

## СОЗДАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО КОНСОРЦИУМА — ОСНОВЫ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ДЛЯ КАРПОВЫХ РЫБ И ОЦЕНКА ЕГО ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Кантор К. В.<sup>1\*</sup>, Проскурнина И. А.<sup>1</sup>, Арашкова А. А.<sup>1</sup>, Коломиец Э. И.<sup>1</sup>, Кошак Ж. В.<sup>2</sup>, Гадлевская Н. Н.<sup>2</sup>, Рыбкина Е. Е.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, ул. Купрэвича, 2, г. Минск, 220141, Республика Беларусь.

<sup>2</sup>РУП «Институт рыбного хозяйства», ул. Стебенева 22, г. Минск, 220024, Республика Беларусь

\*kantorkarina@rambler.ru

### АБСТРАКТ

Выделены и отобраны спорообразующие бактерии, обладающие гидролитической активностью и проявляющие антагонистические свойства в отношении возбудителей болезней карповых рыб; проведена их идентификация, исследовано лечебно-профилактическое действие. На основе консорциума из отобранных штаммов создан экспериментальный образец пробиотической кормовой добавки и установлена оптимальная норма ее ввода в комбикорм.

**Ключевые слова:** пробиотики, бактерии рода *Bacillus*, кормовая добавка, аквакультура, карповые рыбы

### ВВЕДЕНИЕ

Основным сегментом аквакультуры в Республике Беларусь является прудовое рыбоводство, ориентированное, в первую очередь, на выращивание карпа обыкновенного *Cyprinus carpio L.* как базового вида поликультуры. На долю карпа приходится до 85% от общего объема рыбопродукции, получаемой в Республике Беларусь [1], тогда как объемы производства прочих видов определяются степенью сопряженности с технологией его выращивания [2]. Так, в поликультуре с карпом разводят растительноядных рыб и ценных хищников со сходными условиями содержания. Следовательно, повышение продуктивности рыбоводной отрасли в целом коррелирует с успешностью разведения карповых рыб и сдерживается такими факторами как потери вследствие инфекционных болезней и невысокие показатели роста ввиду неблагоприятных условий содержания и использования комбикормов с низким количеством биологически активных веществ в составе [3, 4].

Основными инфекционными заболеваниями карпа в аквакультуре являются аэромонозы и псевдомонозы [5]. Для лечения и профилактики этих болезней чаще всего используются антибиотики, что приводит к селекции и последующей циркуляции в хозяйствах условно-патогенных антибиотикорезистентных микроорганизмов [6], а также к снижению иммунофизиологического статуса рыб и ухудшению качества получаемой продукции вследствие накопления остаточных количеств препаратов.

Увеличение производства рыбопродукции напрямую зависит от усвояемости питательных веществ комбикормов. В естественных условиях карп питается в основном зоопланктоном и зообентосом, т.е. живыми организмами, содержащими легкоусвояемые белки, жиры и, в меньшей степени, углеводы. Однако при разведении рыб семейства Карповые в Республике Беларусь чаще всего используются гра-

нулированные комбикорма, в состав которых с целью удешевления продукции включают сырье растительного происхождения (зерно злаков, отходы переработки масличных культур), богатое сложными углеводами [7]. Наиболее доступной для карповых рыб частью комбикорма остаются белковые соединения (до 70–85%), в то время как углеводная часть усваивается в меньшей степени (в среднем 35–55%). Перевариваемость основного полисахарида кормов — крахмала — составляет в среднем 30–50%, а клетчатки, гемицеллюлозы и пектина — только 10–35% [8]. Таким образом, значительная часть рациона не усваивается в организме рыб и проходит транзитом, что приводит к низким показателям роста, и, как следствие, к увеличению себестоимости получаемой продукции. Одним из способов повышения доступности трудногидролизуемых компонентов корма является применение в рационах гидробионтов кормовых добавок с ферментами [9]. Однако их внесение в состав комбикормов не всегда эффективно, поскольку большинство разработанных ферментных комплексов проявляет наиболее высокую активность в диапазоне температур, характерных для теплокровных животных, тогда как средняя температура воды в прудах в течение сезона составляет около 18 °С [10]. Альтернативой экзогенным ферментам являются кормовые добавки на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus*, способных продуцировать внеклеточные гидролазы (амилазы, ксиланазы, целлюлазы) в условиях низких температур, что позволяет повысить усвоение питательных веществ кормов, способствует уменьшению кормовых коэффициентов, обеспечению высокой энергии роста и сокращению сроков выращивания рыб. Важной особенностью указанных культур наряду с ферментативной активностью является термоустойчивость и, как следствие, высокая сохранность в процессах гранулирования, экструзии и влаготепловой обработки при производстве комбикорма [11–13]. Способность бактерий рода *Bacillus*

подавлять развитие возбудителей инфекционных болезней карпа (*Aeromonas*, *Pseudomonas*) и оказывать неспецифическое иммуностимулирующее действие обеспечивает повышение резистентности организма рыбы в целом и существенное улучшение эпизоотического и экологического состояния рыбоводческих водоемов [14–18].

Таким образом, целью данной работы являлось создание консорциума штаммов бактерий с высокой антимикробной и ферментативной активностью — основы пробиотической кормовой добавки, оценка ее лечебно-профилактического действия на рыб семейства Карповые и подбор нормы ввода в комбикорм.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили вновь выделенные культуры бактерий родов *Bacillus* и *Peribacillus*. В качестве контроля использован штамм *B. subtilis* БИМ В-845Д — основа ранее разработанного коммерческого пробиотического препарата для рыбоводства «Эмили». Изоляты спорообразующих бактерий получали из образцов внутренностей и чешуи карповых рыб, а также донных отложений рыбоводческих водоемов (СПУ «Изобелино» и рыбхоз «Волма» Минского района) после предварительного прогревания образцов (80 °С, 10 мин) [19].

Для определения антимикробной активности бактерий методом лунок [20] в качестве тест-культур использовали штаммы родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*, полученные из РУП «Институт рыбного хозяйства» и Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Все используемые в исследовании тест-объекты были выделены из крови, пораженных покровов и внутренних органов рыб с клиническими признаками бактериальной инфекции. Глубинное культивирование спорообразующих бактерий осуществляли в колбах на модифицированной среде Мейнелла в течение 2 суток, тест-объектов — на мясоептонном бульоне в течение 8–12 ч до значения оптической плотности, соответствующей стандарту мутности Тарасевича.

Качественную оценку  $\alpha$ -амилазной, ксиланазной, целлюлолитической и протеолитической активностей изолятов проводили чашечным методом на агаризованных средах со специфическими субстратами (картофельный крахмал, ксилан, Na-КМЦ и казеинат кальция, соответственно). Об уровне продукции внеклеточных ферментов судили по величине зон гидролиза субстрата вокруг колоний. Для визуализации результатов использовали раствор Люголя ( $\alpha$ -амилазная активность) и конго красного (ксилазная и целлюлазная активность). Сравнительную оценку ферментативной активности изолятов проводили путем сопоставления индексов, рассчитанных как отношение зоны гидролиза субстрата к диаметру колонии [21].

Количественно активность  $\alpha$ -амилазы, эндо-1,4- $\beta$ -глюканазы и эндо-1,4- $\beta$ -ксилазы определяли фотометрически с использованием хромоген-

ных субстратов. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего гидролиз субстрата с образованием 1 мкмоль окрашенных низкомолекулярных фрагментов за 1 мин [22, 23].

Количественно протеолитическую активность бактерий оценивали методом Ансона в модификации Петровой и Винцюнайте. За единицу протеолитической активности принимали количество фермента, катализирующего высвобождение неосаждаемых трихлоруксусной кислотой продуктов гидролиза белкового субстрата в количестве, соответствующем приросту оптической плотности реакционной среды на 0,01 в течение 1 мин [24].

Таксономическое положение отобранных бактериальных культур устанавливали по морфологическим, культуральным, физиолого-биохимическим [25–27] и молекулярно-генетическим признакам. Молекулярно-генетическую идентификацию проводили посредством сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, полученных с использованием универсальных эубактериальных праймеров 8f и 1492r, с нуклеотидными последовательностями в базах *GenBank* и *EzBioCloud*. Секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК отобранных штаммов бактерий выполнены лабораторией «Коллекция микроорганизмов» Института микробиологии НАН Беларуси.

Исследование патогенности, токсичности и токсигенности штаммов проводили в Институте экспериментальной ветеринарии им. Вышелесского по стандартным методикам. Для проверки токсичности бактериальных штаммов на карповых рыбах в РУП «Институт рыбного хозяйства» проводили пороговые тесты с различными концентрациями культуральной жидкости (КЖ), выживаемость рыб регистрировалась на 24-й, 48-й, 72-й и 96-й час [28–30].

Для определения лечебно-профилактического действия спорообразующих бактерий их КЖ в количестве 5, 10 и 15% вносили в комбикорм и в течение 7 сут скармливали разновозрастному карпу (из расчета 5% комбикорма от веса рыбы в аквариуме), после чего рыбам вводили внутривентально по 0,2–0,3 мл суточной бактериальной суспензии патогенного штамма *A. hydrophila* 51, выживаемость рыб регистрировалась на 8 суток после инъекции.

При статистической обработке результатов экспериментов проводили определение средних арифметических и их доверительных интервалов [31, 32].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Из образцов донных отложений рыбоводческих водоемов, внутренностей и чешуи карповых рыб было выделено 98 изолятов спорообразующих бактерий. Оценка их ферментативной активности проводили в сравнении со штаммом из пробиотического препарата «Эмили» на агаризованных средах со специфическими субстратами. Установлено, что 21% изолятов обладает полиферментной активностью.

Таблица 1. Ферментативная активность штаммов

Штаммы	Источник выделения	Ксиланазная активность	Целлюлазная активность	Протеазная активность	Амилазная активность
<b>1</b>	чешуя карпа	<b>7,2±0,3</b>	<b>6,5±0,3</b>	<b>4,6±0,1</b>	<b>5,3±0,2</b>
2	чешуя карпа	6,3±0,2	7,5±0,2	2,7±0,2	2,4±0,3
3	чешуя карпа	1,0±0,4	1,0±0,2	1,7±0,3	3,8±0,3
<b>5</b>	чешуя карпа	<b>7,3±0,3</b>	<b>6,5±0,1</b>	<b>4,3±0,2</b>	<b>4,7±0,2</b>
<b>6</b>	чешуя карпа	<b>6,8±0,2</b>	<b>6,7±0,3</b>	<b>5,0±0,1</b>	<b>5,0±0,1</b>
<b>16</b>	чешуя карпа	<b>5,6±0,2</b>	<b>4,8±0,3</b>	<b>5,7±0,1</b>	<b>3,3±0,3</b>
P1	чешуя карпа	2,2±0,3	1,5±0,4	1,6±0,2	1,7±0,4
<b>P3</b>	чешуя карпа	<b>7,2±0,1</b>	<b>6,1±0,3</b>	<b>5,4±0,2</b>	<b>3,5±0,1</b>
<b>P4</b>	чешуя карпа	<b>6,9±0,2</b>	<b>5,0±0,2</b>	<b>5,2±0,3</b>	<b>5,5±0,2</b>
Pи4	внутренности карпа	5,0±0,4	3,6±0,1	2,3±0,4	1,3±0,2
<b>Pи6</b>	внутренности карпа	<b>6,7±0,3</b>	<b>4,9±0,3</b>	<b>4,8±0,2</b>	<b>5,0±0,4</b>
<b>Pи7</b>	внутренности карпа	<b>5,7±0,1</b>	<b>1,8±0,3</b>	<b>3,4±0,3</b>	<b>3,3±0,3</b>
<b>Pи9</b>	внутренности карпа	<b>7,1±0,2</b>	<b>6,2±0,2</b>	<b>3,5±0,2</b>	<b>3,1±0,3</b>
П1	донные отложения	1,5±0,4	1,7±0,2	1,2±0,1	1,1±0,2
П3	донные отложения	2,0±0,4	1,7±0,4	2,0±0,3	1,2±0,4
П4	донные отложения	1,8±0,3	1,5±0,3	3,4±0,2	1,3±0,4
П5	донные отложения	1,0±0,1	2,0±0,4	2,1±0,4	5,1±0,1
П6	донные отложения	1,8±0,2	1,0±0,1	2,2±0,3	1,3±0,3
П7	донные отложения	2,0±0,3	2,0±0,3	3,7±0,2	1,2±0,1
П8	донные отложения	2,0±0,3	1,5±0,2	1,0±0,3	1,3±0,2
<i>B. subtilis</i> БИМ В-845Д	препарат «Эмилин»	<b>6,7±0,1</b>	<b>5,0±0,3</b>	<b>3,8±0,2</b>	<b>3,7±0,4</b>

Примечание. Ферментативная активность выражена в индексах, рассчитанных как отношение зоны гидролиза субстрата к диаметру колонии

Относительно высоким уровнем продукции амилаз, протеаз, ксиланаз и целлюлаз, превосходящим показатели референтного штамма *B. subtilis* БИМ В-845Д, характеризуется 9% изолятов (1, 5, 6, 16, P3, P4, Pи6, Pи7, Pи9) (таблица 1).

На следующем этапе скрининга для изолятов с наиболее высокими показателями ферментативных активностей была проведена количественная оценка уровня продукции эндо-1,4-β-глюканазы, эндо-1,4-β-ксиланазы, α-амилазы, протеаз, а также исследована антимикробная активность в отношении тест-культур *A. hydrophila* 51 и *P. fluorescens* 1 (таблица 2).

Таблица 2. Ростовые характеристики, антагонистическая и ферментативная активность отобранных изолятов

Согласно исследованиям *in vitro* все отобранные культуры (за исключением изолята 5) ингибируют рост возбудителя аэромоназа. Антимикробная активность к обоим патогенам выявлена у 5 изолятов (1, 15, P3, P4 и Pи6). Максимальной активностью в отношении *A. hydrophila* 51 характеризуются изоляты 16 и Pи6, в отношении *P. fluorescens* 1 — P3 и Pи6.

Наиболее высоким уровнем α-амилазной и протеолитической активности обладают изоляты 6 и 16, эндо-1,4-β-глюканазной — 16 и P3, эндо-1,4-β-ксиланазной — P3 и Pи6.

Для дальнейших исследований были выбраны изоляты 6, 16, P3 и Pи6 с наиболее высокими показателями антимикробной и ферментативной активности.

Отобранные культуры представляют собой грамположительные подвижные палочки с эллипсоидными эндоспорами. Изоляты 6 и 16 образуют на мясо-пептонном агаре (МПА) прозрачные колонии неправильной формы, среднего (2–5 мм) и крупного (более 6 мм) размера, плотной консистенции, с лопастным контуром края, шероховатой поверхностью и бугристым рельефом. Изоляты P3 и Pи6 образуют на МПА прозрачные округлые колонии среднего размера (2–5 мм), вязкой консистенции, с ровным краем, гладким контуром, матовой поверхностью, каплевидным рельефом. По итогам сравнительного анализа секвенированных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с референтными нуклеотидными последовательностями типовых штаммов из баз дан-

Таблица 2. Ростовые характеристики, антагонистическая и ферментативная активность отобранных изолятов

Изоляты	Титр, п/мл		Диаметр зон ингибирования роста патогенов, мм		ЦА, ед./мл	КА, ед./мл	АА, ед./мл	ПА, ед./мл
	КОЕ	Спор	A.hydrophila 51	P.fluorescens 1				
1	1,8x10 <sup>9</sup>	1,5x10 <sup>9</sup>	35,0 ± 0,6	15,0 ± 0,4*	0,81	2,91	0,46	7,9
5	4,0x10 <sup>8</sup>	4,0x10 <sup>8</sup>	-	-	1,07	2,93	0,26	7,7
<b>6</b>	9,6x10 <sup>8</sup>	5,2x10 <sup>8</sup>	37,0 ± 0,9	-	0,53	2,89	<b>0,69</b>	<b>8,7</b>
<b>16</b>	8,3x10 <sup>8</sup>	4,0x10 <sup>8</sup>	<b>40,0 ± 0,8</b>	14,0 ± 0,4*	<b>1,14</b>	1,37	<b>0,65</b>	<b>8,5</b>
<b>P3</b>	1,0x10 <sup>9</sup>	7,7x10 <sup>8</sup>	34,0 ± 0,7	<b>21,0 ± 0,5*</b>	<b>1,16</b>	<b>3,16</b>	0,55	8,1
P4	2,6x10 <sup>9</sup>	1,6x10 <sup>8</sup>	37,0 ± 0,5	10,0 ± 0,5*	1,10	3,05	0,62	8,0
<b>Ри6</b>	1,8x10 <sup>9</sup>	1,3x10 <sup>9</sup>	<b>40,0 ± 0,8</b>	<b>19,0 ± 0,6*</b>	0,67	<b>3,27</b>	0,49	7,6
Ри7	9,0x10 <sup>8</sup>	8,2x10 <sup>8</sup>	34,0 ± 0,7	-	0,89	2,69	0,52	7,0
Ри9	1,1x10 <sup>9</sup>	5,5x10 <sup>8</sup>	37,0 ± 0,6	-	0,78	2,52	0,43	7,2

Примечание. \* – зоны ослабления роста патогена; в остальных случаях приведенные значения соответствуют диаметрам зон лизиса тест-объекта; ЦА – целлюлазная (эндо-1,4-β-глюканазная) активность, КА – ксиланазная (эндо-1,4-β-ксиланазная) активность, АА – амилазная (α-амилазная) активность, ПА – протеолитическая активность

ных GenBank и EzBioCloud установлена принадлежность изолята 6 к виду *Peribacillus butanolivorans* (степень сходства 99,04%), изолята 16 — к виду *Bacillus subtilis* (99,04%), изолятов P3 и Ри6 — к виду *Bacillus amyloliquefaciens* (99,31% и 99,59%, соответственно).

По данным ветеринарно-токсикологического исследования отобранные культуры спорообразующих бактерий непатогенны и безвредны для лабораторных животных, не обладают токсичностью, аллергенностью и токсигенными свойствами.

Были проведены испытания токсичности различных концентраций КЖ отобранных штаммов (25, 50, 100, 200, 400 мл/л) на организм разновозрастного карпа. Изменений в поведении рыбы (повышение или снижение двигательной активности, нарушение равновесия, стремительные плавательные движения, судороги, тремор) отмечено не было, что позволяет классифицировать исследуемые культуры как неопасные и нетоксичные для гидробионтов.

Результаты исследования лечебно-профилактического действия бактериальных культур в составе кормов на карповых рыб показали, что все образцы в дозировках 0,5%, 1,0% и 2,0% повышают сохранность рыбы по сравнению с контрольной группой. Наилучшими лечебными свойствами обладают штаммы *B. amyloliquefaciens* Ри6 и *B. subtilis* 16, которые во всех испытанных концентрациях обеспечивают 100% выживаемость рыбы. Бактерии *B. amyloliquefaciens* P3 и *P. butanolivorans* 6 также положительно влияют на сохранность карпа, но 100% выживаемость отмечена только при дозировке ввода КЖ 1,0% и 0,5%, соответственно.

Методом лунок в опытах *in vitro* оценена биосовместимость исследуемых бактерий с целью создания консорциумов на их основе. Показано, что штамм *P. butanolivorans* 6, не проявляя антагонизма в отношении других культур, незначительно ингиби-

руется культурами *B. subtilis* 16 и *B. amyloliquefaciens* P3 и в значительной степени подавляется культурой *B. amyloliquefaciens* Ри6 (зона подавления роста — 30 мм). Таким образом, ввиду проявления всеми культурами антагонистических свойств по отношению к штамму бактерий *P. butanolivorans* 6, его использование в составах консорциума с остальными бактериями нецелесообразно.

С целью изучения возможности включения штаммов *B. amyloliquefaciens* Ри6, *B. amyloliquefaciens* P3 и *B. subtilis* 16 в состав консорциума, проводили сравнительную оценку их ферментативной и антимикробной активности при температурах 30 °С (оптимальной для роста бактерий и продукции метаболитов) и 18 °С (средней температуре рыбоводческих водоемов). Установлено (таблицы 3, 4), что все исследуемые культуры способны гидролизовать полисахаридные субстраты и проявлять антагонистическую активность в отношении патогенных видов рода *Aeromonas* как при оптимальной, так и при пониженной температуре, причем наибольшую толерантность к перепаду температур проявляли штаммы *B. subtilis* 16 и *B. amyloliquefaciens* Ри6.

У этих культур были отмечены более высокие показатели ферментативной и антагонистической активностей в условиях пониженных температур, что явилось основой для включения их в состав пробиотической кормовой добавки. Отобранные штаммы депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номерами *B. subtilis* В-1878 Г и *B. amyloliquefaciens* В-1879 Г, соответственно.

На основе консорциума бактерий *B. subtilis* В-1878 Г и *B. amyloliquefaciens* В-1879 Г получен экспериментальный образец кормовой добавки в сухой форме, характеризующийся высоким титром КОЕ (1,5x10<sup>9</sup>/г) и спор (1,3x10<sup>9</sup>/г).

При изучении влияния различных норм ввода

Таблица 3. Сравнение ферментативной активности штаммов при различных температурах

Исследуемая культура	Амилазная активность	Целлюлазная активность	Ксиланазная активность
Продукция ферментов при 30 °C			
<i>B. amyloliquefaciens</i> P3	2,8 ± 0,2	8,2 ± 0,2	6,5 ± 0,2
<i>B. amyloliquefaciens</i> Pи6	4,6 ± 0,3	3,1 ± 0,3	5,2 ± 0,4
<i>B. subtilis</i> 16	3,4 ± 0,2	4,0 ± 0,1	5,0 ± 0,3
Продукция ферментов при 18 °C			
<i>B. amyloliquefaciens</i> P3	2,0 ± 0,1	2,5 ± 0,3	3,3 ± 0,2
<i>B. amyloliquefaciens</i> Pи6	3,4 ± 0,2	2,8 ± 0,2	4,5 ± 0,2
<i>B. subtilis</i> 16	3,2 ± 0,4	3,3 ± 0,3	3,8 ± 0,3

Примечание. Ферментативная активность выражена в индексах, рассчитанных как отношение зоны гидролиза субстрата к диаметру колонии

Таблица 4. Сравнение антагонистической активности штаммов при различных температурах

Исследуемая культура	<i>A. salmonicida</i> БИМ В-1803	<i>A. salmonicida</i> БИМ В-1806	<i>A. salmonicida</i> БИМ В-1816	<i>A. rivipollensis</i> БИМ В-1805	<i>A. veronii</i> БИМ В-1810	<i>A. hydrophila</i> БИМ В-1814	<i>A. hydrophila</i> 51
Антагонистическая активность при 30 °C							
<i>B. amyloliquefaciens</i> P3	26±0,5	26±0,6	23±0,4	21±0,8	27±0,5	25±0,6	33±0,5
<i>B. amyloliquefaciens</i> Pи6	27±0,7	27±0,8	25±0,6	23±0,5	27±0,5	25±0,7	38±0,4
<i>B. subtilis</i> 16	23±0,5	22±0,3	21±0,8	20±0,5	26±0,6	21±0,4	35±0,6
Антагонистическая активность при 18 °C							
<i>B. amyloliquefaciens</i> P3	27±0,6	25±0,6	24±0,7	23±0,6	27±0,4	26±0,8	30±0,7
<i>B. amyloliquefaciens</i> Pи6	28±0,6	28±0,5	25±0,4	23±0,6	27±0,7	26±0,6	37±0,7
<i>B. subtilis</i> 16	25±0,4	24±0,6	20±0,4	20±0,7	24±0,6	23±0,5	34±0,4

пробиотической кормовой добавки на эффективность комбикорма и его перевариваемость разновозрастным карпом установлено, что наилучшие показатели достигаются при введении кормовой добавки в количестве 0,5% к массе комбикорма (прирост карпа — 2,86±0,14 г, кормовой коэффициент — 2,6 ед.).

### ВЫВОДЫ

В результате скрининга из 98 изолятов спорообразующих бактерий отобраны штаммы, характеризующиеся высокой гидролитической активностью и способностью ингибировать рост патогенов рыб в температурных условиях рыбоводческих водоемов. Отобранные культуры непатогенны и нетоксичны для лабораторных животных и рыб и способны в дозировке 0,5, 1,0 и 2,0% оказывать лечебно-профилактический эффект на разновозрастного карпа. Установлено, что экспериментальный образец кормовой добавки, созданный на основе консорциума штаммов *B. subtilis* В-1878 Г и *B. amyloliquefaciens* В-1879 Г, в количестве 0,5% в составе комбикорма способен снижать кормовой коэффициент при выращивании рыбы до 2,6 ед. и повышать относительный прирост до 38%.

### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Дегтярик, С. М. Зараженность карпа обыкновенного (*Cyprinus carpio* L.) инвазивными видами возбудителей гельминтозной и бактериальной природы в зависимости от возраста рыб в рыбоводных хозяйствах Беларуси / С. М. Дегтярик, Е. И. Бычкова, М. М. Якович, Г. В. Слободницкая, М. Н. Тютюнова // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси. — 2019. — № 35. — С. 215–222.
- 2 Агеец, В. Ю. Состояние рыбной отрасли в Беларуси в 2018 году и перспективы ее развития на 2019–2020 годы / В. Ю. Агеец, В. Г. Костоусов // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси. — 2019. — № 35. — С. 9–19.
- 3 Агеец, В. Ю. Качественный комбикорм — здоровая рыба — экологически чистая продукция / В. Ю. Агеец, Ж. В. Кошак // Наука и инновации. Ихтиофауна. — 2020. — № 3 (205). — С. 17–21.
- 4 Агеец, В. Ю. Сырье и технология производства комбикормов для ценных видов рыб в Республике Беларусь / В. Ю. Агеец, З. В. Ловкис, Ж. В. Кошак, А. Э. Кошак // Вести национальной академии наук Беларуси. — 2020. — № 1. — С. 79–89.

- 5 Микулич, Е. Л. Болезни рыб: пособие / Е. Л. Микулич; М-во сельск. хоз-ва и продовольств. Респ. Беларусь, Гл. управл. образ. науки и кадров, Бел. гос. сельскохозяйств. академия. — Горки, 2011. — С. 57–60.
- 6 Трифонова, Е. С. Применение пробиотиков для компенсации воздействия агрессивных факторов водной среды при выращивании осетровых рыб в системах с замкнутым водоснабжением / Е. С. Трифонова [и др.] // Тез. Всерос. науч.-практич. конф.: Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов. — Москва, 2003. — С. 130–131
- 7 Гадлевская, Н. Н. Действие экзогенных ферментов на рост карпа / Н. Н. Гадлевская // Вести национальной академии наук Беларуси. — 2005. — № 2. — С. 95–98.
- 8 Егорова, В. И. Особенности мембранного пищеварения у карповых рыб: автореф. дис.к.б.н.: 03.00.13; Ставроп. гос. ун-т. — Ставрополь, 2001. — С. 24.
- 9 Пономарев, С. В., Грозеску Ю. Н., Бахарева А. А. Индустриальное рыбоводство. — СПб.: Лань, 2013. — С. 420.
- 10 Пробиотик «Целлобактерин+»: результаты при выращивании карпа в прудовом хозяйстве [Электронный ресурс] / Портал Sfera.fm — пищевая промышленность России. — Режим доступа: <https://sfera.fm/articles/rybnaya/probiotik-tsellobakterin-v-kormakhdlya-karpa>. — Дата доступа: 02.05.2022.
- 11 Пробиотические препараты на основе микроорганизмов рода *Bacillus* / О. В. Федорова [и др.] // Вестник технологич. ун-та. — 2016. — № 15 (19). — С. 170–174.
- 12 Биологически активные вещества, синтезируемые пробиотическими микроорганизмами родов *Bacillus* и *Lactobacillus* / Н. А. Забокрицкий // the Journal of scientific articles «Health and Education Millenium». — 2015. — № 3 (17). — С. 80–90.
- 13 Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* в птицеводстве / Н. В. Феоктистова [и др.] // Ученые записки Казанск. ун-та. Сер. естеств. науки. — 2017. — № 1 (159). — С. 85–107.
- 14 Кошак, Ж. В. Бактерийные и биопрепараты в профилактике заболеваний рыб / Ж. В. Кошак // Белорусское сельское хозяйство. — 2016. — № 12. — С. 44–46.
- 15 Юрина, Н. А. Новые подходы к использованию биопрепаратов в рыбоводстве / Н. А. Юрина, Е. А. Максим // Сборник научных трудов Северо-Кавказского научно-исследовательского института животноводства. — 2015. — Т. 4.- С. 110.
- 16 Эффективность применения биологически активных добавок в рыбоводстве / В. С. Буяров [и др.] // Вестник Орловского гос. аграрн. ун-та. — 2016. — № 3 (60). — С. 32.
- 17 Изменение прироста массы осетровых при применении пробиотического препарат акваурин / Г. А. Ноздрин [и др.] // Вестник Новосиб. гос. аграрн. ун-та. — 2015. — № 4 (37). — С. 121–122.
- 18 Гаврилин, К. В. Методы специфической и неспецифической иммунопрофилактики бактериальной геморрагической септицемии (аэромоноза) карпа (*Cyprinus carpio L.*): дис. канд. биол. наук: 03.00.10 / К. В. Гаврилин; Всерос. научно-исслед. институт пресноводн. рыбн. хоз-ва. — Москва, 2004. — С. 150.
- 19 Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии. — М.: Колос, 1983. — С. 253.
- 20 Егоров, Н. С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. — М.: Высшая школа, 1965. — С. 38–42
- 21 ОФС.1.7.2.0012.15 Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0012-15-proizvodstvennye-probioticheskie-shtammy-i-shtammy-dlya-kontrolya-probiotikov>. — Дата доступа: 02.05.2022.
- 22 McCleary, B.V., Monaghan, D. New developments in the measurement of  $\alpha$ -amylase, endo-protease,  $\beta$ -glucanase and  $\beta$ -xylanase // 2nd European symposium on enzymes in grain processing / Helsinki, 8–10 December, 1999. — Helsinki, 1999. — P. 31–39
- 23 Mangan, D., Cornaggia, C., Liadova, A. Novel substrates for the automated and manual assay of endo-1,4- $\beta$ -xylanase // Carbohydrate Research. — 2018. — № 445. — P. 14–22.
- 24 Петрова, И. С. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробиологического происхождения / И. С. Петрова, М. М. Винцюнайте // Прикл. биохимия и микробиология. — 1980. — Т. 2, вып. 2. — С. 322–327.
- 25 Williams, S. T. Bergey's manual of systematic bacteriology. — Baltimore: Williams and Wilkins, 1989. — Vol. 4. — P. 2545.
- 26 Герхард, Ф. Методы общей бактериологии: в 3 т. — М.: Мир, 1984. — Т. 3. — С. 264.
- 27 Егоров, Н. С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. — М.: МГУ, 1983. — С. 128.
- 28 ГОСТ 32473–2013 Межгосударственный стандарт "Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение острой токсичности для рыб" — М.: Стандартиформ, 2019. — С. 11.
- 29 Руководство ОЭСР по испытаниям химических веществ № 203. Рыбы: тест на острую токсичность. ОЭСР, Париж, 1992. — С. 10.
- 30 Согласованная на глобальном уровне система классификации опасности и маркировки химической продукции (СГС). Третье пересмотренное издание. Организация Объединенных Наций, Нью-Йорк и Женева, 2009. — С. 654.
- 31 Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Вышэйшая школа, 1973. — С. 320.
- 32 Тюрин, Ю. Н., Макаров, А. А. Статистический анализ данных на компьютере. — М.: ИНФА-М. — 1998. — С. 544.

## REFERENCES

- 1 Degtyarik, S.M., Bychkova, E.I., Yakovich, G.V., Slobodnitskaja, M.N., Tsiutsiunova, M. N. Zarazhennost' karpa obyknovennogo (*Cyprinus carpio L.*) invazivnymi vidami vozbuditelej gel'mintoznoj i bakterial'noj prirody v zavisimosti ot vozrasta ryb v rybovodnyh hozyajstvah Belarusi [The contamination of carp (*Cyprinus carpio L.*) by invasive species of causative agents of gelment and bacterial etiology depending on the age of fish on the fishing farms in Belarus]. *Voprosy rybnogo hozyajstva Belarusi — Belarus Fish Industry Problems*, 2019 (35). — P. 215–222.
- 2 Aheyets, U. Yu., Kostousov, V. G. Sostoyanie rybnoj otrasli Belarusi v 2018 godu i perspektivy ee razvitiya na 2019–2020 gody [The state of the fishing industry of Belarus in 2018 and the perspectives of its development for 2019–2020]. *Voprosy rybnogo hozyajstva Belarusi — Belarus Fish Industry Problems*, 2019 (35). — P. 9–19.
- 3 Aheyets, U. Yu., Koshak, Z. V. Kachestvennyj kombikorm — zdorovaya ryba — ekologicheski chistaya produkcija [Quality compound feed — healthy fish — environmentally friendly products]. *Nauka i innovacii. Ihtiofauna. — Science and innovation. Ichthyofauna.*, 2020, № .3 (205). — P. 17–21.
- 4 Aheyets, U. Yu., Lovkis, Z.V., Koshak, Z. V., Koshak, A. E. Syr'e i tekhnologiya proizvodstva kombikormov dlya cennyh vidov ryb v Respublike Belarus' [Raw materials and feed production technology for valuable fish species in the Republic of Belarus]. *Vesti nacional'noj akademii nauk Belarusi — Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, № 1. — P.79–89.
- 5 Mikulich, E. L. Bolezni ryb: posobie [Fish diseases: a guide]. Horki: Bel. Gos. Sel'skohoz. Akadem., 2011. — C. 57–60.
- 6 Trifonova, E. S. Primenenie probiotikov dlya kompensacii vozdejstviya agressivnyh faktorov vodnoj sredy pri vyrashchivanii osetrovyh ryb v sistemah s zamknutym vodosnabzheniem [The use of probiotics to compensate for the impact of aggressive factors in the aquatic environment when growing sturgeon in systems with a closed water supply]. *Tez. Vseros. nauch.-praktich. konf.: Problemy immunologii, patologii i ohrany zdorov'ya ryb i drugih gidrobiontov [Abstracts Russian scientific and practical. Conf.: Problems of Immunology, Pathology and Health Protection of Fish and Other Hydrobionts]*. Moscow, 2003. — P. 130–131.
- 7 Gadlevskaya, N. N. Dejstvie ekzogennyh fermentov na rost karpa [Effect of exogenous enzymes on carp growth]. *Vesti nacional'noj akademii nauk Belarusi — Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2005 (2). — P. 95–98.
- 8 Egorova, V. I. Osobennosti membrannogo pishchevareniya u karpovyh ryb. Diss. kand. biol. nauk [Features of membrane digestion of cyprinids. Dissertation Ph D.]. Stavropol, 2001. — P. 24.
- 9 Ponomarev, S.V., Grozesku, Yu.N., Bahareva, A. A. Industrial'noe rybovodstvo [Industrial fish farming]. S.-Peterburg: Lan' Publ., 2013. — P.420.
- 10 Probiotik «Cellobakterin+»: rezul'taty pri vyrashchivanii karpa v prudovom hozyajstve (Probiotic "Cellobacterin +": results in the cultivation of carp in a pond farm) Available at: <https://sfera.fm/articles/rybnaya/probiotik-tsellobakterin-v-kormakh-dlya-karpa/> (accessed 2 May 2022).
- 11 Fedorova O. V., Nazmieva A. I., Nuretdinova E. I., Valeeva R. T. Probioticheskie preparaty na osnove mikroorganizmov roda *Bacillus* [Probiotic preparations based on microorganisms of the genus *Bacillus*]. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta — Bulletin of the Technological University*, 2016, № .15. — P. 170–174.
- 12 Zabokrickij, N. A. Biologicheski aktivnye veshchestva, sinteziruemye probioticheskimi mikroorganizmami rodov *Bacillus* i *Lactobacillus* [Biologically active substances synthesized by probiotic microorganisms of the genera *Bacillus* and *Lactobacillus*]. *The Journal of scientific articles «Health and Education Millennium»*, 2015, № 3 (17). — P. 80–90.
- 13 Feoktistova, N.V., Mardanova, A.M., Hadieva, G.F., Sharipova, M. R. Probiotiki na osnove bakterij roda *Bacillus* v pticevodstve [Probiotics based on bacteria from the genus *Bacillus* in poultry breeding]. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki — Scientists Notes of Kazan University. Series Natural Sciences*, 2017, vol. 159, № 1 — P. 85–107.
- 14 Koshak, Z. V. Bakterijnye i biopreparaty v profilaktike zabolevanij ryb [Bacterial and biological preparations in the prevention of fish diseases]. *Belorusskoe sel'skoe hozyajstvo — Belarusian agriculture*, 2016, № 12. — P. 44–46.
- 15 Yurina, N.A., Maksim, E. A. Novye podhody k ispol'zovaniyu biopreparatov v rybovodstve [New approaches to the use of biological preparations in fish farming]. *Sbornik nauchnyh trudov Severo-Kavkazskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta zhivotnovodstva — Collection of scientific papers of the North Caucasian Research Institute of Animal Husbandry*, 2015, vol.4. — P. 110.
- 16 Buyarov, V.S., Yushkova, Yu. A. Effektivnost' primeneniya biologicheskii aktivnyh dobavok v rybovodstve [Efficiency of the use of biologically active additives in fish farming]. *Vestnik Orlovskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta — Bulletin of the Oryol State Agrarian University*, 2016 № .3 (60). — P. 32.
- 17 Nozdrin, G.A., Moruzi, I.V., Pishchenko, E.V., Nurutdinova, S. I. Izmenenie prirosta massy osetrovyh ryb pri primenenii probioticheskogo preparata Akvapurin [Changes in weight gain of sturgeons when applying Aquapurine probiotic]. *Vestnik NGAU (Novosibirskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet) — Bulletin of NSAU (Novosibirsk State Agrarian University)*, 2015, № .4 (37). — P. 121–122.
- 18 Gavrilin, K. V. Metody specificheskoi i nespecificheskoi immunoprofilaktiki bakterial'noj gemorragicheskoi septicemii (aeromonoz) karpa (*Cyprinus carpio L.*). Diss. kand. biol. nauk [Methods of specific and nonspecific immunoprophylaxis of bacterial hemorrhagic septicemia (aeromonosis) of carp (*Cyprinus carpio*

L.) Dissertation Ph D.]. Moscow, 2004. — P.150.

19 Segi, J. Metody pochvennoj mikrobiologii [Soil microbiology methods]. Moscow, Kolos Publ., 1983. — P. 253.

20 Egorov, N. S. Mikroby-antagonisty i biologicheskie metody opredeleniya antibioticheskoj aktivnosti [Antagonistic microbes and biological methods for determining antibiotic activity]. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1965. — P. 36–42.

21 OFS.1.7.2.0012.15 Proizvodstvennye probioticheskie shtammy i shtammy dlya kontrolya probiotikov (General Pharmacopoeia Monograph 1.7.2.0012.15 Production probiotic strains and strains for probiotic control) Available at: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0012-15-proizvodstvennye-probioticheskie-shtammy-i-shtammy-dlya-kontrolya-probiotikov/> (accessed 2 May 2022).

22 McCleary, B.V., Monaghan, D. New developments in the measurement of  $\alpha$ -amylase, endo-protease,  $\beta$ -glucanase and  $\beta$ -xylanase. 2nd European symposium on enzymes in grain processing. Helsinki, 1999. — P. 31–39.

23 Mangan, D., Cornaggia, C., Liadova, A. Novel substrates for the automated and manual assay of endo-1,4- $\beta$ -xylanase. Carbohydrate Research, 2018, N° 445. — P. 14–22.

24 Petrova, I.S., Vincyunajte, M. M. Opredelenie proteoliticheskoj aktivnosti fermentnyh preparatov mikrobiologicheskogo proiskhozhdeniya [Determination of the proteolytic activity of enzyme preparations of microbiological origin]. Prikladnaya biohimiya i mikrobiologiya — Applied Biochemistry and Microbiology, 1980, vol.2, N° 2. — P. 322–327.

25 Williams, S. T. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams and Wilkins Publ., 1989. — P.2545.

26 Gerhard, F. Metody obshchej bakteriologii [General bacteriology methods]. Moscow, Mir Publ., 1984. — P. 264.

27 Egorov, N. S. Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po mikrobiologii [Guide to practical exercises in microbiology]. Moscow, MSU Publ., 1983. — P.128.

28 GOST 32473–2013 Metody ispytaniy himicheskoy produkcii, predstavlyayushchej opasnost' dlya okruzhayushchej sredy. Opredelenie ostroj toksichnosti dlya ryb [State standart 32473–2013. Methods for testing chemical products hazardous to the environment. Determination of acute toxicity to fish]. Moscow, Standartinform Publ., 2019. — P.11.

29 Rukovodstvo OESR po ispytaniyam himicheskikh veshchestv N° 203. Ryby: test na ostruyu toksichnost' [Organization for Economic Cooperation and Development Chemical Testing Guideline No. 203. Fish: Acute Toxicity Test]. Paris, 1992. — P. 10.

30 Soglasovannaya na global'nom urovne sistema klassifikacii opasnosti i markirovki himicheskoy produkcii [Hazard classification and labeling system for chemical products]. New York, Geneva, 2009. — P. 654.

31 Rokickij, P. F. Biologicheskaya statistika [Biological statistics]. Minsk, Vyshejschaya shkola Publ., 1973. — P. 230.

32 Tyurin, Yu.N., Makarov, A. A. Statisticheskij analiz dannyh na komp'yutere [Statistical data analysis using computer]. Moscow, INFA-M Publ., 1998. — P. 544.



**COMPOSING BACTERIAL CONSORTIUM AS A BASIS OF PROBIOTIC FEED ADDITIVE FOR CARP FISH SPECIES AND EVALUATION OF ITS PROPHYLACTING**

**Kantor K. V.<sup>1\*</sup>, Proskurnina I. A.<sup>1</sup>, Arashkova A. A.<sup>1</sup>, Kolomiets E. I.<sup>1</sup>, Koshak Z. V.<sup>2</sup>, Gadlevskaya N. N.<sup>2</sup>, Rybkina E. E.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, Kuprevich str. 2, Minsk, 220141, Republic of Belarus.*

<sup>2</sup>*RUE "Fish Industry Institute", Stebeneva str. 22, Minsk, 220024, Republic of Belarus.*

\*kantorkarina@rambler.ru

**ABSTRACT**

Isolation and screening of sporulating bacteria possessing hydrolytic activity and displaying antagonistic properties toward carp fish pathogens was carried out; identification of isolates was performed and their preventive-curative action was investigated. Microbial consortium formed by the selective strains laid the basis for test specimen of probiotic feed additive; the optimal dosage of its supplying into composite feed rations was calculated.

**Keywords:** probiotics, bacteria of the genus *Bacillus*, feed additive, aquaculture, carp fish

**БАКТЕРИЯЛЫҚ КОНСОРЦИУМ ҚҰРУ — САЗАН БАЛЫҚТАРЫНА АРНАЛҒАН ПРОБИОТИК-  
ТІК АЗЫҚ ҚОСПАСЫНЫҢ НЕГІЗІ ЖӘНЕ ОНЫҢ ЕМДІК-ПРОФИЛАКТИКАЛЫҚ ӘСЕРІН БАҒА-  
ЛАУ**

**Кантор К. В.<sup>1\*</sup>, Проскурнина И. А.<sup>1</sup>, Арашкова А. А.<sup>1</sup>, Коломиец Э. И.<sup>1</sup>, Кошак Ж. В.<sup>2</sup>, Гадлевская Н. Н.<sup>2</sup>,  
Рыбкина Е. Е.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Беларусия ҰҒА микробиология институты, Купрэвича көшесі, 2 үй, Минск қ., 220141, Беларусь Республикасы.

<sup>2</sup>РУП «Балық шаруашылығы институты», Стебенева көшесі, 22 үй, Минск қ., 220024, Беларусь Республикасы

\*kantorkarina@rambler.ru

**ТҮЙІН**

Гидролитикалық белсенділігі бар және тұқы тұқымдасына жататын балық қоздырғыштарына қарсы антагонистік қасиет көрсететін спора түзуші бактериялар бөлініп, іріктелді; оларға идентификация жүргізілді және олардың емдік-профилактикалық әсері зерттелді. Таңдалған штаммдардың консорциумы негізінде пробиотикалық азық қоспасының тәжірибелік үлгісі құрылып, оларды аралас жемге енгізудің оңтайлы нормасы белгіленді.

**Түйінді сөздер:** пробиотиктер, *Bacillus* тектес бактериялар, азық қоспасы, аквамәдениет, тұқы балығы