

ВИЖИВАНІСТЬ ПРОБІОТИЧНИХ ЛАКТОБАКТЕРІЙ В СКЛАДІ ГРАНУЛЬОВАНОГО КОРМУ ПРОТЯГОМ ЙОГО ТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ

Л.В. ХУДА, Н.М. ГОЛІНЕЙ

¹Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського 2, м. Чернівці, 58012
e-mail: l.khuda@chnu.edu.ua

Перспективною групою мікроорганізмів, які можна використовувати як пробіотики в аквакультурі, є бактерії роду *Lactobacillus*. Ефективним методом цільової доставки цих бактерій в організм гідробіонтів, особливо в умовах великих аквакультурних господарств, залишається додавання пробіотичних препаратів безпосередньо у корм. Проте існує проблема довготривалого зберігання кормів з внесеними до них пробіотиками. В даному дослідженні було оцінено виживаність пробіотичних мікроорганізмів роду *Lactobacillus* в складі гранульованого корму протягом його тривалого зберігання. Пробіотичні штами лактобактерій *Lactobacillus casei* IMB B-7280, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMB B-7281 та *L. acidophilus* IMB B-7279, люб'язно надані Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, додавали до зразків корму *Aller Aqua Bronze* з наступною перегрануляцією та висушуванням і зберіганням протягом 28 діб. Встановлено поступове зменшення кількості пробіотичних мікроорганізмів у всіх досліджуваних зразках корму протягом експерименту. Через два тижні від початку дослідження кількості живих клітин *L. casei* та *L. bulgaricus* статистично не відрізнялись один від одної та становили близько 60% від початкової кількості клітин. Натомість, число життєздатних клітин *L. acidophilus* становило 52%. Найвищим показником виживаності в гранульованому кормі на 28 добу його зберігання володіли пробіотичні мікроорганізми *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMB B-7281, що становило 58% від початкової кількості внесених бактерій. Найнижчим показником виживаності серед досліджуваних штамів лактобацил володіють *L. acidophilus*. Оптимальним терміном придатності гранульованого корму, збагаченого пробіотиком, є 14 діб з моменту виготовлення

Ключові слова: пробіотики, лактобактерії, аквакультура, корм

Вступ. Згідно зі звітом Європейського комітету нагляду за використанням ветеринарних антимікробних препаратів (ESVAC), європейські країни в період з 2011 по 2022 рік суттєво скоротили продажі ветеринарних антибіотиків, досягнувши найнижчого рівня за всю історію спостережень. Згідно з даними з 25 країн-членів ЄС загальний обсяг продажів ветеринарних антибіотиків скоротився на 53%. Задекларована «Farm to Fork» стратегія поступово призводить до зниження ризику розвитку резистентності бактерій у сільськогосподарських тварин та людей (Sales ..., 2023).

Однією з перспективних альтернатив застосування антибіотиків є використання пробіотичних мікроорганізмів. В аквакультурі пробіотики можуть запобігати поширенню інфекційних захворювань, підвищувати ефективність перетравлення кормів та стимулювати ріст за рахунок покращення складу гастроінтестинальної мікробіоти, зміцнення імунної системи та підвищення стійкості до стресорних чинників, викликаних індустріальним вирощуванням (Chen X. et al,

2021). Однією з груп мікроорганізмів, які входять до складу нормальної мікрофлори риб та можуть бути застосовані як пробіотики в аквакультурі, є лактобактерії. Показано, що їх використання спричиняє підвищення виживаності, стимуляцію імунного захисту, зростання рівня секреції травних ензимів (Valiollahi J. et al, 2018). Крім цього, лактобактерії здатні позитивно впливати на інші групи пробіотичних мікроорганізмів, тим самим збільшуючи їх чисельність, зокрема біфідобактерії.

Спосіб та форма цільової доставки пробіотичних препаратів в аквакультурі визначається не лише видом та віком особин, яким призначається добавка, а й умовами утримання аквакультурних об'єктів: акваріуми, відкриті водойми, рециркуляційні установки тощо. Ефективним методом, особливо в умовах великих господарств, залишається додавання пробіотичних препаратів безпосередньо у корм. Проте існує проблема довготривалого зберігання кормів з внесеними до них пробіотичними мікроорганізмами. На сьогоднішній день апробуються різноманітні методи збільшення

терміну придатності, наприклад використання колоїдних розчинів мінералів (Chomová N. et al., 2023). Вважливо підбирати такий вид та штам мікроорганізмів, котрий буде здатний максимально довго зберігати життєздатність в умовах довготривалого зберігання. Отже, метою даного дослідження було оцінити виживаність пробіотичних мікроорганізмів роду *Lactobacillus* в складі гранульованого корму протягом його тривалого зберігання.

Матеріали та методи. В роботі використовували пробіотичні штами лактобактерій *Lactobacillus casei* IMB B-7280, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 та *L. acidophilus* IMB B-7279, люб'язно надані для досліджень Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Ліофілізовані культури вказаних мікроорганізмів в кількості 0,2г (число КУО 1×10^{11}) додавали до проб (20 г) попередньо розм'якшеного гранульованого корму Aller Aqua Bronze. Після додавання пробіотиків корми перегранульовували, висушували та в подальшому зберігали при +4°C у герметично закритій тарі.

Експеримент тривав 28 діб. На 1-у, 3, 7, 14, 21 та 28 добу проводився відбір зразків корму для визначення кількості живих клітин пробіотичних мікроорганізмів. Для цього до 1 г корму додавали 100 мл дистильованої води, суспензію фільтрували, з фільтрату відбирали 1 мл і доводили дистильованою водою до об'єму 10 мл. Задля відстеження кількісних змін лактобактерій в кормі, а також для дослідження загального мікробного профілю використовували *Lactobacillus* MRS Agar та м'ясопептонний агар відповідно. Культивування здійснювали протягом 48 годин при температурі 37°C. Отримані результати обраховували статистично з використанням критерію Стюдента.

Результати та їх обговорення. Аналіз отриманих даних показав поступове зменшення кількості пробіотичних мікроорганізмів у всіх досліджуваних зразках корму протягом експерименту (рис. 1.). Так, на 14-ту добу експерименту кількості живих клітин *L. casei* та *L. bulgaricus* статистично не відрізнялись один від одної та становили близько 60% від початкової кількості клітин. Натомість, число життєздатних клітин *L. acidophilus* становило 52%, що є найнижчим результатом на проміжному етапі експерименту серед дослідних зразків та свідчить про втрату половини всіх клітин вже через два тижні зберігання корму. На 28-му добу експерименту кількість живих клітин *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus* складала 58%, 25%, та 16% відповідно. Отже, можна

стверджувати, що найбільш доцільною для використання як пробіотичної добавки є культура *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 за рахунок відносної стабільності та високого показника виживаності на 28-му добу експерименту.

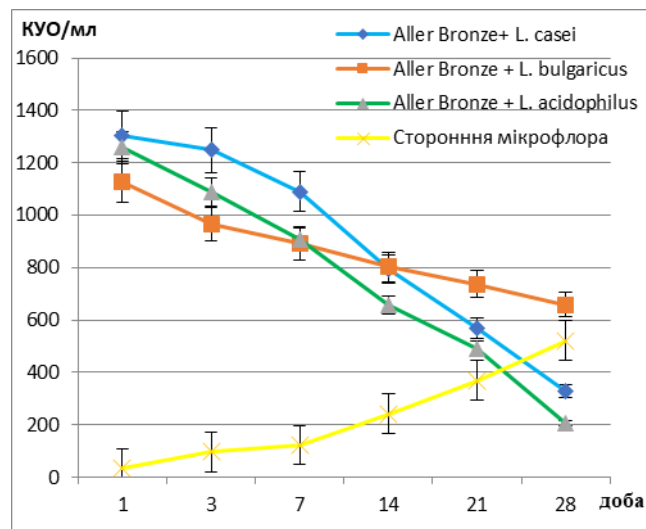


Рис. 1. Кількість колоній лактобактерій та сторонньої мікрофлори в складі гранульованого корму протягом 28 діб його зберігання

Fig. 1. The content of lactobacilli and foreign microflora colonies in granular feed during 28 days of storage

Слід зазначити, що на 14 добу зберігання корму кількість живих клітин *L. bulgaricus* все ще досить висока, проте має тенденцію до подальшого поступового зниження. Отже, перегранульований корм з додаванням пробіотику доцільно зберігати та використовувати протягом не більше, ніж 14 діб задля збереження максимального позитивного ефекту.

Варто зауважити, що пробіотичні бактерії *Lactobacillus casei* IMB B-7280 мають найвищий показник закріпленості в кормі протягом перших трьох діб від початку експерименту. Таким чином можна стверджувати, що пробіотики даного виду доцільно вносити в корм, якщо період його використання є короткотривалим.

Бактерії виду *L. acidophilus* показали найнижчий ступінь прикріплення та виживаності, отже використання його як пробіотичної добавки до корму в досліджуваній концентрації є недоцільним. Зазначимо, що всі колонії, які були досліджені, мали типовий колір, консистенцію та форму країв.

Під час експерименту у зразках корму спостерігали збільшення кількості сторонньої мікрофлори. Протягом перших двох тижнів кількість цих мікроорганізмів була відносно невеликою та не перевищувала 250 КУО/мл.

Проте на 21 та 28 день їх кількість суттєво

зросла, що в певній мірі корелює зі зменшенням кількості пробіотичних бактерій, що може свідчити про конкурентні взаємодії між ними. Ідентифіковані види бактерій, котрі культивувались на м'ясопептонному агарі - це переважно бактерії родів *Bacillus* і *Clostridium*.

Органолептичні показники корму за період проведення експерименту залишались в нормі. Стороннього запаху, зміни текстури чи

утворення плісняви на поверхні гранул помічено не було. Не встановлено також достовірної різниці показників набухання корму Aller Aqua Bronze та зразків з додаванням досліджуваних пробіотичних добавок.

Висновки. Найвищий показник виживаності пробіотичних бактерій у гранульованому кормі на 28 добу.

References:

1. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2022 Trends from 2010 to 2022 Thirteenth ESVAC report 20 November 2023 EMA/299538/2023 Veterinary Medicines Division
2. Chen X. et al. Probiotics improve eating disorders in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) induced by a pellet feed diet via stimulating immunity and regulating gut microbiota. *Microorganisms*. 2021; 9(6): 1288 <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061288>
3. Valiollahi J. et al. Use of *Lactobacillus* for improved growth and enhanced biochemical, hematological, and digestive enzyme activity in common carp fishes, (*Cyprinus carpio* L.), at Mazandaran Iran. *North American Journal of Aquaculture*. 2018; 80 (2): 206–215. <https://doi.org/10.1002/naaq.10027/>
4. Chomová N. et al. Development and evaluation of a fish feed mixture containing the probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* prepared using an innovative pellet coating method. *Frontiers in veterinary science*. 2023; 10: 1-14. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1196884>

SURVIVAL OF PROBIOTIC LACTOBACILLI IN THE COMPOSITION OF GRANULAR FEED DURING ITS LONG-TERM STORAGE

L.V. Khuda, N.M. Holinei

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
l.khuda@chnu.edu.ua

Bacteria of the genus Lactobacillus are a promising group of microorganisms that can be used as probiotics in aquaculture. An effective method of targeted delivery of these bacteria to the body of aquatic organisms, especially in large farms, is the addition of probiotic preparations directly to the feed. However, there is a problem of long-term storage of feed with added probiotics. In this study, the survival of probiotic microorganisms of the genus Lactobacillus in the composition of granular feed during its long-term storage was evaluated. The probiotic strains of lactobacilli Lactobacillus casei IMV B-7280, L. delbrueckii subsp. bulgaricus IMV B-7281 and L. acidophilus IMV B-7279, kindly provided by the D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine, were added to Aller Aqua Bronze feed samples, followed by pelletizing and drying and storage for 28 days. A gradual decrease in the number of probiotic microorganisms in all the studied feed samples during the experiment was found. Two weeks after the beginning of the study, the number of live cells of L. casei and L. bulgaricus did not differ statistically from each other and amounted to about 60% of the initial number of cells. In contrast, the number of viable L. acidophilus cells was 52%. The highest survival rate in the granular feed on the 28th day of its storage was observed for probiotic microorganisms L. delbrueckii subsp. bulgaricus IMV V-7281, which constituted 58% of the initial number of introduced bacteria. The lowest survival rate among the studied lactobacillus strains was observed for L. acidophilus. The optimal shelf life of granular feed enriched with probiotics is 14 days from the date of manufacture.

Keywords: probiotics, lactobacilli, aquaculture, feed

Отримано редколегією 19.11.2023