

УДК 597.442+597.554.3.591.132

ВЛИЯНИЕ КОРМОВОГО ПРОБИОТИКА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* НА ПИЩЕВАРЕНИЕ РЫБ ПРИ САДКОВОМ ВЫРАЩИВАНИИ

© 2017 г. В. А. Зуенко¹, К. С. Лактионов¹, И. В. Правдин²,
Л. З. Кравцова², Н. А. Ушакова³, *

¹Орловский государственный аграрный университет

²Научно-технический центр биологических технологий в сельском хозяйстве – НТЦ БИО
г. Шебекино, Белгородская область

³Институт проблем экологии и эволюции РАН – ИПЭЭ, Москва

*E-mail: naushakova@gmail.com

Поступила в редакцию 15.02.2016 г.

Исследована активность пищеварительных ферментов, качественный состав и соотношение родов бактерий в химусе кишечника двухлеток карпа *Cyprinus carpio* и стерляди *Acipenser ruthenus* при кормлении искусственными кормами в условиях садкового выращивания. Показано, что живые бактерии *Bacillus subtilis*, входящие в состав пробиотика ПроСтор, оказывают положительное влияние на численность и структуру микробного сообщества химуса кишечника, активность ряда пищеварительных ферментов, общую переваримость корма и прирост массы карпа и стерляди. В опытных группах по сравнению с контролем общая численность микроорганизмов в химусе выше: у карпа на 13%, у стерляди – в 3.5 раза. У исследованных видов рыб увеличение активности пищеварительных ферментов сопровождается снижением содержания общего азота, аммиака и мочевины, по-видимому, вследствие как лучшего усвоения белка, так и более интенсивного использования азотистых метаболитов микрофлорой кишечника для синтеза собственной биомассы. Среднесуточный прирост массы карпа и стерляди в опытных группах превышает таковой у рыб в контроле соответственно на 25 и 35%.

Ключевые слова: стерлядь *Acipenser ruthenus*, карп *Cyprinus carpio*, пробиотик ПроСтор, бактерия *Bacillus subtilis*, кишечная микрофлора, активность ферментов, переваримость, компоненты корма, прирост массы.

DOI: 10.7868/S0042875217010179

Индустриальные условия выращивания рыб кардинально отличаются от природной среды обитания: рыбы лишены естественной пищи, нарушены процессы самоочищения воды, увеличен уровень органического загрязнения воды и число условно-патогенных бактерий в водной среде. Под влиянием микрофлоры воды и кормов происходят изменения в микробиоценозе кишечника рыб. Такие изменения, как привило, носят негативный характер, приводят к снижению темпа роста и устойчивости рыб к заболеваниям и увеличивают смертность. Стрессы различного происхождения, неизбежные при интенсивном культивировании, ещё более усугубляют ситуацию (Щербина, 1983; Бурлаченко, 2008; Васильева и др., 2012). В качестве эффективного способа нормализации микробиоценоза кишечника и физиологического состояния рыб признаётся применение пробиотиков (Щербина, Гамыгин, 2006; Pavlov et al., 2014). Введение в корма живых бактерий и их метаболитов

оказывает многообразное действие как на микрофлору желудочно-кишечного тракта, так и на обменные функции организма животных, в том числе и рыб. Внимание к пробиотикам в последнее время существенно возросло в связи с увеличением резистентности рыб к антибиотикам и поиском альтернативы им (Noga, 1995; Пономарев и др., 2002). Наиболее часто для рыб применяют пробиотические препараты на основе бактерий рода *Bacillus*. В частности, показана их эффективность при выращивании осетровых (*Acipenseridae*) и карпа *Cyprinus carpio* в установках замкнутого водоснабжения (Pavlov et al., 2014).

Садковое выращивание рыб – одна из ветвей индустриального рыбководства. Для правильной организации кормления необходимо знать особенности пищеварения объектов выращивания и иметь представление о роли в этом процессе пробиотических бактерий.

Цель работы – исследовать воздействие бактерий *B. subtilis*, входящих в пробиотик кормового назначения ПроСтор, на различные группы кишечных микросимбионтов, активность ферментов кишечника, концентрацию в его химусе метаболитов, перевариваемость питательных веществ и темп роста массы стерляди *Acipenser ruthenus* и карпа при экспериментальном кормлении в условиях садкового культивирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве объектов исследования выбраны стерлядь и карп – виды, характеризующиеся разным типом питания и разным строением пищеварительного тракта. Пищу стерляди составляют водные личинки насекомых, мелкие моллюски, икра других рыб. Её пищеварительный тракт разделяется на переднюю кишку, к которой относятся ротоглоточная полость, пищевод и желудок, среднюю кишку, образующую петлю двенадцатиперстной кишки и нисходящий отдел спиральной кишки, а также заднюю кишку, открывающуюся анальным отверстием. Спиральная кишка является основным местом развития симбионтных микроорганизмов. Карп – неприхотливая к условиям среды, всеядная, быстрорастущая рыба; питается бентосными организмами, фито- и зоопланктоном. Желудок у карпа отсутствует, пища переваривается непосредственно в кишечнике ферментами и симбионтными микроорганизмами.

Исследования проведены в производственных условиях в садковом хозяйстве “Лагуна” (Орловская область) в июле 2015 г. Садки (5.0 × 3.9 × 4.0 м, диаметр ячеи 1.5 см) располагались в водоёме площадью 49 га; глубина в месте установки садков достигала 6 м. Рыб (возраст 1+) выращивали при плотности посадки, соответствующей нормативу: стерлядь – 10–15, карп – 15–20 кг/м² (Щербатова, 2007), и кормили два раза в сутки (в 9 и 20 ч) по нормам кормления (Скляров, 2008) комбикормом; стерлядь – ОТ-7, карпа – ВБС-РЖ. В рацион опытных рыб вводили пробиотик ПроСтор (НТЦ БИО, г. Шебекино Белгородской области) в концентрации 2 кг/т. В начале эксперимента из садков с опытными и контрольными рыбами произвольно отобрали по 20 особей, определили их массу и поместили латунными пластинками с индивидуальным номером, которые закрепили на грудных плавниках. Продолжительность опыта – 30 сут.

В течение опыта основные гидрохимические показатели контролировали ежедневно. Общую жёсткость воды определяли комплексометрическим методом в присутствии трилона Б, аммиачно-буферного раствора и индикатора хром синий К в щелочной среде путем титрования. Температуру воды и содержание растворённого в воде кислорода измеряли портативным термодоксимет-

ром Handy Polaris (Дания); рН – портативным рН-метром HI 98128 (Германия). Концентрацию цианобактерий подсчитывали в камере Нажотта (Россия), общий титр водных микроорганизмов определяли методом Брида (Герхардт и др., 1983) на фиксированных и окрашенных мазках. Общая жёсткость воды варьировала в пределах 2.3–4.1 мг-экв/л, температура воды – 22–25°C, содержание кислорода – 7.5–8.6 мг/л, рН – 7.2, численность цианобактерий – 12–17 тыс/мл, общая обсеменённость микроорганизмами – 10³–10⁶ млн/л, что соответствовало гидробиологическим нормам для изучаемых видов рыб.

Перевариваемость питательных веществ корма (по 10 экз. из каждой группы), анализировали на 30-е сут. после начала опыта путём введения в корм 1%-ной окиси хрома по степени прироста её концентрации в фекалиях (Скляров, 2008). Содержание окиси хрома в фекалиях определяли на хроматографе ВЭЖХ UltiMate 3000 (США). Химический состав (сырой протеин (СП), безазотистые экстрактивные вещества (БЭВ), сырой жир (СЖ) и сырую клетчатку (СК)) кормов и фекалий определяли с помощью экспресс-лаборатории NirsDS 2600 (Швейцария). Сухое вещество (СВ) определяли путём высушивания проб до постоянной массы в сушильном шкафу ШС 35/250-250-П-Стандарт (Россия); сырую золу (СЗ) – озолением в муфельной печи LT 9/12 (Россия).

В конце опыта определяли массу помеченных в начале опыта рыб (по 20 экз. из каждой группы) и отобрали пробы (по 5 экз. из каждой группы) для анализа состава микрофлоры, активности ферментов и концентрации метаболитов. Брали содержимое всего кишечника и тщательно перемешивали. Микробную обсеменённость химуса кишечника подсчитывали по методу Брида под микроскопом Hitachi-NM (Япония) на фиксированных и окрашенных мазках. Для определения родовой принадлежности бактерий учитывали морфологию и размеры клеток и колоний, окраску по Граму, способность к спорообразованию, подвижность, рост на селективных средах, каталазную и оксидазную активности, образование аммиака, индола, сероводорода, газов, способность редуцировать нитраты (Герхардт и др., 1983; Garrity et al., 2005; Krieg et al., 2010).

Для определения значимых для пищеварения микроорганизмов в культуральные среды добавляли минеральные компоненты, а в качестве ростового вещества – стерильный 10%-ный центрифугат кишечника рыб и одно из веществ, обеспечивающих энергетические и пластические функции (пептон, амилосу или целлюлозу). Суммарную активность эндогенных и симбионтных энзимов оценивали в присутствии буфера, поддерживающего уровень рН в пределах тех значений, которые наблюдались в кишечнике карпа (7.6) и стер-

ляди (7.8). Активность гидролиз определяли при 25–30°C.

Активность амилазы (КФ 3.2.1.1) в химусе определяли колориметрически (субстрат – растворимый крахмал); протеаз – по реакции с нингидрином (субстрат – казеин по Гаммерстену); липазы (КФ 3.1.1.3) – титрометрическим методом Альтгаузена; эндогликанызы (целлюлазы, КФ 3.2.1.4) – по изменению вязкости раствора карбоксиметилцеллюлозы; концентрацию мочевины – колориметрическим методом, основанным на взаимодействии водно-спиртового раствора мочевины в присутствии фенола и соляной кислоты с гипохлоритом кальция; аммиака – колориметрией с реактивом Несслера (Клесов и др., 1980; Курилов, 1987; Уголев и др., 2002).

Статистическая обработка экспериментальных данных (определение среднего значения, стандартной ошибки и критериев достоверности по Стьюденту) выполнена в программе Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольных группах общая численность микроорганизмов в химусе кишечника рыб составляла: у карпа – 56.5 ± 2.61 млрд/г, у стерляди более чем на порядок ниже – 4.3 ± 1.27 млрд/г. Различия наблюдались как в качественном составе, так и в соотношении родов бактерий, входящих в микробное сообщество этих видов (рис. 1а, 2а). У карпа в микробном сообществе преобладали бактерии кишечной группы *Escherichia* и *Proteus*, составляя в сумме 36%, а у стерляди – вибрионы *Aeromonas* и *Vibrio*, в сумме также 36%; доля *Enterobacter* как представителя кишечной группы у стерляди составила 15%. У карпа отмечены *Lactobacillus*, которые не обнаружены у стерляди. При этом у обоих видов рыб на долю грамотрицательных бактерий приходилось в около 70%, а бактерий рода *Bacillus* – 13–15%.

В опытных группах общая численность микроорганизмов была выше, чем в контроле ($p < 0.02$): у карпа на 13%, у стерляди – в 3.5 раза, достигнув соответственно 63.8 ± 3.78 и 15.2 ± 0.34 млрд/г. Соотношение представителей разных родов в составе микробиоты химуса кишечника рыб, питавшихся комбикормом с пробиотиком, отличалось от такового у особей контрольных групп (рис. 1б, 2б). Доля представителей кишечной группы была ниже: *Proteus* – на 6–14%, *Acinetobacter* – на 5–9%, *Bacillus* – на 7–8%. Снижение численности бактерий рода *Bacillus* можно объяснить конкурентными взаимоотношениями резидентных бактерий кишечника и пробиотика. Напротив, доля других функционально значимых представителей ассоциации (*Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*) пропорционально увеличилась.

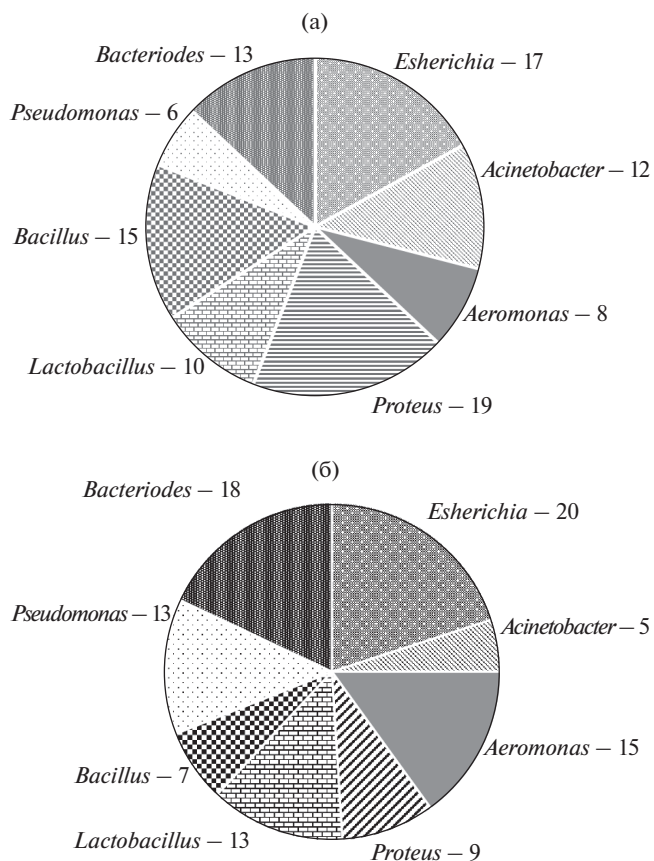


Рис. 1. Состав микробиоты карпа *Cyprinus carpio*, %: а – контроль; б – особи, питавшиеся кормом с добавлением пробиотика ПроСтор.

В абсолютных величинах число бактерий, расщепляющих белок и крахмал, повысилось у обоих изучаемых видов на 19–40 млн, гидролизующих клетчатку (у карпа) – на 10 млн (рис. 3).

Введение в корма пробиотика вызвало изменение биохимических показателей химуса и, прежде всего, активности ферментов (табл. 1). У опытных особей по сравнению с контрольными обоими исследованными видами существенно выше активность протеаз, амилазы, у карпа – эндогликанызы (целлюлазы), и в несколько меньшей степени – липазы. Кроме того, заметно ниже содержание азота в химусе, по-видимому, вследствие лучшего усвоения белка, а также азотистых метаболитов – аммиака и мочевины, которые интенсивнее использовались микрофлорой кишечника для синтеза собственной биомассы. Аналогичные результаты получены при введении пробиотика ПроСтор в рационы кроликов (Лактионов и др., 2012; Ушакова и др., 2013а).

Изменения, происходящие в кишечнике, оказали влияние как на переваримость сухого вещества комбикормов в целом, так и отдельных его ингредиентов, прежде всего (рис. 4). Перевари-

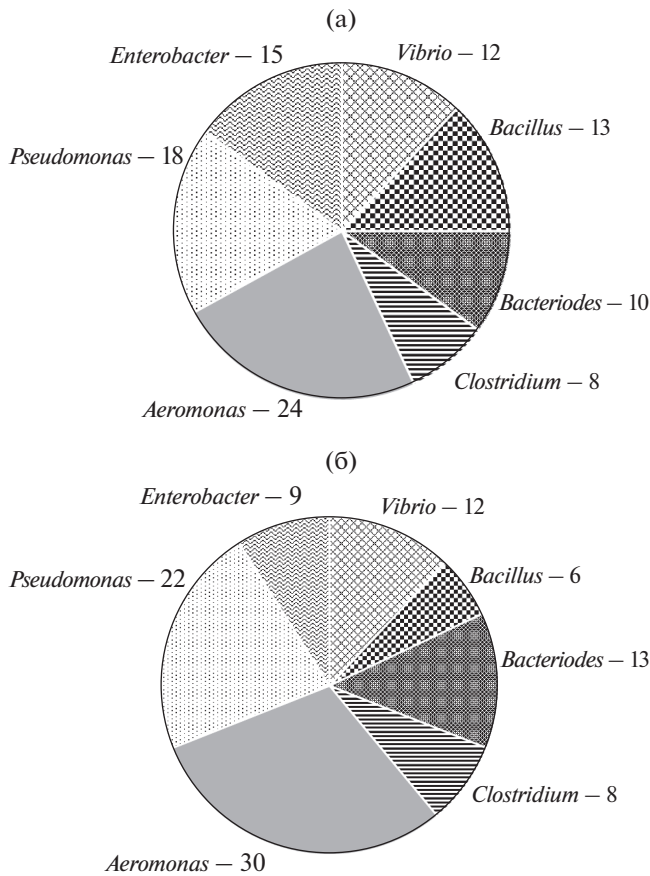


Рис. 2. Состав микробиоты стерляди *Acipenser ruthenus*, %: а – контроль; б – особи, питавшиеся кормом с добавлением пробиотика ПроСтор.

мость сухого вещества комбикорма у карпа как в контроле, так и при введении в рацион пробиотика оказалась в целом выше, чем у стерляди. Это связано, по-видимому, с большей численностью

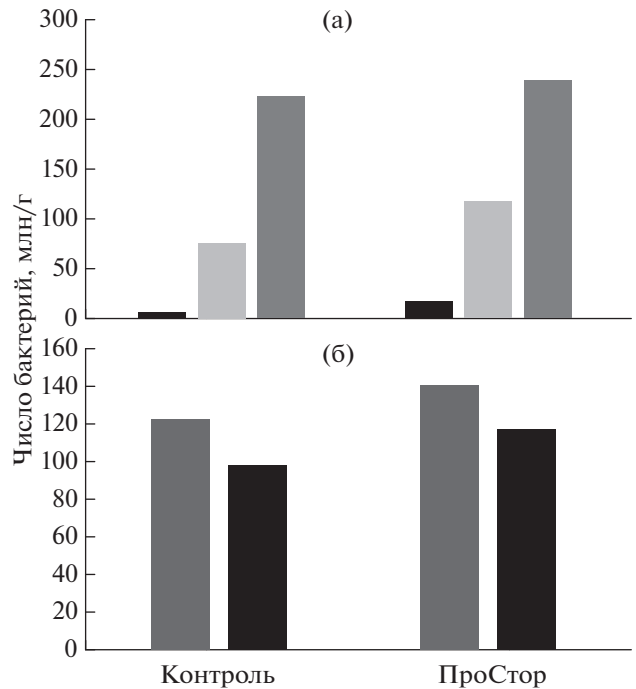


Рис. 3. Численность бактерий, гидролизующих различные субстраты, в химусе кишечника у контрольных рыб и у особей, питавшихся кормом с добавлением пробиотика ПроСтор: а – карп *Cyprinus carpio*, б – стерлядь *Acipenser ruthenus*. Группы бактерий: (■) – целлюлолитические, (▒) – протеолитические, (■) – амилолитические.

кишечных микроорганизмов и лучшей сбалансированностью комбикорма для карпа. Однако у стерляди переваримость протеина и жира оказалась выше, чем у карпа, что можно объяснить особенностями её пищевой специализации.

Выявленное значительное (на 43%) увеличение амилолитической активности химуса у стер-

Таблица 1. Биохимические показатели химуса кишечника у карпа *Cyprinus carpio* и стерляди *Acipenser ruthenus* контрольных и опытных групп

Показатель	Карп		Стерлядь	
	контроль	ПроСтор	контроль	ПроСтор
Активность ферментов:				
– протеазы, мг глицина/мин г	19.3 ± 0.27	20.9 ± 0.43*	15.5 ± 1.20	19.3 ± 0.89
– амилаза, мг крахмала/30 мин г	36.4 ± 1.34	42.3 ± 1.00*	14.2 ± 0.76	20.4 ± 1.15*
– липаза, мл 0.1 н NaOH	4.0 ± 0.50	5.8 ± 0.30	5.1 ± 0.21	5.6 ± 0.24
– экзоглюканаза, мкМ/мин г (× 10 ⁻⁴)	10.3 ± 1.20	14.1 ± 1.02	–	–
Содержание азота:				
– общий азот, % сухого вещества	8.9 ± 0.06	7.3 ± 0.08*	6.4 ± 0.41	4.8 ± 0.46
– азот аммиака, % общего азота	4.6 ± 0.17	3.7 ± 0.15**	5.7 ± 0.12	4.1 ± 0.08 *
– азот мочевины, % общего азота	2.5 ± 0.01	2.0 ± 0.04*	3.8 ± 0.07	2.5 ± 0.05 *

Примечание. Здесь и в табл. 2 отличия от контроля достоверны при: **p* < 0.05, ***p* < 0.02.

ляди опытной группы (табл. 1) подтвердилось переваримостью БЭВ. Известно, что бактерии *B. subtilis* – активные продуценты амилаз. Бациллы с амилотическими свойствами входят и в состав активного начала пробиотика ПроСтор (Ушакова и др., 2009). Введение амилотических бацилл в корм стерляди оказало положительное действие на пищеварение этих рыб при питании искусственными кормами.

Представленные данные свидетельствуют, что введение пробиотика ПроСтор увеличило у карпа и стерляди переваримость СВ соответственно на 22 и 17%, СП – на 11 и 5%, СЖ – на 17 и 7%, БЭВ – на 28 и 26%, СК (у карпа) – на 37% (рис. 4). Разница в переваримости всех нутриентов рациона по сравнению с контролем у карпа достоверна при $p < 0.001$; у стерляди достоверные различия выявлены для показателей переваримости БЭВ и СВ ($p < 0.05$). Усвоение зольных элементов в контроле и опыте находилось приблизительно на одном уровне и составило у карпа 65%, у стерляди – 36%.

Результаты оценки абсолютных и среднесуточных приростов массы контрольных и опытных рыб (табл. 2) соответствуют выявленным позитивным изменениям процессов пищеварения. Месячный прирост массы опытных групп карпа и стерляди превысил таковой контрольных групп соответственно на 25 и 36%, среднесуточный – на 25 и 35%. Существенный прирост массы под влиянием пробиотика у стерляди обусловлен, вероятно, повышением как общей численности кишечных бактерий, так и доли амилотических форм, что способствовало лучшему усвоению компонентов корма.

Таким образом, результаты исследования показали, что бактерии рода *Bacillus*, входящие в состав пробиотика ПроСтор, оказывают положительное влияние на численность и структуру симбиоза химуса кишечника, активность ряда пищеварительных ферментов, общую переваримость корма и прирост массы карпа и стерляди. Снижение в химусе доли бактерий рода *Bacillus* указывает на то, что бактерии *B. subtilis*, входящие в состав пробиотического препарата ПроСтор, вступают в конкурентное взаимодействие с аборигенными видами кишечных микроорганизмов и

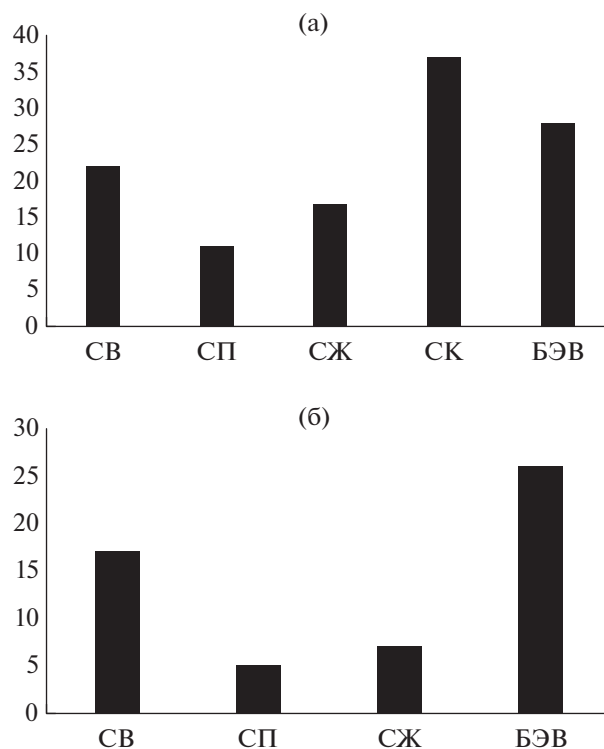


Рис. 4. Увеличение переваримости компонентов комбикорма при использовании пробиотика ПроСтор у карпа *Suiprinus carpio* (а) и стерляди *Acipenser ruthenus* (б), %: СВ – сухое вещество, СП – сырой протеин, СЖ – сырой жир, СК – сырая клетчатка, БЭВ – безазотистые экстрактивные вещества.

стимулируют те формы, которые положительно влияют на процессы пищеварения рыб. Наши данные подтверждают сделанные ранее выводы о влиянии пробиотических бактерии *B. subtilis* В-8130 на кишечный микробиоценоз рубца телят и стимулировании ими собственных целлюлолитических бактерий рубца (Ушакова и др., 2013б). В настоящей работе также выявлено увеличение эндогликаназной (целлюлазной) активности химуса кишечника карпа и существенное (на 37%) повышение переваримости клетчатки корма. Увеличение амилазной активности на 43% у стерляди, по-видимому, связано с избирательным положительным

Таблица 2. Масса и среднесуточный прирост карпа *Suiprinus carpio* и стерляди *Acipenser ruthenus* контрольных и опытных групп

Показатель	Карп		Стерлядь	
	контроль	ПроСтор	контроль	ПроСтор
Масса, г:				
– начало опыта	100.0 ± 8.96	100.0 ± 10.42	100.0 ± 10.62	100.0 ± 15.27
– конец опыта	220.0 ± 10.23	250.0 ± 17.63	125.0 ± 10.46	134.0 ± 2.84
Среднесуточный прирост, г	4.0 ± 0.25	5.0 ± 0.34*	0.85 ± 0.05	1.15 ± 0.10**

характером взаимодействия пробиотика с кишечным микробным сообществом.

Пробиотические бактерии рода *Bacillus* обладают широким спектром биологической активности и влияют на рыб разной пищевой специализации. При этом повышается переваримость и усвоение тех компонентов корма, которые используются организмом не в полной мере вследствие недостаточной энзиматической активности пищеварительной системы. Например, для всеядного карпа перевариваемость клетчатки растительных кормов лимитируется целлюлазной активностью, а для хищника стерляди использование углеводов искусственных кормов – амилолитической. Выявленная в настоящей работе реакция разных представителей кишечного микробного сообщества рыб на воздействие принудительно внедряемых с кормом пробиотических бактерий свидетельствует о наличии потенциала для повышения эффективности пищеварения при использовании искусственного корма путём направленной коррекции межмикробных взаимодействий пробиотиками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бурлаченко И.В.* 2008. Актуальные вопросы безопасности комбикормов в аквакультуре рыб. М.: Изд-во ВНИРО, 183 с.
- Васильева Л.М., Горкина О.В., Лозовская М.В., Щербатова Т.Г.* 2012. Лечебно-профилактические мероприятия при выращивании осетровых в садках // *Естественн. науки.* № 2 (39). С. 154–159.
- Герхардт Ф., Мюррей Р., Робиноу К. и др.* (ред.). 1983. *Методы общей бактериологии.* Т. 1. М.: Мир, 536 с.
- Клесов А.А., Рабинович М.Л., Сеницын А.П. и др.* 1980. Активность и компонентный состав целлюлазных комплексов из различных источников // *Биоорганич. химия.* № 6 (8). С. 1225–1242.
- Курилов Н.В.* 1987. *Методы анализа пищеварительных ферментов (Методические указания).* Боровск: Изд-во ВНИИФБиП, 44 с.
- Лактионов К.С., Козлов А.С., Буяров В.С.* 2012. Влияние пробиотика на физиологию цекального пищеварения кроликов при увеличении доли азотистых компонентов в рационе // *Ветеринар. врач.* № 6. С. 41–44.
- Пономарев С.В., Гамыгин Е.А., Никоноров С.И. и др.* 2002. Технологии выращивания и кормления объектов аквакультуры юга России. Астрахань: Новаплюс, 264 с.
- Скляров В.Я.* 2008. Корма и кормление рыбы в аквакультуре. М.: Изд-во ВНИРО, 150 с.
- Уголев А.М., Масевич Ц.Г., Тимофеева Н.М.* 2002. Исследование пищеварительного аппарата. М.: Макс-Пресс, 116 с.
- Ушакова Н.А., Бродский Е.С., Козлова А.А., Нуфатов А.В.* 2009. Анаэробная твердофазная ферментация растительных субстратов с использованием *Bacillus subtilis* // *Прикл. биохимия и микробиология.* Т. 45. № 1. С. 70–77.
- Ушакова Н.А., Лактионов К.С., Козлова А.А. и др.* 2013а. Особенности воздействия комплексного пробиотика, содержащего бактерии рода *Cellulomonas*, на активно растущих кроликов // *Изв. РАН. Сер. биол.* № 3. С. 292–297.
- Ушакова Н.А., Некрасов Р.В., Мелешко Н.А. и др.* 2013б. Влияние *Bacillus subtilis* на микробное сообщество рубца и его членов, имеющих высокие коэффициенты корреляции с показателями пищеварения, роста и развития хозяина // *Микробиология.* Т. 82. № 4. С. 456–463.
- Щербатова Т.Г.* 2007. Садковое и прудовое выращивание товарных осетровых // *Лекцион. матер. междунар. науч.-практ. семинара по осетроводству.* Астрахань. С. 23–26.
- Щербина М.А.* 1983. *Методические указания по физиологической оценке питательной ценности кормов для рыб.* М.: Изд-во ВНИИПРХ, 83 с.
- Щербина М.А., Гамыгин Е.А.* 2006. *Кормление рыб в пресноводной аквакультуре.* М.: Изд-во ВНИРО, 360 с.
- Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.R.* (eds.). 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* V. 2. The Proteobacteria. Pt. C. N.Y.: Springer-Verlag, 1256 p.
- Krieg N.R., Ludwig W., Whitman W.* (eds.). 2010. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* V. 4. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. N.Y.: Springer-Verlag, 908 p.
- Noga E.J.* 1995. *Fish disease: diagnosis and treatment.* N.Y.: Mosby-Year Book, 321 p.
- Pavlov D.S., Ushakova N.A., Pravdin V.G. et al.* 2014. The ProStor and Ferm KM-1 complex probiotic additives – innovation biotechnological preparations for enhancing the quality of domestic fish mixed feed // *Nova Sci. Publ.* V. 20. P. 239–244.