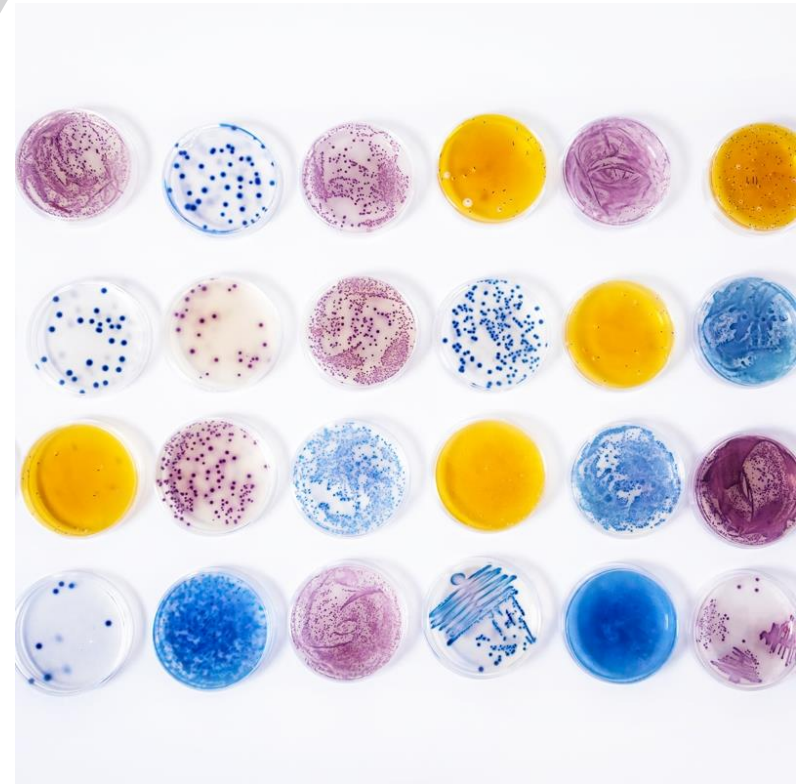


Biopreparaty w hodowli ryb

Anna Majkowska
Laboratorium mikrobiologiczne
Instytut Rozrodu Zwierząt i badań Żywności PAN

Perspektywy rozwoju produkcji rybackiej
w obliczu wyzwań 21. wieku
Gdynia, 10 października 2018 r.





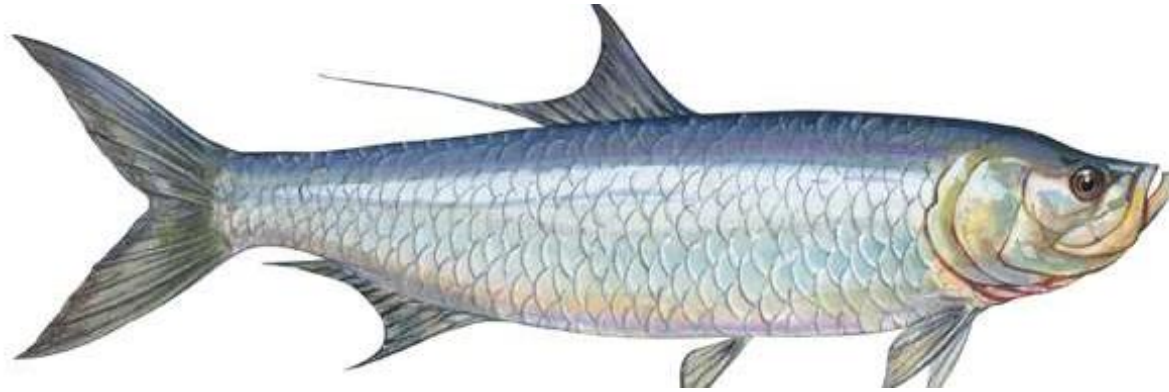
Probiotyki - Prebiotyki

- **Określenie probiotyki oznacza „dla życia” i jest stosowane do nazwania bakterii korzystnie wpływających na ludzi i zwierzęta**

(World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutrition Paper 85; Rome 2006.)

- **Prebiotyk to wybiórczo fermentowany składnik pokarmowy skutkujący swoistymi zmianami składu i/lub aktywności mikroflory przewodu pokarmowego, przynoszący korzyści zdrowotne gospodarzowi.**

(Gibson et al. 2010. Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods 7 (1) 1–19.)



Probiotyky

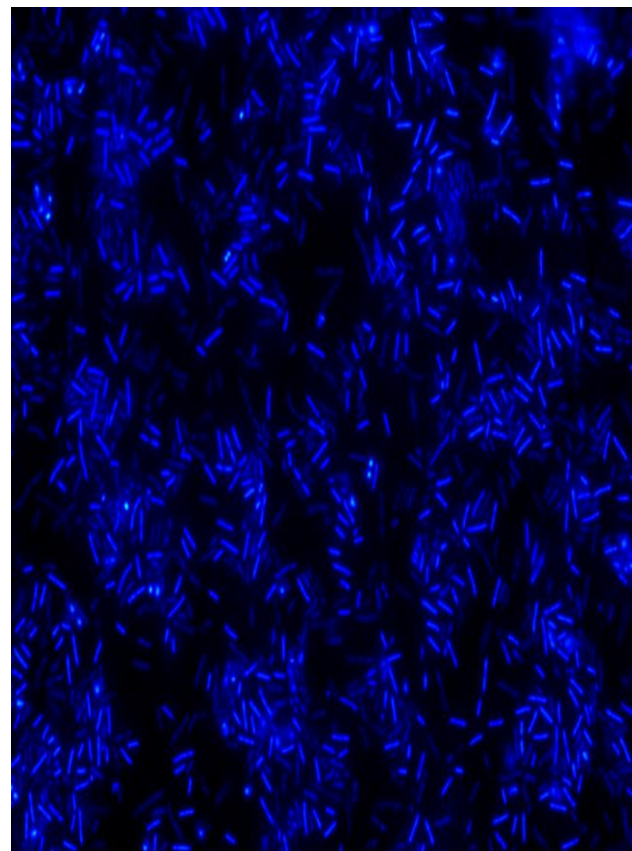


Prebiotyky

Synbiotyky

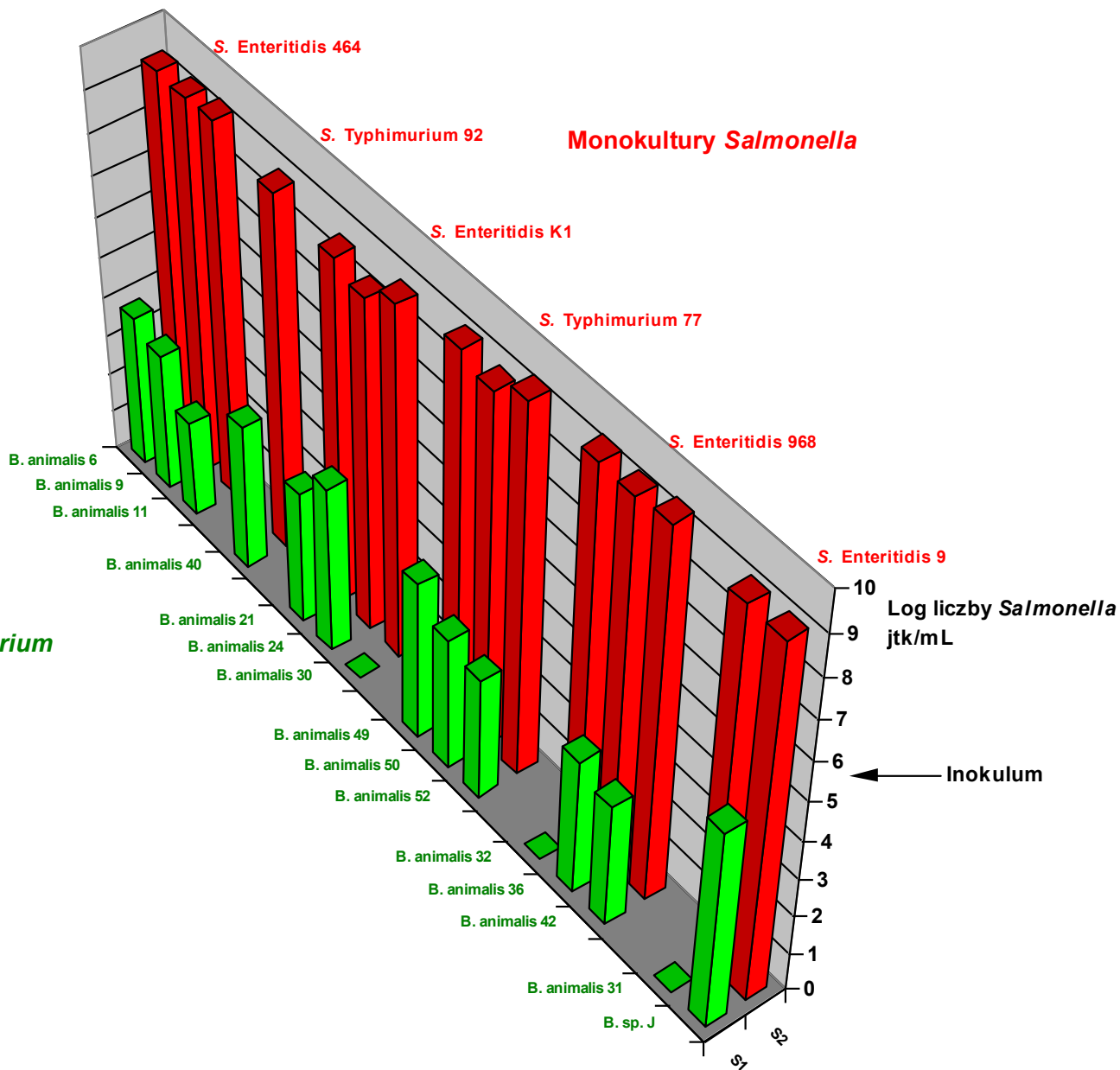
Kryteria selekcji probiotycznych bakterii

- ❖ pochodzenie
- ❖ niepatogenność
- ❖ przeżywalność w niskim pH
- ❖ aktywność antybakteryjna
- ❖ adhezja np. do nabłonka jelita
- ❖ modulacja odpowiedzi immunologicznej
- ❖ aktywność metaboliczna
- ❖ przeżywalność w procesie technologicznym

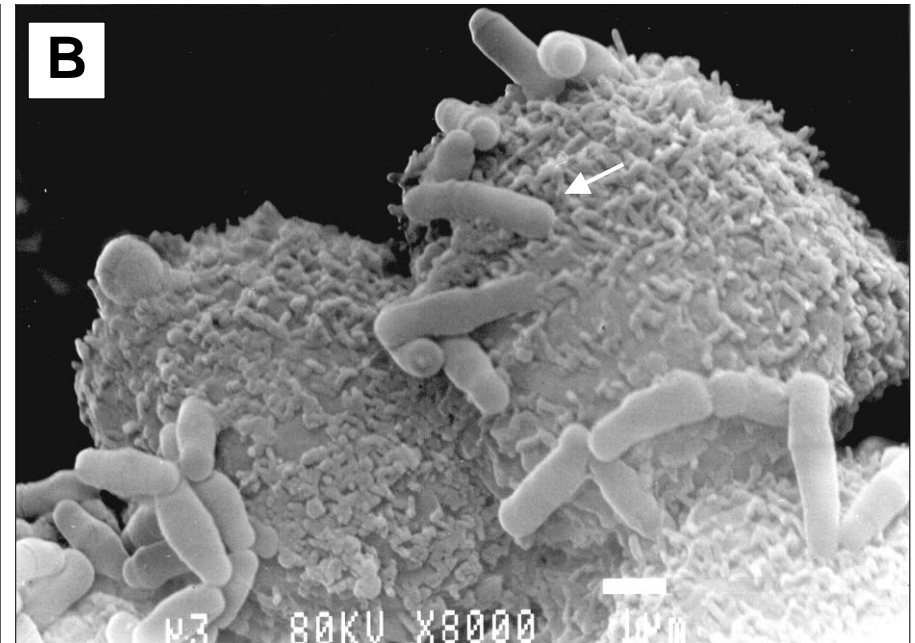
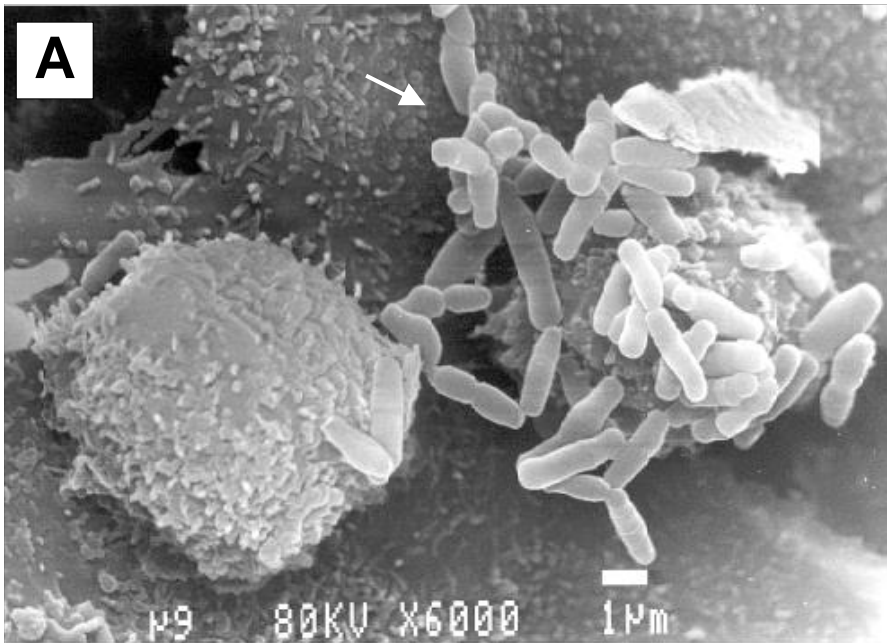


Lactobacillus plantarum W42

Interakcja Bifidobacterium i Salmonella



Adhezja bifidobakterii



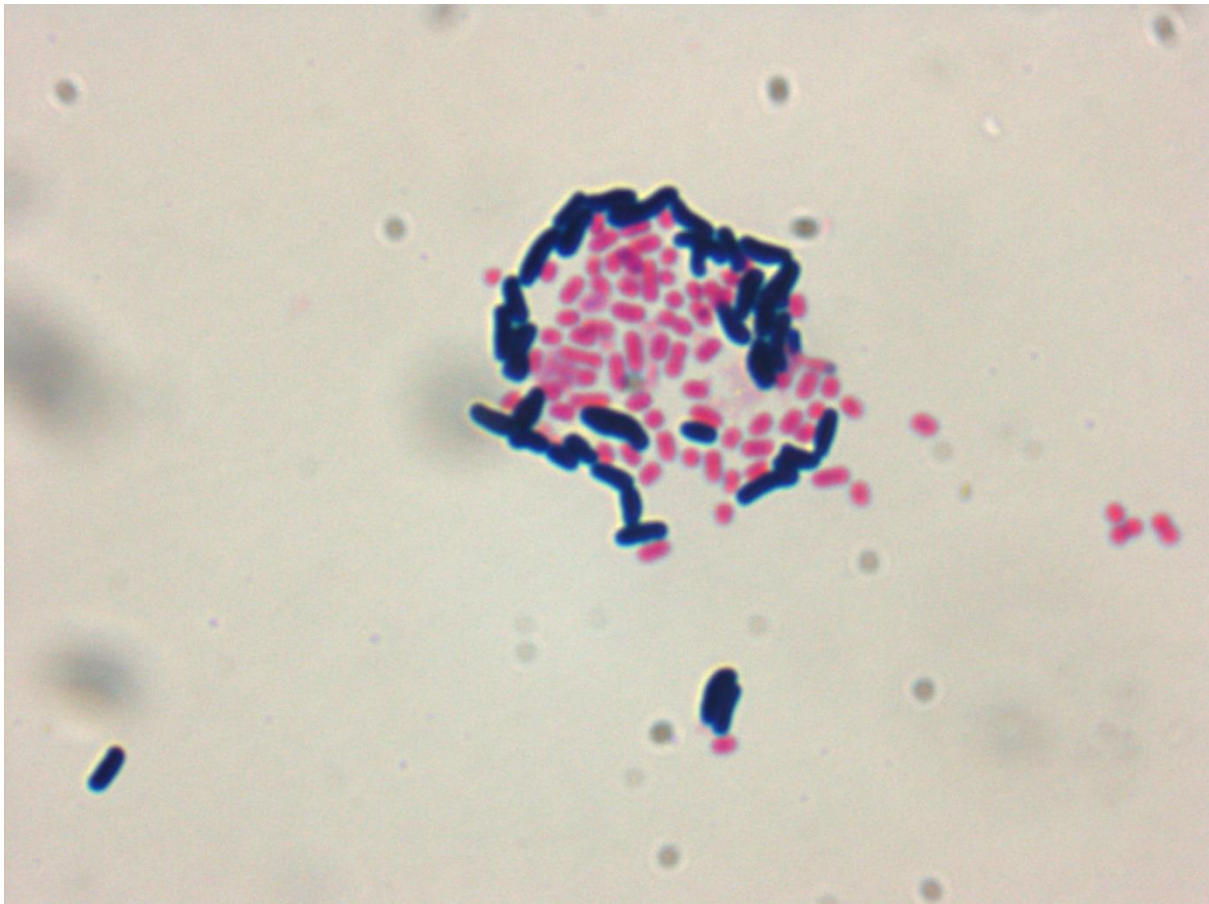
Adhezja *B. animalis* PS46 do linii komórkowej HT29
(mikrofotografie wykonano w elektronowym mikroskopie skaningowym).

A – widoczne skupienia adhezujących komórek bifidobakterii;
B – adhezja do mikrosmków komórek nabłonkowych.

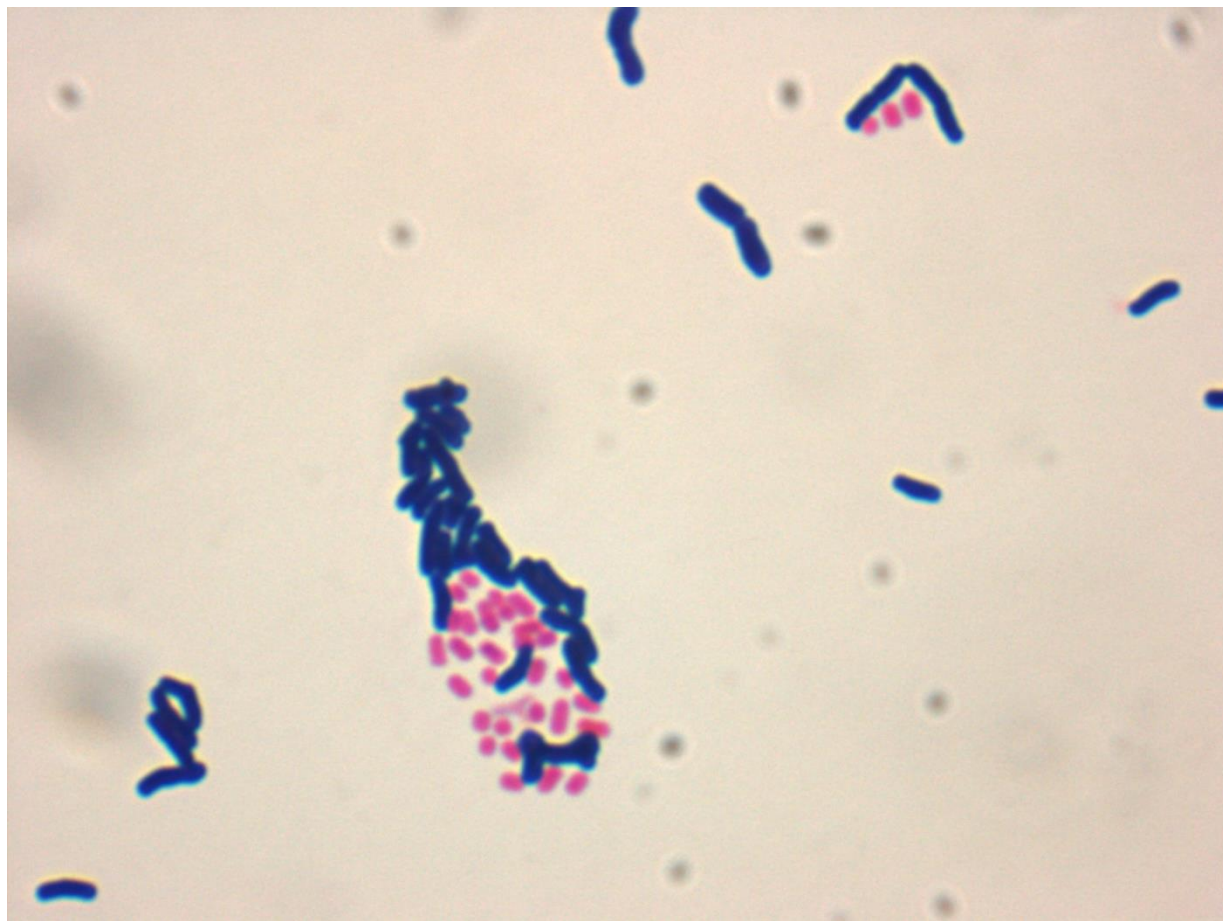
Adhezja *Lactobacillus* do nabłonka



Koagregacja komórek *Bifidobacterium longum* KN4 i *Escherichia coli* O157:H7

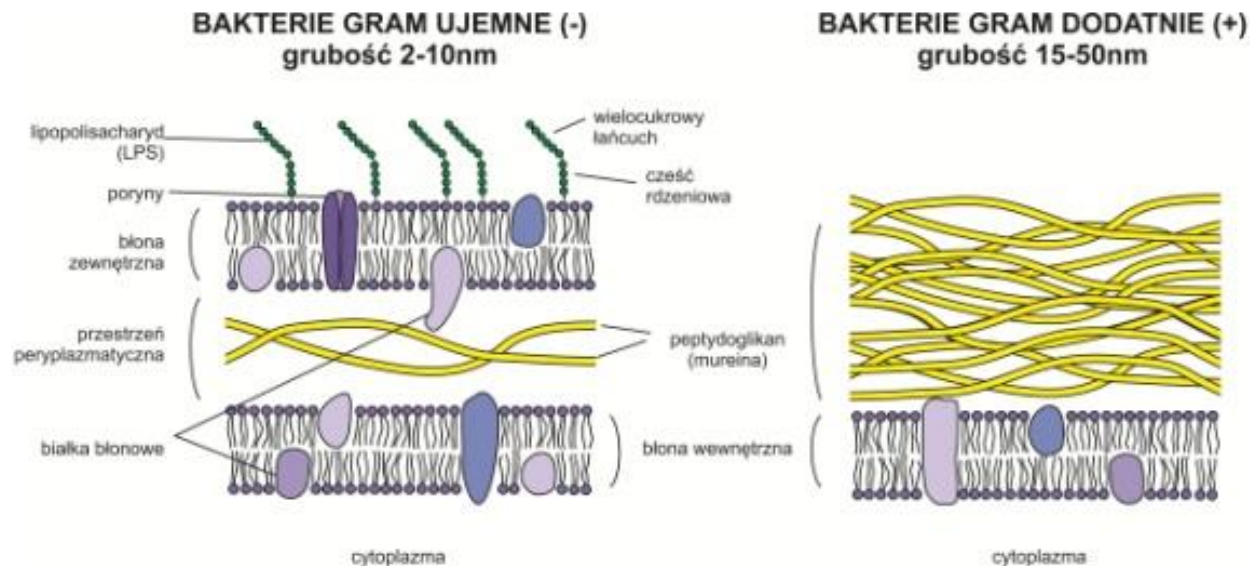


Koagregacja *Bifidobacterium longum* KN4 i *Escherichia coli* s20



Gram dodatnie (G+) – budująca ich ściany mureina (peptydoglikan, mukopeptyd) tworzy wielowarstwową błonę

Gram ujemne (G-) – ich mureina jest jednowarstwowa i otoczona dodatkową błoną zewnętrzną zbudowaną z białek, fosfolipidów i lipopolisacharydu (LPS) składającego się z części rdzeniowej (lipidu A) oraz wielocukrowego łańcucha nadającego bakteriom swoistość antygenową.



rodzaj

gatunek

Symbol szczepu

Lactobacillus rhamnosus GG (ATCC 53013)

Carnobacterium divergens LMG9192

Saccharomyces boulardii

Rodzaje prebiotyków

Fruktany:

Źródła fruktanów:

- cykoria,
- cebula,
- banan,
- czosnek,
- por,
- karczoch,
- pszenica,
- szalotka,
- szparag
- groch,
- mlecz,
- łopian,
- zboża (mniejsze ilości) jak żyto i jęczmień



Stopień polimeryzacji (DP) fruktanów od 2 do 60.

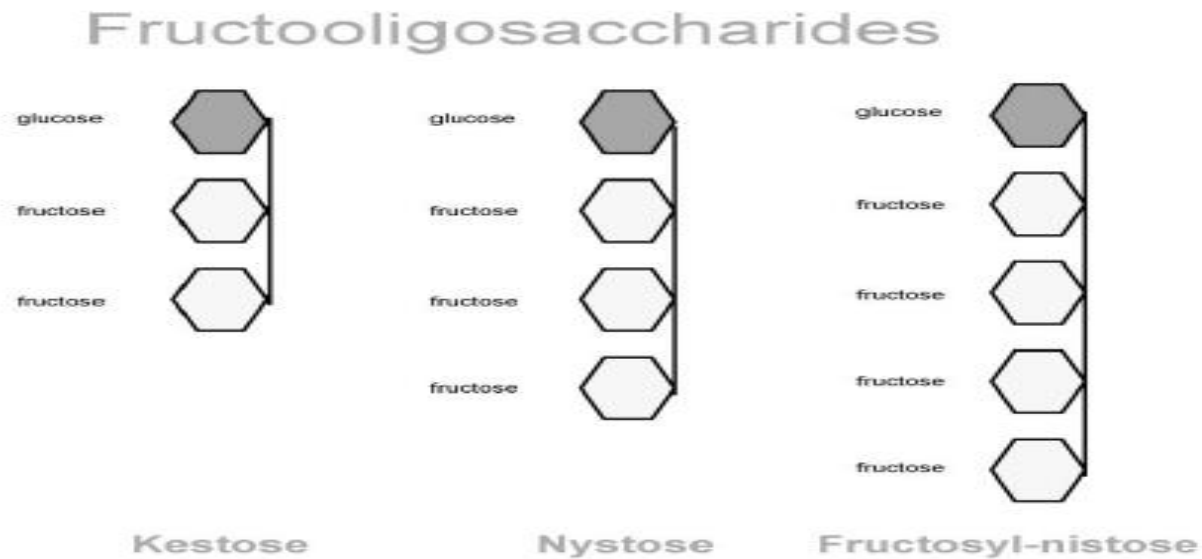
Cząsteczki o liczbie polimeryzacji (DP):

- >10 to inuliny (polisacharydy),
- 2- 9 to niskocząsteczkowe oligomery określane jako fruktooligosacharydy lub oligofruktoza

Otrzymywanie fruktooligosacharydów

Fruktooligosacharydy są otrzymywane na skalę przemysłową z sacharozy w procesie transfruktozylacji, dzięki zastosowaniu β -fruktofuranozydazy.

Fruktooligosacharydy otrzymane w tym procesie zawierają od 2 – 4 cząsteczek D-fruktozy połączonej wiązaniami β -2-1, zakończonymi terminalną D-glukozą z wiązaniem α -1-2glikozydowym.



Właściwości fruktooligosacharydów i inuliny

Fruktooligosacharydy i inulina są:

- wysoce higroskopijne,
- stabilne w zakresie pH 4,0-7,0;
- mniej słodkie niż sacharoza,
- ich wartość energetyczna wynosi 6kJ/g,
- nazywane są „pokarmem okrężnicy”.

* Galaktooligosacharydy (GOS)

α -D-Glu-(1-4)-[β -D-Gal-(1-6)-] $_n$, gdzie $n = 2-5$

Zbudowane są z glukozy i galaktozy.

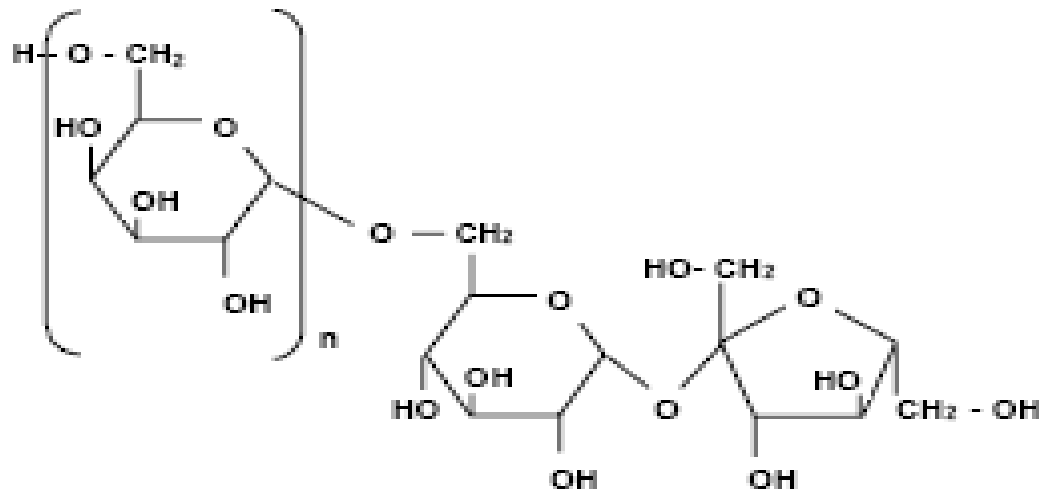


Fig. 1. General chemical structure of galactosyl-oligosaccharides.

Źródło:

Najlepszym, pod względem zawartości, naturalnym źródłem galaktooligosacharydów (GOS) jest mleko ludzkie.

[Martinez - Ferez A. i wsp., 2006].

W wyniku przeprowadzonego doświadczenia stwierdzili:

- mleko ludzkie zawiera

od 5 - 8 gramów GOS na litr

- mleko kozie zawiera

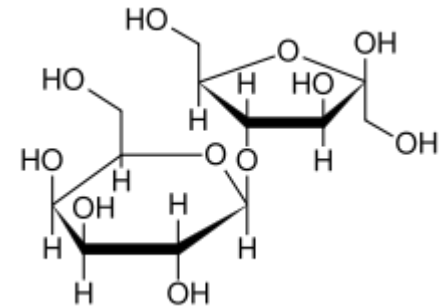
od 0.25 do 0.3 gramów GOS na litr

mleko kozie zawiera 4-5 razy większą ilość GOS niż mleko krowie i 10-ciokrotnie większą zawartością GOS niż mleko owcze.



* Laktuloza

4-O-β-D-galaktopiranozylo-D-fruktoza



Laktuloza to:

- syntetyczny dwucukier, w którym każda cząsteczka galaktozy jest związana z cząsteczką fruktozy,
- dwucukier, który nie występuje naturalnie w przyrodzie,
- dwucukier, który dostaje się do jelita grubego w niezmienionej postaci (wchłaniany zaledwie w ilości ~0,25-2,0% w jelicie cienkim),
- laktuloza jest metabolizowana przez *Bifidobacterium* sp.

i *Lactobacillus* sp.

Nowe prebiotyki?

1. Izomaltooligosacharydy (IMO)

$[\alpha\text{-D-Glu-(1-6)-}]_n$, gdzie $n = 2\text{-}5$

Składają się z reszt $\alpha\text{-D}$ -glukozy powiązanych wiązaniami glikozydowymi $\alpha(1\text{-}6)$.

Przykładami IMO są:

- izomaltoza,
- izomaltotetroza,
- panoza,
- izomaltotrioza.



IMO są wytwarzane poprzez enzymatyczną hydrolizę skrobi kukurydzianej.

2. Oligosacharydy sojowe (SOS)

SOS ekstrahuje się bezpośrednio z surowca, a więc nie jest wymagana obróbka enzymatyczna.

Surowcem jest serwatka sojowa, produkt uboczny przy otrzymywaniu białka sojowego.

Zawiera ona przede wszystkim:

- rafinozę (3 sacharyd, $\alpha\text{-D-Gal-(1-6)-}\alpha\text{-D-Glu-(1-2)-}\beta\text{-D-Fru}$)
- stachiozę (4 sacharyd, $\alpha\text{-D-Gal-(1-6)-}\alpha\text{-D-Gal-(1-6)-}\alpha\text{-D-Glu-(1-2)-}\beta\text{-D-Fru}$)

Rafinoza i stachioza:

- nie ulegają hydrolizie w żołądku i jelicie cienkim,
- nienaruszone docierają do okrężnicy,
- w okrężnicy działają jako czynniki bifidogenne, stymulujące wzrost

Bifidobacterium sp.



3. Ksylooligosacharydy (XOS)



Przykładami ksylooligosacharydów są:

- ksylobioza
- ksylotrioza

Są to polimery D- ksylanów, strukturalnych składników ziarna zbóż i traw.

4. Glukooligosacharydy

Wytwarzane są z wykorzystaniem glukozylotransferazy z *Leuconostoc mesenteroides*, która przenosi reszty glukozy z sacharozy (donor) na maltozę (akceptor).

Powstałe glukooligosacharydy składają się z mono- do heptasacharydów z wiązaniami α -1,2 glikozydowymi, oprócz wiązań α -1,6 pomiędzy resztami glukozydowymi.

Probiotyki w akwakulturze

Bakterie z rodzaju:

Lactobacillus

Lactococcus

Carnobacterium

Streptococcus

Bacillus

Prebiotyki w akwakulturze

Fruktooligosacharydy (FOS)

Inulina

β -glukany

Mananooligosacharydy (MOS)

Galaktooligosacharydy (GOS)

Ksylooligosacharydy (XOS)

Możliwość wykorzystania szczepów probiotycznych w akwakulturze suma europejskiego (*Silurus glanis* L.)

Ewelina Sosnowska-Turek
IRZiBŻ PAN



Przeprowadzono badania nad możliwością wykorzystania i praktycznego zastosowania bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Carnobacterium* jako dodatku do pasz w intensywnym żywieniu suma europejskiego (*Silurus glanis* L.):

- w standardowych warunkach hodowli
- w warunkach kontrolowanego zanieczyszczenia wody szczepami z rodzaju *Aeromonas*

Etap I badań

10⁷ jtk/ml

L. amylophilus LMG11400

L. casei LcY

L. casei subsp. *casei* LMG6904

L. casei subsp. *paracasei* LMG9192

L. casei subsp. *rhamnosus* LMG6400

L. plantarum W42

L. plantarum LMG6907

L. rhamnosus 8/4

L. sakei subsp. *sakei* LMG9468

C. divergens LMG9199

C. mobile LMG9842

C. piscicola LMG9839

10⁵ jtk/ml

A. hydrophila LMG3764

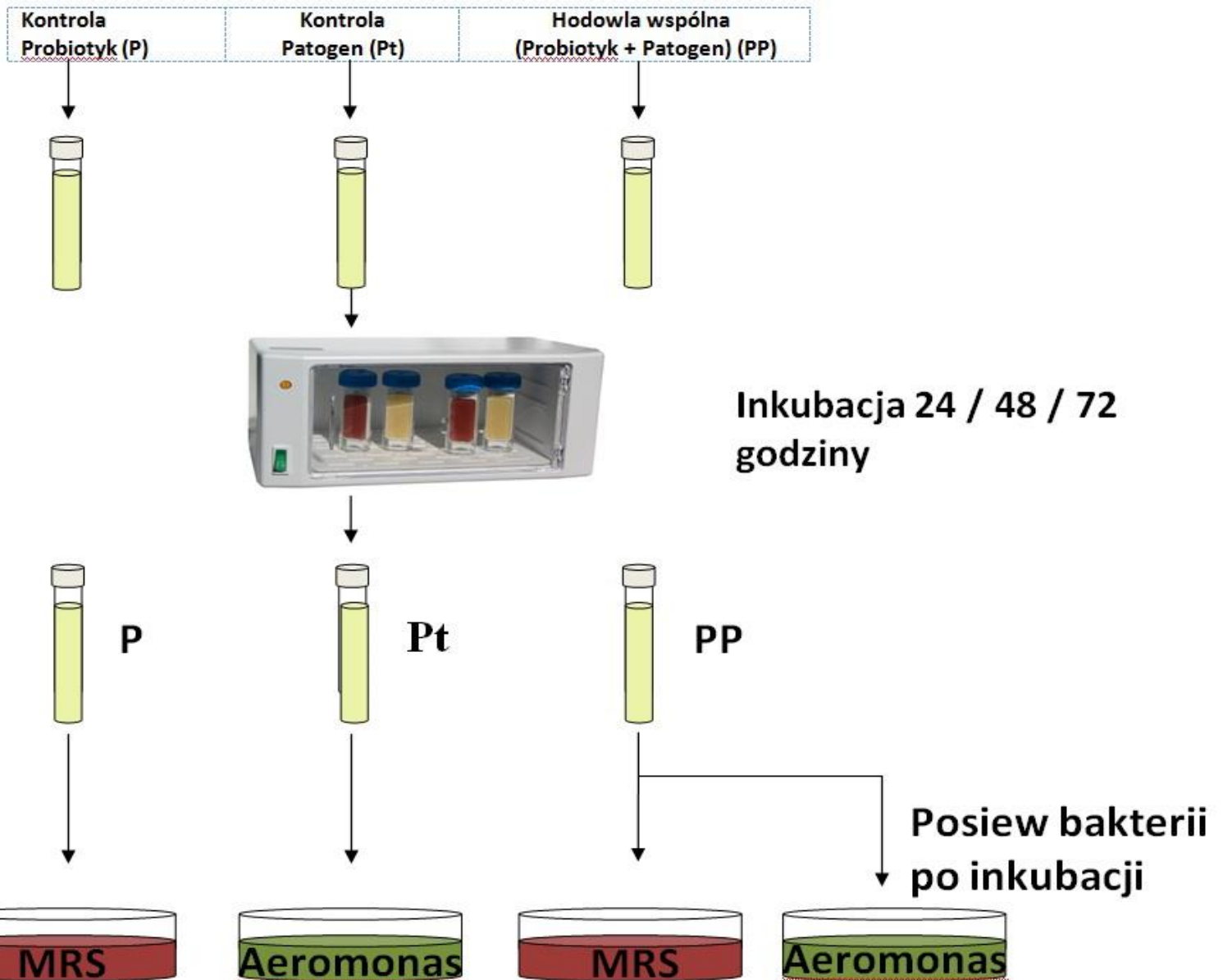
A. salmonicida LMG19569

Szczepy z kolekcji:

IRZiBŻ PAN w Olsztynie

Uniwersytetu w Gandawie

Schemat I etapu badań



Ponadto w I etapie badań wykonano:

- ✓ Kinetykę wzrostu i tempa ukwaszania podłoża przez szczepy *Aeromonas hydrophila* LMG3764 i *A. salmonicida* LMG19569
- ✓ Określono zdolność namnażania wybranych kultur probiotycznych *Lactobacillus casei* LcY, *L. plantarum* W42 w temperaturach: 15 i 20 °C
- ✓ Określono stopień hamowania szczepów *Aeromonas hydrophila* LMG3764 i *A. salmonicida* LMG19569 przez wybrane kultury probiotyczne *Lactobacillus casei* LcY, *L. plantarum* W42 w zróżnicowanych temperaturach 15 i 20 °C
- ✓ Dobór szczepu probiotycznego o najwyższych właściwościach antagonistycznych w stosunku do szczepów patogennych *Aeromonas hydrophila* LMG3764 i *A. salmonicida* LMG19569
- ✓ Uzyskano biomasę bakteryjną szczepu potencjalnie probiotycznego *Lactobacillus plantarum* W42 do procesu liofilizacji
- ✓ Określono stopień hamowania wzrostu szczepów patogennych przez wybrany liofilizowany szczep potencjalnie probiotyczny *Lactobacillus plantarum* W42 w temperaturach 15, 20 i 28 °C

I ETAP BADAŃ

Selekcja i dobór szczepów bakteryjnych

Na podstawie wyników I etapu badań dokonano doboru szczepów do badań *in vivo*:

- ✓ probiotycznego - ***Lactobacillus plantarum* W42**
- ✓ patogennego - ***Aeromonas salmonicida* LMG19569**

Zoptymalizowany proces namnażania i liofilizacji
szczepu *Lactobacillus plantarum* W42 pozwala
uzyskać koncentrację komórek 10^{11} jtk/ml



Etap II badań

Wpływ preparatu probiotycznego *Lactobacillus plantarum* W42 w paszy na stan zdrowotny suma europejskiego (*Silurus glanis* L.) w warunkach kontrolowanego chowu i zanieczyszczenia wody patogennym szczepem *A. salmonicida* LMG19569

Przeznaczone do badań ryby z gatunku suma europejskiego (*Silurus glanis* L.) były w wieku trzech miesięcy i pochodziły z Gospodarstwa Rybackiego w Komorowie.



Przed rozpoczęciem doświadczenia ryby wybrano losowo; wazono, mierzono i podzielono na 4 grupy:

NI(-) - **nieinfekowana** grupa ryb karmionych paszą **bez dodatku** preparatu probiotycznego

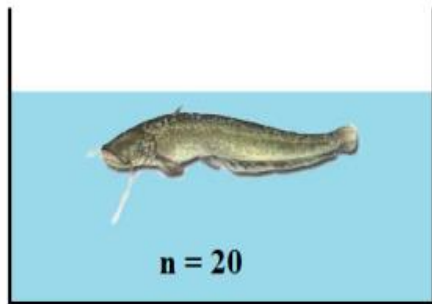
NI(+) - **nieinfekowana** grupa ryb karmionych paszą **z dodatkiem** preparatu probiotycznego

I(-) - **infekowana** grupa ryb karmionych paszą **bez dodatku** preparatu probiotycznego

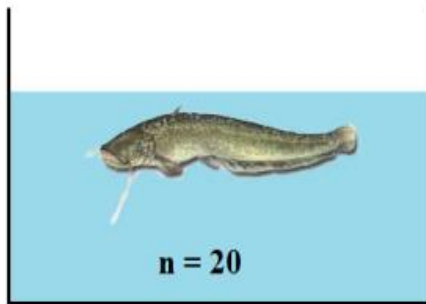
I(+) - **infekowana** grupa ryb karmionych paszą **z dodatkiem** preparatu probiotycznego

**Chów ryb przebiegał w trzech okresach
badawczych:**

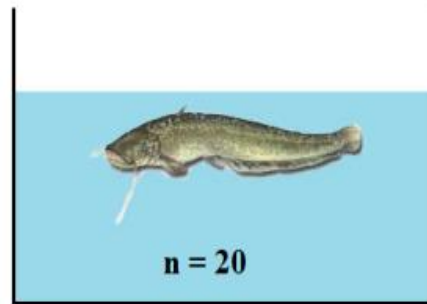
2-tygodniowy okres adaptacji ryb do środowiska



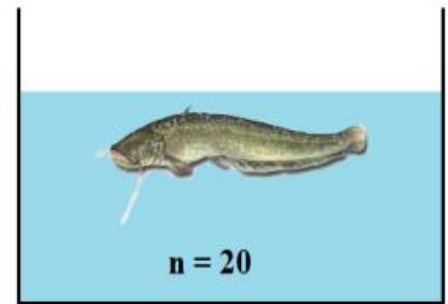
NI(-)



NI(+)

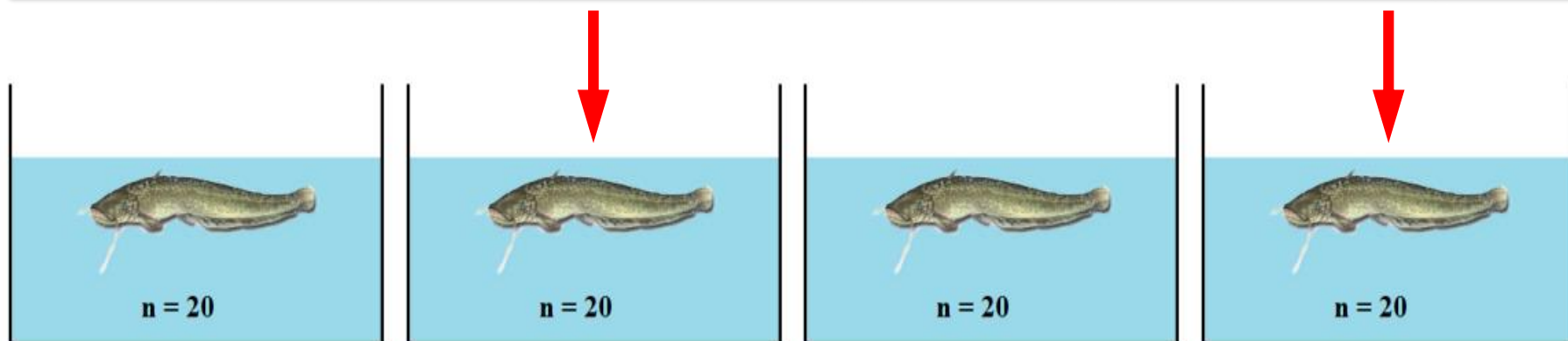


I(-)



I(+)

8- tygodniowy okres żywienia paszą z dodatkiem preparatu probiotycznego w wybranych dwóch grupach- **NI(+)** i **I(+)**



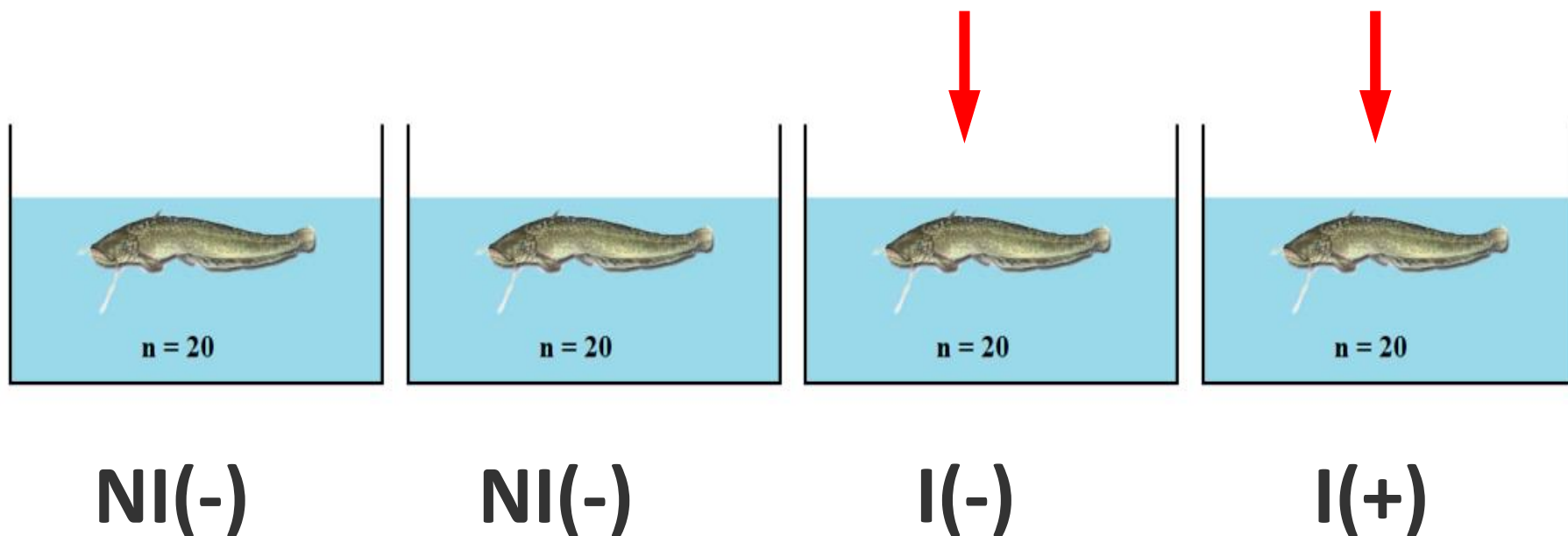
NI(-)

NI(+)

I(-)

I(+)

Bakteryjnego zanieczyszczenia wody szczepem
***A. salmonicida* LMG19569** w grupach I(-) i I(+)



Wykonano analizy:

- Jakościowe i ilościowe mikroflory bakteryjnej treści przewodu pokarmowego
- Wskaźników hematologicznych
- Histologiczne wątroby
- Profilu kwasów tłuszczowych i poziomu cholesterolu w tkance mięśniowej
- Morfometryczne jelita środkowego

Wpływ dodatku preparatu probiotycznego do paszy na masę i długość ciała ryb

Okres badawczy	Parametr [jednostka]	Grupy ryb					Probiotyki	Infekcja	<i>P</i> (probiotyki x infekcja)
		NI(-)	NI(+)	I(-)	I(+)	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	
3 okres badawczy - po zanieczyszczeniu wody patogenem	Masa ciała ryb [g]	103,5	112,1	106,9	110,9	0,846	0,411	0,879	0,762
	Długość ciała Lt ryb [cm]	24,15	24,70	25,0	26,1	0,201	0,209	0,089	0,672

**Wpływ preparatu probiotycznego na mikroflorę
bakteryjną treści przewodu pokarmowego suma
europejskiego *Silurus glanis* L.**

Metoda Fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) umożliwiła bardzo dokładną ocenę ilościową i jakościową mikroflory bakteryjnej przewodu pokarmowego. Jednocześnie pokazała wpływ probiotyku na populację bakterii w przewodzie pokarmowym ryb.

W grupie ryb suplementowanych preparatem probiotycznym (*L. plantarum* W42) zaobserwowano istotny, ponad 4% wzrost udziału wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA). W tym wzrost kwasu DHA z grupy omega 3.

Dodatek probiotyku w paszy spowodował zahamowanie procesu zmian martwiczych w mięszu wątroby i stymulował układ odpornościowy ryb.



Dziękuję za uwagę

