

МРНТИ 62.09.39, 69.25.15, 34.27.39, 34.27.51

А.В. ЧИЖАЕВА^{1*}, А.А. АМАНГЕЛДІ¹, А.Ж. АЛЫБАЕВА¹,
Е.А. ОЛЕЙНИКОВА¹, И.Ю. ПОТОРОКО²

¹ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,
Алматы, Казахстан

²ФГАОУ ВО "Южно-Уральский государственный университет",
Челябинск, Россия

*anna_chizhaeva@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ И ЭКЗОПОЛИСАХАРИД-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ И ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В АКВАКУЛЬТУРЕ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.05

Аннотация

Исследована протеолитическая активность и способность к продуцированию экзополисахаридов у 17 штаммов молочнокислых бактерий и 8 штаммов пропионовокислых бактерий. Наиболее высокой протеолитической активностью среди исследуемых молочнокислых бактерий обладают вновь выделенные изоляты *Wf-20*, *Wf-2*, *Wf-10* и коллекционный штамм *Lacticaseibacillus casei* *Ai-2*. Среди пропионовокислых бактерий наиболее высокой протеиназон-пептидазной активностью обладают новые изоляты *P-2*, *P-3*, *P-4*, *P-8* и коллекционный штамм *Propionibacterium freudenreichii* *subsp. shermanii*-3. Наибольшее количество экзополисахаридов синтезируют новые изоляты *Mg-1* (320мг/100мл) и *Mg-2* (360 мг/100мл). Еще 4 новых изолята молочнокислых бактерий (*Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20*) и 4 новых изолята пропионовокислых бактерий (*P-2*, *P-4*, *P-5*, *P-8*) можно отнести к штаммам со средней степенью продукции экзополисахаридов – от 110 до 220 мг/100 мл среды. В результате проведенных исследований отобраны 7 штаммов - кандидатов в пробиотики для аквакультуры: изоляты молочнокислых бактерий *Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20* и изоляты пропионовокислых бактерий *P-2*, *P-3* и *P-8*, обладающие средней или высокой протеолитической и экзополисахарид-продуцирующей способностью. Введение их в состав пробиотических препаратов для рыб позволит улучшить процессы пищеварения, ускорить адаптацию животных к высокоэнергетическим рационам и небелковым азотистым веществам, повысить эффективность использования корма, резистентность к болезням, выживаемость и продуктивность рыб.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, пропионовокислые бактерии, протеолитическая активность, продуцирование экзополисахаридов, пробиотик, аквакультура.

Аквакультура является динамично развивающимся направлением продовольственного сектора, способным решить проблемы здорового и белкового питания. Согласно последней мировой статистике ФАО, мировое производство аквакультуры достигло в 2018 г рекордного уровня - 114,5 млн тонн в живом весе, стоимость продаж составила 263,6 млрд долларов США. В общем объеме продукции водных животных составляла 82,1 млн. тонн (250,1 млрд долларов США), среди них преобладали рыбы (54,3 млн. тонн, 139,7 млрд долларов США), произведенные в аквакультуре внутренних водоемов (47 млн т, 104,3 млрд долларов США), а также в морской и прибрежной аквакультуре (7,3 млн т, 35,4 млрд долларов США). Помимо рыбы в аквакультуре водных животных были произведены моллюски (17,7 млн тонн, 34,6 млрд долларов США), ракообразные (9,4 млн. тонн, 69,3 млрд долларов США), морские беспозвоночные (435 400 тонн, 2 млрд долларов США), водные черепахи

(370000 тонн, 3,5 млрд долларов США) и лягушки (131300 тонн, 997 млн долларов США) [1].

На глобальном уровне, начиная с 2016 года, аквакультура является основным источником рыбы, доступной для употребления в пищу, в 2018 г эта доля составляла 52 процента от общего объема, опередив рыболовство. И по прогнозам ФАО, в ближайшие годы следует ожидать еще большего роста производства аквакультуры в мире, причем его большая доля будет приходиться на страны Азии [1].

Однако, быстрое расширение интенсивной аквакультуры уже привело к увеличению распространенности трансграничных вирусных, бактериальных, паразитарных и грибковых инфекций у культивируемых водных организмов, что повлияло на устойчивость производства аквакультуры во многих странах [2]. Весьма существенные экологические, социальные и экономические последствия вспышек заболеваний обусловливают необходимость смены парадигмы в работе с рисками биобезопасности аквакультуры. Новая стратегия улучшения контроля безопасности предусматривает инновационные технические разработки, касающиеся усиления профилактики заболеваний в аквакультуре (включая снижение устойчивости к противомикробным препаратам в аквакультуре и применении подходящих альтернатив противомикробным препаратам), кормов, генетического отбора, биозащиты и контроля болезней, цифровых инноваций и т.д. [1].

Альтернативным эффективным профилактическим и защитным средством для уменьшения зависимости от антибиотиков, вакцин и других лекарственных химиопрепаратов, а также для улучшения здоровья рыб в аквакультуре могут служить препараты на основе живых клеток микроорганизмов и/или их метаболитов (пробиотики, метабиотики и т.д.) [3-7]. При этом, молочнокислые и пропионовокислые бактерии можно рассматривать при разработке таких препаратов как наиболее успешные и безопасные микроорганизмы для аквакультуры. Молочнокислые и пропионовокислые бактерии являются представителями микробиоты рыб и человека, они обладают антагонистической активностью к условно-патогенным бактериям, грибам и вирусам, возбуждающим микробиологическую порчу кормов, загрязняющим водоемы, а также вызывающим заболевания рыб. Многочисленные научные исследования доказывают ценность этой обширной группы микроорганизмов для предотвращения и лечения заболеваний рыб и других водных организмов [3,8]. Живые клетки молочнокислых и пропионовокислых бактерий, их ферменты и метаболиты положительно влияют на резистентность к инфекционным заболеваниям, выживаемость и продуктивность рыб. Пропионовокислые бактерии, обладающие повышенной фунгицидной активностью, при введении их в состав ассоциаций в дополнение к молочнокислым бактериям позволяют расширить спектр антагонистической активности пробиотика в отношении микотоксигенных грибов. Антимутагенная защита пропионовокислых бактерий может способствовать снижению генетических изменений у рыб [9].

Одним из важных критериев, которым должен обладать успешный кандидат в пробиотики, помимо антагонистической активности, безопасности и др., является способность штаммов микроорганизмов производить органические кислоты, внеклеточные ферменты (протеаза, производство амилазы, целлюлозы, фитазы, хитиназы, липазы и др.) и экзополисахариды (ЭПС) [5]. Молочнокислые и пропионовокислые бактерии синтезируют молочную, пропионовую и уксусную кислоты, которые обладают antimикробными свойствами, способствуют улучшению пищеварения, нормализации микробиоты водных животных, а также поддержанию чистоты воды в искусственных водоемах [10,11]. Производство и доступность внеклеточных ферментов, таких как протеазы, карбогидразы, амилазы, липазы и фитазы у молочнокислых и пропионовокислых бактерий способствуют тому, что пробиотики на

их основе положительно влияют на темпы роста хозяина, улучшая конверсию и усвояемость корма. Помимо этого, продуцируемые этой группой микроорганизмов экзополисахариды, обладают защитными свойствами, способностью сорбировать микотоксины и вещества, вызывающие токсические, аллергические реакции и гиперчувствительность к компонентам корма. Молочнокислые и пропионовокислые бактерии участвуют в формировании феномена «оральной толерантности» к пищевым антигенам.

В связи с вышеизложенным, проводимые исследования, направленные на поиск новых отечественных штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий с высокой ферментативной и экзополисахарид-продуцирующей активностью для последующей разработки на их основе высокоактивного стабильного пробиотического препарата для кормления рыб в условиях аквакультуры, являются актуальными, имеют научную и практическую значимость.

Материалы и методы

Объектами исследования служили изоляты молочнокислых и пропионовокислых бактерий, выделенные из сырьевых компонентов (зерно и мука кукурузы, пшеницы, ячменя ржи, пшеничная клейковина и зародыш, кукурузный глютен и др.), входящих в рецептуры кормов для рыб и других естественных источников (молочные продукты, рубец КРС, кишечник рыб), а также коллекционные штаммы. Образцы сырья для выделения новых штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий отбирали из различных регионов РК (Алматинская, Туркестанская, Восточно-Казахстанская, Костанайская и Павлодарская области).

Изоляты молочнокислых бактерий получали методом высева определенного количества сырья и его разведений на агаризованные элективные питательные среды MRS (TM Media, Индия) и Lactic Streak Agar (TM Media, Индия). Для выделения пропионовокислых бактерий использовали агар ASLA с ростовой добавкой для пропионовокислых бактерий. Культивирование изолятов проводили в анаэростате в атмосфере с содержанием 14-16% углекислого газа, 4-6% водорода и кислорода — не более 0,1%, при температуре 30, 37 и 42°C в течение 24-48 часов.

Отдельные колонии пересевали в стерильное обезжиренное молоко; изоляты, образующие сгусток, использовали для получения чистой культуры и дальнейших исследований их пробиотических свойств. Для культивирования чистых культур молочнокислых и пропионовокислых бактерий использовали жидкую питательную среду MRS Broth (TM Media, Индия), для пропионовокислых бактерий дополнительно использовали среду следующего состава: пептон -1,0%; дрожжевой экстракт — 1,0%; глюкоза – 1,5%; восстановители (0,5% сульфита натрия или 0,05% цистеина и 0,05 % твина-80).

Кислотообразование штаммов оценивали по активной и титруемой кислотности при культивировании в стерильном обезжиренном молоке или среде MRS Broth. Титруемую кислотность определяли титрометрическим методом, активную кислотность (рН) определяли потенциометрически при помощи электронного pH-метра [12].

Протеолитическую активность выделенных изолятов определяли на питательной среде следующего состава (% мас./об.): пептон - 0,5; говяжий экстракт - 0,3; обезжиренное молоко -1; агар -1,8; вода -100. Молоко стерилизовали отдельно, добавляли перед использованием в стерильную расплавленную среду, тщательно перемешивали. Теплую питательную среду разливали по чашкам Петри и давали остывать, далее агаровую среду перфорировали стерилizedованной пробкой Бора и заливали в лунки сухую культуру молочнокислых или пропионовокислых бактерий, предварительно выращенную на MRS Broth при соответствующей оптимальной температуре (30,37°C).

Чашки выдерживали при 32-37°C в течение 48 ч инкубации и наблюдали за протеазой по зоне просветления молочной среды вокруг лунки, измеряя диаметр зоны [13].

Экзополисахаридобразующую активность молочнокислых и пропионовокислых бактерий определяли следующим образом: культивирование бактерий проводили в колбах (объемом 50 мл) в жидкой среде MRS Broth (pH=6,0) при температуре 32-37°C в течение 48 ч. Далее образование ЭПС определяли согласно схеме:

- 1) отделение культуральной жидкости от биомассы,
- 2) центрифугирование при 5000 g в течение 15 мин,
- 3) охлаждение бесклеточного супернатанта до 4°C,
- 4) внесение в охлажденный супернатант двойного объема 96% охлажденного этилового спирта (3-5 °C); отстаивание в течение 12 ч при температуре 4 °C,
- 5) центрифугирование при 4000 g в течение 60 мин,
- 6) промывание осадка этиловым спиртом, высушивание ЭПС при 50°C до постоянного веса (в течение 48 часов), взвешивание.

Результаты и обсуждение

С целью отбора высокоактивных штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий был проведен скрининг ферментативной и экзополисахарид-продуцирующей активности у 22-х выделенных чистых изолятов бактерий, а также у трех коллекционных культур с высокой антагонистической активностью (*Lactobacillus helveticus* Sh-4, *Lacticaseibacillus casei* Ai-2, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* -3). Скрининг проводили по следующим признакам: кислотообразование, протеолитическая активность и способность к образованию экзополисахаридов.

Результаты исследования кислотообразующей и протеолитической активности у выделенных и коллекционных штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий, представленные в таблице 1, свидетельствуют о наличии среди них как штаммов с высокой

Таблица 1 – Физиолого-биохимическая активность выделенных и коллекционных штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий

Штамм	Активная кислотность, pH	Титруемая кислотность, °Т	Протеолитическая активность, диаметр зоны, мм
1	2	3	4
Молочнокислые бактерии			
<i>Mg-1</i>	4,6	96±0,38	8±0,05
<i>Mg-2</i>	4,5	98±0,33	9±0,03
<i>Wg-1</i>	3,9	164±0,10	9±0,03
<i>Wg-3</i>	4,0	152±0,62	9±0,02
<i>Wg-4</i>	3,5	200±0,28	9±0,04
<i>Wg-8</i>	3,6	191±0,68	11±0,04
<i>Wg-35</i>	3,4	210±0,48	10±0,02
<i>Wf-2</i>	3,0	254±0,16	12±0,04
<i>Wf-6</i>	3,0	249±0,37	10±0,02
<i>Wf-10</i>	4,7	89±0,01	12±0,03
<i>Wf-20</i>	3,1	241±0,16	20±0,04
<i>Wf-71</i>	36	190±0,18	8±0,03
<i>Rg -9</i>	4,5	103±0,02	9±0,02
<i>Rf -3</i>	4,3	120±0,21	10±0,05

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
<i>Kc-1</i>	3,3	220±0,12	9±0,01
<i>Lb.h. Sh-4</i>	3,3	220±0,02	9±0,01
<i>Lb.c. Ai-2</i>	3,1	240±0,04	12±0,02
Пропионовокислые бактерии			
<i>P-1</i>	4,4	109±0,17	9±0,01
<i>P-2</i>	4,3	125±0,12	16±0,03
<i>P-3</i>	4,4	115±0,13	14±0,02
<i>P-4</i>	3,9	160±0,14	13±0,02
<i>P-5</i>	4,3	120±0,09	11±0,01
<i>P-7</i>	4,4	110±0,39	10±0,01
<i>P-8</i>	4,2	130±0,27	12±0,02
<i>Pb.sh.-3</i>	4,3	125±0,07	12±0,01

энергией кислотообразования и средней протеолитической активностью (*Wg-35*, *Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20*, *Kc-1*, *Ai-2*, *P-4*), так и штаммов с низкой способностью к продукции кислот и пептизации белка (*Mg-1*, *Mg-2*, *Rg-9*, *P-1*).

При тестировании культур молочнокислых и пропионовокислых бактерий на протеолитическую активность выявлено, что при добавлении в молочный агар небольших количеств пептона и мясного экстракта наблюдается активация ферментных протеолитических систем у всех штаммов бактерий. Среди всех исследуемых культур следует отметить новый выделенный изолят молочнокислых бактерий *Wf-20* и изолят пропионовокислых бактерий *P-2* (рисунок 1), обладающие наиболее высокой протеиназно-пептидазной активностью, сравнимой с активностью известных производственных пробиотических штаммов [12]. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования наиболее активных штаммов в составе пробиотического препарата для рыб, поскольку продукция органических кислот, а также внеклеточных и клеточно-связанных протеиназ и пептидаз обусловливает лечебно-профилактические свойства культур, играет существенную роль в нормализации белкового обмена в организме, способствует лучшей конверсии и усвоению корма [14].

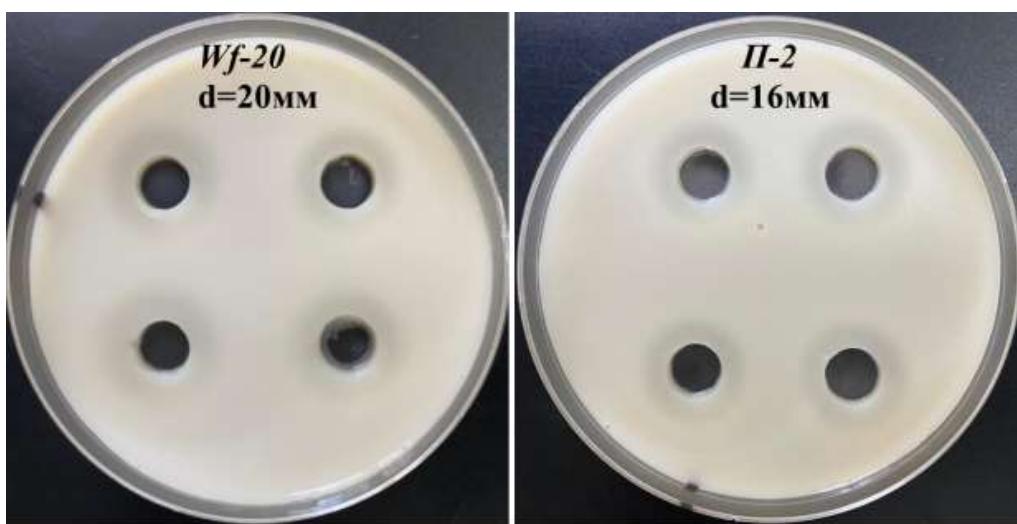


Рисунок 1 – Протеолитическая активность изолята молочнокислых бактерий *Wf-20* и изолята пропионовокислых бактерий *P-2* на молочном агаре с добавлением пептона и мясного экстракта, d -диаметр зоны протеолиза

Способность к продукции экзополисахаридов – весьма ценный признак для пробиотических микроорганизмов. Выделяемые экзополисахариды обладают протекторной функцией, защищают клетки от высыревания, повышают их устойчивость к стрессам в неблагоприятных условиях. Способность к продуцированию экзополисахаридов, обладающих термо- и криопротекторными свойствами, будет увеличивать выживаемость пробиотических микроорганизмов при получении сухой формы препарата, а также в случае ввода пробиотика в состав экструдированных кормов для рыб. Экзополисахариды также способствуют адгезии пробиотических микроорганизмов на слизистых покровах и стенках кишечника рыб, участвуют в регуляции роста и размножения полезных микроорганизмов, в иммунных процессах и т.д.

Результаты исследования способности к образованию экзополисахаридов у выделенных и коллекционных молочнокислых и пропионовокислых бактерий, представленные на рисунках 2 и 3, свидетельствуют о том, что все тестируемые микроорганизмы в разной степени продуцируют ЭПС. Наибольшее количество полисахаридов экскретируют изоляты молочнокислых бактерий *Mg-1* (320 мг/100 мл) и *Mg-2* (360 мг/100 мл). Еще 4 новых изолята молочнокислых бактерий (*Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20*) и 4 новых изолята пропионовокислых бактерий (*P-2*, *P-4*, *P-5*, *P-8*) можно отнести к штаммам со средней степенью продукции экзополисахаридов – от 110 до 220 мг/100 мл среды.

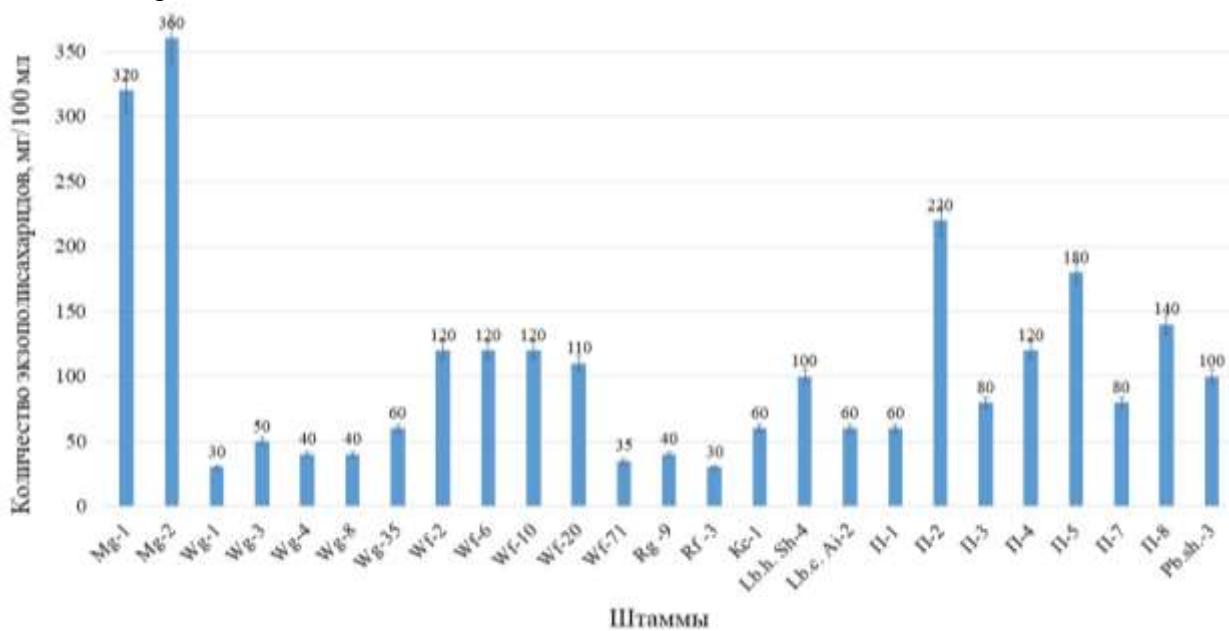


Рисунок 2 – Экзополисахарид-продуцирующая активность молочнокислых и пропионовокислых бактерий

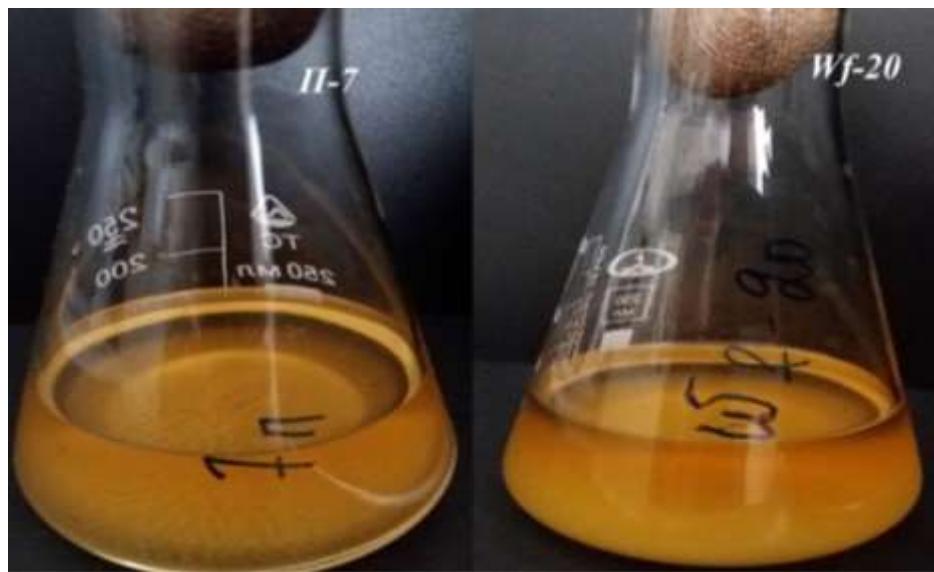


Рисунок 3 – Образование экзополисахаридов изолятами *II-7* и *Wf-20*

Таким образом, в результате скрининга физиолого-биохимических свойств 22-х новых и 3-х коллекционных штаммов, отобраны 7 штаммов-кандидатов в пробиотики: изоляты молочнокислых бактерий *Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20* и изоляты пропионовокислых бактерий *II-2*, *II-3* и *II-8*, обладающие высокой и средней протеолитической и экзополисахарид-продуцирующей активностью.

Разработка на их основе инновационного пробиотического препарата для предотвращения развития микробиологической порчи кормов для рыб, улучшения их качества, санитарного состояния и увеличения сроков хранения; улучшения санитарного состояния водоемов для рыб, а также для повышения продуктивности и резистентности ценных видов рыб к инфекционным заболеваниям будет способствовать устойчивому развитию аквакультуры и получению безопасной рыбной продукции.

Финансирование

Данное исследование финансируется Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант № АР09258412).

Литература:

- 1 FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. – 2020. – 224 p. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- 2 Stentiford G.D., Sritunyalucksana K., Flegel T.W., Williams B.A., Withyachumnarnkul B., Itsathitphaisarn O., Bass D. New paradigms to help solve the global aquaculture disease crisis // PLoS Pathog. – 2017. – №13. – e1006160.
- 3 Ringø E., Doan H.V., Lee S.O., Soltani M., Hoseinifar S.H., Harikrishnan R., Song S. K. Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture // J. Appl. Microbiol. – 2020. – Vol.129, Is.1. – P. 116-136. <https://doi.org/10.1111/jam.14628>
- 4 Dawood M.A.O., Koshio S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review // Aquaculture. – 2016. – Vol. 454. – P. 243-251.
- 5 Goutam Banerjee, Arun Kumar Ray. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries // Research in Veterinary Science. – 2017. – Vol. 115. – P.66-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>
- 6 Narayanan Gobi, Baskaralingam Vaseeharan, Jiann-Chu Chen, Ravichandran Rekha, Sekar Vijayakumar, Mahalingam Anjugam, Arokiadhas Iswarya. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis Dahb1* improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus* // Fish and Shellfish Immunology. – 2018. – Vol. 74. – P. 501-508.

7 Soltani M., Ghosh K., Hoseinifar S.H., Kumar V., Lymbery A.L., Roy S., Ringø E.. Genus *bacillus*, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bioactive components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish// Rev. Fish. Sci. Aquac. – 2019. – Vol.27, Is.3. – P.331-379. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1597010>

8 Le B., Yang S.H. Probiotic potential of novel *Lactobacillus* strains isolated from salted-fermented shrimp as antagonists for *Vibrio parahaemolyticus* // J. Microbiol. – 2018. – Vol.56. – P. 138-144. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7407-x>

9 Zarate G. Dairy Propionibacteria: Less Conventional Probiotics to Improve the Human and Animal Health // Probiotic in Animals. – 2012.

10 Garcés M.E., Olivera N.L., Fernández M., Rossi C.R., Sequeiros C. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing *Carnobacterium* spp. isolated from healthy Patagonian trout and their potential for use in aquaculture // Aquac. Res. – 2020. <https://doi.org/10.1111/are.14806>

11 Gong L., He H., Li D., Cao L., Ali Khan T., L, Y., Pan L., Yan, L., Ding X., Sun Y., Zhang Y., Yi G., Hu S., Xia L. A new isolate of *Pediococcus pentosaceus* (SL001) with antibacterial activity against fish pathogens and potency in facilitating the immunity and growth performance of grass carps // Front. Microbiol. – 2019. – Vol. 10. – P. 1384. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01384>

12 Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 104 с.

13 Chirom Aarti, Ameer Khusro, Rakesh Varghese, Mariadhas Valan Arasu, Paul Agastian, Naïf Abdullah Al-Dhabi, Soundharajan Ilavenil, Ki Choon Choi. In vitro studies on probiotic and antioxidant properties of *Lactobacillus brevis* strain LAP2 isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India // LWT - Food Science and Technology. – 2017. – Vol.86. – P.438-446.

14 Новик Г.И. и др. Биологическая активность микроорганизмов-пробионтов //Прикл. биохим. и микробиол. – 2006 – Т.42, №2. – С. 187-194.

А.В. ЧИЖАЕВА^{1*}, А.А. АМАНГЕЛДІ¹, А.Ж. АЛЫБАЕВА¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА¹,
И. Ю. ПОТОРОКО²

¹ «Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС,
Алматы, Қазақстан

²"Оңтүстік-Орал мемлекеттік университеті" ФМАЖБ БМ,
Челябинск, Ресей

*anna_chizhaeva@mail.ru

АКВАКУЛЬТУРАДА ҚОЛДАНУ ҮШИН ПЕРСПЕКТИВАЛЫ СҮТ ҚЫШҚЫЛЫ МЕН ПРОПИОН ҚЫШҚЫЛЫ БАКТЕРИЯЛАРЫНЫҢ ПРОТЕОЛИТИКАЛЫҚ ЖӘНЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИД-ӨНДІРУШІ БЕЛСЕНДІЛІГІН ЗЕРТТЕУ

Түйін

Сүт қышқылды бактерияларының 17 штаммында және пропион қышқылды бактерияларының 8 штаммында протеолитикалық белсенділік пен экзополисахаридтерді өндіру қабілеті зерттелді. Зерттелген сүт қышқылды бактерияларының ішіндегі ең жоғары протеолитикалық белсенділікке жаңадан бөлінген WF-20, Wf-2, Wf-10 изоляттары және *Lacticaseibacillus casei* Ai-2 коллекциялық штаммы ие. Пропион қышқылды бактерияларының ішінде П-2, П-3, П-4, П-8 жаңа оқшауланған изоляттары және *Propionibacterium freudenreichii* subsp *shermanii*-3 коллекциялық штаммы протеиназапептидазаның ең жоғары белсенділігіне ие. Полисахаридтердің ең көп санын жаңа МД-1 (320 мг/100 мл) және Mg2 (360 мг/100 мл) изоляттары синтездеді. Сүт қышқылды бактерияларының тағы 4 жаңа изоляты (Wf-2, Wf-6, Wf-10, Wf-20) және пропион қышқылды бактерияларының 4 жаңа изоляттарын (П-2, П-4, П-5, П – 8)

экзополисахаридтер өндірісінің орташа дәрежесі бар штамдарға жатқызуға болады-110-нан 220 мг/100 мл ортада. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде аквакультура үшін пробиотиктерге үміткер 7 штамм таңдалды: сүт қышқылды бактерияларының изоляттары *WF-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20* және пропион қышқылы бактерияларының изоляттары *P-2*, *P-3* және *P-8*, орташа немесе жоғары протеолитикалық және экзополисахарид-өндіру қабілеті бар. Оларды балыққа арналған пробиотикалық препараттардың құрамына енгізу ас қорыту процестерін жақсартады, жануарлардың жоғары энергиялы диеталар мен ақуыз емес азотты заттарға бейімделуін тездедеді, жемді пайдалану тиімділігін, ауруға төзімділікті, балықтардың өмір сүруін және өнімділігін арттырады.

Кілтті сөздер: сүт қышқылды бактериялар, пропион қышқылды бактериялар, протеолитикалық белсенділік, экзополисахаридтер өндірісі, пробиотик, аквакультура.

IRSTI: 62.09.39, 69.25.15, 34.27.39, 34.27.51

A.V. CHIZHAYEVA^{1*}, A.A. AMANGELDI¹, A. Zh. ALYBAEVA¹,
Ye. A. OLENIKOVA¹, I.Y. POTOROKO²

¹LLP "Scientific and Production Center of Microbiology and Virology", Almaty, Kazakhstan

²FSAEI HE "South Ural State University", Chelyabinsk, Russia

*anna_chizhaeva@mail.ru

INVESTIGATION OF THE PROTEOLYTIC AND EXOPOLYSACCHARIDE-PRODUCING ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA AND PROPIONIC ACID BACTERIA PROMISING FOR USE IN AQUACULTURE

doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.05

Summary

The proteolytic activity and ability to produce exopolysaccharides in 17 strains of lactic acid bacteria and 8 strains of propionic acid bacteria were studied. The newly isolates *Wf-20*, *Wf-2*, *Wf-10* and the collection strain *Lactocaseibacillus casei* *Ai-2* have highest proteolytic activity among the studied lactic acid bacteria. Among propionic acid bacteria, the new isolates *P-2*, *P-3*, *P-4*, *P-8* and the collection strain *Propionibacterium freudenreichii* *subsp shermanii*-3 have the highest proteinase-peptidase activity. The largest number of exopolysaccharides are synthesized by new isolates *Mg-1* (320mg/100ml) and *Mg-2* (360 mg/100ml). Another 4 new isolates of lactic acid bacteria (*Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20*) and 4 new isolates of propionic acid bacteria (*P-2*, *P-4*, *P-5*, *P-8*) can be attributed to strains with an average degree of exopolysaccharide production - from 110 to 220 mg/100 ml of medium. In result of the conducted studies 7 candidate strains for probiotics for aquaculture were selected: isolates of lactic acid bacteria *Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20* and isolates of propionic acid bacteria *P-2*, *P-3* and *P-8* having medium or high proteolytic and exopolysaccharide-producing ability. Their introduction into the composition of probiotic preparations for fish will improve the digestive processes, accelerate the adaptation of animals to high-energy diets and non-protein nitrogenous substances, increase the efficiency of feed use, disease resistance, survival and productivity of fish.

Keywords: lactic acid bacteria, propionic acid bacteria, proteolytic activity, production of exopolysaccharides, probiotic, aquaculture.

Aquaculture is a dynamically developing area of the food sector that can solve the problems of healthy and protein nutrition. According to the latest FAO world statistics, global

aquaculture production reached a record level in 2018 - 114.5 million tonnes in live weight, the value of sales amounted to USD 263.6 billion. In the total volume the farming of aquatic animals amounted to 82.1 million tonnes (USD 250.1 billion), fish predominated among them (54.3 million tonnes, USD 139.7 billion), harvested from inland aquaculture (47 million tonnes, USD 104.3 billion), as well as marine and coastal aquaculture (7.3 million tonnes, USD 35.4 billion). In addition to fish, shellfish (17.7 million tonnes, USD 34.6 billion), crustaceans (9.4 million tonnes, USD 69.3 billion), marine invertebrates (435,400 tonnes, USD 2 billion), aquatic turtles (370 000 tonnes, USD 3.5 billion) and frogs (131 300 tonnes, USD 997 million) were produced in aquaculture [1].

At the global level, since 2016, aquaculture has been the main source of fish available for food, in 2018 this share accounted for 52 percent of the total, ahead of fishing. According to FAO forecasts, even greater growth in aquaculture production in the world should be expected in the coming years, with a large share of it coming from Asian countries [1].

However, the rapid expansion of intensive aquaculture has already led to an increase in the prevalence of cross-border viral, bacterial, parasitic and fungal infections in cultivated aquatic organisms, which has affected the sustainability of aquaculture production in many countries [2]. The very significant environmental, social and economic consequences of disease outbreaks necessitate a paradigm shift in dealing with the biosafety risks of aquaculture. The new strategy for improving safety control provides for innovative technical developments related to strengthening disease prevention in aquaculture (including reducing antimicrobial resistance in aquaculture and the use of suitable alternatives to antimicrobial drugs), feed, genetic selection, biosecurity and disease control, digital innovations, etc. [1].

Preparations based on living cells of microorganisms and/or their metabolites (probiotics, metabiotics, etc.) can serve as an alternative effective preventive and protective agent to reduce dependence on antibiotics, vaccines and other medicinal chemotherapeutics, as well as to improve the health of fish in aquaculture [3-7]. At the same time, lactic acid bacteria and propionic acid bacteria can be considered in the development of such drugs as the most successful and safe microorganisms for aquaculture. Lactic acid bacteria and propionic acid bacteria are representatives of the fish and human microbiota, they have antagonistic activity to conditionally pathogenic bacteria, fungi and viruses that excite microbiological spoilage of feed, pollute water bodies, and cause fish diseases. Numerous scientific studies prove the value of this vast group of microorganisms for the prevention and treatment of diseases of fish and other aquatic organisms [3,8]. Living cells of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria, their enzymes and metabolites have a positive effect on resistance to infectious diseases, survival and productivity of fish. Propionic acid bacteria with increased fungicidal activity, when introduced into associations in addition to lactic acid bacteria, allow to expand the spectrum of antagonistic activity of the probiotic against mycotoxicogenic fungi. Antimutagenic protection of propionic acid bacteria may contribute to the reduction of genetic changes in fish [9].

One of the important criteria that a successful candidate for probiotics should have, in addition to antagonistic activity, safety, etc., is the ability of microbial strains to produce organic acids, extracellular enzymes (protease, amylase production, cellulose, phytase, chitinase, lipase, etc.) and exopolysaccharides (EPS) [5]. Lactic acid and propionic acid bacteria synthesize lactic, propionic and acetic acids, which have antimicrobial properties, contribute to improving digestion, normalizing the microbiota of aquatic animals, as well as maintaining the purity of water in artificial reservoirs [10,11]. The production and availability of extracellular enzymes such as proteases, carbohydrases, amylases, lipases and phytases in lactic acid bacteria and propionic acid bacteria contribute to the fact that probiotics based on them positively affect the growth rate of the host, improving the conversion and digestibility of feed. In addition, exopolysaccharides produced by this group of microorganisms have protective properties, the ability to absorb mycotoxins and substances that cause toxic, allergic reactions and

hypersensitivity to feed components. Lactic acid bacteria and propionic acid bacteria are involved in the formation of the phenomenon of "oral tolerance" to food antigens.

In connection with the above, the ongoing research aimed at finding new domestic strains of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria with high enzymatic and exopolysaccharide-producing activity for the subsequent development on their basis of a highly active stable probiotic drug for feeding fish in aquaculture conditions are relevant, have scientific and practical significance.

Materials and methods

The objects of the study were isolates of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria isolated from raw materials (corn grain and flour, wheat, rye barley, wheat gluten and germ, corn gluten, etc.) included in the formulations of fish feeds and other natural sources (dairy products, cattle rumen, fish intestines), as well as collection strains. Samples of raw materials for isolation of new strains of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria were taken from various regions Republic of Kazakhstan (Almaty, Turkestan, East Kazakhstan, Kostanay and Pavlodar regions).

Isolates of lactic acid bacteria were obtained by seeding a certain amount of raw materials and its dilutions on elective nutrient media MRS Agar (TM Media, India) and Lactic Streak Agar (TM Media, India). To isolate propionic acid bacteria, ASLA agar with a growth additive for propionic acid bacteria was used. Isolates were cultured in an anaerostat in an atmosphere containing 14-16% carbon dioxide, 4-6% hydrogen and oxygen - no more than 0.1%, at a temperature of 30, 37 and 42 °C for 24-48 hours.

Individual colonies were placed into sterile skimmed milk; the isolates forming the clot were used to obtain pure culture and further studies of their probiotic properties. For the cultivation of pure cultures of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria the liquid nutrient medium MRS Broth (TM Media, India) was used, for propionic acid bacteria, the following medium was additionally used: peptone - 1.0%; yeast extract - 1.0%; glucose - 1.5%; reducing agents (0.5% sodium sulfite or 0.05% cysteine and 0.05% twin-80).

The acid formation of the strains was evaluated by the active and titratable acidity when cultured in sterile skimmed milk or MRS Broth medium. Titrated acidity was determined by titrometric method, active acidity (pH) was determined potentiometrically using an electronic pH meter [12].

The proteolytic activity of the isolates was determined on nutrient medium of the following composition (% wt./vol.): peptone - 0.5; beef extract - 0.3; skimmed milk -1; agar - 1.8; water -100. The milk was sterilized separately, added to a sterile molten medium before use, and thoroughly mixed. The warm nutrient medium was poured into cups and allowed to cool down, then the agar medium was perforated with a sterilized Boron plug and a daily culture of lactic acid bacteria or propionic acid bacteria, previously grown on MRS Broth at the appropriate optimal temperature (30.37 °C), was poured into the wells. The cups were kept at 32-37°C for 48 hours of incubation and the protease was observed along the zone of enlightenment of the lactic medium around the well, measuring the diameter of the zone [13].

The exopolysaccharide-forming activity of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria was determined as follows: bacterial cultivation was carried out in flasks (with a volume of 50 ml) in a liquid medium MRS Broth (pH=6.0) at a temperature of 32-37 °C for 48 hours. Further, the formation of EPS was determined according to the scheme:

- 1) separation of culture fluid from biomass,
- 2) centrifugation at 5000 g for 15 min,
- 3) cooling of the cell-free supernatant to 4°C,
- 4) introduction of 96% cooled ethyl alcohol (3-5 °C) into the cooled supernatant of double volume; settling for 12 hours at a temperature of 4 °C,

- 5) centrifugation at 4000 g for 60 min,
 6) washing the sediment with ethyl alcohol, drying EPS at 50 ° C to a constant weight (within 48 hours), weighing.

Results and discussion

In order to select highly active strains of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria, screening of enzymatic and exopolysaccharide-producing activity of 22 isolates of bacteria and three collection cultures with high antagonistic activity (*Lactobacillus helveticus Sh-4*, *Lacticaseibacillus casei Ai-2*, *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii -3*) was carried out. Screening was carried out according to the following criteria: acid formation, proteolytic activity and the ability to form exopolysaccharides.

The results of the study of acid-forming and proteolytic activity in isolated and collection strains of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria, presented in Table 1, indicate the presence among them as the strains with high acid formation energy and average proteolytic activity (*Wg-35*, *Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20*, *Ks-1*, *Ai-2*, *P-4*), and strains with low ability to produce acids and protein peptization (*Mg-1*, *Mg-2*, *Rg-9*, *P-1*).

Table 1 - Physiological and biochemical activity of isolated and collectible strains of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria

Strain	Active acidity, pH	Titrated acidity, °T	Proteolytic activity, zone diameter, mm
Lactic acid bacteria			
<i>Mg-1</i>	4,6	96±0,38	8±0,05
<i>Mg-2</i>	4,5	98±0,33	9±0,03
<i>Wg-1</i>	3,9	164±0,10	9±0,03
<i>Wg-3</i>	4,0	152±0,62	9±0,02
<i>Wg-4</i>	3,5	200±0,28	9±0,04
<i>Wg-8</i>	3,6	191±0,68	11±0,04
<i>Wg-35</i>	3,4	210±0,48	10±0,02
<i>Wf-2</i>	3,0	254±0,16	12±0,04
<i>Wf-6</i>	3,0	249±0,37	10±0,02
<i>Wf-10</i>	4,7	89±0,01	12±0,03
<i>Wf-20</i>	3,1	241±0,16	20±0,04
<i>Wf-71</i>	36	190±0,18	8±0,03
<i>Rg -9</i>	4,5	103±0,02	9±0,02
<i>Rf -3</i>	4,3	120±0,21	10±0,05
<i>Kc-1</i>	3,3	220±0,12	9±0,01
<i>Lb.h. Sh-4</i>	3,3	220±0,02	9±0,01
<i>Lb.c. Ai-2</i>	3,1	240±0,04	12±0,02
Propionic acid bacteria			
<i>P-1</i>	4,4	109±0,17	9±0,01
<i>P-2</i>	4,3	125±0,12	16±0,03
<i>P-3</i>	4,4	115±0,13	14±0,02
<i>P-4</i>	3,9	160±0,14	13±0,02
<i>P-5</i>	4,3	120±0,09	11±0,01
<i>P-7</i>	4,4	110±0,39	10±0,01
<i>P-8</i>	4,2	130±0,27	12±0,02
<i>Pb.sh.-3</i>	4,3	125±0,07	12±0,01

At testing cultures of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria for proteolytic activity, it was found that when small amounts of peptone and meat extract are added to milk agar, activation of enzyme proteolytic systems is observed in all bacterial strains. Among all the studied cultures, it should be noted a new isolate of lactic acid bacteria *Wf-20* and an isolate of propionic acid bacteria *P-2* (Figure 1), which have the highest proteinase-peptidase activity, comparable to the activity of known industrial probiotic strains [12]. The data obtained indicate the prospects of using the most active strains as part of probiotic preparation for fish, since the production of organic acids, as well as extracellular and cell-related proteinases and peptidases, determines the therapeutic and prophylactic properties of cultures, plays a significant role in the normalization of protein metabolism in the body, contributes to a better conversion and assimilation of feed [14].

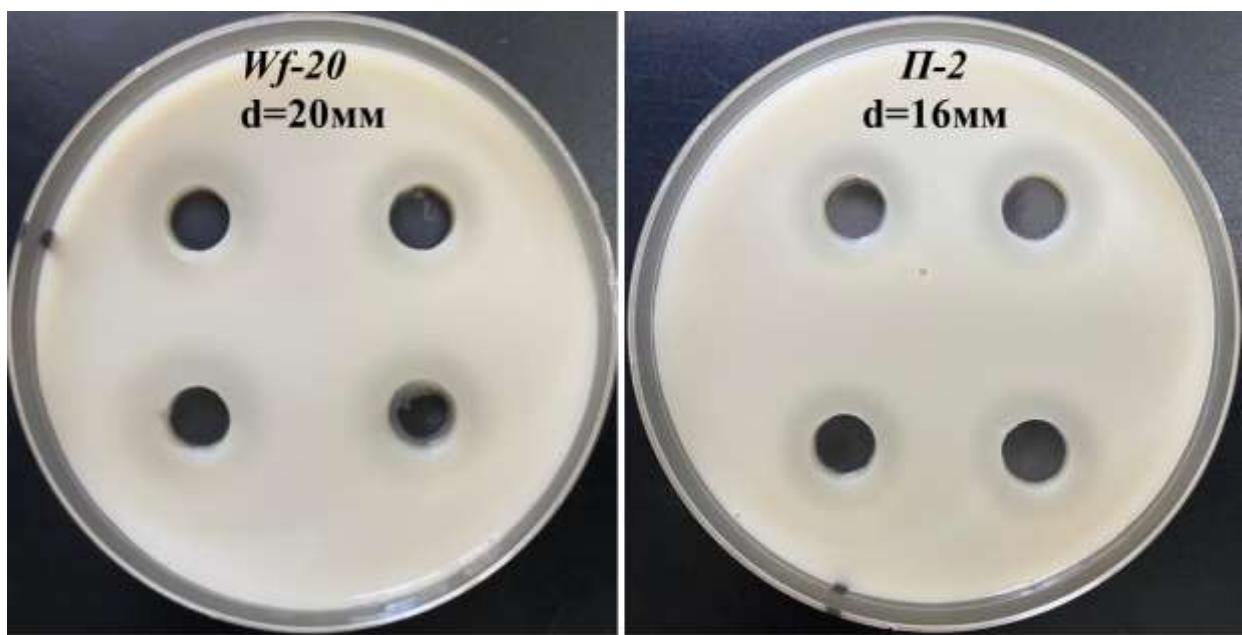


Figure 1 - Proteolytic activity of lactic acid bacteria isolate *Wf-20* and propionic acid bacteria isolate *P-2* on milk agar with the addition of peptone and meat extract, *d* - is the diameter of the proteolysis zone

The ability to produce exopolysaccharides is a very valuable trait for probiotic microorganisms. The secreted exopolysaccharides have a protective function, protect cells from drying out, increase their resistance to stress in adverse conditions. The ability to produce exopolysaccharides with thermo- and cryoprotective properties will increase the survival of probiotic microorganisms when obtaining a dry form of the drug, as well as in the case of introducing a probiotic into the composition of extruded fish feed. Exopolysaccharides also promote adhesion of probiotic microorganisms on the mucous membranes and intestinal walls of fish, participate in the regulation of growth and reproduction of beneficial microorganisms, in immune processes, etc.

The results study of the ability to form exopolysaccharides in isolated and collectible lactic acid bacteria and propionic acid bacteria, shown in Figures 2 and 3, indicate that all tested microorganisms produce EPS to varying degree. The greatest amount of polysaccharides is excreted by isolates of lactic acid bacteria *Mg-1* (320 mg/100 ml) and *Mg-2* (360 mg/100 ml). Another 4 new isolates of lactic acid bacteria (*Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20*) and 4 new isolates of propionic acid bacteria (*P-2*, *P-4*, *P-5*, *P-8*) can be attributed to strains with an average degree of production of exopolysaccharides - from 110 to 220 mg/100 ml of medium.

Thus, as a result of screening the physiological and biochemical properties of 22 new and 3 collection strains, 7 candidate strains for probiotics were selected: isolates of lactic acid bacteria *Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20* and isolates of propionic acid bacteria *P-2*, *P-3* and *P-8*, which have high and medium proteolytic and exopolysaccharide-producing activity.

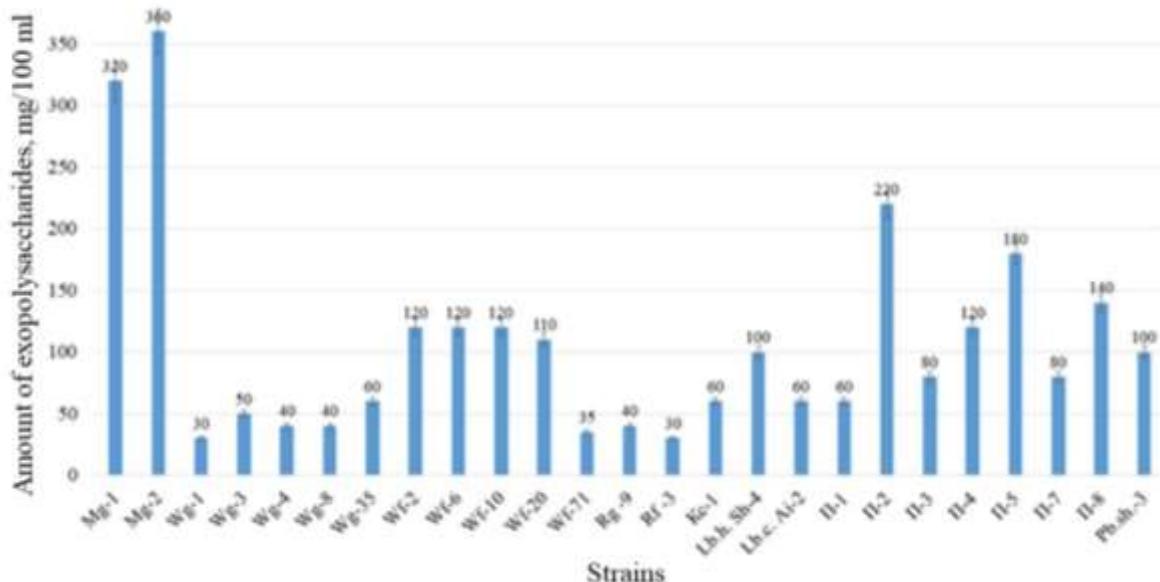


Figure 2 - Exopolysaccharide-producing activity of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria



Figure 3 - Formation of exopolysaccharides by *P-7* and *Wf-20* isolates

Development on their basis of an innovative probiotic preparation to prevent the microbiological spoilage of feed for fish, improve their quality, sanitary condition and increase shelf life; improving the sanitary condition of fish reservoirs, as well as increasing the productivity and resistance of fish to infectious diseases will contribute to the sustainable development of aquaculture and the production of safe fish products.

Financing

This study is funded by the Science Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (grant № AP09258412).

References:

- 1 FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. – 2020. – 224 p. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- 2 Stentiford G.D., Sritunyalucksana K., Flegel T.W., Williams B.A., Withyachumnarnkul B., Itsathitphaisarn O., Bass D. New paradigms to help solve the global aquaculture disease crisis // PLoS Pathog. – 2017. – №13. – e1006160.
- 3 Ringø E., Doan H.V., Lee S.O., Soltani M., Hoseinifar S.H., Harikrishnan R., Song S. K. Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture // J. Appl. Microbiol. – 2020. – Vol.129, Is.1. – P. 116-136. <https://doi.org/10.1111/jam.14628>
- 4 Dawood M.A.O., Koshio S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review // Aquaculture. – 2016. – Vol. 454. – P. 243-251.
- 5 Goutam Banerjee, Arun Kumar Ray. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries // Research in Veterinary Science. – 2017. – Vol. 115. – P.66-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>
- 6 Narayanan Gobi, Baskaralingam Vaseeharan, Jiann-Chu Chen, Ravichandran Rekha, Sekar Vijayakumar, Mahalingam Anjugam, Arokiadhas Iswarya. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis Dahb1* improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus* // Fish and Shellfish Immunology. – 2018. – Vol. 74. – P. 501-508.
- 7 Soltani M., Ghosh K., Hoseinifar S.H., Kumar V., Lymbery A.L., Roy S., Ringø E.. Genus bacillus, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bioactive components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish// Rev. Fish. Sci. Aquac. – 2019. – Vol.27, Is.3. – P.331-379. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1597010>
- 8 Le B., Yang S.H. Probiotic potential of novel *Lactobacillus* strains isolated from salted-fermented shrimp as antagonists for *Vibrio parahaemolyticus* // J. Microbiol. – 2018. – Vol.56. – P. 138-144. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7407-x>
- 9 Zarate G. Dairy Propionibacteria: Less Conventional Probiotics to Improve the Human and Animal Health // Probiotic in Animals. – 2012.
- 10 Garc' es M.E., Olivera N.L., Fern' andez M., Rossi C.R., Sequeiros C. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing *Carnobacterium* spp. isolated from healthy Patagonian trout and their potential for use in aquaculture // Aquac. Res. – 2020. <https://doi.org/10.1111/are.14806>
- 11 Gong L., He H., Li D., Cao L., Ali Khan T., L, Y., Pan L., Yan,L., Ding X., Sun Y., Zhang Y., Yi G., Hu S., Xia L. A new isolate of *Pediococcus pentosaceus* (SL001) with antibacterial activity against fish pathogens and potency in facilitating the immunity and growth performance of grass carps // Front. Microbiol. – 2019. – Vol. 10. – P. 1384. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01384>
- 12 Metodicheskie ukazaniya po sanitarno-epidemiologicheskoy ocenke bezopasnosti i funkcion'nogo potenciala probioticheskikh mikroorganizmov, ispol'zuemyh dlya proizvodstva pishchevyh produktov: Metodicheskie ukazaniya. M.: Federal'nyj centr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2011.104 s.
- 13 Chirom Aarti, Ameer Khusro, Rakesh Varghese, Mariadhas Valan Arasu, Paul Agastian, Naif Abdullah Al-Dhabi, Soundharajan Ilavenil, Ki Choon Choi. In vitro studies on probiotic and antioxidant properties of *Lactobacillus brevis* strain LAP2 isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India. LWT - Food Science and Technology. 2017. Vol.86. P.438-446.
- 14 Novik G.I. i dr. Biologicheskaya aktivnost' mikroorganizmov-probiontov. Prikl. biohim. i mikrobiol. 2006. T.42, No 2. S. 187-194.