



UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI w OLSZTYNIE

WYDZIAŁ BIOINŻYNIERII ZWIERZĄT

Dziedzina: Nauki Rolnicze

Dyscyplina: zootechnika i rybactwo



mgr Jacek Arkadiusz Potorski

Ocena potencjału probiotycznego szczepu *Carnobacterium maltaromaticum* w podchowcie wybranych gatunków ryb

Praca doktorska wykonana
w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód
i Mikrobiologii Środowiskowej

Promotor:

dr hab. inż. Iwona Gołaś, prof. UWM

Promotor pomocniczy:

dr hab. inż. Anna Gotkowska-Płachta

Celem pracy było określenie potencjału probiotycznego środowiskowych bakterii *Carnobacterium maltaromaticum* oraz zbadanie możliwości zastosowania tego szczepu w postaci dodatku do pasz stosowanych w akwakulturach ryb o różnych wymaganiach temperaturowych, jako metody wpływającej na wzrost dobrostanu wybranych gatunków ryb i efektywność ich podchowów eksperymentalnych w zamkniętych obiegach wody (RAS).

Pierwszy etap badań obejmował selekcję i zdefiniowanie właściwości probiotycznych środowiskowego szczepu *C. maltaromaticum* na podstawie badań mikrobiologicznych dotyczących wymagań fizjologicznych izolatu (optymalnej temperatury wzrostu, zapotrzebowania na tlen), właściwości biochemicznych i aktywności metabolicznej w stosunku do 96 różnych źródeł węgla. Oceniano przeżywalność środowiskowego izolatu *C. maltaromaticum* w warunkach stresogennych obejmujących: środowiska hodowlane zróżnicowane pod względem zawartości związków pokarmowych, wartości odczynu (5 - 9 pH) i zasolenia (2 - 20% NaCl), odporności na antybiotyki powszechnie stosowane w terapii ludzi i ryb a także antagonistycznego oddziaływania na bakterie patogenne dla ryb (*Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri*). Określano wpływ izolatu *C. maltaromaticum* na liczebności mikrobioty saprofitycznej i potencjalnie chorobotwórczej (TVC 28°C, Hem 37°C, *Staphylococcus* sp., *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Clostridium* sp., TBP, grzybów drożdżoidalnych i pleśniowych) występującej w wodzie, paszach, skórze i treści przewodów pokarmowych ryb.

Drugi etap badań polegał na przeprowadzeniu eksperymentalnych podchowów narybku pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) i suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) w zamkniętych obiegach wody (RAS). Każdy gatunek ryb (n=180) podzielono na dwie grupy (kontrolną i badawczą) a z każdej grupy wyłoniono po 3 reprezentatywne obsady ryb (n=30), które podchowowano w oddzielnych basenach RAS. Podczas trwania doświadczenia (8 tygodni) ryby karmiono paszą w ilościach: 1.3% (pstrąg tęczowy) oraz 3% (suma afrykański) biomasy ryb. Ryby w grupach kontrolnych były żywione paszami komercyjnymi Aller Gold (pstrąg tęczowy) i Aller Bronze (suma afrykański), natomiast w grupach badawczych odpowiednimi paszami z 0.1% dodatkiem *C. maltaromaticum*. W trakcie eksperymentów prowadzono badania mikrobiologiczne wody, ryb (skóry, treści przewodów pokarmowych) i pasz, analizowano wskaźniki hodowlane, współczynniki strawności składników pokarmowych pasz oraz histologię jelit.

Otrzymane wyniki wykazały, że bakterie *C. maltaromaticum* spełniają założenia definicji probiotyków (FAO/WHO Working Group Report 2002) i mogą być stosowane w żywieniu narybku, gdyż nie stwierdzono niekorzystnego wpływu na zdrowie obydwu

gatunków podchowrywanych ryb. Odnotowano pozytywne oddziaływanie badanego szczepu na skład ilościowy i jakościowy mikrobioty: środowiska wodnego RAS, stosowanych pasz (Aller Gold, Aller Bronze) oraz skóry i treści przewodów pokarmowych eksperymentalnie podchowrywanego narybku pstrąga tęczowego i suma afrykańskiego. Efektami karmienia obu gatunków narybku paszami suplementowanymi środowiskowym probiotycznym izolatem *C. maltaromaticum* były korzystne zmiany wskaźników hodowlanych u badanych ryb (FCR i SGR), polepszenie strawności składników pokarmowych pasz w tym: białka surowego, związków bezazotowych wyciągowych (NFE) i popiołu surowego oraz zwiększenie powierzchni chłonnej kosmków jelitowych pstrąga tęczowego i suma afrykańskiego.

The aim of the study was to determine the probiotic potential of environmental *Carnobacterium maltaromaticum* bacteria and to investigate the possibility of using this strain in the form of an additive to fodder used in aquaculture of fish with different temperature requirements, as a method influencing the welfare increase of selected fish species and efficiency their experimental rearing in closed water circuits (RAS).

The first stage of the research involved the selection and definition of the probiotic properties of the environmental *C. maltaromaticum* strain based on microbiological tests regarding the physiological requirements of the isolate (optimal growth temperature, oxygen demand), biochemical properties and metabolic activity in relation to 96 different carbon sources. The survival of the environmental *C. maltaromaticum* isolate under stressful conditions was assessed, including: breeding environments diversified in terms of the nutrients content, pH values (5-9 pH) and salinity (2-20% NaCl), resistance to antibiotics commonly used in human and fish therapy, and antagonist effect on fish pathogenic bacteria (*Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri*). The influence of the *C. maltaromaticum* isolate on the number of saprophytic and potentially pathogenic microbiota (TVC 28 °C, Hem 37 °C, *Staphylococcus sp.*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Clostridium sp.*, TBP, yeast and mould fungi) present in water, feed, skin and digestive tract content of fish was determined.

The second stage consisted in carrying out experimental rearing of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and African catfish (*Clarias gariepinus*) fry in closed water circuits (RAS). Each species of fish (n = 180) was divided into two groups (control and research), and from each group, 3 representative fish stocks (n = 30) were selected and reared in separate RAS pools. During the experiment (8 weeks), the fish were fed with feed in the amount of 1.3% (rainbow trout) and 3% (African catfish) of the fish biomass. The fish in the control groups were fed with commercial feeds Aller Gold (rainbow trout) and Aller Bronze (African catfish), while in the research groups they were fed with appropriate feeds with 0.1% addition *C. maltaromaticum*. During the experiments, microbiological tests of water, fish (skin, digestive tract content) and feed were carried out, breeding indices, feed nutrient digestibility factors and intestinal histology were analyzed.

The obtained results showed that *C. maltaromaticum* bacteria performed the conditions of the probiotics definition (FAO/WHO Working Group Report 2002) and could be used in fry feeding, because no adverse effects on the health of both fish species were found. A positive impact of the tested strain on the quantitative and qualitative composition of the microbiota: the RAS aquatic environment, the feeds used (Aller Gold, Aller Bronze) as well as the skin and the contents of the digestive tracts of the experimentally reared fry of rainbow trout and African

catfish was noted. The effects of feeding both fry species with feed supplemented by the environmental probiotic *C. maltaromaticum* isolate were favorable changes in breeding indicators in the tested fish (FCR and SGR), improved digestibility of feed nutrients, including: crude protein, nitrogen-free extracts (NFE) and crude ash, and increased surface area absorbent intestinal villi of rainbow trout and African catfish.