	3a	3a	2a	2a
6	2a	3a	3a	3a
7	1a	1a	1a	1a
8	2a	2a	2a	2a
9	2a	2a	2a	2a
10	3a	3a	3a	3a
11	2a	3a	2a	3a
12	2a	2a	2a	3a
13	3a	3a	2a	2a
14	2a	2a	2a	2a
15	1a	1a	1a	1a
16	1a	1a	1a	1a
17	3a	2a	2a	2a
18	3a	3a	2a	2a
19	2a	2a	2a	2a
20	3a	2a	2a	2a
21	1a	1a	1a	1a
22	1a	1a	1a	1a
23	2a	3a	2a	3a
24	1a	1a	1a	1a

LIITE 1 (sivu 4/4).

KOE-ERÄ II, 48h

Käsittely	Rinnakkaiset		Rinnakkaiset	
	A	B	C	D
1	3a	3b	3a	3b
2	3b	3b	3a	3a
3	3a	3b	3b	3b
4	3b	3b	3b	3b
5	3b	3b	3a	3b
6	3a	3b	3a	3a
7	3b	3a	3b	3b
8	3a	3b	3a	3b
9	3b	3b	3b	3b
10	3b	3a	3b	3a
11	3a	3b	3a	3b
12	3a	3b	3b	3b
13	3a	3b	3b	3b
14	3b	3a	3b	3a
15	2a	2a	2a	2a
16	2a	2b	2a	2b
17	3b	3b	2b	2b
18	3b	3a	3a	3b
19	3a	3b	3b	3b
20	3b	3b	3a	3b
21	3b	3b	3b	3b
22	3b	3b	3b	3a
23	3b	3b	3a	3a
24	3b	3b	3a	3a

