

ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ РЫБОВОДСТВА

Н.В.Сверчкова, Т.В.Романовская*, Н.В.Евсегнеева*, Г.В.Жук*, Э.И.Коломиец*,
В.Ю.Агеец, С.М.Дегтярик, Е.В.Максимьюк,*

**Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, ул. Купровича, 2,
220141, Беларусь, microbio@mbio.bas-net.by*

*РУП «Институт рыбного хозяйства»,
220024, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Стебенева, 22,
e-mail: belniirh@tut.by*

BASIC PRINCIPLES FOR DEVELOPMENT OF ECO-SAFE PREPARATION FOR FISH CULTURE

N. Sverchkova, T. Romanovskaya*, N. Evsegneeva*, G. Zhuk*, E. Kolomiets*,
V. Ageets, S. Degtyarik, E. Maksimjuk*

**Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences, Minsk, Belarus,
2, Kuprevich Str., Minsk, 220141, Belarus, microbio@mbio.bas-net.by*

*RUE "Fish industry institute",
220024, Stebeneva str., 22, Minsk, Republic of Belarus,
e-mail: belniirh@tut.by*

Резюме. Подобраны штаммы бактерий рода *Bacillus* с высокой антагонистической активностью в отношении патогенов рыб. На их основе создан препарат пробиотического действия, разработана технология его получения и применения для профилактики и лечения бактериальных болезней рыб семейства карповых.

Ключевые слова. *Bacillus subtilis*, патогены рыб, пробиотик, спорообразующие бактерии.

Abstract. There are selected the strains of *Bacillus* bacteria with high antagonistic activity in relation to fish pathogens. On their basis there was generated a probiotic preparation, developed the technological process of its production and application for prevention and treatment of bacterial diseases of cyprinoid fishes.

Key words: *Bacillus subtilis*, fish pathogens, probiotic, sporogenous bacteria.

Введение. Эффективность рыбоводства существенно снижается из-за гибели рыб вследствие инфекционных заболеваний, возбудителями которых являются патогенные бактерии различных таксономических групп [1].

Использование антибиотиков приводит к формированию антибиотикорезистентности у возбудителей болезней рыб, а также к накоплению остаточных количеств препаратов в продукции рыбоводства. Современные требования к качеству и безопасности рыбной продукции инициируют исследования по созданию экологически безопасных средств для профилактики и лечения болезней рыб. Наиболее рациональным способом в борьбе с возбудителями бактериозов является использование пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* [2]. Бациллы характеризуются высокой биологической эффективностью, способностью повышать специфическую и неспецифическую резистентность организма рыбы, оказывать противоаллергенное действие, регулировать и стимулировать пищеварение. Применение пробиотических добавок в кормлении рыб способствует физиологическому ускорению их роста, сокращению сроков откорма и затрат на корм.

В связи с вышеуказанной задачей настоящего исследования является разработка основ создания экологически безопасного пробиотического препарата для рыбоводства, включающая следующие этапы: скрининг штаммов бактерий рода *Bacillus* с высокой антимикробной активностью к патогенной и условно-патогенной микрофлоре рыб, отбор и изучение наиболее активных культур, характеризующихся высокой антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний рыб, а также ферментативной (протеазной, ксиланазной, эндогликоназной) активностью, разработка на их основе технологии получения и применения пробиотического препарата для профилактики и лечения бактериальных болезней рыб.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы спорообразующих бактерий рода *Bacillus* с антимикробной активностью в отношении возбудителей болезней рыб. Бактерии-антагонисты выделяли из почвенных образцов, а также из образцов воды и ила прудов рыбоводческих хозяйств. В качестве тест-объектов использовали патогенные и условно-

патогенные бактерии, вызывающие бактериальные болезни рыб - *Aeromonas* sp., *Pseudomonas putrefaciens*, *Sphingobacterium multivorum* и др., предоставленные РУП «Институт рыбного хозяйства».

Глубинное культивирование бактерий-антагонистов рода *Bacillus* проводили при температуре 30°C в колбах Эрленмейера на качалке (180-200 об/мин), в ферментерах объемом 10 и 100 л (интенсивность аэрации 1,0 л воздуха/л среды·мин, скорость вращения мешалки 200-220 об/мин) на питательной среде с мелассой в качестве источника углерода. Для засева питательной среды использовали 1-2-суточный вегетативный посевной материал в количестве 10% об. При отработке условий культивирования бактерий в ферментерах варьировали режимы аэрации (0,8-1,2 л воздуха на 1 л среды в минуту) при скорости перемешивания 200 об/мин.

При определении титра клеток бактерий применяли метод предельных разведений [3]. Концентрацию спор оценивали аналогичным методом после прогревания бактериальной суспензии при 80°C в течение 10 мин.

Первичный отбор антагонистов проводили методом точечного тестирования [4]. Для оценки антагонистической активности препарата использовали метод лунок [4]. Результаты учитывали после 24-48 ч инкубирования при температуре 30°C по диаметру зон задержки роста тест-культур.

Протеазную активность бактерий оценивали методом Ансона в модификации Петровой и Винцюнайте, основанном на ферментативном гидролизе казеината натрия [5]. Активность эндо-1,4-β-глюконазы (Сх-фермента) определяли вискозиметрическим методом [6] в модификации Н.А.Ушаковой и соавт. по снижению вязкости раствора натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы [7]. Ксиланазную активность определяли по ГОСТ 353047-2008 [8].

Испытания эффективности действия пробиотика при скармливании в составе комбикормов проведены в лабораторных условиях РУП «Институт рыбного хозяйства», а также в рыбоводных хозяйствах республики.

Полученные результаты подвергали статистической обработке с помощью программы Microsoft Excel. При статистической обработке результатов экспериментов проводили определение средних арифметических и их доверительных интервалов для уровня вероятности 95% [9].

Результаты и обсуждение. Выделенные культуры бактерий (около 900 изолятов) были проверены на способность ингибировать рост и развитие патогенных и условно-патогенных бактерий родов *Aeromonas*, *Pseudomonas*. Согласно данным первичного отбора около 5% культур проявляли антагонистическую активность к испытанным тест-объектам. Для дальнейшей работы методом лунок отобраны культуры, наиболее активно подавляющие рост испытанных бактериальных тест-объектов, из которых максимальной антагонистической активностью обладали 2 изолята - 54 и 355 (табл. 1).

Таблица 1. – Сравнительная оценка антагонистической активности изолятов

Изолят	Диаметр зоны подавления роста тест–культур, мм		
	<i>Aeromonas sp.</i> 40	<i>Aeromonas sp.</i> 56	<i>Ps. putrefaciens</i> 62
38	23,0±0,3	26,5±0,4	27,0±0,5
44	23,0±0,2	25,0±0,3	30,0±0,4
50	26,0±0,4	31,0±0,5	21,0±0,4
52	23,0±0,2	25,0±0,3	29,0±0,4
54	25,0±0,3	31,0±0,4	32,0±0,5
67	22,0±0,2	23,5±0,3	28,0±0,3
130	24,0±0,2	25,5±0,2	21,5±0,3
133	25,0±0,2	31,0±0,2	20,0±0,3
146	24,0±0,6	30,0±0,4	27,0±0,2
355	27,0±0,7	32,0±0,5	32,5±0,3
359	26,0±0,6	28,0±0,3	31,0±0,5

В соответствии с морфологическими, культуральными, физиолого-биохимическими свойствами изоляты 54 и 355 были предположительно идентифицированы как *Bacillus subtilis* (табл. 2). Принадлежность отобранных изолятов к виду *B. subtilis* была подтверждена на основе ПЦР-анализа нуклеотидных последовательностей 16sРНК.

Таблица 2. – Физиолого-биохимические свойства отобранных изолятов бактерий

Физиолого-биохимические свойства	Изоляты	
	54	355
Окраска по Граму	+	+
Образование спор	+	+
Каталаза	+	+
Образование ацетиметилкарбинола (реакция Фогес-Проскауэра)	+	+
О/Ф тест по Хью-Лейфсону	«F» реакция	«F» реакция
Кислотообразование из сахаров:		
D-глюкозы	+	+
L-арабинозы	-	-
D-ксилозы	+	+
D-маннита	+	+
$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	+	+
Утилизация цитрата	-	-
Гидролиз:		
крахмала	+	+
казеина	+	+
желатина	+	+
Рост в присутствии:		
5% NaCl	+	+
7% NaCl	+	+
10% NaCl	-	±
Деградация тирозина	±	-

По результатам ветеринарно-токсикологических испытаний, проведенными сотрудниками УО «Гродненский государственный аграрный университет», установлено, что исследуемые культуры *B. subtilis* 54 и *B. subtilis* 355 являются непатогенными и безвредными для лабораторных животных, не

обладают токсичностью, аллергенностью и токсигенными свойствами и могут использоваться в ветеринарной практике.

Штаммы *B. subtilis* 54 и *B. subtilis* 355 депонированы в коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси.

Изучена антимикробная активность отобранных бактерий в отношении более широкого спектра патогенной и условно-патогенной микрофлоры рыб. Установлено, что диаметр зоны задержки роста испытанных тест-объектов достигает 24,0-34,0 мм (табл. 3).

Таблица 3. – Спектр антимикробной активности отобранных штаммов в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры рыб

Тест-объект	Диаметр зоны задержки роста тест-объекта штаммом-антагонистом, мм	
	<i>B. subtilis</i> 54	<i>B. subtilis</i> 355
<i>Aeromonas</i> sp. 40	25,0±0,3	27,0±0,7
<i>Aeromonas</i> sp. 54	28,0±0,4	29,0±0,4
<i>Aeromonas</i> sp. 56	31,0±0,4	32,0±0,5
<i>Aeromonas sobnia</i> 61	27,5±0,6	28,0±0,3
<i>Aeromonas hydrophila</i> 63	26,0±0,3	24,0±0,2
<i>Pseudomonas putrefaciens</i> 62	31,5±0,5	32,5±0,3
<i>Sphingobacterium multivorum</i> 60	34,0±0,6	28,0±0,5

Полезным свойством штаммов, составляющих основу пробиотика, является наличие у них комплекса ферментов, разлагающих крахмал, пектин, целлюлозу, жиры, протеины и обеспечивающих более полное усвоение рыбами компонентов комбикормов. Синтезируемые бактериями протеазы оказывают также стимулирующее влияние на регенерационные процессы организма животных и рыб, обладают тромболитическим действием. В связи с вышеуказанным, представляло интерес оценить гидролазную активность исследуемых штаммов.

В ходе исследований установлено, что бактерии характеризуются высокой протеазной, эндоглюконазной, ксиланазной активностями, причем, по уровню активности штамм *B. subtilis* 355 превосходит *B. subtilis* 54 (табл. 4).

Таблица 4. – Гидролазная активность штаммов *B. subtilis* – антагонистов патогенов рыб

Исследуемая культура	Гидролазная активность, ед/мл		
	протеазная	эндогликоконазная	ксилазная
<i>B. subtilis</i> 54	10,2±0,05	0,886±0,00055	2,29±0,008
<i>B. subtilis</i> 355	18,0±0,162	0,908±0,00058	3,54±0,02

Однако, учитывая то обстоятельство, что в отношении некоторых патогенов (*A. hydrophila* 63 и *S. multivorum* 60) штамм *B. subtilis* 54 проявляет более высокую активность, было решено включить оба штамма в состав препарата. Для подтверждения целесообразности данного решения методом лунок оценена совместимость отобранных штаммов бактерий *B. subtilis*. В ходе исследований показано отсутствие перекрестной антагонистической активности культур, что свидетельствует о возможности их совместного использования.

Таким образом, по результатам проведенных исследований показано, что отобранные бактерии рода *Bacillus* с взаимодополняющими свойствами обладают высокой антагонистической активностью в отношении различных патогенных и условно-патогенных бактерий – возбудителей болезней рыб, а также гидролазной активностью, что свидетельствует о перспективности их использования в качестве основы комплексного пробиотического препарата для профилактики и лечения бактериальных болезней рыб.

В основу технологии получения пробиотического препарата с использованием двух штаммов спорообразующих бактерий *B. subtilis* положен глубинный способ культивирования, обеспечивающий возможность всестороннего контроля за развитием штаммов-продуцентов. Проведены исследования по оптимизации питательных сред и параметров культивирования бактерий в ферментационных аппаратах различного типа. Установлено, что оптимальные условия для роста и накопления культурами антимикробных метаболитов в опытно-промышленных условиях достигаются при интенсивности аэрации 1 л воздуха/л среды мин, температуре 30°C,

скорости вращения мешалки 200 ± 20 об/мин с использованием питательной среды с мелассой в качестве источника углерода на 48 ч роста (табл.5.).

Таблица 5. – Динамика роста и антимикробной активности бактерий *B. subtilis* в оптимизированных условиях при глубинном культивировании в ферментере емкостью 100 л

Длительность культивирования, ч	Титр, КОЕ/мл		Диаметр зон подавления роста <i>Aeromonas sp. 56</i>	
	<i>B. subtilis</i> 54	<i>B. subtilis</i> 355	<i>B. subtilis</i> 54	<i>B. subtilis</i> 355
0	$2,5 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$	12,0	12,0
4	$3,1 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	12,5	12,0
8	$4,2 \times 10^7$	$3,6 \times 10^8$	16,0	15,0
12	$7,4 \times 10^8$	$1,8 \times 10^9$	18,5	15,5
16	$1,3 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	21,5	22,0
20	$1,4 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	24,5	23,5
24	$1,6 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	29,5	29,5
30	$2,0 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	30,5	29,0
36	$2,5 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$	30,0	29,5
42	$2,6 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	31,0	28,5
48	$3,1 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	31,0	29,0

Проведенные исследования по оптимизации условий глубинного культивирования бактерий позволяют получить культуральную жидкость (КЖ) бактерий с титром $2,4-3,1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл и высокой антагонистической и ферментативной активностями (диаметр зоны задержки роста тест-культуры 29-31 мм; зона гидролиза целлюлозы – 18-20 мм).

Важным этапом работ по созданию пробиотического препарата, наряду с отработкой параметров глубинного культивирования бактерий-антагонистов, является поиск рациональной препаративной формы, так как она в значительной мере обеспечивает эффективность его использования. Пробиотики выпускают в виде сухих или жидких препаратов, лиофильно-высушенных микроорганизмов в чистом виде или технической форме с

питательной средой. В качестве наполнителей используют сухое молоко, сахарозу, кукурузную, рыбную или другую муку. Последние более удобны при скармливании рыбе и животным.

Конечный этап получения пробиотического препарата на основе двух штаммов спорообразующих бактерий *B.subtilis* включал приготовление смеси КЖ бактерий, добавление к ней наполнителя (пшеничной муки) и высушивания полученной смеси до влажности 5% с использованием распылительной или лиофильной сушки.

Для оценки безвредности препарата проведены ветеринарно-токсикологические испытания на лабораторных животных (белых мышах) и рыбах. Установлено, что исследуемый пробиотический препарат не является токсичным и по степени воздействия на организм животных согласно ГОСТ 12.1.007-76 относится к 4 классу опасности – вещества малоопасные. Эмилин не является также патогенным и токсичным для рыб. При испытаниях не зарегистрировано отрицательного влияния на организм рыб, проявлений острой и хронической токсичности. Гематологические показатели рыб, получавших препарат, были в пределах физиологической нормы.

Лабораторные испытания пробиотического препарата на рыбах (сеголетках карпа) показали его эффективность при введении *per os* как для профилактики, так и для лечения аэромоноза у рыб. Минимальной дозой, при введении которой в организм рыбы наблюдается положительный эффект, является доза $1,1 \times 10^7$ КОЕ/кг живого веса.

Проведены исследования по оценке эффективности действия препарата при применении в составе корма в лабораторных условиях, а также в рыбоводных хозяйствах. Препарат использован в дозе $1,4 \times 10^8$ КОЕ/кг (200 г/т).

В первой серии лабораторных опытов кормление пробиотиком предшествовало заражению рыб аэромонадами (смыв бактериальной культуры *Aeromonas hydrophyla* (штамм Aer-64) задавали рыбам *per os*) – таким образом определяли профилактическую эффективность препарата. Во второй серии опытов кормление начинали после заражения и начала развития клинических

признаков аэромоноза (терапевтическая эффективность пробиотика). Рыба из контрольных групп препарат с кормом не получала. Наблюдение за подопытной рыбой осуществляли в течение 18 суток.

После кормления рыбы пробиотиком в течение 5 дней из расчета $1,4 \times 10^8$ КОЕ/кг и последующего заражения штаммом аэромонад у рыб из опытных групп в течение всего периода наблюдения не отмечено развития инфекционного процесса и гибели. У рыбы из контрольной группы, которая получала комбикорм без препарата, инфекционный процесс развивался бурно: на 2-й день эксперимента отмечено развитие клинических признаков, к утру 3-го дня погибло 70 % подопытных рыб, к утру 4-го дня - остальные 30%. Для них было характерно вздутие брюшка, экзофтальмия, при вскрытии обнаружено наличие кровянистого экссудата в полости тела.

Во второй серии опытов развитие клинических признаков аэромоноза началось у подопытных карпов на 2-е сутки. Сразу начали кормление пробиотиком. У рыб из всех опытных групп отмечено легкое покраснение основания плавников и ануса, дальнейшего развития клинических признаков заболевания не наблюдалось. Указанные признаки наблюдались у 100 % подопытных рыб, а у 15 %, кроме того, отмечено ерошение чешуи в передней части туловища и легкая экзофтальмия. Однако на 3 день кормления пробиотиком клинические признаки начали исчезать, и уже на 5 день они не отмечались у 60% рыб из опытных групп. Спустя сутки после окончания кормления рыба в опытных аквариумах была жива, активна и клинически здорова.

В контрольном аквариуме в течение 6 суток погибло 80% рыб. У оставшихся экземпляров болезнь перешла в хроническую форму: язвы у основания плавников, которые в течение 18 сут. наблюдения постепенно зарубцевались. При посевах из внутренних органов оставшихся в живых рыб были реизолированы в большом количестве патогенные бактерии Aer-64, что подтверждено при помощи тест-системы Api 20E.

В производственных условиях ОАО «Опытный рыбхоз «Селец» Березовского р-на Брестской области испытания проводились на двухлетках карпа общим весом 1600 кг, размещенных на садковой линии отделения «Белоозерск». Экспериментально установлено, что пробиотик благотворно влияет на жизнестойкость рыб, уровень контаминации внутренних органов условно-патогенной и сапрофитной микрофлорой остается стабильно сниженным. Рыба, прокормленная препаратом, не болеет бактериальными инфекциями, начинает раньше и активнее питаться. У нее выше выход из зимовки (на 8%) и навеска (на 10%), чем у рыбы, не получавшей пробиотика.

По результатам производственных испытаний разработана инструкция по применению пробиотического препарата для профилактики и лечения бактериальных болезней (аэромоноз, псевдомоноз и др.) прудовых рыб, в соответствии с которым препарат применяют перорально в смеси с кормом: 200 г/т комбикорма один раз в день на протяжении 5 суток (суточная норма лечебного корма - 5% от массы рыбы). Рекомендовано также применение препарата в виде лечебных ванн из расчета 10 г/м³ с прекращением водообмена на 20 минут (один раз в сутки в течение 5 дней). Побочных действий после применения препарата прудовым рыбам указанными способами в рекомендуемых дозах не установлено.

Заключение. В результате проведенных исследований создан экологически безопасный пробиотический препарат для профилактики и лечения бактериозов рыб семейства карповых, разработана технология его получения в опытно-промышленных условиях, а также рекомендации по применению. Использование пробиотика в рыбоводных хозяйствах Беларуси позволит улучшить эпизоотическую ситуацию на всех этапах выращивания рыбы, получать жизнеспособный посадочный материал и качественную товарную рыбопродукцию.

Список использованных источников

1. Радько, М.М. Борьба с болезнями рыб - актуальная задача рыбоводства Беларуси / М.М.Радько, Э.К.Скурат, С.М.Дегтярик,

М.В.Якубовский, А.И.Чигир, В.Г.Лысый // Белорусское сельское хозяйство. – 2008. – № 2 (78).

2. Скурат, Э.К. Пробиотики для профилактики бактериальных инфекций у рыб / Э.К. Скурат, В.А. Сиволоцкая, Т.А. Говор // Аналит. и реф. инф. Сер.: Болезни гидробионтов в аквакультуре. – 2001. – № 2 – С.30–32.

3. Лысак В.В. Микробиология. / В.В. Лысак, Р.А. Желдакова.- Методические рекомендации к лабораторным занятиям, контроль самостоятельной работы студентов. БГУ, Минск, 2002. – 54 С.

4. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии.– Й. Сэги. М.: Колос, 1983. – 253 С.

5. Петрова, И.С. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробиологического происхождения / И.С. Петрова, М.М. Винцянайте // Прикл. биохим. и микробиол. –1980. –Т.2, вып. 2. – С.322-327.

6. Синицин, А.П., Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов / А.П.Синицын.- М.: Изд-во МГУ, 1995. –С. 146-147.

7. Изучение механизмов пробиотического действия штамма *Bacillus subtilis* 8130 /Н.А.Ушакова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология.- 2006. – Т.42, №3. – С.285-291.

8. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности ксиланазы. ГОСТ Р 53047–2008; 30.06.2009.

9. Тюрин Ю.Н., Макаров А.А. Статистический анализ данных на компьютере.– М.: ИНФА-М.– 1998.– 544 С.