

Lilianna Hoffmann¹, Jan Mazurkiewicz^{1,2}, Krzysztof Florczyk², Hieronim Burchardt³

¹Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Zakład Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury, Instytut Zoologii

²Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Zakład Doświadczalny Technologii Produkcji Pasz
i Akwakultury, Muchocin

³JHJ Sp. z o.o., Nowa Wieś

Zastosowanie probiotycznego dodatku paszowego w chowie karpi

Wstęp

Probiotyki stanowiące integralną część podawanej paszy zyskują coraz większą popularność na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat. Po raz pierwszy termin 'probiotyki' został zdefiniowany przez Parkera (1974) jako organizmy oraz substancje, które mogą brać aktywny udział w utrzymaniu równowagi mikrobiologicznej przewodu pokarmowego. Z kolei według definicji Fullera (1989) probiotyki to żywe organizmy stanowiące suplement diety, które korzystnie wpływają na równowagę mikrobiologiczną organizmu gospodarza. Natomiast Moriarty (1990) rozwinął dotychczas stosowane definicje i zaproponował, aby probiotyki traktowano jako dodatki nie tylko do pokarmu, ale również wody, na której jakość miałyby bezpośrednio wpływać. Dekadę później, Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa wraz ze Światową Organizacją Zdrowia (2001) zaproponowały definicję probiotyku, która łączyła dotychczasowe idee Fullera i Moriarty'ego: probiotyk miał stanowić żywe mikroorganizmy, które po wprowadzeniu do organizmu gospodarza wywierały korzystny wpływ na jego zdrowie.

W niedługim czasie ukazały się badania, w których zasugerowano możliwość zastąpienia antybiotyków probiotykami w hodowli ryb (Verschuere in. 2000, Irianto i Austin 2002). Antybiotyki są często wykorzystywane w akwakulturze, jednakże związane jest to z zaburzeniami równowagi flory bakteryjnej jelit, co wpływa na żywienie, fizjologię i odporność immunologiczną ryb (Rekecki i in. 2009, Rawls i in. 2007, Maynard i in. 2012). Natomiast jedno z pierwszych badań nad zastosowaniem probiotyku w akwakulturze przeprowadzono ponad 20 lat temu. Wówczas pozytywnie oceniono wpływ probiotyku na przeżywalność węgorza japońskiego (*Anguilla japonica*) zainfekowanego przez Gram-ujemne bakterie *Edwardsiella* (Kozasa 1986). Obecnie badacze coraz częściej sięgają po preparaty zarówno pro-, jak i prebiotyczne ze względu na korzyści, jakie wynikają z ich stosowania w akwakulturze (Dawood i Koshio 2016). Do najczęściej

wymienianych zalet stosowania probiotyków należą: poprawa wzrostu (Cruz i in. 2012) oraz funkcjonowania układu immunologicznego ryb (Nayak 2010), aktywność antagonistyczna podawanych szczepów bakterii w stosunku do patogenów chorobotwórczych (El-Kholy i in. 2014), zewnątrzkomórkowa produkcja enzymów wspierająca organizm gospodarza (Ray i in. 2012), czy zapobieganie kolonizowaniu błony śluzowej przewodu pokarmowego przez bakterie chorobotwórcze (Yirga 2015).

Z drugiej strony, wielu badaczy decyduje się na podawanie prebiotyków, które w przeciwieństwie do probiotyków – nie zawierają w swoim składzie żadnych mikroorganizmów. Prebiotyki stanowią nietrawione substancje będące elementem mieszanki paszowej dla zwierząt, które umożliwiają specyficzne zmiany w kompozycji składu gatunkowego mikroflory bądź aktywności tych organizmów, korzystnie wpływając na zdrowie gospodarza (Ringø i in. 2014). Ogromną zaletą stosowania prebiotyków jest fakt, iż większość z nich stanowi naturalne składniki pokarmowe oraz to, że ich podawanie nie jest obligowane uzyskaniem autoryzacji (Yousefian i Amiri 2009). Niemniej, według Gibsona i innych (2004), ażeby składnik diety został określony mianem prebiotycznego musi spełniać kilka ważnych kryteriów, tj. musi być odporny na enzymy i soki trawienne, fermentację mikrobiologiczną oraz powinien selektywnie stymulować do wzrostu bądź aktywności tylko wybrane szczepy bakterii. Natomiast korzyści związane z podawaniem prebiotyków są podobne do tych jak w przypadku probiotyków, bowiem zauważa się poprawę wzrostu ryb, zwiększenie aktywności enzymów trawiennych i odpowiedzi immunologicznej oraz odporności na stres (Dawood i in. 2015).

Ostatnią grupą substancji, która nierzadko występuje w pokarmach dla ryb są synbiotyki, będące połączeniem zarówno pro-, jak i prebiotyku (Akrami i in. 2015). Popularność synbiotyków dopiero wzrasta, ale obecnie można mówić o korzyściach wynikających z poprawy spożycia

paszy i zwiększonej zdrowotności ryb (Dawood i Koshio 2016).

Celem niniejszych badań było określenie wpływu podawania probiotycznego dodatku paszowego LAVIPAN zawierającego bakterie fermentacji mlekowej, w formie suplementu diety dla karpia. Spodziewanym efektem podawania preparatu LAVIPAN w formie probiotycznego dodatku paszowego jest głównie poprawa przyrostów oraz lepsze wykorzystanie zadanej paszy. Badania przeprowadzono równocześnie w dwóch ośrodkach chowu ryb: w warunkach doświadczalnych (Zakład Doświadczalny Technologii Produkcji Pasz i Akwakultury w Muchocinie) oraz produkcyjnych (Gospodarstwo Rybackie Stanisław Błaszkwia, PHU GAMA w Lipce). Obydwa doświadczenia żywieniowe przeprowadzono w tym samym czasie na krocisku karpia, a wspólnym czynnikiem doświadczalnym był rodzaj podawanej paszy.

Materiały i metody

Badania w warunkach doświadczalnych

Badania przeprowadzono w Zakładzie Doświadczalnym Technologii Produkcji Pasz i Akwakultury w Muchocinie, należącym do Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Test wzrostowy trwał 90 dni i został zrealizowany w okresie od 02.07. do 29.09.2015 roku w sześciu zbiornikach doświadczalnych. Powierzchnia każdego zbiornika wynosiła 40 m², a zasilanie wodą odbywało się w systemie otwartym. Konstrukcja zbiorników pozwalała na utrzymywanie maksymalnego poziomu zalewu przy stałym przepływie wody, a indywidualny system doprowadzania i odprowadzania wody umożliwiał prowadzenie cyklicznych odłowów kontrolnych badanych ryb (co 10 dni). W każdym z sześciu zbiorników doświadczalnych umieszczono po 20 sztuk krociska karpia. Układ doświadczalny zawierał dwie grupy zwierząt – grupę kontrolną, która otrzymywała mieszankę paszową dla karpia (n = 3) oraz grupę doświadczalną, gdzie pasza została uzupełniona o probiotyczny dodatek paszowy LAVIPAN (n = 3). Po zakończeniu każdej dekady, na początku oraz na końcu doświadczenia, zwierzęta w każdym stawku były ważone, a na podstawie uzyskanych wyników obliczono następujące wskaźniki hodowlane: SGR, PWG, FCR, PER, PR, FR i SR.

Podczas trwania testu wzrostowego, codziennie przeprowadzano kontrole parametrów fizykochemicznych wody poprzez pomiary temperatury wody (°C) oraz ilości rozpuszczonego w niej tlenu (mg O₂ dm⁻³) z zastosowaniem tlenomierza mikrokomputerowego ELMETRON CO 315 (Elsent Wrocław, Polska). Odczyn wody mierzono raz w tygodniu przy użyciu miernika WTW Multi Line P3 (WTW Weilheim, Niemcy).

Karpie otrzymywały paszę przez sześć dni w tygodniu (od poniedziałku do soboty) z automatycznych karmników taśmowych dla ryb przez 12 godzin na dobę (od 9.00 do 21.00). Dobowe dawki paszy obliczano w oparciu o klucz żywienia karpia opracowany przez Miyatake (1997), z uwzględnieniem temperatury wody i aktualnej biomasy ryb. Wielkość dawki ustalano na podstawie odłowów kontrolnych, które służyły również do obliczenia wartości wskaźników chowu.

Na początku i na końcu eksperymentu pobrano próby ryb w celu oznaczenia składu chemicznego ich ciała. Ryby usypiano w roztworze anestetyku Propiscin (Siwicki 1984), mielono (KNIFETEC 1095 Sample Mill, FOSS TECATOR, Höganäs, Szwecja) oraz homogenizowano (Laboratory homogenizer H500, POLEKOLAB, Warszawa, Polska).

Z przygotowanego materiału oznaczono następujące parametry: suchą masę, białko ogólne, tłuszcz surowy i popiół surowy. Analizę chemiczną ciał ryb wykonano według zaleceń AOAC (2000). Zawartość białka ogólnego oznaczono na analizatorze Kjell-Foss Automatic 16210 (AISN Foss Electric, Dania), tłuszcz surowy oznaczono metodą Soxhleta (ekstrakcja eterem etylowym przez 12 godzin), a zawartość popiołu oznaczono metodą spalania próby w temperaturze 550°C przez 12 godzin (piec Linn High Therm GmbH, Eschenfelden, Niemcy).

Badania w warunkach produkcyjnych

Test wzrostowy w warunkach produkcyjnych został przeprowadzony w Gospodarstwie Rybackim Stanisław Błaszkwia PHU GAMA w Lipce w sezonie hodowlanym 2015. Doświadczenie zostało wykonane w sześciu stawach: Skalmierz 1, 2 i 3 o powierzchniach, odpowiednio: 2,11, 2,07 i 5,50 ha oraz Lipka 1, 2 i 3 o powierzchniach, odpowiednio: 2,12, 1,32 i 5,0 ha.

Poszczególne stawy były obsadzone rybami na początku kwietnia, a odłowy zostały wykonane w połowie października, z wyjątkiem stawu Lipka 1, który z uwagi na deficyt wody spowodowany suszą został odłowiony 15.08.2015 r. Tak jak w przypadku doświadczenia prowadzonego w warunkach doświadczalnych, eksperyment w warunkach produkcyjnych zawierał dwie grupy zwierząt – otrzymujące tylko mieszankę paszową dla karpia, stanowiące grupę kontrolną (n = 3; stawy Skalmierz 1, 2 i 3) oraz otrzymujące paszę z probiotycznym dodatkiem paszowym LAVIPAN (n = 3, stawki Lipka 1, 2 i 3), stanowiące grupę doświadczalną.

Karpie otrzymywały paszę trzy razy w tygodniu (poniedziałek, środa i piątek), która była podawana z łodzi na karmiska usytuowane na dnie stawów. Dawki paszy obliczano w oparciu o preliminarz paszowy opracowany na początku sezonu, z uwzględnieniem przyrostów masy ryb określa-

nych na podstawie cyklicznych odłowów kontrolnych oraz aktualnej temperatury wody.

Pasze

Mieszanki paszowe zastosowane w badaniach wykonane zostały metodą prasowania wysokociśnieniowego, temperatura przetwarzania surowców w tym procesie nie przekraczała 50°C. Po wysuszeniu otrzymany granulata został pokryty filmem hydrofobowym w procesie natłuszczania natryskowego.

Mieszanka paszowa wykorzystana w warunkach doświadczalnych została skomponowana w oparciu o komercyjne składniki (tab. 1), zgodnie z zapotrzebowaniem pokarmowym karpia podanym przez National Research Council (2011) jako dieta pełnoporcjowa o zawartości 32% białka ogólnego, 7% tłuszczu i 18,0 MJ energii brutto (tab. 2).

TABELA 1

Skład surowcowy mieszanki paszowej stosowanej w warunkach doświadczalnych

Składniki	g kg ⁻¹
Mączka rybna ¹	75,0
Mączka z erytrocytów ²	100,0
Drożdże paszowe ³	65,0
Poekstrakcyjna śruta sojowa ⁴	135,0
Poekstrakcyjna śruta rzepakowa ⁵	100,0
Śruta z pszenicy	460,0
Olej rybny ⁶	37,0
Lecytyna sojowa ⁷	10,0
Premix mineralno-witaminowy ⁸	15,0
Premix Vitamin ⁹	1,0
Chlorek choliny	2,0
Kwas askorbinowy ¹⁰	0,1
Lizyna	3,5
DL-metionina	1,2

¹ Danish fishmeal, Type F, 72% białka ogólnego, 12% tłuszczu, FF Skagen, Dania.

² AP 301 P, 92% białka ogólnego, APC (GB) Ltd, Ings Road, Doncaster, UK.

³ >45% białka ogólnego, <6% popiołu.

⁴ Toastowana, 46-47% białka ogólnego.

⁵ 33% białka ogólnego, 2% tłuszczu.

⁶ Agro-fish, Kartoszyño, Poland.

⁷ BergaPure, deoiled lecithin, 97% czystej lecytyny, Berg + Schmidt GmbH & Co. KG, Hamburg, Niemcy.

⁸ Polfamix W, BASF Polska Ltd. Kutno, Poland – zawiera w 1 kg: vitamin A 1000000 IU., vitamin D₃ 200000 IU, vitamin E 1.5 g, vitamin K 0.2 g, vitamin B₁ 0.05 g, vitamin B₂ 0.4 g, vitamin B₁₂ 0.001 g, nicotinic acid 2.5 g, D-calcium pantothenate 1.0 g, choline chloride 7.5 g, folic acid 0.1 g, methionine 150.0 g, lysine 150.0 g, Fe 2.5 g, Mn 6.5 g, Cu 0.8 g, Co 0.04 g, Zn 4.0 g, J 0.008 g, nośnik do 1000.0 g.

⁹ Vitazol AD₃E, BLOWET Drwalew, Poland – zawiera w 1 kg: vitamin A 50000 IU, vitamin D₃ 5000 IU, vitamin E 30.0 mg, vitamin C 100.0 mg.

¹⁰ Rovimix Stay-C 35, DSM Nutritional Product, Saint-Louis Cedex, Francja.

Natomiast mieszanka paszowa przeznaczona dla karpia w Gospodarstwie Rybackim w Lipce stanowiła dietę

TABELA 2

Kalkulowana wartość pokarmowa mieszanki paszowej stosowanej w warunkach doświadczalnych

Składnik	g kg ⁻¹
Białko ogólne (% s.m.)	32,2
Arginina	5,1
Histydyna	3,1
Lizyna	5,6
Tryptofan	1,2
Fenylalanina + Tyrozyna	5,7
Metionina + Cystyna	3,0
Treonina	3,4
Leucyna	7,3
Izoleucyna	4,3
Walina	5,4
Tłuszcz surowy (% s.m.)	7,0
ZBAW (% s.m.)	42,5
Włókno surowe (% s.m.)	3,7
Popiół (% s.m.)	5,8
Fosfor ogólny (% s.m.)	0,7
Wapń (% s.m.)	0,6
Energia brutto (MJ kg ⁻¹)	18,0
E/P (kJ g ⁻¹ białka)	54,4

TABELA 3

Skład surowcowy oraz kalkulowana wartość pokarmowa mieszanki paszowej stosowanej w warunkach produkcyjnych

Składniki	g kg ⁻¹
Śruta kukurydziana	590,0
Koncentrat białkowy PL 68 ¹	300,0
Łój wołowy	100,0
Premix mineralno-witaminowy	10,0
Białko ogólne (% s.m.)	27,2
Tłuszcz surowy (% s.m.)	12,1
ZBAW (% s.m.)	45,3
Włókno surowe (% s.m.)	2,1
Popiół (% s.m.)	2,7
Fosfor ogólny (% s.m.)	0,5
Wapń (% s.m.)	0,1
Energia brutto (MJ kg ⁻¹)	18,5
E/P (kJ g ⁻¹ białka)	39,4

¹ suszona biomasa bakterii non-GMO, produkt uboczny wytwarzania kwasu L-glutaminowego (MSG)

uzupełniająca dla karpia o zawartości 27% białka ogólnego i 12% tłuszczu (tab. 3).

Czynnik różnicujący, tj. probiotyczny dodatek paszowy, dodano wyłącznie do pasz dla grup eksperymentalnych, oznaczonych jako „LAVIPAN” w ilości 1,0 g kg⁻¹ paszy – co w przeliczeniu na jednostki tworzące kolonie (jtk) stanowiło 10×10⁸ jtk w 1 kg paszy. Probiotyczny dodatek paszowy LAVIPAN składa się z bakterii kwasu mlekowego, drożdży i substancji ziołowych. Zastosowanie LAVIPANU wpływa na: prawidłowy rozwój bakterii kwasu mlekowego, wytworzenie substancji ograniczających wzrost szkodli-

wych bakterii *E. coli*, Salmonella oraz Clostridium, wytworzenie β -glukanów oraz stymulację wydzielania enzymów trawiennych zwierząt (np. maltazy, sacharazy, β -galaktozydazy), stymulację produkcji immunoglobulin oraz związanie mykotoksyn zawartych w paszy (dane producenta). Oczekiwany efektem stosowania wspomnianego preparatu jest uzyskanie równowagi mikrobiologicznej przewodu pokarmowego, poprawa przyrostów czy lepsze wykorzystanie paszy (ibidem).

Wszystkie wymienione rodzaje pasz przygotowano wyłącznie na potrzeby niniejszego doświadczenia. Pasze były przechowywane w szczelnych i nieprzezroczystych pojemnikach z tworzywa sztucznego, w pomieszczeniu magazynowym o niemodyfikowanej atmosferze.

Wskaźniki chowu ryb

Na podstawie biomasy obsad oraz zużycia pasz obliczono następujące wskaźniki chowu (na podstawie Hardy i Barrows 2002):

1) średni dobowy przyrost masy jednostkowej ryb (Specific Growth Rate):

$$SGR = (100 \times (\ln w_t - \ln w_o) \times t^{-1})$$

gdzie: w_o – początkowa średnia masa jednostkowa ryb (g), w_t – końcowa średnia masa jednostkowa ryb, t – liczba dni doświadczenia.

2) procentowy przyrost masy jednostkowej ryb (Percentage Weight Gain):

$$PWG = 100 \times (w_o/w_i)$$

gdzie: w_o – początkowa średnia masa jednostkowa ryb (g), w_i – całkowity przyrost masy.

3) średni bezwzględny współczynnik pokarmowy pasz (Feed Conversion Ratio):

$$FCR = F \times (W_t - W_o)^{-1}$$

gdzie: F – ilość skarmionej paszy (g), W_t – końcowa masa ryb (g), W_o – początkowa masa ryb (g).

4) współczynnik wydajności wzrostowej białka paszowego (Protein Efficiency Ratio):

$$PER = (W_t - W_o) \times P^{-1}$$

gdzie: P – masa białka zadanego rybom w paszy w czasie doświadczenia (g), W_t – końcowa masa ryb (g), W_o – początkowa masa ryb (g).

5) wskaźnik retencji białka (Protein Retention):

$$PR = (P_t - P_o) \times P^{-1}$$

gdzie: P_t – masa białka ogólnego w ciele ryby po zakończeniu doświadczenia (g), P_o – masa białka ogólnego w ciele ryby przed rozpoczęciem doświadczenia (g), P – masa białka ogólnego zadanego rybom w paszy (g).

6) wskaźnik retencji tłuszczu (Fat Retention):

$$FR = (F_t - F_o) \times F^{-1}$$

gdzie: F_t – masa tłuszczu surowego w ciele ryby po zakończeniu doświadczenia (g), F_o – masa tłuszczu surowego w ciele ryby przed rozpoczęciem doświadczenia (g), F – masa tłuszczu surowego zadanego rybom w paszy (g).

7) wskaźnik przeżywalności ryb (Survival Rate):

$$SR = (L_t \times L_o^{-1}) \times 100$$

gdzie: L_t – końcowa liczba ryb (szt.), L_o – początkowa liczba ryb (szt.).

Analiza statystyczna

Wyniki biotechniczne testu wzrostowego oraz wartości wskaźników przewartościowania składników pokarmowych pasz zostały obliczone przy użyciu arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel. Wyniki opracowano przy użyciu pakietu statystycznego Statistica 5 PL (StatSoft 2001).

Analizie statystycznej zostały poddane masy obsad, wartości wskaźników SGR, FCR, PWG i PER uzyskane dla dwóch wariantów doświadczalnych, wartości wskaźników PR, FR i SR w jednym terminie, natomiast wyniki analiz składu chemicznego ciała ryb w dwóch terminach.

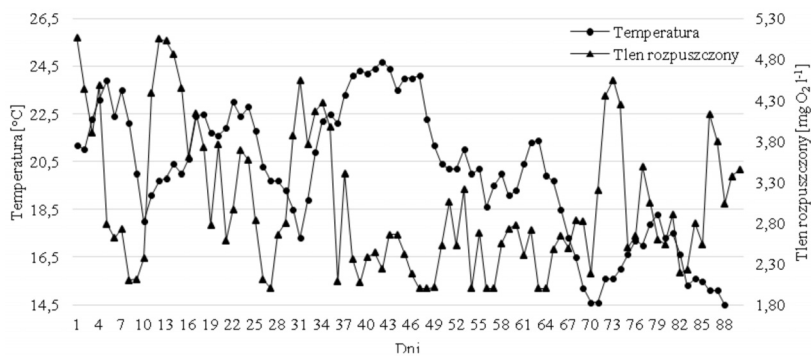
Na podstawie testu Kołmogorowa-Smirnowa na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ ustalono, że masy obsad oraz wskaźniki hodowlane posiadają rozkład normalny. Dla wymienionych parametrów sprawdzono również homogeniczność wariancji testem Bartletta i otrzymano wynik pozytywny. Ze względu na to, że zbiory danych spełniały wszystkie konieczne założenia poddano je wielowymiarowej analizie wariancji. Efektami głównymi był czas i rodzaj paszy, estymowana była również ich interakcja – z wyjątkiem wyników wskaźników PR i FR. Po analizie wariancji zastosowano również grupę analiz post-hoc. Przy użyciu testu T-Tukeya wyznaczono grupy jednorodne.

Wyniki

Badania w warunkach doświadczalnych

Na podstawie przeprowadzanych pomiarów parametrów fizykochemicznych wody w zbiornikach doświadczalnych na terenie ZDTPPiA w Muchocinie, wyznaczono wartości minimalne i maksymalne dla temperatury wody, rozpuszczonego w niej tlenu oraz odczynu. Zmiany średnich wartości temperatury wody i zawartości tlenu w czasie testu wzrostowego w warunkach doświadczalnych przedstawiono na rysunku 1.

Temperatura wody mieściła się w zakresie 14,5-24,7°C, średnia wartość tego parametru wynosiła 20,1°C, natomiast temperatura wody powyżej wartości średniej była odnotowywana przez połowę okresu



Rys. 1. Zmiany dobowych średnich wartości temperatury wody i zawartości tlenu w wodzie podczas testu wzrostowego w warunkach doświadczalnych.

doświadczenia (46 dni). Średnia zawartość rozpuszczonego w wodzie tlenu wynosiła $3,1 \text{ mg O}_2 \text{ dm}^{-3}$ (ilość tlenu rozpuszczonego \geq średniej odnotowano przez 32 dni), przy wartościach granicznych od minimum 2,0 do

TABELA 4

Średnie masy ciała ryb oraz wartości wskaźników chowu karpia¹ w warunkach doświadczalnych

Dni testu	Kontrola	LAVIPAN
Średnia masa ciała (g szt. ⁻¹)		
start	366,2 ± 10,6 ^a	379,0 ± 13,1 ^a
30	616,3 ± 30,4 ^a	645,7 ± 29,3 ^a
60	1025,8 ± 15,6 ^a	1042,4 ± 9,2 ^a
90	1191,5 ± 13,7 ^a	1197,3 ± 26,2 ^a
SGR (% d ⁻¹)		
30	1,73 ± 0,02 ^a	1,77 ± 0,04 ^a
30-60	1,70 ± 0,01 ^a	1,60 ± 0,18 ^a
60-90	0,52 ± 0,02 ^a	0,48 ± 0,01 ^a
1-90	1,31 ± 0,01 ^a	1,28 ± 0,01 ^a
PWG (%)		
30	68,29 ± 0,99 ^a	70,01 ± 1,87 ^a
30-60	66,43 ± 0,1 ^a	61,63 ± 8,77 ^a
60-90	16,15 ± 0,77 ^a	14,88 ± 0,53 ^a
1-90	225,32 ± 4,07 ^a	215,37 ± 3,96 ^a
FCR		
30	1,16 ± 0,04 ^a	1,16 ± 0,03 ^a
30-60	1,81 ± 0,01 ^a	1,78 ± 0,01 ^b
60-90	1,86 ± 0,09 ^a	1,83 ± 0,15 ^b
1-90	1,92 ± 0,03 ^b	1,84 ± 0,03 ^a
PER		
30	2,27 ± 0,05 ^a	2,20 ± 0,09 ^a
30-60	1,68 ± 0,01 ^a	1,78 ± 0,01 ^a
60-90	1,63 ± 0,08 ^a	1,65 ± 0,07 ^a
1-90	1,58 ± 0,02 ^a	1,56 ± 0,09 ^a
PR (%)		
1-90	21,50 ± 0,91 ^b	17,97 ± 1,21 ^a
FR (%)		
1-90	117,20 ± 2,99 ^b	92,10 ± 4,41 ^a
SR (%)		
1-90	100	100

¹Wartości są średnimi z trzech powtórzeń (n=3) ± odchylenie standardowe (SD). Wartości średnie w poszczególnych wierszach oznaczone tymi samymi indeksami literowymi nie różnią się istotnie (P<0,05).

maksimum $5,1 \text{ mg O}_2 \text{ dm}^{-3}$. Odczyn wody mieścił się w zakresie pH od 6,8 do 7,5, średnia wartość wynosiła pH = 7,1.

W warunkach doświadczalnych nie odnotowano statystycznie istotnych różnic dla średnich jednostkowych mas ciała i względnego przyrostu masy ciała karpia z wariantu kontrolnego oraz otrzymujących paszę z probiotycznym dodatkiem paszowym LAVIPAN (tab. 4). Względne dobowe przyrosty masy ciała ryb (SGR) w czasie testu wzrostowego nie różniły się istotnie, a wartości obliczone za cały okres doświadczenia były bardzo wyrównane: od $1,31\% \text{ d}^{-1}$ w grupie kontrolnej do

$1,28\% \text{ d}^{-1}$ w grupie LAVIPAN. W pierwszym miesiącu testu wzrostowego nie odnotowano statystycznie istotnych różnic dla wskaźnika FCR w obydwu wariantach doświadczenia. W drugim i trzecim miesiącu, a także dla całego okresu doświadczenia wartość współczynnika pokarmowego była statystycznie istotnie niższa w grupie ryb żywionej paszą z dodatkiem preparatu LAVIPAN ($p \leq 0,05$). Wykorzystanie białka paszowego (PER) było bardzo podobne w obydwu wariantach doświadczenia (brak istotnych różnic), natomiast retencja białka (PR) i tłuszczu (FR) w ciele ryb były wyższe w wariantach kontrolnym (istotność różnic potwierdzona statystycznie), wyniosły one, odpowiednio: 21,5% i 117,2%. Podczas testu wzrostowego nie odnotowano strat w obsadach ryb, przeżywalność wyniosła 100%.

Zawartość suchej masy, białka ogólnego, tłuszczu surowego i popiołu surowego w ciałach badanych ryb zaprezentowano w tabeli 5. Udział wody nie zmienił się w czasie trwania testu wzrostowego, a ilość białka u obydwu grup doświadczalnych była istotnie niższa po zakończeniu testu wzrostowego ($p \leq 0,05$). Zawartość tłuszczu w ciele ryb z obydwu wariantów oraz popiołu z wariantu kontrolnego zwiększyła się istotnie statystycznie w porównaniu do momentu rozpoczęcia badań. Z kolei u ryb, którym podawana była pasza z probiotycznym dodatkiem paszowym LAVIPAN nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w ilości popiołu przed rozpoczęciem i po zakończeniu badań.

TABELA 5

Podstawowy skład chemiczny karpia przed rozpoczęciem i po zakończeniu testu wzrostowego¹

Składnik	Początek eksperymentu	Koniec eksperymentu	
		Kontrola	LAVIPAN
Sucha masa	29,2 ± 0,4 ^a	30,65 ± 0,32 ^a	29,51 ± 0,21 ^a
Białko ogólne	16,9 ± 0,2 ^c	14,42 ± 0,20 ^a	14,10 ± 0,30 ^a
Tłuszcz surowy	10,3 ± 0,1 ^a	12,63 ± 0,90 ^b	11,37 ± 0,20 ^b
Popiół	2,0 ± 0,1 ^a	2,51 ± 0,10 ^b	2,96 ± 0,30 ^a

¹Wartości są średnimi z trzech powtórzeń (n=3) ± odchylenie standardowe (SD). Wartości średnie w poszczególnych wierszach oznaczone tymi samymi indeksami literowymi nie różnią się istotnie (P<0,05).

Dane wyjściowe oraz wyniki doświadczenia w warunkach produkcyjnych

Staw	Kontrola			LAVIPAN		
	Skalmierz 1	Skalmierz 2	Skalmierz 3	Lipka 1*	Lipka 2	Lipka 3
Obsada [szt.]	1480	1400	2500	1500	930	3500
Obsada [kg]	340	340	600	240	180	560
Początkowa masa jedn. [g]	230	243	240	160	193	160
Odłów [szt.]	800	720	1130	900	763	2764
Odłów [kg]	1136	1209	1819	1820	1343	4975
Końcowa masa jedn. [g]	1420	1680	1600	2000	1760	1800
Przyrost masy jedn. [g]	1190	1437	1360	1840	1566	1640
Współczynnik pokarmowy	2,70	2,36	2,85	1,67	1,54	1,55
Straty [%]	46	49	55	40	18	21

*staw Lipka 1 został odłowiony w dniu 15.08.2015. z powodu deficytu wody

Badania w warunkach produkcyjnych

Karpie dokarmiane w warunkach produkcyjnych paszą z probiotycznym dodatkiem paszowym LAVIPAN osiągnęły istotnie wyższą końcową masę ciała (1760-2000 g) w porównaniu z rybami dokarmianymi paszą kontrolną (1420-1680 g). Podobne zależności odnotowano w przyrostach masy ciała ryb – te dokarmiane paszą z preparatem LAVIPAN były wyższe o 20-25% w porównaniu z grupą kontrolną (tab. 6). Współczynnik pokarmowy pasz w grupie ryb żywionych paszą z LAVIPANEM mieścił się w zakresie od 1,54 do 1,67, natomiast w grupie kontrolnej przyjął wartości 2,36-2,85.

Rodzaj stosowanej paszy miał wyraźny wpływ na przeżywalność ryb, bowiem straty zwierząt z grupy kontrolnej wynosiły od 46 do 55%, natomiast ryb dokarmianych z probiotycznym dodatkiem paszowym LAVIPAN – około 20% (z wyłączeniem stawu Lipka 1, który został wcześniej odłowiony z powodu deficytu wody, co mogłoby przyczynić się do stopniowego pogarszania warunków chowu karpia).

Dyskusja

Na podstawie uzyskanych wyników zauważono, że w warunkach doświadczalnych rodzaj podawanego pokarmu nie miał znaczącego wpływu na wyniki chowu karpia. W przypadku warunków produkcyjnych, odnotowano lepsze wykorzystanie paszy oraz przyrosty masy ciała ryb dokarmianych mieszanką paszową z dodatkiem preparatu probiotycznego. Ponadto podczas badań zaobserwowano pozytywny wpływ podawanej paszy na przeżywalność karpia: na poziomie 100% w warunkach doświadczalnych oraz 80% w warunkach produkcyjnych.

Bakterie kwasu mlekowego (LAB), stanowiące m. in. składnik paszy doświadczalnej LAVIPAN, są najczęściej stosowanym probiotykiem, zarówno w żywieniu ludzi (Fioramonti i in. 2003), jak i zwierząt, w tym także ryb (Ringø i Gatesoupe 1998, Hagi i in. 2004). Występują u ryb słodkowodnych (Jankauskienė 2000) jako jeden z

składników naturalnej flory jelitowej zwierząt zmienneocielnych (Izvekova i in. 2007).

Ze względu na ciągle uzupełnianą wiedzę dotyczącą mikrobiomu przewodu pokarmowego ryb oraz możliwości zastosowania jej w praktyce, probiotyki coraz częściej stanowią suplement mieszanek paszowych dla ryb. Podobny układ w schemacie doświadczalnym zastosowano w badaniach nad dodatkiem trzech kombinacji bakterii ze szczepu *Bacillus* sp. (Yanbo i Zirong 2006). Podczas trwania 60-dniowego testu wzrostowego, młodocianym osobnikom karpia podawano paszę z dodatkiem liofilizowanych fotosyntetyzujących bakterii *Bacillus* sp., zliofilizowanych bakterii wymienionego powyżej szczepu oraz połączenia obu powyższych kombinacji. Uzyskano satysfakcjonujące wyniki w przypadku dodatku 2 g bakterii na 1 kg paszy. Natomiast w przypadku dodania 1 kg preparatu na 1 kg paszy uzyskano następujące wartości wskaźnika FCR – 2,27 (Yanbo i Zirong 2006) i 1,83 (badania własne). Badacze wskazali na wyraźną poprawę wzrostu i procesów trawiennych oraz lepsze wykorzystanie paszy przez ryby.

Badania z wykorzystaniem probiotyku w formie dodatku bakterii kwasu mlekowego do mieszanki paszowej dla ryb przeprowadzono w warunkach doświadczalnych na narybku karpia (Ramakrishnan i in. 2008). W żywieniu zwierząt zastosowano dziewięć pasz eksperymentalnych oraz paszę kontrolną. Probiotyk (w tym przypadku bakterie kwasu mlekowego), drożdże (*Saccharomyces cerevisiae*) oraz spirulinę (*Spirulina maximus*) podawano w formie 1, 2 i 3% stężenia, natomiast koncentracja drobnoustrojów wynosiła od 10^7 do 10^8 jtk w 1 kg paszy – a więc podobna do tej w przeprowadzonym przez nas doświadczeniu. Po przeanalizowaniu składu suchej masy ciał badanych ryb nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie, jednakże w porównaniu do grupy kontrolnej, zwierzęta otrzymujące paszę z dodatkiem bakterii kwasu mlekowego, drożdży lub spiruliny charakteryzowały się wyższą przeżywalnością w zakresie od 3 do 22%. Porównując wyniki wspomnianych badaczy z 15 dnia doświadczenia, dla zadanego 1 g prepa-

ratu zawierającego bakterie na 1 kg paszy (Yanbo i Zirong 2006) oraz najkrótszego okresu eksperymentu z zastosowaniem preparatu LAVIPAN (badania własne) uzyskano zbliżone wartości FCR odpowiednio 1,25 i 1,16 oraz PER – 1,91 i 2,20. Pomimo iż karpie, które otrzymywały paszę ze spiruliną charakteryzowały się wyższą zawartością białka w tuszy od pozostałych grup, autorzy rekomendowali również stosowanie diety z dodatkiem bakterii kwasu mlekowego czy drożdży.

Natomiast badania dotyczące wyizolowania bakterii szczepu *Lactobacillus* z jelit dwóch różnych grup wiekowych karpia – dorosłych o masie 800-1000 g i narybku o wadze od 70 do 90 g przeprowadzono kilka lat temu (Hagi i Hoshino 2009). Wykazano, że z pobranych i zinkubowanych próbek możliwe było uzyskanie materiału, który można wykorzystać jako probiotyczny suplement diety dla narybku lub kroczka karpia. We wcześniejszych badaniach wspomnianego zespołu badawczego (Hagi i in. 2004) odnotowano również sezonową zmienność bakterii kwasu mlekowego, zależną od temperatury otoczenia. Wymienione powyżej eksperymenty korespondują z badaniami przeprowadzonymi kilka lat wcześniej (Gatlin 2002), gdzie wykazano, że wyizolowanie mikroorganizmów z przewodu pokarmowego ryb dorosłych może służyć jako dodatek do pokarmu przeznaczanego dla stadiów młodocianych ryb.

Jednakże w akwakulturze coraz częściej stosowane są różne kombinacje pro-, pre- i synbiotyków. Badania na narybku karpia z wykorzystaniem fruktooligosacharydów oraz drożdży piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*) wykazały istotne zmiany w obrazie elementów morfologicznych krwi (Abdulrahman i Ahmed 2015). Podany w paszy prebiotyk spowodował wzrost granulocytów, co w opinii autorów pracy mogło się przyczynić do stymulacji układu odpornościowego ryb. Badacze zgodzili się również co do wpływu podawanych prebiotyków na wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz *Bacillus*.

Przykładem kolejnych tego typu badań jest także eksperyment polegający na dodaniu do paszy dla narybku karpia synbiotyku zawierającego bakterie *Enterococcus faecium* (probiotyk) oraz fruktooligosacharydy (prebiotyk) w preparacie Biomin IMBO®, w celu zbadania wpływu podawanej paszy na wzrost ryb oraz aktywność enzymów trawiennych (Dehaghani i in. 2015). Wykazano zwiększoną aktywność i wydzielanie się enzymów trawiennych oraz lepsze wykorzystanie paszy. Wskaźnik SGR w 60 dniu doświadczenia dla rekomendacji 1 kg na 1 kg paszy wyniósł odpowiednio 1,22 dla preparatu Biomin IMBO®, gdzie dla LAVIPANU w tym samym okresie odnotowano wartość 1,60. Badacze zasugerowali także, że wraz ze wzrostem bakterii *Enterococcus faecium*, wzrostowi ulegały również bakterie kwasu mlekowego, co korzystnie wpłynęło na przyrosty ryb.

Wnioski

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można stwierdzić, że:

- w warunkach doświadczalnych podawanie karpom paszy suplementowanej probiotycznym dodatkiem paszowym LAVIPAN nie miało istotnego wpływu na przyrosty masy ciała ryb i ich przeżywalność oraz efektywność wzrostową białka paszowego, natomiast podkreślić należy pozytywny wpływ na konwersję składników pokarmowych diety;
- w warunkach produkcyjnych odnotowano istotny wpływ podawania paszy z dodatkiem probiotycznym na przyrosty masy ciała karpia, efektywność wykorzystania składników pokarmowych diety oraz przeżywalność ryb.

Biorąc pod uwagę powyższe wnioski, można rekomendować stosowanie probiotycznego dodatku paszowego LAVIPAN w ilości 1 g na 1 kg paszy (10×10^8 jtk w 1 kg paszy).

Literatura

- Abdulrahman N.M., Ahmed V.M. 2015 – Comparative effect of probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*), prebiotic (fructooligosaccharide FOS) and their combination on some differential white blood cells in young common carp (*Cyprinus carpio* L.). Asian J. Sci. Technol. 6(2): 1136-1140.
- Akrami R., Nasri-Tajan M., Jahed A., Jahedi M., Razeghi Mansour M., Jafarpour S.A. 2015 – Effects of dietary synbiotic on growth, survival, lactobacillus bacterial count, blood indices and immunity of beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1754) juvenile – Aquacult. Nutr. 21(6): 952-959.
- AOAC 2000 – Official methods of analysis of the association of analytical chemists, 19th edn. Association of Analytical Chemists, Arlington.
- Committee on Animal Nutrition. Board on Agriculture. National Research Council. 2011 – Nutrient Requirements of Fish and Shrimp – Animal Nutrition Series. Washington 2011.
- Cruz P.M., Ibanez A.L., Hermosillo O.A.M., Saad H.C.R. 2012 – Use of probiotics in aquaculture – ISRN Microbiol. doi:10.5402/2012/916845: 1-13.
- Dawood M.A.O., Koshio S., Ishikawa M., Yokoyama S. 2015 – Dietary supplementation of β -glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major* – Aquacult. Nutr. 23(1): 148-159.
- Dawood M.A.O., Koshio S. 2016 – Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review – Aquaculture 454: 243-251.
- Dehaghani P.G., Baboli M.J., Moghadam T.A., Ziaei-Nejad S., Pourfarhadi M. 2015 – Effect of synbiotic dietary supplementation on survival, growth performance, and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings – Czech J. Anim. Sci. 60(5): 224-232.
- El-Kholy A., El-Shinawy S., Meshref A., Korny A. 2014 – Screening of antagonistic activity of probiotic bacteria against some food-borne pathogens – J. Appl. Environ. Microbiol. 2(2): 53-60.
- FAO/WHO. 2001 – Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation.
- FAO/WHO. 2001. Food and Nutrition Paper No. 85: Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria – Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Cordoba, Argentina 1-4 October 2001.
- Fioramonti J., Theodorou V., Bueno L. 2003 – Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology – Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology 17: 711-724.
- Fuller R. 1989 – Probiotics in man and animals – J. Appl. Bacteriol. 66(5): 365-378.
- Gatesoupe F.J. 1999 – The use of probiotics in aquaculture – Aquaculture 180(1-2): 147-165.

- Gatlin D.M. 2002 – Nutrition and Fish Health – W: Halver J.E., Hardy R.W. (Red.) – Fish Nutrition, 3rd edn. Academic Press Inc., San Diego, CA, USA: 694.
- Gibson G.R., Probert H.M., Van Loo J., Rastall R.A., Roberfroid M.B. 2004 – Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics – *Nutr. Res. Rev.* 17: 259-275.
- 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 – *Aquaculture* 234 (1-4): 335-346.
- Hagi T., Hoshino T. 2009 – Screening and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from cultured common carp intestine – *Bio-sci., Biotech. Bioch.* 73: 1479-1483.
- 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 – *Aquaculture* 234: 335-346.
- Hardy R.W., Barrows F.T. 2002 – Diet formulation and manufacture. [W:] Halver J.E., Hardy R.W. (Red.) – Fish Nutrition, 3rd edn. Academic Press Inc., San Diego, CA, USA: 506-601.
- Irianto A., Austin B. 2002 – Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) – *J. Fish Dis.* 25: 333-342.
- Izvekova G.I., Izvekov E.I., Plotnikov A.O. 2007 – Symbiotic microflora in fishes of different ecological groups – *Izvestiya Akademii Nauk, Seriya Biologicheskaya* 6: 728-737.
- Jankauskienė R. 2000 – Defence mechanisms in fish: *Lactobacillus* genus bacteria of intestinal wall in feeding and hibernating carps – *Ekologija (Vilnius)* 1: 3-6.
- Kozasa M. 1986 – Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding – *Microbiol. Aliment. Nutr.* 4: 121-135.
- Maynard C.L., Elson C.O., Hatton R.D., Weaver C.T. 2012 – Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system – *Nature* 489: 231-241.
- Miyatake H. 1997 – Carp – *Yoshoku*. 34(5): 108-111.
- Moriarty D.J.W. 1990 – Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora – W: Lésel R. (Red.) – *Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier Science, Amsterdam: 217-222.
- Nayak S.K. 2010 – Probiotics and immunity: a fish perspective – *Fish Shellfish Immun.* 29: 2-14.
- Parker R.B. 1974 – Probiotics, the other half of the antibiotics story – *Anim. Nutr. Health* 29: 4-8.
- Ramakrishnan C.M., Haniffa M.A., Manohar M., Dhanaraj M., Arockiaraj A.J., Seetharaman S., Arunsingh S.V. 2008 – Effects of probiotics and spirulina on survival and growth of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) – *Isr. J. Aquacult. Bamidgheh* 60(2): 128-133.
- Rawls J.F., Mahowald A., Goodman A.L., Trent C.M., Gordon J.I. 2007 – In vivo imaging and genetic analysis link bacterial motility and symbiosis in the zebra fish gut – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 7622-7627.
- Ray A.K., Ghosh K., Ringø E. 2012 – Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: A review – *Aquacult. Nutr.* 18: 465-492.
- Rekecki A., Dierckens K., Laureau S., Boon N., Bossier P., Van den Broeck W. 2009 – Effect of germ-free rearing environment on gut development of larval sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) – *Aquaculture* 293: 8-15.
- Ringø E., Gatesoupe F.J. 1998 – Lactic acid bacteria in fish: a review – *Aquaculture* 160: 177-203.
- Ringø E., Dimitroglou A., Hoseinifar S.H., Davies S.J. 2014 – Prebiotics in finfish: an update – W: Merrifield D.L., Ringø E. (Red.). *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*. Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, UK: 360-400.
- Siwicki A. 1984 – New anaesthetic for fish – *Aquaculture* 38 (2): 171-176.
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W. 2000 – Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture – *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 655-655.
- Yanbo W., Zirong X. 2006 – Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities – *Anim. Feed Sci. Technol.* 127: 283-292.
- Yirga H. 2015 – The use of probiotics in animal nutrition – *J. Publ. Health* 3: 132-142.
- Yousefian M., Amiri M.S. 2009 – A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp – *Afr. J. Biotechnol.* 8(25): 7313-7318.

Przyjęto po recenzji 21.02.2017 r.

USING PROBIOTIC FEED SUPPLEMENTS IN CARP REARING

Lilianna Hoffmann, Jan Mazurkiewicz, Krzysztof Florczyk, Hieronim Burchardt

ABSTRACT. Probiotics are one of the more frequently used ingredients in fish feeds and other reared animals. Particular attention was paid to fish feeds supplemented with lactic acid bacteria that were used in aquaculture for feeding fish from the common carp family, salmonids, flatfish, and eel. The aim of the study was to assess the impact of the probiotic feed additive LAVIPAN, which is enriched with lactic acid bacteria (LAB). The study was carried out simultaneously in two different animal breeding centers – under laboratory conditions (Experimental Station of Feed Production Technology and Aquaculture in Muchocin) and under factory conditions (Stanisław Błaszczewski fish farm, PHU GAMA in Lipka village). The subject of the study was common carp fingerlings, and the trial lasted for two months. The beneficial effects on the rearing indexes, weight gain, survival rate, and fish health are discussed. Feeds for common carp fingerlings should be supplied with a probiotic feed additive in the amount of 1 g per 1 kg of fish feed.

Keywords: common carp, *Cyprinus carpio*, lactic acid bacteria, probiotics, feed additive