Humus- ja rautapitoisuuden vaikutukset Saprolegnioosiin ja immuunipuolustukseen järvilohella

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND

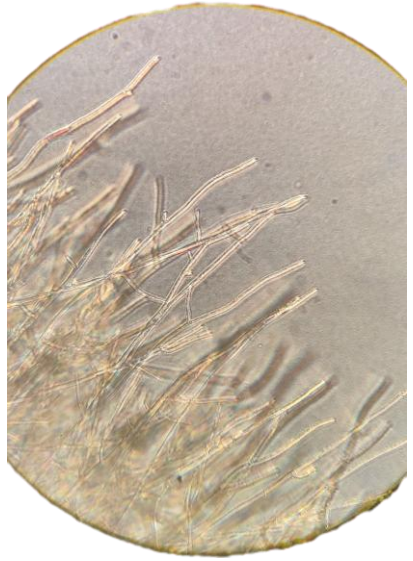
Ruskettuvien vesien yllättävä riski järvilohen terveydelle

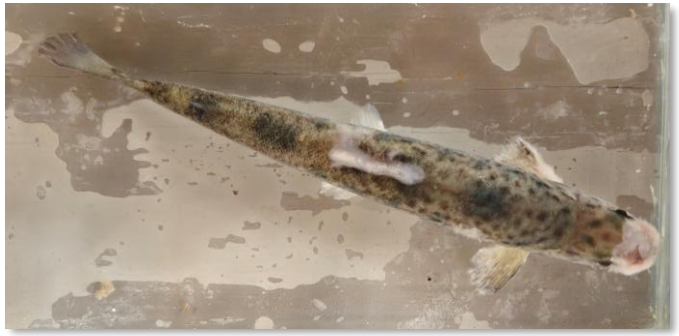
J. Haverinen[1], **A. Papadopoulou**[2], T. Korkea-aho[3], P. Pylkkö[4]
S. Airaksinen[5], X. Zhu[1], N. Kinnunen[1], X. Deng[2], T. Zhu[1], K. Anttila[2]

[1]Itä-Suomen yliopisto, [2]Turun yliopisto, [3]Ruokavirasto, [4]Luonnonvarakeskus, [5]Alltech Fennoaqua

Vesihome – merkittävä kalatauti

- *Saprolegnia parasitica* opportunistinen vesihome
- Infektoi
  - iho
  - kidukset
  - mätimunat
- Erityisen herkät kehitysvaiheet
  - smoltit
  - kutu- ja emokalat
- Aiheuttaa merkittäviä ongelmia lohikalojen viljelyssä!





Ruskeutuvat vedet Suomessa

- Humus- ja rautapitoisuudet kasvaneet voimakkaasti viimeisten 15-30 vuoden aikana

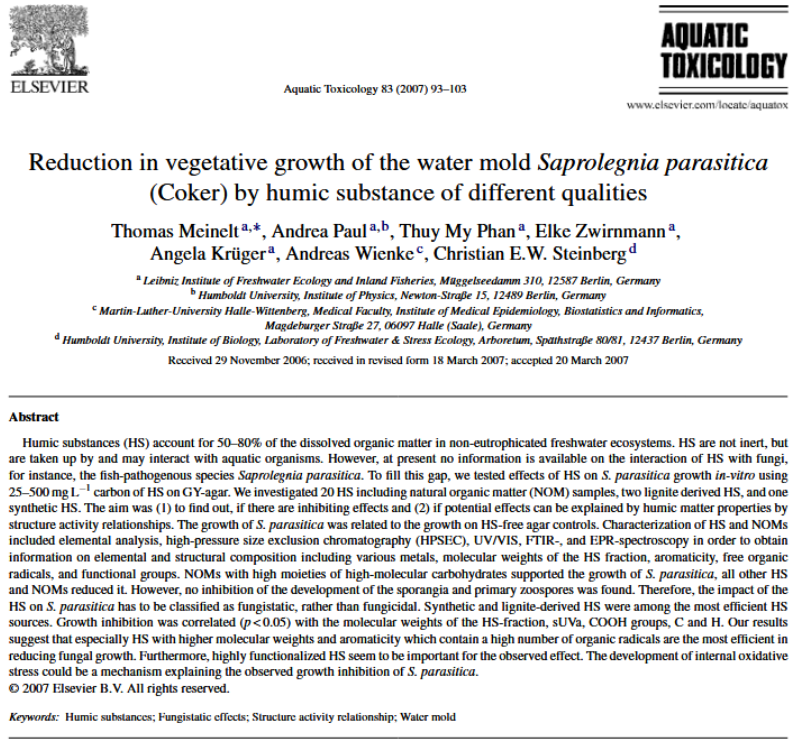
Syitä:

- lisääntyneet sateet ja rankkasateet
- leudot talvet (vähemmän jäätä, enemmän sulamista)
- valuma-alueiden ojitus ja maankäyttömuutokset

→Kalat altistuvat yhä enemmän **humus + rauta -yhdistelmille**

Humusaineet voivat suojata Saprolegnialta

- Meinelt et al. 2007: monet humusaineet hidastavat *S. parasitica* kasvua (fungistaattinen)
- Tehokkaimmat humusaineet
  - korkea aromaattisuus
  - suuri molekyylipaino
  - paljon radikaaleja
- Mahdollinen mekanismi: oksidatiivinen stressi vesihomeelle tai suora vaikutus sen soluseinän kanssa



ELSEVIER

Aquatic Toxicology 83 (2007) 93–103

AQUATIC TOXICOLOGY

www.elsevier.com/locate/aquatox

Reduction in vegetative growth of the water mold *Saprolegnia parasitica* (Coker) by humic substance of different qualities

Thomas Meinelt [a,*], Andrea Paul [a,b], Thuy My Phan [a], Elke Zwirnmann [a], Angela Krüger [a], Andreas Wienke [c], Christian E.W. Steinberg [d]

[a] *Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Müggelseedamm 310, 12587 Berlin, Germany*
[b] *Humboldt University, Institute of Physics, Newton-Straße 15, 12489 Berlin, Germany*
[c] *Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Medical Faculty, Institute of Medical Epidemiology, Biostatistics and Informatics, Magdeburger Straße 27, 06097 Halle (Saale), Germany*
[d] *Humboldt University, Institute of Biology, Laboratory of Freshwater & Stress Ecology, Arboretum, Spathstraße 80/81, 12437 Berlin, Germany*

Received 29 November 2006; received in revised form 18 March 2007; accepted 20 March 2007

Abstract

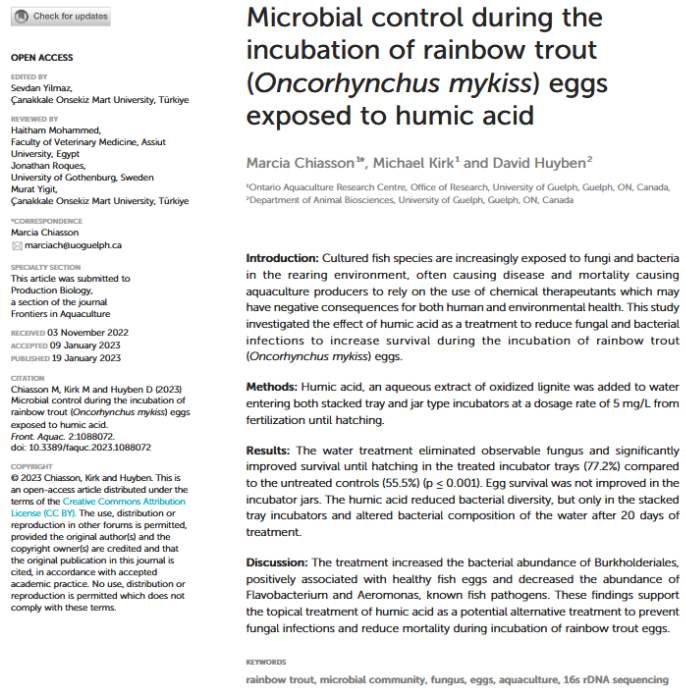
Humic substances (HS) account for 50–80% of the dissolved organic matter in non-eutrophicated freshwater ecosystems. HS are not inert, but are taken up by and may interact with aquatic organisms. However, at present no information is available on the interaction of HS with fungi, for instance, the fish-pathogenous species *Saprolegnia parasitica*. To fill this gap, we tested effects of HS on *S. parasitica* growth *in-vitro* using 25–500 mg L^{-1} carbon of HS on GY-agar. We investigated 20 HS including natural organic matter (NOM) samples, two lignite derived HS, and one synthetic HS. The aim was (1) to find out, if there are inhibiting effects and (2) if potential effects can be explained by humic matter properties by structure activity relationships. The growth of *S. parasitica* was related to the growth on HS-free agar controls. Characterization of HS and NOMs included elemental analysis, high-pressure size exclusion chromatography (HPSEC), UV/VIS, FTIR-, and EPR-spectroscopy in order to obtain information on elemental and structural composition including various metals, molecular weights of the HS fraction, aromaticity, free organic radicals, and functional groups. NOMs with high moieties of high-molecular carbohydrates supported the growth of *S. parasitica*, all other HS and NOMs reduced it. However, no inhibition of the development of the sporangia and primary zoospores was found. Therefore, the impact of the HS on *S. parasitica* has to be classified as fungistatic, rather than fungicidal. Synthetic and lignite-derived HS were among the most efficient HS sources. Growth inhibition was correlated ($p < 0.05$) with the molecular weights of the HS-fraction, sUVa, COOH groups, C and H. Our results suggest that especially HS with higher molecular weights and aromaticity which contain a high number of organic radicals are the most efficient in reducing fungal growth. Furthermore, highly functionalized HS seem to be important for the observed effect. The development of internal oxidative stress could be a mechanism explaining the observed growth inhibition of *S. parasitica*.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Humic substances; Fungistatic effects; Structure activity relationship; Water mold

Humusaineiden muita vaikutuksia

- Useat tutkimukset (esim. Lieke, Chiason, Prokešovà)
  - vähentävät *Saprolegnia* -infektioita mädissä
  - muuttavat mikrobiyhteisön koostumusta vedessä
  - lisäävät limakalvon lysotsyymiaktiivisuutta
  - parantavat antioksidanttipuolustusta

→ Humusaineita pidetään suojaavina *Saprolegniaa* vastaan



Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Sevdan Yilmaz,
Çanakkale Onsekiz Mart University, Türkiye

REVIEWED BY
Haitham Mohammed,
Faculty of Veterinary Medicine, Assiut University, Egypt
Jonathan Roques,
University of Gothenburg, Sweden
Murat Yigit,
Çanakkale Onsekiz Mart University, Türkiye

*CORRESPONDENCE
Marcia Chiasson
marciach@uoguelph.ca

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to Production Biology, a section of the journal Frontiers in Aquaculture

RECEIVED 03 November 2022
ACCEPTED 09 January 2023
PUBLISHED 19 January 2023

CITATION
Chiasson M, Kirk M and Huyben D (2023) Microbial control during the incubation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs exposed to humic acid.
Front. Aquac. 2:1088072.
doi: 10.3389/faquc.2023.1088072

COPYRIGHT
© 2023 Chiasson, Kirk and Huyben. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Microbial control during the incubation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs exposed to humic acid

Marcia Chiasson[1*], Michael Kirk[1] and David Huyben[2]

[1]Ontario Aquaculture Research Centre, Office of Research, University of Guelph, Guelph, ON, Canada, [2]Department of Animal Biosciences, University of Guelph, Guelph, ON, Canada

Introduction: Cultured fish species are increasingly exposed to fungi and bacteria in the rearing environment, often causing disease and mortality causing aquaculture producers to rely on the use of chemical therapeutants which may have negative consequences for both human and environmental health. This study investigated the effect of humic acid as a treatment to reduce fungal and bacterial infections to increase survival during the incubation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs.

Methods: Humic acid, an aqueous extract of oxidized lignite was added to water entering both stacked tray and jar type incubators at a dosage rate of 5 mg/L from fertilization until hatching.

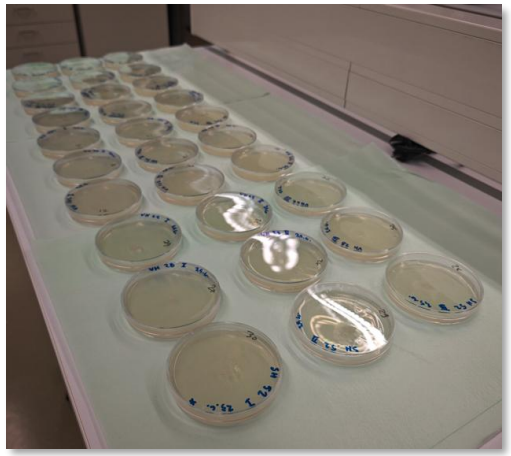
Results: The water treatment eliminated observable fungus and significantly improved survival until hatching in the treated incubator trays (77.2%) compared to the untreated controls (55.5%) ($p \leq 0.001$). Egg survival was not improved in the incubator jars. The humic acid reduced bacterial diversity, but only in the stacked tray incubators and altered bacterial composition of the water after 20 days of treatment.

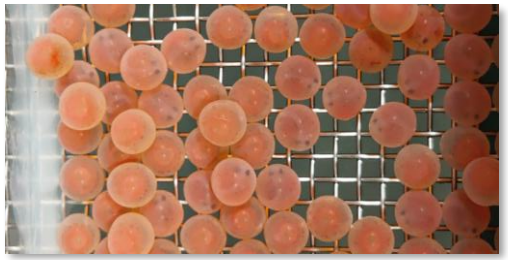
Discussion: The treatment increased the bacterial abundance of Burkholderiales, positively associated with healthy fish eggs and decreased the abundance of Flavobacterium and Aeromonas, known fish pathogens. These findings support the topical treatment of humic acid as a potential alternative treatment to prevent fungal infections and reduce mortality during incubation of rainbow trout eggs.

KEYWORDS
rainbow trout, microbial community, fungus, eggs, aquaculture, 16s rDNA sequencing

Tutkimusaukko

- Suurin osa tutkimuksista tehty:
  - in *vitro* -kokeilla
  - mätikokeilla
- Harvoin tutkittu:
  - eläviä kaloja
  - pitkäaikaista altistusta
- Humusaineet ja rauta tutkittu useimmiten erikseen, vaikka luonnonvesissä ne esiintyvät yhdessä

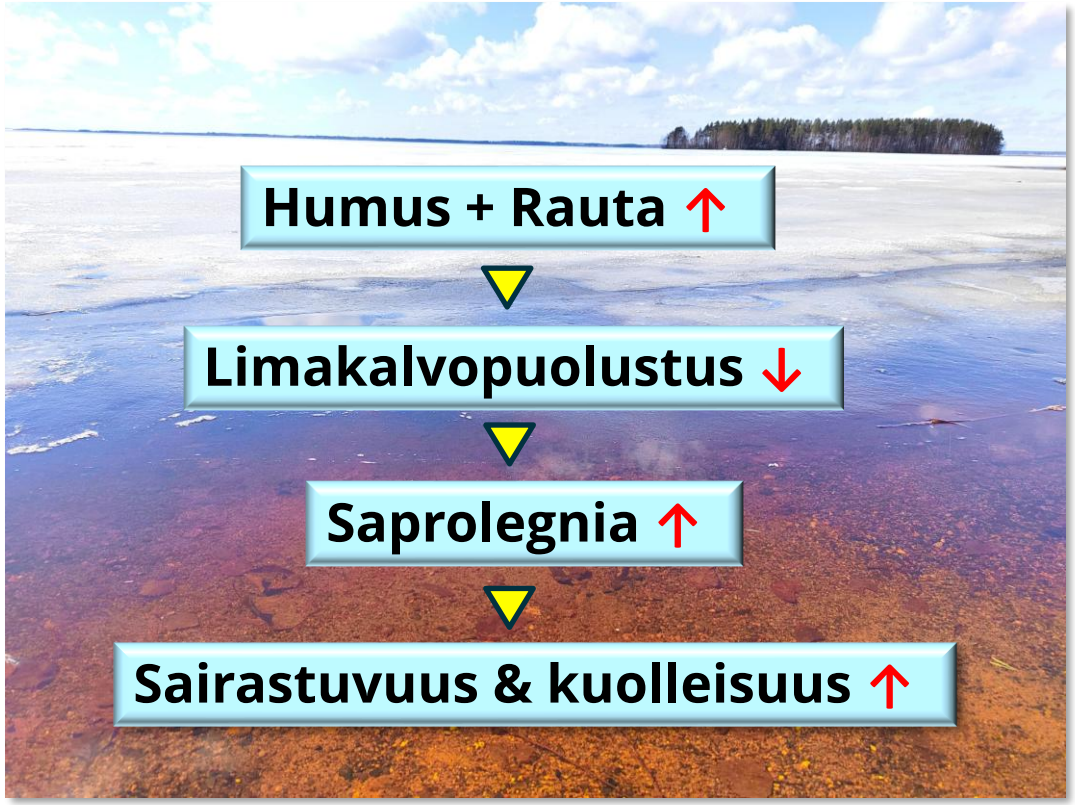




Tutkimuskysymys

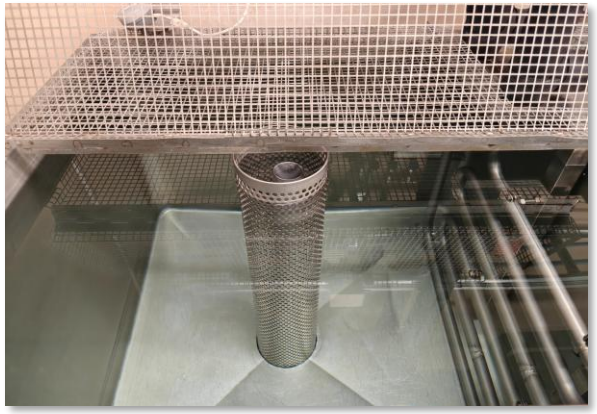
- Voiko korkea **humus + rauta** yhdessä:
  - heikentää kalojen limakalvoimmuniteettia?
  - lisätä *Saprolegnia* -infektioita?

- Hypoteesi
  - limakalvopuolustus ↓
  - infektiot ↑
  - sairastuvuus ja kuolleisuus ↑



Koeasetelma

- 1+ järvilohi
- 9 allasta (~600 L)
- 3 käsittelyä x 3 toistoa
- 32 kalaa/allas
- Läpivirtaus + ilmastus + automaattinen lämpötilakontrollointi (12°C)



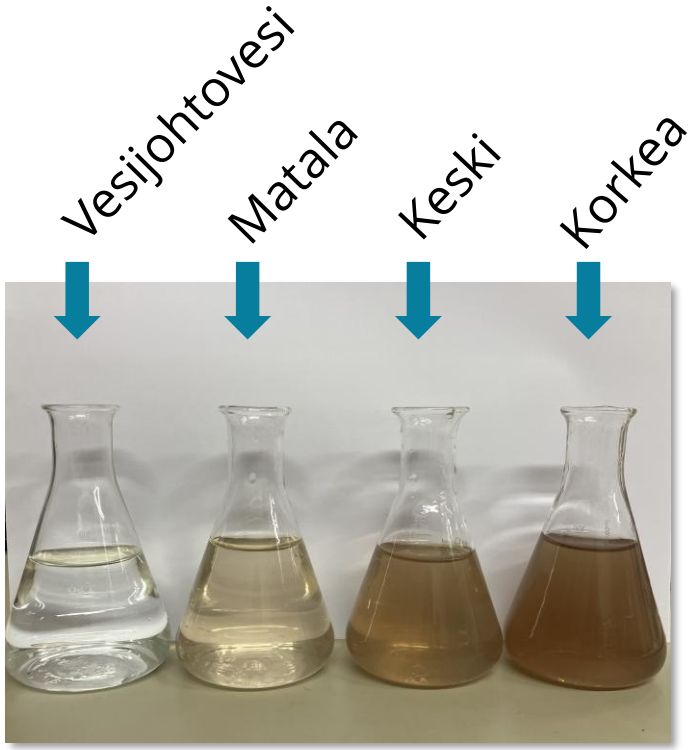
Alkutilanne ennen käsittelyjä

- Kalat ulkoisesti terveitä
- Limasta löytyi subkliinistä *Saprolegnia parasitica* – DNA:ta (PCR)
- Tyypillinen tilanne viljelylaitoksilla

Käsittelyt

- Kaupallinen humustuote (kasvipohjainen) ja rautakloridi
- Käsittelyt:

Käsittelyt	DOC (mg/L)	Fe (mg/L)
matala	5	0.5
keski	15	1
korkea	20	2



- Suljettu vesikierto + veden vaihto

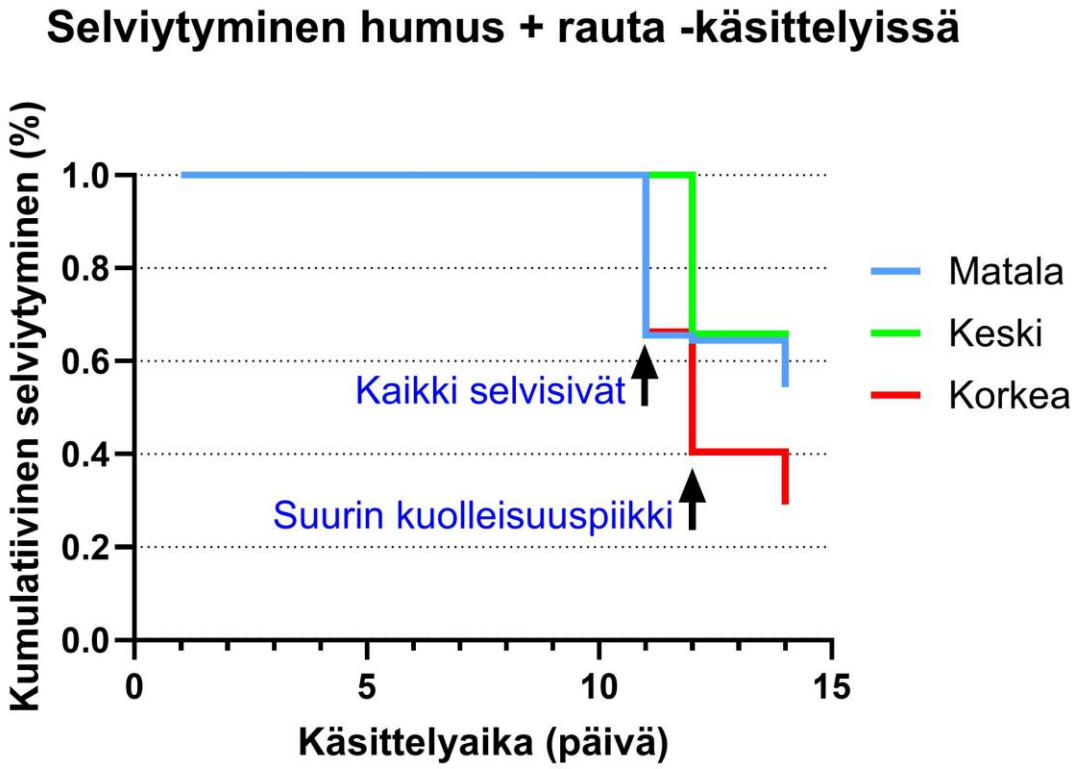
Seuranta ja näytteenotto

- Seuranta:
  - Lämpötila 12°C ja O_2 - päivittäin
  - pH, typpi, nitraatti, ammonium - ennen ja jälkeen veden vaihdon
  - kalojen kunto ja käyttäytyminen – useita kertoja päivässä
- Näytteenotto
  - suoritettu Aluehallintoviraston hankeluvan (ESAVI/8021/2025) mukaisesti

Tulokset – kuolleisuus

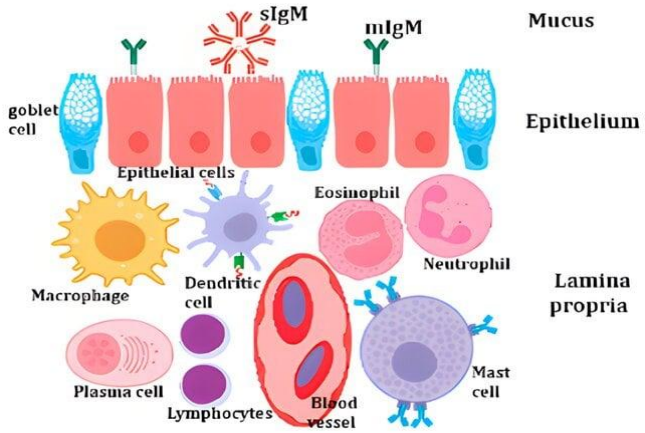
- Kuolleisuus kasvoi käsittelyn voimakkuuden myötä Kaplan-Meier – selviytymisanalyysin perusteella
- Log-Rank: $p < 0.001$
- Kuolleisuus käsittelyryhmittäin
  - Matala käsittely: ~54 % selviytyminen
  - Korkea käsittely: ~29 % selviytyminen
  - Kaikki kuolleet kuoli vesihomeeseen

→Yhteys: Humus + rauta → heikentynyt liman puolustus → nopeampi infektio → korkeampi kuolleisuus



Lysotsyymi – puolustusentsyymi

- Hajottaa bakteerin soluseinän rakennetta → bakteerin hajoaminen
- Kalojen limakalvoilla (iho, kidukset, lima) sekä plasmassa ja mätimunissa
- Osa ensimmäistä puolustuslinjaa patogeeneja vastaan
- Lysotsyymiaktiivisuus tärkeä mittari limakalvon terveydelle ja vastustuskyvylle (esim. *Saprolegniaa* vastaan)
- Korkeampi aktiivisuus → parempi suoja opportunistisia taudinaiheuttajia vastaan



Tulokset – lysotsyymiaktiivisuus

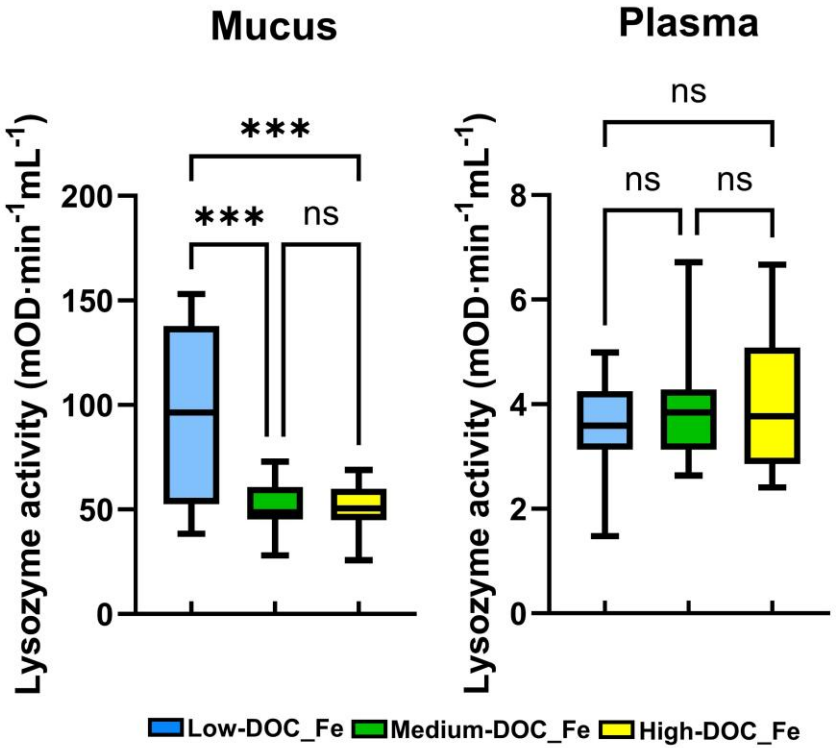
- Liman lysotsyymiaktiivisuus
  - laski humus + Fe noustessa

$p < 0.001$

- Plasman lysotsyymiaktiivisuus
  - ei muutosta

$p > 0.05$

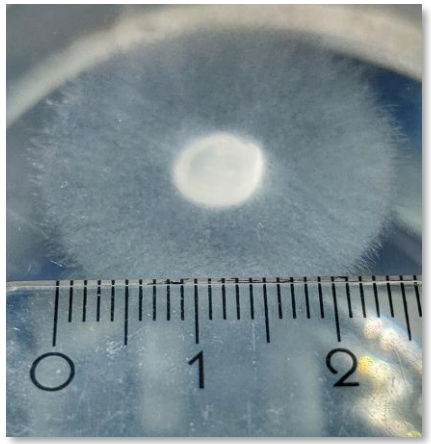
→ limakalvon ensimmäisen puolustuslinjan toiminta heikkeni humus + rauta käsittelyssä

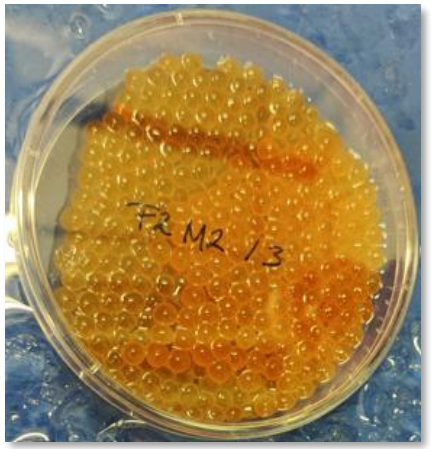


Mahdollinen selitys

- Aikaisemmat tutkimukset:
  - in vitro -kokeita
  - mätikokeita
  - matala rautapitoisuus (Fe)
- Tässä tutkimuksessa:
  - elävät kalat
  - pitkä altistusaika
  - korkea rautapitoisuus (Fe)

→ Korkea rautapitoisuus voi **muuttaa humuksen vaikutuksen negatiiviseksi**



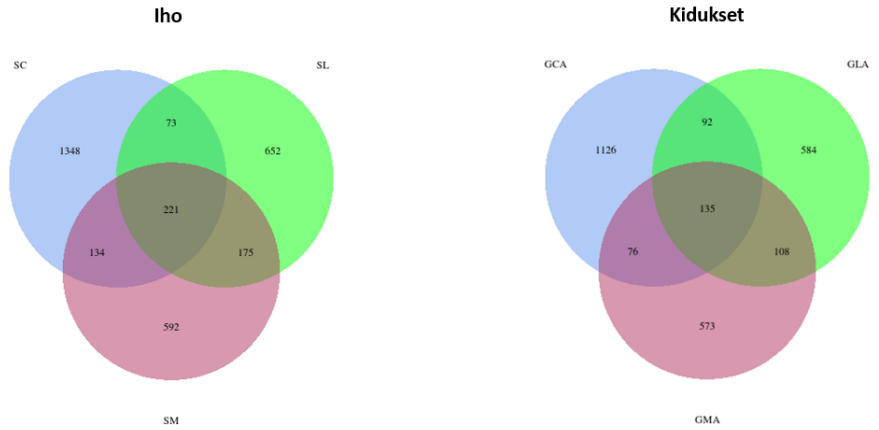


Tulevia analyyseja – limakalvon immunologia ja mikrobiomi

- Ihon ja kidusten limakalvon immunologia
- Ihon ja kidusten limakalvon mikrobiomi
- Tulokset valmistuvat myöhemmin

Venn diagram- Lohen ihon ja kidusten mikrobiota

Venn-diagrammi esittää visuaalisesti joukkojen tai ryhmien väliset suhteet, yhtäläisyydet ja erot päällekkäisten kuvioiden avulla

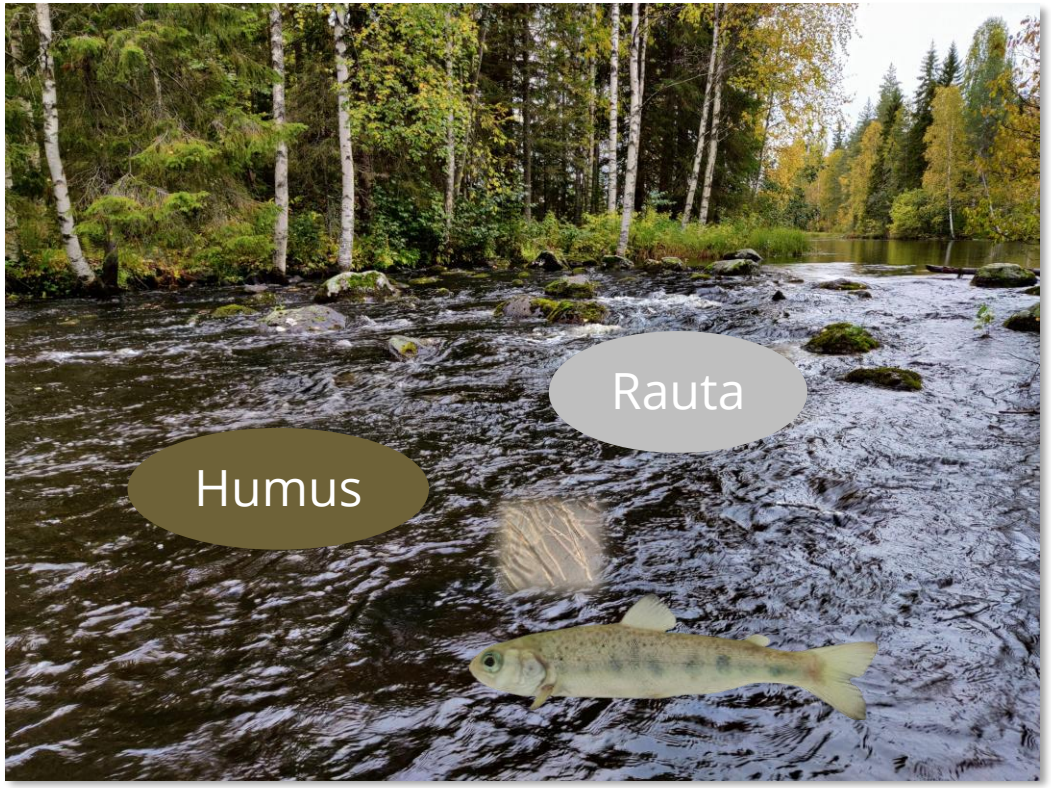


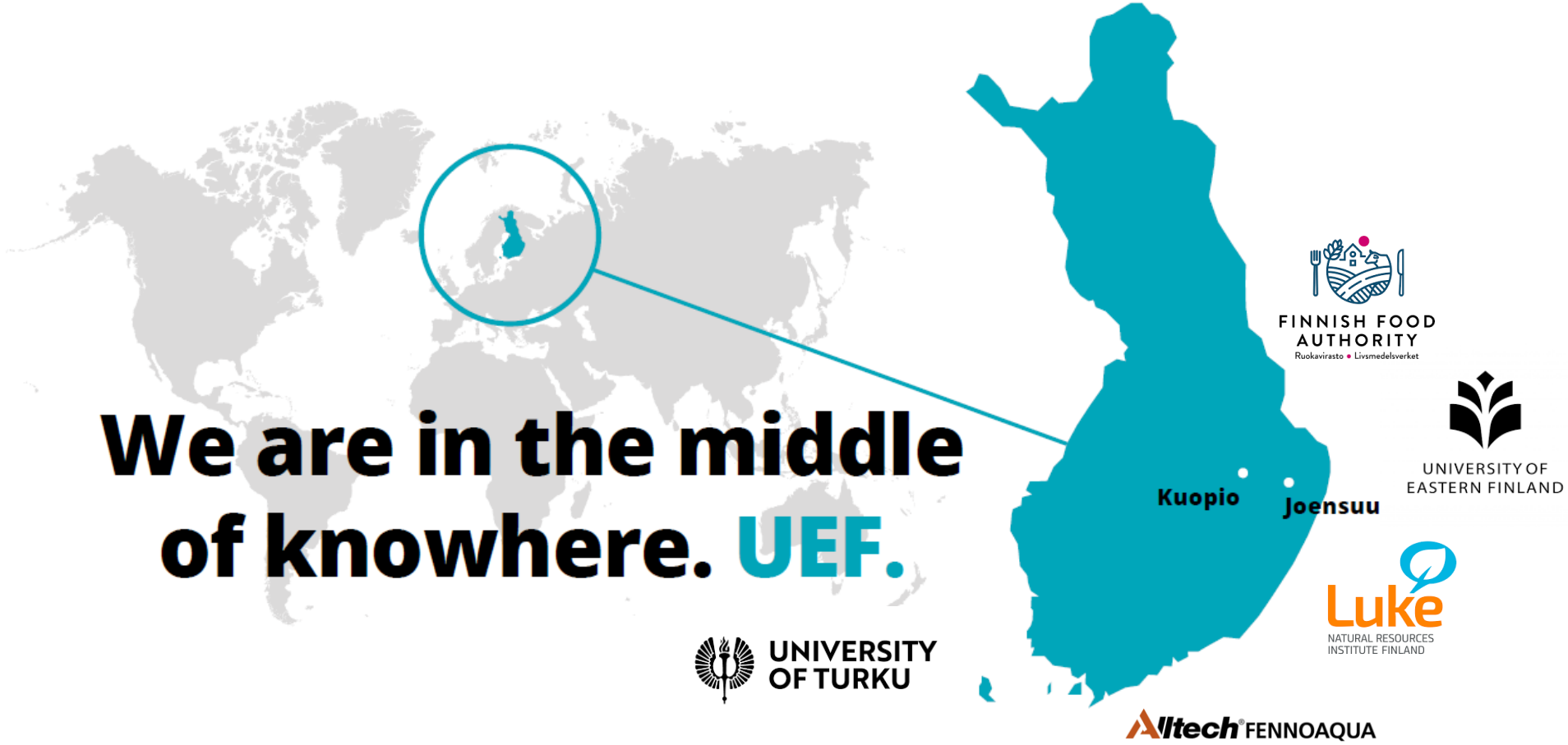
- **Lohen ihon ja kidusten mikrobiota vaikuttaa kalan terveyteen**

Johtopäätökset

- Korkea humus + rauta vaikutukset
  - heikensi limakalvon immuniteettia
  - lisäsi *Saprollegnia* -infektioita
  - lisäsi kuolleisuutta

→ Ruskeutuneet vedet voivat lisätä järvilohen altistumisriskiä vesihomeelle



KONEEN SÄÄTIÖ
KONE FOUNDATION

KIITOS!