

27/2024
Technologie

VYUŽITÍ TECHNOLOGIE NANOVLÁKENNÝCH FILTRŮ K DETEKCI PATOGENŮ V CHOVECH RYB

Ing. Karel Halačka, CSc.

Mgr. Jan Mendel, Ph.D.



ÚSTAV BIOLOGIE

OBRATLOVCŮ

AKADEMIE VĚD ČR



Technologie 27/2024

VYUŽITÍ TECHNOLOGIE NANOVLÁKENNÝCH FILTRŮ K DETEKCI PATOGENŮ V CHOVECH RYB

Ing. Karel Halačka, CSc.
Mgr. Jan Mendel, Ph.D.

Brno, 2024

Technologie vznikla za finanční podpory projektu NAZV QK21010030 – Globalizace, moderní technologie a změna klimatu jako zdroje nových možností a ohrožení pro chovný management lososovitých ryb.

Podíl autorů:

Ing. Karel Halačka, CSc. 50 %

Mgr. Jan Mendel, Ph.D., 50 %

Adresa autora:

Ústav biologie obratlovců Akademie věd ČR, v. v. i.,
Květná 8, Brno 603 00

Obsah

1. Cíle technologie	4
2. Popis technologie	4
3. Oblast výzkumu a místo ověření technologie	4
4. Úvod	4
4.1. Patogenní organismy ve vodním prostředí	4
4.2. Metody záchytu	5
4.3. Význam detekce	5
5. Okruhy ověření	5
5.1. Výběr monitorovacích profilů, vliv odběru v různém čase a četnost vzorkování	5
5.2. Design odběrů vody	6
5.3. Porovnání efektivity nanovláknenných filtrů	7
5.4. Způsoby filtrace	8
5.5. Transport a uchovávání vzorků	10
6. Výsledky	10
6.1. Výběr monitorovacích profilů, vliv odběru v různém čase a četnost vzorkování	10
6.2. Design odběrů vody	11
6.3. Porovnání efektivity nanovláknenných filtrů a pořizovacích nákladů	11
6.4. Způsoby filtrace	11
6.5. Transport a uchovávání vzorků	12
7. Závěry	13
8. Novost postupů	13
9. Ekonomické aspekty	13
10. Popis uplatnění technologie	14
11. Seznam literatury	14

1. Cíle technologie

Cílem technologie bylo v systémech sloužících k intenzivní produkci sladkovodních ryb ověřit možnosti rozšíření preventivních a průkazových monitoringů o nanofiltrace ke kvalitativní i kvantitativní detekci patogenních organismů (mikroorganismů a parazitů). Spolehlivé výsledky by umožňovaly včasný a cílený léčebný přístup omezující jejich negativní vliv na chované organismy, zlepšení welfare daného chovu, snížení množství preventivních a kurativních prostředků a zefektivnění ekonomiky chovatelského zařízení.

2. Popis technologie

V letech 2021–2024 byla vyvíjena a ověřována metoda odběru vzorků nanofiltrací vody následně využitelných pro molekulárně-genetickou detekci patogenních organismů v chovech ryb. Použití nanovláknenných filtrů o vhodné poréznosti umožňuje navržení technologie k precizní filtraci částic o velikosti až na úrovni 100 nm. Výsledným produktem je filtrační koláč obsahující dostatečně reprezentativní množství vzorku získaného akceptovatelnou filtrační rychlostí. Testován a optimalizován byl kompletní pracovní postup od výběru monitorovacích míst až po transport vzorků do laboratoře. Aplikace technologie umožňuje chovatelskému managementu kvalitativní i kvantitativní celosezónní detekci patogenů/parazitů i žádoucích mikroorganismů v rámci preventivních a průkazových monitoringů.

3. Oblast výzkumu a místo ověření technologie

Testování a ověřování efektivity navržené technologie: intenzivní chovy ryb; nanofiltrace vody přítokové a uvnitř systému; kvalitativní i kvantitativní celosezónní detekce patogenů/parazitů i žádoucích mikroorganismů; preventivní a průkazový monitoring. Ověření proběhlo na rybochovném objektu firmy BioFish s.r.o. v rámci jak vlastních chovných recirkulačních systémů, tak i na jednotlivých přítocích vody (hlubinných i povrchových) a dále při experimentech v chovatelském zařízení Rybníkářství Pohořelice a.s.

4. Úvod

4.1. Patogenní organismy ve vodním prostředí

Vodní prostředí, ať již ve volné přírodě nebo v rybochovných zařízeních, bývá během roku různou intenzitou kontaminováno patogeny, jež mohou být nositeli významných onemocnění pro chované organismy. Druhová skladba a množství

mikroorganismů i parazitů jsou odvislé od řady faktorů, jakými jsou např. roční období, původ násady, kvalita vody (teplota, pH, obsah rozpuštěného kyslíku, výskyt produktů dusíkatého metabolismu ryb, množství nerozpuštěných látek, aj.), přítomnost či absence hostitelských organismů apod. Spolehlivá informace o patogenitě vody, jak přitékající do odchovného systému, tak v něm cirkulující, umožňuje chovateli omezit vodním managementem a včasným preventivně-léčebným zásahem rozvoj daného onemocnění a zlepšit tak zdravotní stav ryb i efektivitu chovu.

Z pohledu chovu lososovitých ryb k největším ekonomickým ztrátám dochází úhynem způsobeným bakteriálními i virovými nákazami (ERM - bakteriální hemoragická septicémie, flavobakteriózy, furunkulóza, laktokokóza, VHS - virová hemoragická septicémie, IHN - infekční hematopoetická nekróza, IPN - Infekční nekróza pankreatu, ISA - infekční anémie lososů) a parazitózami (ichtyoftirióza, PKD – proliferativní onemocnění ledvin). Na detekci původců bakteriálních a parazitárních onemocnění byla směřována tato technologie.

4.2. Metody záchytu

Molekulárně-genetický materiál rozptýlený ve vodním prostředí je třeba před vlastní analýzou koncentrovat, což je obvykle prováděno filtrací nebo Target concentration technology (TCT).

4.3. Význam detekce

Včasná a citlivá detekce patogenů před jejich manifestací u chovaných organismů a možnost stanovení jejich aktuálního množství má zásadní význam pro prevenci a léčbu. Chovateli tak přináší zvýšení efektivitu chovu, nezanedbatelný je i environmentální přínos spojený s omezením použití léčebných prostředků a jejich reziduí.

5. Okruhy ověření

5.1. Výběr monitorovacích profilů, vliv odběru v různém čase a četnost vzorkování

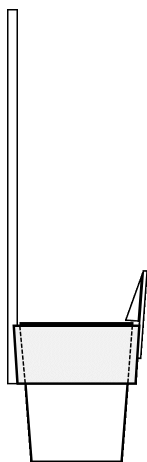
K monitoringu byly vybrány všechny potenciální zdroje vody daného rybochovného zařízení (5x povrchové, 5x hlubinné) a 3 profily v každém ze dvou systémů – RAS 1 a RAS 2 (vstup vody do systému, biofiltr, výstup vody z odchovných nádrží k biofiltru). Vzorky byly odebírány jednou (listopad–únor), resp. dvakrát (březen–říjen) měsíčně. Pro posouzení intervalu rozptylu naměřených hodnot patogenní nálože v systému byly odebírány a testovány vzorky ve 3 různých časech – 0, 0+10min a 0+30min.

5.2. Design odběrů vody

- a) nasátí vody hadičkou opatřenou sacím košem, sloužícím kromě zabránění nasátí větších částic i jako zátěž, do skleněné odběrné nádoby o objemu 250 ml pomocí vývěvy (obr. 1)
- b) odběr vody do plastové nádoby o objemu 500 ml umístěné na držáku (obr. 2)



Obr.1. Odběrová sestava s vývěvou



Obr.2. Držák s odběrovou nádobkou

5.3. Porovnání efektivity nanovláknenných filtrů a pořizovacích nákladů

Srovnávány byly tři typy/provedení nanofiltrů:

- jednorázový stříkačkový filtr (obr. 3)
- jednorázová filtrační kapsle (obr. 4)
- opakovaně použitelné pouzdro vlastní konstrukce (užitný vzor), ve kterém byl umístěn kruhový výsek membránového nanofiltru o průměru 45 mm (obr. 5a, b).



Obr.3. Stříkačkový filtr



Obr.4. Filtrační kapsle



a)

Obr. 5.:

a) Pouzdro s nanofiltrem vlastní výroby;

b) Kruhové výseky nanofiltru



b)

Kromě typu/provedení nanofiltrů byla testována i rychlost a spolehlivost filtrace při použití různých velikostí pórů (230–400 nm).

5.4. Způsoby filtrace

Otestována byla efektivita/použitelnost tří způsobů filtrace v polních podmínkách:

- Pomocí filtrační soupravy s horní nálevkou a dolním zásobníkem, připojeným k vakuové vývěvě (obr. 6).
- Pomocí rotační pumpy tlačící vodu z odběrné lahve do jednorázové nanofiltrační kapsle (obr. 7).
- Protlačení vody nanofiltrem umístěným v opakovaně použitelném filtračním pouzdru pomocí stříkačky o objemu 150 ml (obr. 8). Při potřebě vyššího tlaku (větší obsah částic ve vodě) lze umístit stříkačku do upravené vytlačovací pistole (obr. 9).



Obr. 6. Filtrační souprava s vývěvou



Obr. 7. Rotační pumpa



Obr. 8. Filtrační pouzdro s nanofiltrem a stříkačkou



Obr. 9. Filtrace s délkově upravenou vytlačovací pistolí

5.5. Transport a uchovávání vzorků

Byl testován vliv teploty během transportu (bez zamražení x box se suchým ledem), resp. přechovávání (pokojová teplota x mrazák při teplotě -20°C) a vliv doby přechovávání bez zamrazování (1, 3 a 5 dnů) vzorku na detekci patogenů ve vodě a nanofiltrech.

6. Výsledky

6.1. Výběr monitorovacích profilů, vliv odběru v různém čase a četnost vzorkování

Zvolený design umožnil získat celkový přehled o patogenech jak v potenciálních vodních zdrojích, tak i uvnitř daného systému RAS, a to včetně možných změn při průchodu chovnou částí, resp. biofiltrační jednotkou. Tří bodový odběrový design v systému RAS: vstup zdrojové vody, hlubinný biofiltr v systému a výstup vody ze systému přináší reálný pohled na potenciální hrozby a potřeby. Vzorkování na biofiltru se ukázalo jako nejúčinnější k záchytu patogenů (dle RT-qPCR diagnostiky). Monitoring vstupu a výstupu vody ze systému (jejich srovnání) může

být ukazatelem účinnosti léčebných postupů. Pro podrobnější monitoring vývoje hladin jednotlivých patogenů je vhodný sběr vzorků 2× měsíčně v nejvíce exponovaných měsících v roce (tj. březen–říjen). Zvolená četnost vzorkování umožňuje jak zpětné sledování účinků léčebných postupů/zásahů uvnitř systému RAS, tak i včasné odhalení přítomnosti nežádoucích/žádoucích mikroorganismů ve vodních zdrojích a lze navrhnout rychlé omezení kontaminovaného zdroje pro chovný systém. Vliv odběrů vzorků v různém čase (0, 0+10min, 0+30min) na rozptyl naměřených hodnot patogenní nálože byl zaznamenán v rozmezí max. 1–3 cyklů.

6.2. Odběr vody

Jako optimální se jevil odběr vody do plastových nádob pomocí příslušného držáku vlastní konstrukce. Nasávání vody hadičkou pomocí vývěvy přináší kromě vyšší finanční náročnosti na přístrojové vybavení i řadu praktických nevýhod:

- k absolutnímu zamezení kontaminace je třeba pro každý odběr počítat s nejen novou odběrnou lahví, ale i hadicí se sítkem, což výrazně zvyšuje cenu i objem potřebného vybavení
- prakticky nelze odebírat vodu vytékající z hadic či kohoutů
- vzhledem k tomu, že vody v recirkulačních systémech permanentně proudí a hloubka se obvykle pohybuje do 1,50–1,75 metrů, stačí k reprezentativnímu odběru vzorek vody z horní části vodního sloupce, což lze snadno uskutečnit odběrnou nádobou umístěnou na vhodném držáku.

Nasávání vzorku vody hadicí by bylo možné doporučit spíše v případě hlubokých nádrží.

6.3. Porovnání efektivity nanovlákných filtrů a pořizovacích nákladů

Jako optimální pro bakteriální a parazitární monitoring prováděný za účelem detekce organismů v rybochovných zařízeních se jeví filtry o udávané velikosti pórů 300–400 nm, jež prakticky spolehlivě zachycující částice požadované velikosti. Při porovnání pozice zachycení množství patogenů z různých částí filtru byla zjištěna lepší detekce patogenu na středu filtru.

Co se týče typu nanofiltru, je zde významný rozdíl ve finančních nákladech: cca 20 Kč kruhový výsek v kombinaci s opakovaně využitelným pouzdem vs. cca 200 Kč jednorázová filtrační kapsle.

6.4. Způsoby filtrace

Ukázalo se, že nanofiltrace vody při použití výše zmiňovaných způsobů filtrace s menšími póry (pod 400 nm) a potřebě zfiltrovat objem minimálně 100–150 ml vyžaduje k průchodu vody značných tlaků. Odběr vody pod 100 ml se nedoporučuje, dochází ke snížení detekce patogenů.

Aby bylo možné zfiltrovat doporučený objem odebrané vody, se filtrace podtlakovou jednotkou ukázala jako nepřiměřeně časově náročná (minimálně desítky minut) a to navíc jen v případě vody obsahující velmi malé množství rozptýlených částic (což v praxi nastává jen minimálně).

Obdobná byla situace při snaze protlačit filtrovaný vzorek pomocí rotační pumpy, kde se jako slabé místo ukázala nedostatečná pevnost hadice čerpadla, kdy po několika desítkách sekund docházelo k prasknutí.

Pouze tlak vyvolaný stlačením injekční stříkačky, s možným znásobením pomocí vytlačovací pistole, je ve většině případů dostatečný k nanofiltraci vzorku vody v chovatelských systémech v potřebném objemu a za poměrně krátký čas (do 1 min).

6.5. Transport a uchovávání vzorků

Pro dostatečnou stabilizaci vzorků by mělo dojít ihned po odběru vody/provedení filtrace k zamrazení vody/filtru na suchém ledu po období transportu a v laboratoři jejich uložení do mrazáku ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). V případě potřeby lze provést transport bez suchého ledu a poté umístit vzorky ihned do mrazáku. Doba transportu bez ledu by však neměla přesáhnout 2 hodiny. Po uplynutí této doby dochází ke snížení schopnosti detekce patogenů, a to především u vzorků vody. Dlouhodobější transport bez zamražení a uchovávání vzorků v teplotě místnosti po 1–5 dní vede ke snížení detekce patogenů o 6 cyklů až nestanovitelné.

7. Závěry

Na základě vývoje některých komponent a jejich ověření v reálných chovech lze konstatovat následující:

- ☞ bodový odběr přítoků vody a tří klíčových míst v chovném systému poskytuje ucelený pohled na kvalitu vody a efektivitu preventivně-léčebných procedur
- ☞ odběr vzorku vody přímo do sterilního plastového 500 ml kelímku pomocí držáku je zcela dostačující
- ☞ pro bakteriální a parazitární monitoring je vhodné použití středu sterilního nanofiltru s parametry kruhová výseč 45 mm a póry 400 nm
- ☞ přefiltrování 100–150 ml vody zajišťuje potřebné množství vzorku k následným molekulárně-genetickým analýzám
- ☞ k protlačení vzorku vody se nejlépe osvědčilo využití sterilní injekční stříkačky (objem 150 ml) a v případě většího množství částic bylo možné tlak v sestavě dále zvýšit použitím délkově upravené vytlačovací pistole
- ☞ pro stabilizaci vzorků vody/nanofiltru jejich transport a dlouhodobější uchovávání je optimální zamražení při transportu na suchém ledu, resp. zmražení při -20 °C a v případě krátkodobého transportu (do 2 hod.) postačí i pokojová teplota. Do doby analýzy v laboratoři postačí uložení vzorků v mrazáku při -20 °C.
- ☞ sterilizace všech komponent a nástrojů UV zářením je dostačující

8. Novost postupů

Daná technologie představuje ověřený pracovní postup k získání molekulárně-genetického vzorku patogenních činitelů nanofiltrací z vody v polních podmínkách. Vyznačuje se celistvostí přístupu a zařazením několika zcela nových prvků vyvinutými autory (zahrnuje 4 funkční vzorky – diagnostické RT-qPCR soupravy a 1 užitiný vzor - Souprava pro odběr a filtraci vzorků vody).

9. Ekonomické aspekty

Infekční onemocnění a nevhodné chovatelské podmínky působí významné ztráty v chovech sladkovodních ryb (na úrovni 20–40 % při odchovu juvenilních ryb či 5–10 % a při závažných nákazách 20–40 % u odchovu tržních ryb). Což představuje hospodářské škody na úrovni nižších desítek milionů Kč ročně. Proto spolehlivá znalost míry nežádoucího zamoření vodního zdroje i efektivní bezpečná léčba a funkční systém včasného varování pro rychlé a cílené použití preventivních a léčebných opatření přinese velké úspory pro chovatele (zvýšení přežití, snížení nákladů na chov). Předpokládáme, že s využitím předložených postupů a zásad dojde ke snížení ztrát min. o 1–10 %, což přinese úsporu na úrovni min. 100 tis. až 2 mil. Kč ročně.

10. Popis uplatnění technologie

Uvedená technologie je na řešitelském pracovišti již plně využívána k výzkumným i komerčním účelům. Od roku 2024 je zařazena do portfolia produktů a služeb Centra aplikovaných služeb při ÚBO AV ČR (AplZool) a je nabízena ve formě externích zakázek soukromým rybochovným zařízením, vysokým školám, státním institucím, ústavům AV ČR i dalším subjektům zabývajících se chovatelstvím ryb, zemědělstvím a ochrannou přírodou.

11. Seznam literatury

Halačka K., Mendel J., 2023: CZ 37354 U1 - Souprava pro odběr a filtraci vzorků vody. Užité vzor: 14 str.

Šindelka R., Mendel. J., 2022: Diagnostická souprava RT-qPCR FLAVident na detekci a kvantifikaci *Flavobacterium psychrophilum* ve vzorcích vody, tkání a kožních stěrů. Funkční vzorek 15/2022: 12 str.

Šindelka R., Mendel. J., 2022: Diagnostická souprava RT-qPCR AEROMident na detekci a kvantifikaci *Aeromonas* spp. ve vzorcích vody, tkání a kožních stěrů. Funkční vzorek 16/2022: 12 str.

Šindelka R., Mendel. J., 2022: Diagnostická souprava RT-qPCR TETRACAPSident na detekci a kvantifikaci *Tetracapsuloides bryosalmonae* ve vzorcích vody, tkání a kožních stěrů. Funkční vzorek 17/2022: 12 str.

Šindelka R., Mendel. J., 2023: Diagnostická souprava RT-qPCR ICHTident na detekci a kvantifikaci *Ichthyophthirius multifiliis* ve vzorcích vody, tkání a kožních stěrů. Funkční vzorek 18/2023: 12 str.

Využití technologie nanovláknenných filtrů k detekci patogenů v chovech ryb
technologie 27/2024

Ing. Karel Halačka, CSc.
Mgr. Jan Mendel, Ph.D.

Vydavatel: Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., Květná 170/8, 603 00 Brno
Grafická úprava a zalomení: Ján Otradovec
Tisk: Computer MCL Brno spol. s. r. o.
Vydání: první, 2024
Počet stran: 16
ISBN 978-80-87189-46-7



Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i.
Květná 8, Brno 603 00
Tel.: +420 543 422 540
E-mail: ubo@ivb.cz

www.ivb.cz