

УДК 579.676/639.3.043.2

DOI: 10.17072/1994-9952-2020-2-115-119.

Н. А. Коломин, О. Б. Сопрунова

Астраханский государственный технический университет, Астрахань, Россия

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ИЗОЛЯТОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ НА РАЗВИТИЕ И ВЫЖИВАНИЕ ГИДРОБИОНТОВ

Выделены и изучены новые изоляты молочнокислых бактерий, перспективные для использования в составе кормов для гидробионтов. В ходе исследования выделено 9 изолятов молочнокислых бактерий и изучены их физиолого-биохимические и производственно-ценные свойства. Выделенные изоляты обладают достаточно хорошей активностью кислотообразования (56.5–110 T°), выраженной сахаролитической активностью (расщепляют глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу и галактозу), способностью развиваться при высоких концентрациях NaCl. Для изучения эффективности использования молочнокислых бактерий в составе кормов использовали 4 наиболее активных изолята. В результате включения в аквариумные корма изучаемых изолятов установлено положительное действие двух изолятов на рыбоводно-биологические показатели рыб. Полученные данные свидетельствуют одновременно о биологической безопасности исследуемых культур, а также об увеличении интенсивности роста аквариумных рыб.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии; пробиотики; корма.

N. A. Kolomin, O. B. Soprunova

Astrakhan State Technical University, Astrakhan, Russian Federation

THE EFFECT OF NEW LACTIC ACID BACTERIA ON GROWTH AND SURVIVAL OF HYDROBIONTS

The article is devoted to the study and isolation of new isolates of lactic acid bacteria. During the study, 9 isolates of lactic acid bacteria were isolated and their physiological, biochemical, and production-valuable properties were studied. The isolates have sufficient acid-forming activity (56.5-110 T°), expressed saccharolytic activity (breakdown glucose, lactose, sucrose, maltose and galactose), the ability to develop at high concentrations of NaCl. Four of the most active isolates were used to study the effectiveness of lactic acid bacteria in the feed composition. As a result of inclusion of studied isolates in aquarium fodders, positive effect of two isolates on fish-growing and biological indices of fish has been established. The obtained data indicate at the same time the biological safety of the studied cultures, as well as the increase in the growth intensity of aquarium fish.

Key words: lactic acid bacteria; probiotics; feed.

В настоящее время аквакультура в России набирает стремительные обороты благодаря внедрению высокоинтенсивных методов выращивания гидробионтов. Однако при выращивании рыб в искусственных условиях наблюдается повышение уровня органического загрязнения водной среды и, как следствие, увеличение числа патогенных микроорганизмов. В результате ухудшения экологических условий, связанных с высоким уровнем кормления и большой плотностью посадки, снижается устойчивость гидробионтов к стрессовым факторам, что, в конечном счете, приводит к снижению темпа роста, устойчивости к заболеваниям, увеличению смертности. Традиционно в аквакультуре для лечения и профилактики заболеваний гидробионтов используют химические вещества, в том числе антибиотики. Однако их воздействие может спровоцировать появление устойчивых

мутагенных микробных штаммов, неблагоприятно влияющих на здоровье рыб [Jahangiri, 2018; Tarnecki, 2019].

Для нормализации условий, следует использовать пробиотические добавки, которые стимулируют оптимизацию протекания обменных процессов. В России на сегодняшний день уделяется большое внимание созданию эффективных пробиотических препаратов, использующихся в составе кормов для гидробионтов. Пробиотические препараты содержат в своем составе стабилизированные культуры микроорганизмов и продукты их ферментации, обладающие набором полезных свойств [Ушакова и др., 2012; Орлова, 2019]. Они стимулируют рост естественной микробиоты, повышают неспецифический иммунитет, а также подавляют рост и развитие условно-патогенных и па-

тогенных микроорганизмов. Как известно, пробиотики не оказывают отрицательного воздействия на микробиоту пищеварительного тракта, не загрязняют продукты рыбоводства и окружающую среду [Юрина, 2015; Артюхова, Ключева, 2015].

В технологии производства многих российских пробиотических препаратов используются импортные заквасочные культуры, имеющие достаточно высокую цену. В связи с этим разработка новых пробиотических препаратов на основе активных штаммов молочнокислых бактерий является актуальным и перспективным направлением.

Цель работы – исследование влияния новых изолятов молочнокислых бактерий в составе стартовых кормов на рост и развитие аквариумных рыб.

В соответствии с целью поставлены следующие задачи:

1. Выделение чистых культур молочнокислых бактерий из различных естественных источников.
2. Отбор наиболее активных изолятов молочнокислых бактерий на основании изучения физиолого-биохимических признаков.
3. Характеристика биологической эффективности использования молочнокислых бактерий в составе стартовых кормов.

Материалы и методы исследования

Источниками выделения для молочнокислых бактерий являлись молочная продукция домашнего производства (творог, брынза, сметана); квашеные овощи промышленного производства (капуста, томат) и домашнего приготовления (капуста, перец, чеснок). Выделение молочнокислых бактерий осуществляли на плотных и в жидких средах Бликфельда при 37°C. Получение чистых культур, определение каталазной, оксидазной, протеолитической, амилитической, сахаролитической и кислотообразующей активности проводили с использованием общепринятых методов. Определение устойчивости к желчи проводили на жидкой питательной среде, содержащей 0.5, 20.0 и 40.0% желчи в течение 24 ч. Способность бактерий расти в присутствии NaCl исследовали на жидкой питательной среде с добавлением соли в концентрации 5, 10 и 15% в течение 24 ч. Идентификацию микроорганизмов проводили на основании морфологических и физиолого-биохимических признаков [Нетрусов и др., 2005; ГОСТ 33951-2016].

Изучение эффективности использования молочнокислых бактерий в составе кормов проводили с помощью наиболее активных изолятов, которые обладали достаточно высокой активностью кислотообразования, желче- и солеустойчивостью. Для получения жидкой формы препаратов готовили бактериальные суспензии с единой концентрацией клеток. В качестве сорбента применяли корм

для аквариумных рыб – перетертых дафний. Жидкие формы препаратов вносили в корм путем орошения водным раствором добавок с последующим подсушиванием. Растворы распыляли равномерным слоем стерильными пульверизаторами. Подсчет клеток осуществляли в счетных камерах Горяева [Бурлаченко, 2008].

Определение влияния изолятов проводили на 2-суточных аквариумных рыбах гуппи, которые были разделены на 5 групп: контрольную и четыре опытных по 20 голов в каждой. Технология содержания во всех вариантах идентична и выполнена в соответствии с методиками (проводилась искусственная аэрация, фильтрация и подогрев воды в каждом аквариуме). Кормление контрольной группы осуществляли кормом без внесения добавок, а опытных групп – кормами, содержащими в своем составе по 1 изоляту молочнокислых бактерий в единой концентрации. Кормление производили дважды в сутки с промежутком в 7 ч. О действии препаратов судили по рыбоводно-биологическим характеристикам, что характеризовало действие препаратов на состояние молоди. В качестве рыбоводно-биологических показателей были взяты абсолютный и среднесуточный прирост, коэффициент массонакопления, а также выживаемость рыб в выборке. Взвешиванию и измерению подвергали всех рыб контрольной и опытной групп. Выживаемость выражали в процентах от общего количества рыб. Продолжительность опыта составила 60 сут. [Бурлаченко, 2008].

Результаты и их обсуждение

В результате исследований выделено 9 изолятов молочнокислых бактерий (табл. 1). При культивировании молочнокислых бактерий на плотной питательной среде установлено, что изоляты формируют гладкие выпуклые колонии светлого цвета, с ровным краем, однородной консистенцией. При культивировании изолятов в жидкой питательной среде наблюдалось изменение pH, помутнение среды и появление осадка. При микроскопировании обнаружены грамположительные непорообразующие палочки в цепочках и грамположительные кокки в цепочках с различным размером клеток.

Выявлено, что изоляты обладают достаточно хорошей активностью кислотообразования (56.5–110 Т°), что является одним из главных критериев отбора молочнокислых бактерий при разработке новых пробиотических препаратов. Также изоляты обладают выраженной сахаролитической активностью – расщепляют глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу и галактозу: не образуют каталазу, оксидазу, амилазу, протеазу и цитохромы. Это свидетельствует о том, что данные показатели соответствуют родовой характеристике молочнокис-

лых бактерий.

Таблица 1

Физиолого-биохимические свойства молочнокислых бактерий

Показатель	Изоляты молочнокислых бактерий								
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9
Источник выделения	брынза	брынза	творог	капуста	сметана	чеснок	капуста	перец	чеснок
Оксидаза	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Каталаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Цитохромы	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Протеаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Амилаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Липаза	0	0.1	0.7	0.1	0.5	0	0.4	0.3	0.1
Активность кислотообразования, ч	80	70	100	20	95	75	70	75	55
Сбраживание углеводов									
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Сахароза	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Галактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Рост в жидкой среде, содержащей NaCl, %									
5	+	+	+	+	+	-	+	+	+
10	+	+	+	+	+	-	-	-	+
15	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Рост в жидкой среде, содержащей желчь, %									
0.5	+	+	-	+	+	-	-	+	+
20	+	+	-	+	-	-	-	+	+
40	+	+	-	-	-	-	-	-	+

Одним из основных критериев для отбора производственно-ценных штаммов с пробиотическими свойствами является оценка толерантности молочнокислых бактерий к желчи и солености. Исследования показали, что все исследуемые изоляты, кроме одного (№ 6), способны развиваться в присутствии 5%-ного NaCl. На основании полученных данных можно выделить три солеустойчивых изолята (№ 2, 3, 5), развивающихся при концентрации NaCl 15%, и шесть слабогалофильных (№ 1–5, 9). Кроме этого, установлено, что шесть изолятов (№ 1-, 2-, 4-, 5-, 8-, 9-й) способны развиваться при низких концентрациях желчи, при концентрации 20% развиваются пять изолятов (№ 1-, 2-, 4-, 8-, 9-й), а при максимальной концентрации (40%) – 3 изолята (№ 1-, 2-, 9-й).

На основании результатов изучения физиолого-биохимических свойств и способности культивирования при сохранении свойств в лабораторной культуре для дальнейших исследований выбраны 4 изолята (№ 1-, 2-, 3-, 5-й), которые рассматривались в качестве добавки в составе кормов для аквариумных рыб.

В результате включения в рацион отобранных изолятов, обладающих пробиотическими свойствами, происходит улучшение рыбоводно-биологических показателей рыб (табл. 2). Подопытные рыбы по всем вариантам опыта потребляли внесенную порцию корма за одинаковый период времени – 2–3 мин. Это свидетельствует о том, что изоляты не ухудшают вкусовые качества корма.

Таблица 2

Рыбоводно-биологические показатели выращивания молоди гуппи

Показатели	Варианты опыта				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 5	К
Масса начальная, г	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.001
Масса конечная, г	0.33±0.08	0.5±0.15	0.33±0.03	0.38±0.06	0.33±0.03
Длина начальная, см	0.6±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1
Длина конечная, см	1.16±0.29	1.76±0.14	1.4±0.14	1.63±0.15	1.4±0.18
Кормовой коэффициент, ед.	1.09	1.02	1.1	1.08	1.08
Абсолютный прирост, г	0.32	0.49	0.32	0.37	0.32
Продолжительность опыта, сут.	60	60	60	60	60
Среднесуточный прирост, г/сут.	0.005	0.008	0.005	0.006	0.005
Среднесуточная скорость роста, %	6	6.73	6	6.25	6
Коэффициент массонакопления, ед.	0.023	0.028	0.023	0.025	0.023

При наблюдении за тест-объектами отклонений в поведении не обнаружено: рыбы активно передвигались в толще воды, реагировали на звуковые и тактильные раздражения. И в опыте, и в контроле наблюдался прирост массы рыб. Абсолютный прирост в варианте с добавлением изолята № 2 составил 0.49 г, что в 1.5 раза больше, чем в контрольном варианте, где прирост составил 0.32 г. Длина рыбы в опытных группах (№ 2 – 1.76 ± 0.14 ; № 5 – 1.63 ± 0.15) также несколько выше, по сравнению с контролем (1.4 ± 0.18). Сохранность рыб в период эксперимента составила 90%, что свидетельствует об отсутствии отрицательного влияния добавок на основе изучаемых изолятов. При использовании изолята № 2 скорость роста молодежи увеличилась на 30%, № 5 – на 15% по сравнению с этим же показателем в контрольном варианте.

Поедание корма во всех группах одинаково, так как кормление проводили нормировано. Однако при скармливании корма с изолятом № 2 кормовой коэффициент ниже (1.02), чем в контроле (1.08).

Таким образом, в ходе проведенного эксперимента установлено положительное действие изолятов № 2 и 5 на развитие тест-объектов, что не только повышает эффективность используемых кормов при выращивании аквариумных рыб, но и свидетельствует одновременно о биологической безопасности исследуемых культур.

Заключение

В результате эксперимента доказано, что все рыболовные показатели выше в группах, получавших корм с добавлением изолятов № 2 и 5 по сравнению с контролем, на основании чего можно констатировать, что изоляты оказывают положительное действие. Положительный эффект применения добавок, возможно, объясняется тем, что добавляемые в состав кормов изоляты, обладают определенным набором пробиотических свойств, в том числе наличием ферментов, способствующих быстрому расщеплению и лучшему усвоению пищи.

Несмотря на все преимущества применения бактериальных культур в составе пробиотических препаратов, многие хозяйства все же отказываются из-за их высокой стоимости и неуверенности в положительных производственных результатах. Однако практика показывает, что применение пробиотических добавок дает ощутимый эффект, а расходы на них компенсируются повышением показателей продуктивности гидробионтов [Буяров, Юшкова, 2017].

Библиографический список

- Артюхова С.И., Ключева К.В. Перспективы разработки отечественных биологически активных добавок к пище на основе консорциумов молочнокислых бактерий и бифидобактерий // Россия молодая: передовые технологии – в промышленность. 2015. № 3. С. 208–212.
- Бурлаченко И.В. Актуальные вопросы безопасности комбикормов в аквакультуре рыб. М.: Изд-во ВНИРО, 2008. 182 с.
- Буяров В.С., Юшкова Ю.А. Организация пробиотического кормления молодежи стерляди с целью предупреждения возникновения алиментарных заболеваний в индустриальной аквакультуре // Состояние и пути развития аквакультуры в Российской Федерации в свете импортозамещения и обеспечения продовольственной безопасности страны: материалы II нац. науч.-практ. конф. СПб., 2017. С. 5–9.
- ГОСТ 33951-2016. Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов. М.: Стандартинформ, 2016. 15 с.
- Нетрусов А.И. и др. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с.
- Орлова Т.Н. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий для ферментированных молочных продуктов // Ползуновский вестник. 2019. № 2. С. 47–50.
- Ушакова Н.А. и др. Поколение пробиотических препаратов кормового назначения // Фундаментальные исследования. 2012. № 1. С. 184–192.
- Юрина Н.А. Новые подходы к использованию биопрепаратов в рыболовстве // Сб. науч. тр. Северо-Кавказского НИИ животноводства. 2015. Т. 4. С. 109–113.
- Jahangiri L. Administration of Probiotics in the Water in Finfish Aquaculture Systems: A Review // Fishes. 2018. Vol. 3, Iss. 3, P. 33.
- Tarnecki A.M. Benefits of a Bacillus probiotic to larval fish survival and transport stress resistance // Scientific reports. 2019. Vol. 9, Iss. 1, P. 1–11.

References

- Artyukhova S.I., Klyueva K.V. [Prospects for the development of domestic biologically active food additives on the basis of lactic acid bacteria and bifidobacteria consortia]. *Rossija molodaja: peredovye tehnologii – v promyshlennost'*. N 3 (2015): pp. 208-212. (In Russ.).
- Burlachenko I.V. *Aktual'nye voprosy bezopasnosti kombikormov v akvakul'ture ryb*. [Topical problems of the mixed feed safety in fish farming]. Moscow, VNIRO Publ., 2008. 183 p.

- Buyarov V.S., Yushkova U.A. [Organization of preventive feeding of young sterlet in order to prevent the occurrence of alimentary diseases in industrial aquaculture]. *Sostojanie i puti razvitija akvakul'tury v Rossijskoj federacii v svete importozameščeniya i obespečeniya prodovol'stvennoj bezopasnosti strany* [State and ways of development of aquaculture in the Russian Federation in the light of import substitution and ensuring food security of the country: Materials of the scientific and practical conference]. St-Peterburg, 2017, pp. 5-9. (In Russ.).
- GOST 33951-2016. *Moloko i moločnaja produkcija. Metody opredelenija moločnokislych mikroorganizmov* [Milk and milk products. Methods for determination of the lactic acid bacteria]. Moscow, Standartinform Publ., 2016. 15 p. (In Russ.).
- Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. *Praktikum po mikrobiologii* [Workshop on Microbiology]. Moscow, Akademiya Publ., 2005. 608 p. (In Russ.).
- Orlova T.N. [Isolation and identification of lactic acid bacteria for fermented dairy products]. *Polzunovskij vestnik*. N 2 (2019): pp. 47-50. (In Russ.).
- Ushakova N.A., Nekrasov R.V., Pravdin V.G., Kravtsova L.Z., Bobrovskaya O.I., Pavlov D.S. [Generation of probiotic preparations fodder purposes] *Fundamental'nye issledovaniya*. N 1 (2012): pp. 184-192. (In Russ.).
- Jurina N.A. [New approaches to use of biological products in aquaculture]. *Sbornik naučnykh trudov Severo-Kavkazskogo NII životnovodstva*. V. 4 (201): pp. 109-113. (In Russ.).
- Jahangiri L. Administration of Probiotics in the Water in Finfish Aquaculture Systems: A Review. *Fishes*. V. 3, Iss. 3 (2018): p. 33.
- Tarnecki A.M. Benefits of a Bacillus probiotic to larval fish survival and transport stress resistance. *Scientific reports*. V. 9, Iss 1 (2019): pp. 1-11.

Поступила в редакцию 15.03.2020

Об авторах

Коломин Никита Александрович, аспирант кафедры «Прикладная биология и микробиология» Астраханский государственный технический университет
ORCID: 0000-0001-6445-101X
414056, Астрахань, ул. Татищева, 16;
kolomin94@mail.ru

Сопрунова Ольга Борисовна, доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой «Прикладная биология и микробиология» Астраханский государственный технический университет
ORCID: 0000-0002-5710-6362
414056, Астрахань, ул. Татищева, 16;
soprunova@mail.ru; (8512)614225

Информация для цитирования:

Коломин Н.А., Сопрунова О.Б. Влияние новых изолятов молочнокислых бактерий на развитие и выживание гидробионтов // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2020. Вып. 2. С. 115–119. DOI: 10.17072/1994-9952-2020-2-115-9.

Kolomin N.A., Soprunova O.B. [The effect of new lactic acid bacteria on growth and survival of hydrobi-onts]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija*. Iss. 2 (2020): pp. 115-119. (In Russ.). DOI: 10.17072/1994-9952-2020-2-115-119.

About the authors

Kolomin Nikita Alexandrovich, Postgraduate student of the Department «Applied Biology and Microbiology» Astrakhan State Technical University.
ORCID: 0000-0001-6445-101X
414056, Russia, Astrakhan, Tatishecheva Str., 16;
kolomin94@mail.ru

Soprunova Olga Borisovna, Doctor of biology, Professor, Head of the Department «Applied Biology and Microbiology» Astrakhan State Technical University.
ORCID: 0000-0002-5710-6362
414056, Russia, Astrakhan, Tatishecheva Str., 16;
soprunova@mail.ru; (8512)614225

