

## IZOLÁCIA KYSELINU MLIEČNU PRODUKUJÚCICH BAKTÉRIÍ Z TRÁVIACEHO TRAKTU PSTRUHA DÚHOVÉHO ISOLATION OF LACTIC ACID PRODUCING BACTERIA FROM GASTROINTESTINAL TRACT OF RAINBOW TROUT

*Peter Popelka, Jana Koščová, Dagmar Mudroňová, Slavomír Marcinčák, Jozef Nagy*

**Abstract:** Probiotics are defined as live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host. Most probiotics proposed as biological control agents in aquaculture belong to the lactic acid bacteria (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*), or to the genus *Vibrio*, *Bacillus*, and *Pseudomonas*. Numbers of lactic acid producing bacteria, enterobacteria and total aerobic bacteria in two groups of rainbow trout killed immediately after catching and after shipment to the laboratory has been compared. The numbers of lactic acid producing bacteria in both groups ranged from 10.67 to 11.05 log<sub>10</sub>cfu/g, and the differences were not statistically significant. Significantly significant differences were observed only in the number of enterobacteria.

**Keywords:** gastrointestinal tract, probiotics, rainbow trout

### ÚVOD

Infekčné choroby u rýb sú spôsobené rôznymi faktormi ako sú vírusy alebo baktérie a predstavujú v súčasnosti najväčší problém ohrozujúci odvetvie akvakultúry. Masívne používanie antimikrobiálnych látok na kontrolu chorôb a podporu rastu u zvierat, zvyšuje selektívny tlak na mikroorganizmy a povzbudzuje prirodzený vznik bakteriálnej rezistencie. Rezistentné patogénne baktérie rýb predstavujú problém tak v sektore akvakultúry, ako aj v prípade transferu génov rezistencie na ľudské patogény (**Kesarcodi-Watson a i., 2008**).

Bolo navrhnutých niekoľko alternatívnych stratégií pre použitie antibiotík, pričom medzi nové alternatívne stratégie zaraďujeme aj využitie probiotických organizmov, ktorých perspektíva v akvakultúre je sľubná. Probiotiká sú živé mikroorganizmy, ktoré poskytujú zdravotný prínos pre hostiteľa, pokiaľ sa podávajú v dostatočnom množstve. Vo všeobecnosti, najčastejšie používanými a skúmanými sú baktérie produkujúce kyselinu mliečnu (LAB) (**Hagi a i., 2004**). Probiotiká boli definované **Fullerom (1989)** ako živé mikrobiálne krmné doplnky, ktoré priaznivo ovplyvňujú hostiteľský organizmus zvierat tým, že zlepšujú jeho črevnú rovnováhu. Používanie navrhovanej definície Fullerom si však v prípade akvakultúry vyžaduje zváženie a úpravu. Baktérie prítomné vo vodnom prostredí majú vplyv na zloženie črevnej mikroflóry a naopak. Môžeme tvrdiť, že v akvakultúre systémy bezprostredného okolitého prostredia majú oveľa väčší vplyv na zdravotný stav, ako u suchozemských zvierat alebo ľudí. Deterministické faktory ovplyvňujúce mikrobiálny rozvoj v akvakultúre predstavujú teplota vody, koncentrácia kyslíka a množstvo a akosť krmiva. Tieto faktory životného prostredia spolu vytvárajú prostredie, v ktorom vybraný a dobre definovaný rozsah mikroorganizmov je schopný sa množiť. V tomto kontexte je výstižnejšia v súčasnosti uznávaná nová definícia probiotík podľa **FAO/WHO (2002)**, ktorá hovorí, že: „Probiotiká sú biopreparáty obsahujúce živé mikroorganizmy, ktoré ak sú aplikované v adekvátnom množstve majú pozitívny vplyv na zdravie organizmu“.

Záujem o LAB vychádza zo skutočnosti, že sú prirodzenou mikroflórou gastrointestinálneho traktu (GIT) so schopnosťou znášať kyslé prostredie a pôsobenie

žlčových kyselín tráviaceho traktu. LAB plnia funkcie premeny laktózy na kyselinu mliečnu, a tým znižujú pH v GIT a prirodzene bránia kolonizácii GIT nežiaducimi baktériami (Klewicki a Klewicka, 2004).

Cieľom práce je stanovenie celkového počtu baktérií, enterobaktérií a počtu kyselinu mliečnu produkujúcich baktérií v tráviacom trakte pstruha dúhového potenciálne využiteľných ako probiotiká. Vhodné bakteriálne kmene budú následne identifikované a hodnotené na základe selekčných kritérií.

## MATERIÁL A METÓDY

V pokuse boli použitých 12 kusov pstruha dúhového (*Oncorhynchus mykiss*) vo veku 12 mesiacov a o hmotnosti  $200 \pm 20$  g vylovených zo sádky rybochovného zariadenia v Diviakoch firmy Rybárstvo Požehy s.r.o. Ryby boli kŕmené extrudovaným kompletným krmivom pre pstruhy (5 mm pelety) obsahujúcim rybiu múčku, rybí olej, obilniny, olejiny, vitamínovo-minerálny premix, antioxidanty a stabilizátory a krvné deriváty.

Pstruhy boli rozdelené do dvoch skupín po 6 kusov, v prvej skupine boli pstruhy usmrtené okamžite po vylovení, zachladené na ľade a vzorky čreva a črevného obsahu za účelom mikrobiologického vyšetrenia boli odobraté po 4 hodinách prepravy z miesta výlovu do laboratória. Pstruhy v druhej skupine boli z miesta výlovu prepravené počas 4 hodín v živom stave do laboratória, následne boli usmrtené a boli odobraté vzorky ako u predchádzajúcej skupiny.

**Mikrobiologické vyšetrenie črevného obsahu:** Navážené príslušné množstvo črevného obsahu (0,5 alebo 1 g) bolo riedené vo fyziologickom roztoku (desiatkové riedenie  $10^{-1}$  až  $10^{-6}$ ). Z riedení sa potom vzorky inokulovali na príslušné živné médiá (deMan, Rogosa a Sharpe agar - MRS, krvný agar - KA, ENDO agar) a inkubovali sa pri  $37^\circ\text{C}$  aeróbne (KA, ENDO), anaeróbne, respektívne mikroaerofilne (MRS). Následne po inkubácii boli stanovené počty celkových KMB (kyslomliečnych baktérií, najmä laktobacilov) (MRS), celkové počty aeróbných baktérií vrátane *Bacillus* spp. (KA), počty enterobaktérií (ENDO).

**Štatistické spracovanie výsledkov:** Výsledky boli spracované popisnou štatistikou a stanovením trendu vzostupu resp. poklesu sledovaných baktérií. Pre porovnanie rozdielov medzi skupinami sme použili párový t-test v programe GraphPad Prism verzia 5,00 (2007).

## VÝSLEDKY

Výsledky stanovenia počtu kyselinu mliečnu produkujúcich baktérií sú uvedené v Tabuľke 1. Počty kyslomliečnych baktérií boli vyššie v skupine 2 o 0,38 log v porovnaní so skupinou 1, pričom rozdiely neboli signifikantne významné ( $p > 0,05$ ).

**Tab. 1 Počty kyselinu mliečnu produkujúcich baktérií na MRS agare (kritériom selekcie je nízke pH  $5,7 \pm 0,2$ )**

	Skupina 1		Skupina 2	
		$\log_{10}\text{cfu/g}$		$\log_{10}\text{cfu/g}$
1	$7,95 \cdot 10^{10}$	10,07	$1,2 \cdot 10^{11}$	11,18
2	$7,9 \cdot 10^{10}$	10,07	$1,4 \cdot 10^{11}$	11,34
3	$1,05 \cdot 10^{11}$	11,05	$2,7 \cdot 10^{10}$	10,99
4	$8,8 \cdot 10^{10}$	10,17	$1,7 \cdot 10^{11}$	11,53
5	$1,65 \cdot 10^{11}$	11,50	$1,2 \cdot 10^{11}$	11,18
6	$1,17 \cdot 10^{11}$	11,16	$8 \cdot 10^{10}$	10,08
Priemer $\pm$ SD		<b><math>10,67 \pm 0,64</math></b>		<b><math>11,05 \pm 0,51</math></b>

## Potravinárstvo

Výsledky stanovenia počtu enterobaktérií sú uvedené v Tabuľke 2. Počty zástupcov čeľade *Enterobacteriaceae* boli vyššie v skupine 2 o 2,03 log v porovnaní so skupinou 1, pričom rozdiely boli signifikantne významné ( $p < 0,05$ ).

**Tab. 2 Počty enterobaktérií na ENDO agare - médium pre izoláciu zástupcov čeľade *Enterobacteriaceae* (selektívne médium pre G- tyčinky)**

	Skupina 1		Skupina 2	
		$\log_{10}\text{cfu/g}^{-1}$		$\log_{10}\text{cfu/g}^{-1}$
1	$1,34 \cdot 10^5$	5,29	$2,6 \cdot 10^6$	6,96
2	$1,44 \cdot 10^5$	5,36	$4 \cdot 10^5$	5,39
3	$1,4 \cdot 10^4$	4,34	$2,1 \cdot 10^8$	8,74
4	$1,26 \cdot 10^5$	5,23	$7 \cdot 10^8$	8,95
5	$1 \cdot 10^4$	4,00	$1,8 \cdot 10^6$	6,59
6	$4 \cdot 10^7$	7,39	$3,2 \cdot 10^7$	7,16
Priemer $\pm$ SD		<b>5,27 <math>\pm</math> 1,18</b>		<b>7,30 <math>\pm</math> 1,35*</b>

\*Rozdiely sú signifikantne významné ( $p < 0,05$ ).

Výsledky stanovenia počtu celkových aeróbných baktérií sú uvedené v Tabuľke 3. Počty celkových aeróbných baktérií boli vyššie v skupine 2 o 1,08 log v porovnaní so skupinou 1, pričom rozdiely neboli signifikantne významné ( $p > 0,05$ ).

**Tab. 3 Počty celkových aeróbných baktérií na krvnom agare (KA)**

	Skupina 1		Skupina 2	
		$\log_{10}\text{cfu/g}^{-1}$		$\log_{10}\text{cfu/g}^{-1}$
1	$1,7 \cdot 10^5$	5,53	$2 \cdot 10^3$	3,69
2	$1,8 \cdot 10^5$	5,59	$3,75 \cdot 10^5$	5,32
3	$1,8 \cdot 10^4$	4,59	$3 \cdot 10^8$	8,10
4	$8 \cdot 10^4$	4,08	$1,1 \cdot 10^7$	7,10
5	$1,3 \cdot 10^4$	4,26	$8 \cdot 10^6$	6,08
6	$1,2 \cdot 10^7$	7,18	$4,2 \cdot 10^7$	7,44
Priemer $\pm$ SD		<b>5,21 <math>\pm</math> 1,16</b>		<b>6,29 <math>\pm</math> 1,61</b>

### DISKUSIA

Vývoj probiotík pre komerčné využitie v akvakultúre je mnohostupňový a multidisciplinárny proces vyžadujúci si tak základný ako aj aplikovaný výskum a ekonomické posúdenie jeho použitia. Získanie vhodného kandidáta probiotík je v tomto procese veľmi dôležité. V tejto fáze je výber kmeňov založený na základe posúdenia funkcií, ktoré u možných probiotík očakávame. Predpokladá sa, že kmene preukazujúce dominantnú schopnosť kolonizácie črevnej mukózy rýb sú vhodnými kandidátmi pre konkurenčné vylúčenie patogénov z adhézie receptorov črevnej steny. Podobne, prítomnosť dominantného bakteriálneho kmeňa vo vysokých hustotách v vodnom prostredí indikuje jeho schopnosť rásť úspešne za daných podmienok a možno očakávať, že tento kmeň bude súťažiť efektívne o živiny s možnými nežiaducimi kmeňmi (Balcazar a i., 2006).

Po získaní skupiny izolátov, tieto musia byť selektované za účelom získania obmedzeného počtu bakteriálnych kmeňov pre ďalšie skúmanie. Zvyčajným spôsobom ako vykonať skrining kandidátov na probiotiká je uskutočnenie *in vitro* testov antagonizmu, v ktorých sú známe patogény vystavené účinku probiotík alebo ich extracelulárnych metabolitov na pevnom alebo tekutom médiu (Sica a i., 2012). Antibakteriálny účinok baktérií predstavujú: produkcia bakteriocínov, lyzozýmu, proteáz, peroxidu vodíka a zmena pH hodnoty produkciou organických kyselín (Vandenbergh, 1993). Kandidát na probiotiká by mal byť

tiež schopný kolonizovať a pretrvávajúť v hostiteľskom organizme alebo v jeho okolitom prostredí. Schopnosť kmeňa kolonizovať črevný trakt, alebo vonkajší povrch hostiteľa a adhérenca na mukóznú vrstvu môžu byť dobrými kritériami pre predvoľbu spomedzi potencionálnych probiotík (Ali a i., 2010).

### ZÁVER

Probiotiká sú definované ako živé mikroorganizmy, ktoré pri podaní v dostatočnom množstve predstavujú zdravotný prínos pre hostiteľa. Väčšina probiotík navrhovaných ako biologická ochrana v oblasti akvakultúry patrí medzi baktérie mliečneho kvasenia (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*), alebo k rodom *Vibrio*, *Bacillus* a *Pseudomonas*. V práci bolo porovnávané počty kyseliny mliečnu produkujúcich baktérií, enterobaktérií a celkový počet aeróbných baktérií u dvoch skupín pstruhov usmrtených po vylovení a po preprave do laboratória. Počty kyseliny mliečnu produkujúcich baktérií sa u oboch skupín pohybovali v rozpätí od 10,67 do 11,05 log<sub>10</sub>cfu/g<sup>-1</sup>, pričom rozdiely neboli štatisticky významné. Signifikantne významné rozdiely boli zaznamenané len v počte enterobaktérií.

### LITERATÚRA

- ALI, H. M., GHAZALAH, A. A., GEHAD, E. A., HAMMOUDA, Y. A., ABO-STATE, H. A. 2010. Practical Aspects and Immune response of Probiotics Preparations Supplemented to Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Diets. In *Nature and Science*, 8, 5, 39-45.
- BALCAZAR, J. L., DE BLAS, I., RUIZ-ZARZUELA, I., CUNNINGHAM, D., VENDRELL, D., MUZQUIZ, J. L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. In *Veterinary Microbiology*, 114, 173-186.
- FULLER, R. 1989. A review: probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.
- HAGI, T., TANAKA, D., IWAMURA, Y., HOSHINO, T. 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. In *Aquaculture*, 234, 335-346.
- FAO/WHO. 2002. Joint working group report on rafting guidelines for the probiotics in food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1. [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/probiotics2/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics2/en/index.html)
- KESARCODI-WATSON, A., KASPAR, H., LATEGAN, M. J., GIBSON, L. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. In *Aquaculture*, 274, 1-14.
- KLEWICKI, R., KLEWICKA, E. 2004. Antagonistic activity of lactic acid bacteria as probiotics against selected bacteria of the Enterobacteriaceae family in the presence of polyols and their galactosyl derivatives. In *Biotechnology Letters*, 26, 317-320.
- SICA, M. G., BRUGNONI, L. I., MARUCCI, P. L., CUBITTO, M. A. 2012. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming. In *Antonie van Leeuwenhoek*, DOI 10.1007/s10482-012-9703-5.
- VANDENBERGH, P. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. In *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 221-238.

**Pod'akovanie:** Spracovanie príspevku bolo podporené grantom VEGA 1/0067/13.

**Kontaktná adresa:** doc. MVDr. Peter Popelka, PhD., Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, e-mail: popelka@uvm.sk