

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів

**Використання дріжджів *Saccharomyces boulardii*
як пробіотиків у аквакультурі**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, групи 407

спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

Іванюха К.В.

Керівник: к.б.н., доцент **Васіна Л.М.**

До захисту допущено:

Протокол засідання кафедри № ____

від „__” _____ 2023 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г. П.

Чернівці–2023

Анотація

Робота присвячена дослідженню можливості використання дріжджів *Saccharomyces boulardii* як пробіотиків для гідробіонтів.

Показано, що відновлені на спеціальному поживному середовищі культури *Saccharomyces boulardii* проявляють значний гальмівний вплив на розвиток представників роду *Saprolegnia*, що є збудниками інфекційних хвороб риб, членистоногих та інших гідробіонтів.

Встановлена можливість сумісного культивування *S. boulardii* і *Lactobacillus*. Максимальний позитивний ефект проявлявся у випадку асоціацій пробіотичних мікроорганізмів при співвідношенні інокуляту 5%:5%. При цьому визначали як зростання нагромадження біомаси, так і збільшення кількості колонієутворювальних одиниць мікроорганізмів.

Проаналізовано можливість біоінкапсуляції монокультур *S. boulardii* й їх асоціацій з *Lactobacillus* у *Daphnia magna*. Відзначено збільшення виживаності дрібних прісноводних ракоподібних в обох експериментальних варіантах.

Дослідження проводили на кафедрі біохімії та біотехнології Навчально-наукового інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича у 2022-2023 рр.

Ключові слова: *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, асоціації, біоінкапсуляція.

Abstract

The work is devoted to the study of the possibility of using *Saccharomyces boulardii* yeast as probiotics for hydrobionts.

It is shown that *Saccharomyces boulardii* cultures restored on a special nutrient medium have a significant inhibitory effect on the development of representatives of the genus *Saprolegnia*, which are the causative agents of infectious diseases of fish, arthropods and other hydrobionts.

The possibility of simultaneous cultivation of *S. boulardii* and *Lactobacillus* was established. The maximum positive effect was manifested in the case of associations of probiotic microorganisms with an inoculum ratio of 5%:10%. At the same time, both the increase in the accumulation of biomass and the increase in the number of colony-forming units of microorganisms were determined.

The possibility of bioencapsulation of *S. boulardii* monocultures and their associations with *Lactobacillus* in *Daphnia magna* was analyzed. An increase in the survival rate of small freshwater crustaceans was noted in both experimental variants.

The research was conducted at the Department of Biochemistry and Biotechnology of the Educational and Scientific Institute of Biology, Chemistry and Bioresources of Yuri Fedkovich Chernivtsi National University in 2022-2023.

Key words: *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, associations, bioencapsulation.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

ЗМІСТ

ВСТУП

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	
1.1. Загальна характеристика пробіотиків	7
1.2. Особливості організації та життєдіяльності <i>Saccharomyces boulardii</i>	9
1.3. Сумісне культивування <i>Saccharomyces boulardii</i> і <i>Lactobacillus</i>	13
1.4. Технології біоінкапсуляції в живі корми	18
1.5. <i>Saprolegnia</i> – збудник інфекційних хвороб риб	20
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	23
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	27
ВИСНОВКИ.....	33
СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	34
ДОДАТКИ.....	39

ВСТУП

Раціональне використання кормових добавок у процесі вирощування риби дозволяє підвищити продуктивність і якісні характеристики отриманого продукту та забезпечити рентабельність виробництва. Водночас, збалансування складу корму для задоволення потреб у поживних речовинах шляхом введення високоякісних, легкозасвоюваних інгредієнтів, адаптованих до видових та вікових особливостей об'єкта аквакультури, є ключовим завданням сучасної аквакультури.

З іншого боку, актуальними залишаються питання боротьби зі збудниками інфекційних хвороб гідробіонтів, насамперед риб – аеромоноз, весняна віремія коропів, сапролегніоз, триходиноз, псевдомоноз, вібріоз. Антимікробні препарати все ще залишаються основою боротьби з бактеріальними захворюваннями, але мультирезистентність до них розвивається швидкими темпами. Тому, ефективною альтернативою є введення в раціони водних організмів пробіотичних препаратів та добавок, які сприяють підвищенню доступності та засвоюваності поживних речовин раціону, нормалізації мікробіоти кишечника та загалом позитивно впливають на функціональний стан органів і систем організму.

Пробіотики можна добавляти безпосередньо у воду, здійснювати індивідуальне введення *per os*, змішувати з сухим кормом чи використовувати живі вектори доставки (зоопланктон).

Вважаючи на позитивні ефекти застосування *S. boulardii* у медицині й ветеринарії та високий антагоністичний потенціал даних мікроскопічних грибів, ймовірно, його використання для потреб аквакультури сприятиме зниженню розповсюдження патогенів, причому не лише бактерій, а й грибів.

Тому, метою нашої роботи було дослідження можливості використання *Saccharomyces boulardii* в технології біоінкапсуляції живих кормів.

Відповідно до мети поставленні наступні завдання:

1. Приготувати середовище культивування для ефективного відновлення *Saccharomyces boulardii*.
2. Виділити з природнього середовища (ставкової води) представників роду *Saprolegnia* та оцінити вплив *Saccharomyces boulardii* на їх розвиток.
3. Проаналізувати можливість сумісного культивування в уніфікованому поживному середовищі *Saccharomyces boulardii* й *Lactobacillus* шляхом створення відповідних асоціацій.
4. Оцінити виживаність *Daphnia magna* за умов біоінкапсуляції *Saccharomyces boulardii* у вигляді монокультури чи асоціацій.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика пробіотиків

Пробіотики – живі мікроорганізми, що здатні позитивно впливати на здоров'я організму шляхом нормалізації складу та функціонування мікрофлори шлунково-кишкового тракту (найчастіше це біфідобактерії та лактобактерії, які здатні боротися з патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами) [1].

Більш широким визначенням, що відповідає сучасному рівню знань, є визначення пробіотиків Б. А. Шендерова: це «речовини мікробного і немікробного походження», які при природному введенні сприятливо впливають на фізіологічні та біохімічні функції в організмі, шляхом стимуляції мікроекологічного статусу. Всесвітня організація охорони здоров'я визначає поняття пробіотиків як живі мікроорганізми в кількості, достатній для живих організмів.

Пробіотики містять потенційно корисні бактерії або дріжджі. Найчастіше у медичній практиці та ветеринарії використовують молочнокислі бактерії. Нове покоління пробіотиків має в основі генетично модифіковані (рекомбінантні) штами мікроорганізмів із заданими властивостями.

Класифікацію пробіотиків проводять, враховуючи кількість мікроорганізмів, що входять у препарат, їхню родову належність або наявність додаткових компонентів у складі препарату [20].

- монопробіотики – препарати, що містять мікроорганізми одного виду і штаму. У свою чергу вони поділяються на біфідо-, колі-, лактобактерії, бацили та дріжджі;
- поліпробіотики – містять той самий тип бактерій, але різні штами. За складом вони можуть бути біфідовмісними, лактовмісними і бацилярними;

- комплексні пробіотики – містять різні види мікроорганізмів. Вони являють собою комбінації біфідо- і лактобактерій, біфідобактерій і апатогенних штамів *Escherihia coli*, біфідобактерій, лактобактерій та апатогенних ентерококів [1].

У виробництві пробіотичних препаратів можуть використовуватися лише штами, які продемонстрували свою клінічну ефективність. Щоб мікроорганізми могли використовуватися як пробіотики, вони повинні відповідати ряду критеріїв і мати такі властивості:

1. Повна ідентифікація до роду, виду і штаму.
2. Здатність прикріплюватися до поверхні слизової оболонки і зберігати функціональні властивості в кишечнику.
3. Клінічна валідність в дослідженнях *in vitro* та *in vivo*.
4. Відсутність генів патогенності, токсичності та стійкості до антибіотиків.
5. Життєздатність і стабільність в шлунково-кишковому тракті та стійкість до жовчних кислот, травних ферментів, низького рН.
6. Зберігати стабільність під час виробничого процесу, обробки, підготовки і зберігання.

Для успішного пробіотичного ефекту мікроорганізми, в складі пробіотичного препарату, повинні досягти частини шлунково-кишкового тракту і забезпечити оптимальні умови для їх життєдіяльності, наприклад, у випадку пероральних пробіотиків – товстого кишечника.

Сучасні дослідження показують, що вплив пробіотиків на організм є комплексним і багатограним, і здійснюється на кількох рівнях одночасно:

- підвищення захисних та посилення бар'єрних властивостей епітелію кишечника;
- конкуренція у порожнині кишечника з патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами;
- імуномодельююча дія [19].

Позитивні ефекти пробіотиків такі:

- Пригнічують ріст шкідливих мікроорганізмів за рахунок синтезу антибактеріальних речовин (коротколанцюгових жирних кислот тощо), конкурують з ними за поживні речовини і рецептори адгезії;
- Беруть участь в активації імунних активних клітин і стимуляції імунітету;
- Допомагають відновити та оптимізувати функцію біоплівки, що покривають слизову біотопів;
- Впливають на метаболічну діяльність відповідних клітин органів для регулювання їх фізіологічних функцій, біохімічних і поведінкових реакцій;
- Мікробні клітини або їх метаболіти, абсорбовані зі шлунково-кишкового тракту, безпосередньо впливають на ферментативні та інші клітинні реакції в ендокринній, нервовій, імунній та інших системах, органах і тканинах [13].

Пробіотики застосовують в промисловості та в аквакультури з метою підтримки росту. Ці корисні мікроорганізми здатні стимулювати всмоктування мінералів, продукцію нуклеїнових кислот та активувати ріст корисної мікрофлори кишечника. Вони посилюють швидкість конверсії корму, підвищують виживання водних видів, призводять до скорочення використання хіміотерапевтичних засобів.

1.2. Особливості організації та життєдіяльності *Saccharomyces boulardii*

Дріжджі *Saccharomyces boulardii* широкодоступні в природному середовищі – як аутохтонів їх виявляють на рослинах, в повітрі і воді, в харчових продуктах, як алохтони – в багатьох інших екологічних нішах, включаючи кишечник людини.

Типи взаємодії даних дріжджів з іншими мікроорганізмами - різноманітні, включаючи симбіоз, паразитизм і конкуренцію [23].

S. boulardii мають типову будову для дріжджів. Клітини овальні діаметром 2-3 мкм і довжиною 2,5-10,5 мкм, містять усі клітинні органели та ряд специфічних структур.

Дріжджові клітини здатні розмножуватись двома шляхами – через брунькування або шляхом спороутворення.

Оптимальною температурою росту є 37 °С, хоча виявляються стійкими до дуже високих температур, зберігаючи 65% життєздатності при 52 °С [11,21].

Клітинна стінка дріжджів *S.boulardii* становить приблизно 30% сухої маси клітини і складається переважно з полісахаридів (85%) та білків (15%). Біохімічний аналіз засвідчує, що глюкоза, N-ацетилглюкозамін та залишки манози складають 80-90%, 1-2% та 10-20% загального вмісту полісахаридів [17].

S. boulardii – одноклітинний організм, відноситься до нижчих грибів. Характеризується пробіотичним потенціалом і часто використовується як харчова добавка [21]. *S. boulardii* володіє помітними фенотиповими ознаками та фізіологічними властивостями, що лежать в основі використання його як пробіотики, такими як оптимальна температура росту, стійкість до шлункового середовища та життєздатність при низькому рН.

S. boulardii має здатність метаболізувати різні вуглеводи, включаючи глюкозу, сахарозу, мальтозу та інші. Вуглеводи слугують їм джерелом енергії для росту та метаболічних процесів. Дріжджі здатні також синтезувати та перетворювати різні жирні кислоти. *S. boulardii* містить різноманітні білки, які відіграють важливу роль у функціонуванні клітин і метаболічних шляхах. Вони можуть брати участь у процесах транспорту речовин, ферментативних реакціях та інших клітинних процесах. Також, дані дріжджі можуть синтезувати вітамін - В6 та інші біологічно активні сполуки, які можуть мати корисний вплив на організм.

Позитивні ефекти дії *S. boulardii* на макроорганізм:

- Антимікробна активність: зниження швидкості росту патогенних кишкових бактерій, зниження шлунково-кишкової транслокації мікробів [21], втрата ефекту бактеріальної патогенності, зменшення афінності зв'язування клітини-хазяїна з бактеріальною популяцією [11].

- Антитоксині ефекти:
 - а) блокування активних центрів патогенних рецепторів [8],
 - б) посилення вироблення антитіл проти токсину А *Clostridium difficile*,
 - в) опосередкування синтезу ферменту фосфатази у випадку інфікування патогенними *Escherichia coli*.
 - г) посилення продукції IgA ентероцитами тонкої кишки.

Розщеплення патогенних білків *S. boulardii* виявилось ефективнішим за подібний ефект, встановлений для найпоширеніших пробіотичних бактерій (лактобактерій). Окрім того, дані мікроскопічні гриби резистентні до дії різних антибіотиків [32].

S. boulardii своєю присутністю та/або метаболічною активністю можуть перешкоджати потенційно шкідливим бактеріям, що локалізовані на слизовій оболонці.

Загальна імунна стимуляція є перевагою для організму господаря, що дозволяє усунути патогени на ранній стадії. Цей ефект, опосередкований дріжджами, особливо важливий для підтримання мікробного середовища [33].

Щоб запобігти механічному знищенню кишкової мікробіоти організмом господаря, дуже важливо, щоб його компоненти прилипали до слизистих поверхонь [25]. Деякі пробіотики експресують поверхневі адгезини, які опосередковують адгезію до шарів слизової оболонки шляхом розпізнавання молекул-господарів, таких як трансмембранні білки (інтегрини або кадгерини) і компоненти позаклітинного матриксу (колаген, фібронектин, ламінін або еластин) [20]. Пробіотики також можуть впливати на виробництво муцину та бар'єрну функцію кишечника, тим самим

запобігаючи адгезії та подальшому проникненню патогенних організмів [12].

Муцин виробляється епітеліальними клітинами, щоб запобігти адгезії патогенних бактерій, тоді як пробіотики, як у випадку *S. Boulardii*, повинні мати можливість прилипати до слизової кишечника. Адгезія *S. boulardii* до слизової оболонки сприяє зниженню доступності місць зв'язування патогенів [9].

Зменшення запалення та секреції має явну симптоматичну перевагу та супроводжується швидшим відновленням мікробіоти, створюючи кишкове середовище, схоже на те, що є при здорових умовах.

Механізми дії *Saccharomyces boulardii* є складними і включає декілька основних аспектів:

- *S. boulardii* впливають на імунну систему, сприяючи збалансованій імунній реакції. Вони можуть знижувати запалення, регулювати вироблення цитокінів і стимулювати імунні клітини. При дисбактеріозі захищатиме від патогенів і їх токсинів, регенеруватиме клітини слизової оболонки та поліпшить їх ферментативну функцію.
- Загальна оздоровча стимуляція імунної системи. Може зв'язуватися з токсинами, що продукуються патогенними бактеріями та нейтралізувати їх.
- *S. boulardii* сприяє підтримці та відновленню рівноваги кишечної мікрофлори. Він може стимулювати розмноження корисних бактерій, таких як *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* та сприяти зменшенню чисельності патогенних мікроорганізмів.
- Дріжджі конкурують з патогенними бактеріями та грибами за доступ до харчових ресурсів і життєвого простору в кишечнику. Вони виробляють антибіотичні речовини та інші метаболіти, що знижують виживання патогенних організмів [20].

Для даних мікроорганізмів встановлений й пребіотичний ефект – клітинна стінка *S. boulardii* містить глюкани, манопротеїни та хітин, які служать субстратами для мікробної ферментації [30].

Деякі штами *S. boulardii* здатні продукувати високі концентрації оцтової кислоти. У свою чергу, зниження рН у травному організмі господаря внаслідок утворення оцтової кислоти має важливе значення для антимікробної активності коротколанцюгових органічних кислот. Комбінований ефект високої концентрації соляної кислоти та нижчого рН у шлунку може бути додатковим механізмом, який робить *S. boulardii* ефективним пробіотиком. Під час лікування антибіотиками та інфікування патогенами концентрація кисню також збільшується в шлунково-кишковому тракті [36], що може підтримувати антимікробну дію *S. boulardii*.

Захисний ефект *S. boulardii* пов'язаний із підтримкою бар'єрної функції та зменшенням шкідливих фізіологічних реакцій, викликаних токсинами і досягається шляхом вивільнення протеаз і розщеплення токсинів [26].

1.2. Сумісне культивування *Saccharomyces boulardii* і *Lactobacillus*

Уже тривалий час відомо про позитивні ефекти у випадку кокультивування мікроскопічних грибів (дріжджів) та окремих бактерій. Як свідчать літературні дані, одночасний ріст *Saccharomyces boulardii* і *Lactobacillus plantarum* створює деякі переваги з точки зору продуктивності, але однією з найбільш цікавих властивостей є здатність взаємної стимуляції росту [6].

Сумісне культивування лактобактерій і дріжджів можна здійснювати за допомогою різних методів, залежно від конкретного застосування і бажаного результату [16].

Згідно літературних даних, є три найбільш поширені методи сумісного культивування лактобактерій і дріжджів:

1. Одночасна інокуляція:

У цьому методі як лактобактерії, так і дріжджі одночасно інокулюють у середовище культивування. Середовище повинно бути придатним для росту обох мікроорганізмів. Цей метод забезпечує взаємодію та метаболічну кооперацію між лактобактеріями і дріжджами від початку процесу культивування. Сумісне культивування підтримується протягом усього періоду ферментації, і отримані продукти можуть мати поєднані характеристики обох мікроорганізмів.

2. Послідовна інокуляція:

У методі послідовної інокуляції лактобактерії і дріжджі інокулюються в середовище культивування на різних етапах ферментаційного процесу. Зазвичай, лактобактерії інокулюються спочатку, щоб вони могли створити сприятливі умови для росту дріжджів. Після певного періоду часу в середовище вводять дріжджі. Послідовна інокуляція може бути корисною, коли лактобактерії виробляють речовини, які сприяють росту дріжджів або коли головною метою є отримання певного метаболічного продукту дріжджів.

3. Супутня іммобілізація:

Спільна іммобілізація передбачає фізичне прикріплення або захоплення як лактобацил, так і дріжджів у матриці-носії, такій як альгінатні кульки або желатин. Іммобілізовані клітини потім вводять у систему бродіння. Спільна іммобілізація забезпечує безпосередню близькість і взаємодію між лактобактеріями та дріжджами, уможливлуючи метаболічну кооперацію. Цей метод також забезпечує покращену стабільність і захист клітин, дозволяючи багаторазове використання в процесах бродіння [7].

Важливо відзначити, що конкретні умови, культуральне середовище та параметри бродіння (наприклад, температура, рН, доступність кисню) повинні бути оптимізовані для спільного культивування лактобактерій і дріжджів, беручи до уваги вимоги та сумісність обох мікроорганізмів.

Для спільного культивування дріжджів і лактобактерій необхідне середовище, яке задовольняє потреби обох мікроорганізмів. Основні фактори, які слід враховувати при виборі спільного середовища, включають:

- рН. Дріжджі зазвичай краще ростуть в нейтральному або слабнокислому середовищі (рН близько 6-7), тоді як лактобактерії можуть потребувати кислого середовища (нижче рН 6).

- Живильні речовини. Дріжджі та лактобактерії мають різні вимоги до нутрієнтів. Дріжджі, зазвичай, потребують вуглеводів, амінокислот і певних вітамінів для свого росту, тоді як лактобактерії можуть використовувати вуглеводи, але часто вимагають додаткових джерел азоту, які можуть бути амінокислотами чи пептидами. Середовище має містити живильні речовини, які задовольняють потреби обох мікроорганізмів.

- Кисневий режим. Деякі штами дріжджів можуть рости в аеробних умовах, тоді як штами *Lactobacillus* вимагають анаеробних умов. Лактобактерії, зазвичай, розвиваються краще в анаеробних або мікроаерофільних умовах, де кисень обмежений. Спільне середовище повинно бути адаптовано до відповідного кисневого режиму, який підходить для обох мікроорганізмів.

Враховуючи ці фактори, можна налаштувати середовище шляхом оптимізації складу [7].

Культивування *Saccharomyces boulardii* і *Lactobacillus plantarum* може бути корисним, оскільки ці два мікроорганізми мають потенційні синергістичні взаємодії та, при цьому, виявляють позитивний вплив на стан макроорганізму. Спільне культивування *Saccharomyces boulardii* і *Lactobacillus plantarum* має свої переваги і недоліки. До позитивних аспектів сумісного культивування відносять:

- Синергія. Лактобактерії і дріжджі можуть взаємодіяти та використовувати метаболічні шляхи один одного, що може призводити до синергії у виробництві певних продуктів. Наприклад, лактобактерії можуть

виробляти органічні кислоти, які можуть бути використані дріжджами як джерело для продукції ефективних алкогольних або бродильних продуктів.

- **Покращена якість продуктів.** Спільне культивування лактобактерій і дріжджів може призводити до покращення смакових характеристик ферментованих продуктів. Наприклад, виноградний сік, що зброджується сумісно дріжджами і лактобактеріями, може мати більш складний і цікавий смак порівняно з традиційно виготовленими продуктами.

- **Стабільність культури.** Лактобактерії та дріжджі можуть взаємодіяти та доповнювати один одного в культурі, що стабілізуватиме культивування. Лактобактерії можуть продукувати речовини, які сприяють збереженню дріжджів і запобігають забрудненню культури шкідливими мікроорганізмами.

Взаємодія цих двох мікроорганізмів може підсилити їхні корисні ефекти та сприяти збалансованому складу мікрофлори.

До негативних аспектів сумісного культивування відносять:

- **Конкуренція між мікроорганізмами.** Лактобактерії і дріжджі здатні конкурувати один з одним за простір, поживні речовини та інші ресурси. Це виявлятиметься у незбалансованого рості одного з мікроорганізмів, що може негативно вплинути на виробництво та якість кінцевого продукту.

- **Несумісність ферментаційних параметрів.** Лактобактерії і дріжджі можуть мати різні оптимальні умови для росту і ферментації, такі як температура, рН, кисневий режим тощо. Використання спільного середовища може створювати виклики при забезпеченні оптимальних умов для обох мікроорганізмів.

- **Складність контролю.** Спільне культивування лактобактерій і дріжджів може бути складним з точки зору контролю ферментаційного процесу. Різні режими росту і ферментації мікроорганізмів можуть вимагати

складних налаштувань та моніторингу, щоб забезпечити оптимальні умови для обох культур [16].

S. boulardii і *L. plantarum* здатні утворювати бактеріо- та фунгіцидні сполуки, засоби на їх основі можуть використовуватися як протигрибкові та протибактеріальні препарати. Вони можуть спільно діяти для боротьби з патогенними мікроорганізмами, такими як *Candida* або патогенними штамами бактерій. Пробіотичні дріжджі та молочнокислі бактерії може продукувати антимікробні сполуки, такі як органічні кислоти, пероксид водню або бактеріоцини, які можуть впливати на ріст і виживання іншого організму.

S. boulardii і *L. plantarum* конкурують за прикріплення до специфічних рецепторів на епітеліальних клітинах кишечника. Це впливає на їх здатність колонізувати та функціонувати в кишечнику.

Враховуючи це, важливо пам'ятати, що антагоністичні взаємодії між *S. boulardii* і *L. plantarum* можуть бути контекстуальними і залежать від умов середовища, концентрації організмів і багатьох інших факторів.

Отже, *Saccharomyces boulardii* – одноклітинні гриби, які, очевидно, можуть бути потенційно ефективними для потреб аквакультури. Вони покращують травлення і засвоєння поживних речовин, сприяють зміцненню імунної системи, перешкоджають розмноженню хвороботворних бактерій і грибів, зменшують запальні процеси в шлунково-кишковому тракті тварин.

1.4. Технології біоінкапсуляції в живі корми

Живі корми (морський чи прісноводний зоопланктон) можуть бути використані як потужні біологічні носії завдяки, насамперед, малому розміру та легкому вирощуванню.

Ці «живі контейнери» можуть доставляти в організм риби профілактичні й лікувальні засоби, біологічно активні сполуки, есенціальні нутрієнти, пробіотики.

Процес вакцинації – метод індукції захисних імунних реакцій у риб проти інфекційних патогенів шляхом впливу на них непатогенних форм або компонентів мікроорганізмів [35]. Вакцинація сприяє екологічній, соціальній та економічній стійкості глобальної аквакультури як ефективний метод боротьби з широким спектром бактеріальних і вірусних захворювань. Звичайна рибна вакцина містить або створює молекулу, яка функціонує як антиген. Цей компонент згодом активує вроджену та/або адаптовану імунну відповідь риби проти певної хвороби [14].

Найважливішою формою аквакультурної вакцинації є пероральна вакцинація. Вакцини для перорального застосування можна вводити шляхом збагачення складеного корму, шляхом інкапсуляції в різноманітних полімерах або шляхом біоінкапсуляції в живих кормах, таких як коловертки, дафнія та артемія. У комбінованих кормах пероральні вакцини розроблені або шляхом нанесення антигену на корм методом розпилення, або змішування антигену з кормом під час їх виробничого процесу для спільної обробки. Перевага доставки антигену пероральним шляхом полягає в тому, що вона не викликає стресу та її легко вводити великій кількості риб одночасно [22]. Введення пероральних вакцин через комбіновані корми пов'язане з ймовірністю того, що антиген буде перетравлений травними ферментами риб. У цьому аспекті підхід передбачав введення вакцини в живий корм, а потім годування нею мальків видів риб [9]. Вважається, що вакцина біоінкапсулюється в ліпідну композицію організмів живого корму, що запобігає її деградації травними ферментами риб [28].

Пероральні вакцинації мають кілька недоліків, включаючи необхідність у великій кількості антигенів, необхідність збереження антигенів під час їх проходження через шлунок, а також композицію вакцин для підвищення стимуляції захисного імунітету. Певні досягнення, здійснені науковою спільнотою для розширення меж пероральної вакцинології у риб, — для покращення виробництва антигенів для бактерій і вірусних патогенів, різноманітні технології інактивації нативних

цільноклітинних антигенів і виробництво субодиничних вакцин у гетерологічному білку. *Escherichia coli* та дріжджі є найбільш часто використовуваними системами експресії білка для виробництва субодиничних антигенів у рибних вакцинах [15].

Інактивовані вакцини або вбиті цільноклітинні вакцини – це суспензія термічно або хімічно знищених патогенів, які можуть викликати певну захисну імунну відповідь проти таких патогенів при введенні у водних організмів, чутливих до інфекційних захворювань. Інактивовані вакцини використовуються для придушення бактеріальних інфекцій у риб, у тому числі тих, що спричиняють вібріоз та хвороби *Aeromonas septicemia*, такі як *V. anguillarum*, *V. ordalli*, *Y. ruckeri*, *V. salmonicida* та *A. salmonicida* [24].

Були досліджені різні ефективні методи доставки, щоб зберегти цілісність антигену до того, як він досягне цільової імунологічної ділянки. Такі системи доставки дотримуються техніки інкапсуляції, коли антигенну сполуку інкапсулюють у носій, який може захистити її від несприятливих шлункових умов риби [22]. Значення методів інкапсуляції, коли композицію антигену інкапсульовано з кормом, легше вводити та супроводжувати пероральний шлях споживання корму. Існують, по суті, три методи розробки вакцин за допомогою методів інкапсуляції, таких як використання адгезивів, таких як харчова олія або желатин, для підгодівлі готового корму порошком вакцини, розпилення готового корму рідкою суспензійною вакциною та спільна обробка антигену з кормом під час виробничий процес [3].

Окрім різних методів інкапсуляції під час вакцинації в аквакультурі, іншою стратегією є введення вакцини шляхом біоінкапсуляції живих кормів, таких як артемія, дафнія та коловертки.

Науплії морської креветки *Artemia* є найбільш широко використовуваним живим кормом у вирощуванні личинок риби. Харчова якість артемії може бути додатково посилена для забезпечення відповідних потреб личинкам риб шляхом біоінкапсуляції відповідних кількостей

частинок або емульгованих сполук, багатих поліненасиченими жирними кислотами. Цей метод біоінкапсуляції, також відомий як збагачення артемій, має значний позитивний вплив на продукції личинок риб з точки зору їх виживання, росту, успішного метаморфозу, реактивності та стресостійкості [17].

Живі дріжджі часто використовуються як корм для різних організмів, включаючи дафній. Дріжджі містять велику кількість білків, вуглеводів та інших поживних речовин, що робить їх привабливими як харчовий джерело.

Дафнії легко розмножуються у водному середовищі і мають високу репродуктивну потужність. Це означає, що їх можна легко вирощувати в контрольованих умовах, забезпечуючи постійний доступ до живого корму личинок риби. Використання дафнії як живого корму має кілька переваг. Вона має невеликі розміри, що дозволяє личинкам риби здобувати їжу легко та ефективно. Крім того, дафнії багаті на жирні кислоти, вітаміни та мінерали, які сприяють здоровому росту та розвитку личинок.

Деякі види риб, зокрема карпові та **трофейні** види, часто харчуються дафніями на ранніх стадіях свого життєвого циклу. Тому дафнії використовуються в аквакультурі для забезпечення належного харчування рибних личинок та забезпечення їх здорового росту.

1.5. *Saprolegnia* – збудник інфекційних хвороб риб

Saprolegnia – еукаріотичний патоген риб, що розповсюджений у прісноводних середовищах. Патоген має вигляд білих або сіруватих ниткоподібних структур, подібних до пуху або волосся, які з'являються на поверхні тіла хазяїна. Ці нитки складаються з міцелію – грибкових гіф, які проникають у тканини тварин і виділяють ферменти для розкладання органічних речовин [4].

Saprolegnia parasitica є найбільш вірулентним збудником хвороби сапролегніоз, яка викликає нищівні інфекції прісноводних риб [34], тоді як інші види *Saprolegnia*, такі як *S. diclina* та *S. australis*, інфікують рибу та її

ікру [29]. Види *Saprolegnia* можуть спричинити значні втрати при вирощуванні лососевих і відповідальні за «зимову загибель» в аквакультурі сома.

Патоген на перших етапах вражає поверхневі тканини, включаючи плавники або голову, і в подальшому поширюється на всю поверхню тіла риби. Коли вся поверхня тіла буде зараженою, тоді інфекція може розповсюдитися на внутрішні органи, а саме у нирки, печінку, травний тракт та в селезінку. Інфіковану рибу можна розпізнати за білими плямами на шкірі та зябрах, схожими на пух [34]. Розмножуються ооміцети та, у тому числі сапролегнії, декількома способами:

- Безстатеве розмноження відбувається за допомогою окремих, відокремлених від основної маси міцелію гіф, гем – особливих потовщених невеликих фрагментів міцелію, але, головним чином, за допомогою рухливих і дуже жвавих зооспор, які у величезних кількостях формуються в зооспарангіях – спеціалізованих відростках гіф, відокремлених від інших перегородкою.

- Статеве розмноження сапролегнієвих здійснюється за допомогою особливих статевих репродуктивних структур – гаметангіїв – органів, де формуються статеві клітини. Жіночий гаметангій називається оогонієм, чоловічий – антеридієм. В оогоніях розвиваються яйцеклітини. В антеридії знаходиться цитоплазма з гаплоїдними ядрами, диференційовані гамети не утворюються. Антеридій наближається до оогонія, щільно прилягає до нього і випускає один або кілька відростків, що проникають через пори оболонки до яйцеклітин. За цими відростками гаплоїдні ядра антеридія перетікають у яйцеклітини. Зиготи, що утворилися після злиття ядер, покриваються щільною подвійною оболонкою, перетворюючись на ооспори. Після деякого періоду спокою за сприятливих умов ооспора проростає, утворюючи нові гіфи.

Saprolegnia здатна перетворювати як поживний субстрат будь-яку органічну речовину: залишки корму, гниючі частини рослин, насіння тощо.

Для виділення *Saprolegnia* використовують різний біологічний матеріал, наприклад пошкоджений епідерміс чи шкірний слиз. Культивувати ці гриби можна й на агаризованих спеціальних середовищах або спеціальних поживних середовищах, що містять антибіотики. Одне з таких середовищ запропоноване Willoughby (1984) та модифіковане Vega-Ramírez (2008) містить: D-глюкозу 16,7 мМ; розщеплений казеїнпептон 1,3 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 мМ; KH_2PO_4 10 мМ; CaCl_2 0,5 мМ і Na_2HPO_4 5 мМ та 500 мг/л ампіциліну.

Отже, *Saccharomyces boulardii* – дріжджі, які використовується як добавки до їжі або пробіотичні засоби. Вони виявляють згубний вплив на патогенні мікроорганізми, стимулюють розвиток аутохтонної шлунково-кишкової мікрофлори та здійснюють імуностимулюючу та імуномодулюючу функцію. З іншого боку, *Saprolegnia* – прісноводний гриб, патогенний для водних організмів, що викликає важкі ураження шкіри та плавників риб. Тому, представляє інтерес дослідження можливості використання *Saccharomyces boulardii* як пробіотика для потреб аквакультури.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом дослідження виступали чисті культури молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* (люб'язно надані нам співробітниками Ужгородського національного університету), дрібних ракоподібних *Daphnia magna* та відновлені нами з лікарського препарату *Saccharomyces boulardii*.

Культивування мікроорганізмів здійснювали на елективних поживних середовищах:

1. *Lactobacillus* у середовищі де Мана, Рогоза й Шарпа (MRS), до складу якого входять: пептон, м'ясний екстракт, дріжджовий екстракт, глюкоза, твін-80, амоній цитрат, магній сульфат, марганець сульфат, натрій гідрофосфат, агар-агар, вода очищена;

2. *Saprolegnia* у картопляно-декстрозному агарі (PDA), що відповідно містило: картопляний бульйон (приготування здійснювали з 200 г картоплі в 1 л дистилату), декстроза – 20 г/л та агар-агар – 20 г/л, ампіцилін – 500 мг/л.

3. *Saccharomyces boulardii* у синтетичному середовищі Рідера, до складу якого входило (г/л): джерело карбону, сульфат амонію – 3 г/л, сульфат магнію – 0,7 г/л, нітрат кальцію – 0,04 г/л, хлорид натрію – 0,5 г/л, дигідрофосфат калію – 1,0 г/л, гідрофосфат калію 1,0 г/л.

Відновлення вихідних культур послідовно проводили з використанням відповідних рідких та щільних поживних середовищ: лактобактерії у середовищі MRS за температури 37 °C впродовж 24 год; дріжджі у середовищі Рідера 30 °C впродовж 48 год.

Виділення накопичувальної культури патогенних грибів роду *Saprolegnia* здійснювали з прісної води (міська стояча водойма), використовуючи тваринний органічний субстрат як джерело карбону та нітрогену. Чашку Петрі витримували впродовж 7 діб за температури 22 °C та 16-денному фотоперіоді. Ідентифікацію мікроорганізму здійснювали

візуально та мікроскопічно, шляхом приготування фіксованого забарвленого препарату.

Виділення чистої культури патогену здійснювали на елективному середовищі шляхом вичерпного штрихування. Принцип цього методу полягає в розподілі мікробіологічного петлею досліджуваного матеріалу на поверхню агаризованого живильного середовища з отриманням колоній із ізольованих клітин.

Чистоту виділених культур перевірили візуально та шляхом мікроскопічного контролю. Під час візуального контролю розглядали ріст мікроорганізмів уздовж штриха на скошеному агаризованому середовищі. Для мікроскопічного контролю були відібрані колонії, які були чітко відокремлені від інших колоній і демонстрували рівномірний характер росту. Для мікроскопічного контролю утворених гіф та спорангій готували фіксований препарат [2].

Посів культури мікроорганізмів. У чашках Петрі обережно припіднімали кришку і на центр агаризованої пластинки вносили мікропіпеткою краплину суспензійної досліджуваної культури. За допомогою стерильної бактеріологічної петлі обережно розподіляли бактерії рівномірно по всій поверхні середовища. На зовнішній стороні дна чашки робили позначки і поставили у термостат на 1-2 доби.

Кількість життєздатних клітин визначали за методом Коха. Суть цього методу полягає в посіві на тверде середовище, розлите у чашки Петрі, досліджуваного матеріалу та наступному підрахунку утворених колоній (КУО). Вважається, що кожна колонія є результатом одноклітинної проліферації.

Загальну кількість біомаси мікроорганізмів визначали опосередковано шляхом вимірювання оптичної густини культури при 540 нм при вирощуванні мікроорганізмів у рідких поживних середовищах на КФК-2. За контроль використовували те саме охолоджене живильне середовище, на якому культивували мікроорганізми.

Для визначення типів взаємовідносин (антагонізму) використовували метод відтермінованого антагонізму. При цьому ключова культура (*Saccharomyces boulardii*) висівалася петлею по діаметру у чашці Петрі на тверде поживне середовище. Після 24 год культивування за температури 28 °С у термостаті перпендикулярно висівали тест-культури мікроорганізмів – *Lactobacillus* чи *Saprolegnia*. У першому випадку використовували середовище загального типу – МПА, у другому – спеціальне для культивування грибів – агар Сабуро. Через 24-72 год оцінювали ступінь інгібування розвитку мікроорганізмів, вимірюючи величину зони лізису колоній тест-культур.

Сумісне культивування пробіотичних дріжджів та молочнокислих бактерій здійснювали на уніфікованому середовищі згідно власної рецептури. Основними компонентами середовища були (в г/л): пептон – 5, глюкоза – 10, хлорид натрію – 5, агар-агар – 20.

Вміст посівного матеріалу дослідних культур складав у різних варіаціях 5-10%. Вирощування проводили впродовж двох діб за температури 30 °С.

Біоінкапсуляцію моно- чи дикомпонентних пробіотичних культур у прісноводний планктон (*Daphnia magna*) здійснювали шляхом вигодовування дрібних ракоподібних відповідним кормовим субстратом впродовж 6 діб.

Вирощували дафнії у ємностях місткістю 0,25 л. Початкова щільність складала 15 особин. В умовах кліматичної кімнати забезпечувався 16-годинний фотоперіод та температура 22 °С. Кожні 48 год вносили досліджувані суспензії дріжджів та молочнокислих бактерій, стандартизовану у кількості $4 \cdot 10^6$ КУО дріжджів в об'ємі 200 мкл. Як контрольний кормовий субстрат для зоопланктону використовували водну суспензію *Saccharomyces cerevisiae* такої ж концентрації.

Для підрахунку кількості клітин у кормовому субстраті використовували камеру Горяєва, за потреби здійснювали відповідне

розведення. Для цього використовували світловий мікроскоп (сумарне збільшення у 100 разів).

Показники виживаності дафній визначали на 24, 48, 72 год від початку насичення у контрольних та дослідних зразках. Проводилися вирахування кількості мертвих та живих особин.

Експериментальні дані опрацьовували статистично з використання програмного забезпечення Microsoft Excel.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що комплексні засоби, основою яких є *Saccharomyces boulardii*, давно та успішно використовуються для нормалізації якісно-кількісного складу аутохтонної мікрофлори людей у випадку антибіотикотерапії чи розвитку інфекційних хвороб [21]. На сьогодні у літературних джерелах відсутні дані щодо застосування подібних препаратів для потреб аквакультури, хоча відомо, що дані дріжджі виявляють вагомий фунгіцидний ефект. Вважаючи на те, що значну кількість випадків хвороб риб спричиняє водна цвіль *Saprolegniales*, наш інтерес привернуло досліджень взаємовідносин патогенного та пробіотичного мікроорганізмів.

Тому на першому етапі експериментальних досліджень нами проводилося відновлення культури *S. boulardii* (з лікарського засобу «Ентерол 250») та отримання накопичувальної й чистої культур *Saprolegnia*.

Для отримання *S. boulardii* використовували рідке та щільне поживне середовище Рідера. Попередньо нами було розведено матеріал із однієї капсули препарату в рідкому середовищі у стерильній пробірці. Висів готового розведеного матеріалу проводили на щільне поживне середовище методом вичерпнувального штрихування. Чашки поміщали у термостат за температури 30 °C на 48 год. Після чого проводили аналіз сформованих колоній та здійснювали мікробіологічний контроль. Колонії *S. boulardii* відповідали наступним критеріям: розмір – 8 мм, форма – овальна, колір – жовто-білий, рельєф – випуклий, характер краю – рівний.

Для мікроскопічного контролю були відібрані ізольовані колонії, які були чітко відокремлені від інших колоній і демонстрували рівномірний характер росту (рис. 3.1). Як свідчить мікроскопічний аналіз мікроорганізми відновлених культур повністю відповідали морфотипу *S. boulardii* – кулясті клітини, що формували своєрідний малюнок

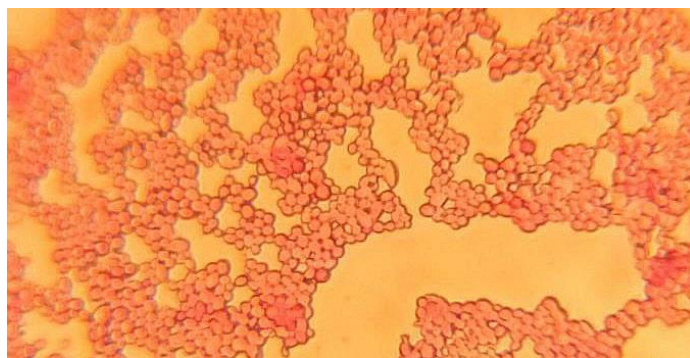


Рис. 3.1. Мікропрепарат виділеної чистої культури *Saccharomyces boulardii*

Saprolegnia – це рід грибів, які, зазвичай, ростуть у водних середовищах, особливо в прісних водоймах, а також на ґрунті або на рослинах.

Для отримання накопичувальної культури *Saprolegnia* в лабораторних використовували як органічний субстрат тваринний матеріал (двокрила комаха). Розташовували його у центрі чашки Петрі заповненою ставковою водою (міська водойма). Через 4-7 доби спостерігати ріст гриба на тілі мухи, з'явився помітний білий пух, що складається з гіф сапролегнієвих грибів.

Для виділення чистої культури використовували картопляно-декстрозний агар, що показане для виділення ниткоподібних грибів. Стерильною бактеріологічною петлею було відділено *Saprolegnia* з тіла комахи і методом штриха нанесено на поживне середовище. Вирощували культуру в термостаті за температури 30 °C впродовж 72 год.

Для мікроскопічного контролю були відібрані ізолювані колонії, яким притаманний рівномірний ріст. Мікроскопічний аналіз показав наявність характерних, для сапролегній, гіф та зооспор (рис. 3.2).



Рис. 3.2. Мікропрепарат виділеної чистої культури *Saprolegnia*

Saccharomyces boulardii та *Saprolegniales* можуть відображати різні типи взаємодії. Взаємодія може бути досить складною і залежати від багатьох факторів, таких як типи метаболітів, конкуренція за поживні речовини, вироблення антимікробних речовин тощо.

Для визначення типу взаємовідносин між *Saccharomyces boulardii* та *Saprolegnia*, мікроорганізми засівали «газоном» на поверхню агаризованого середовища Сабуро – спочатку дріжджі, а через добу – водну цвіль. Вирощування здійснювали за температури 30 °C впродовж 24 год.

Як свідчать експериментальні дані, *Saccharomyces boulardii* демонструє інгібуючий вплив на розвиток *Saprolegnia*, на 100% пригнічуючи її ріст на середовищі Сабуро.



Рис. 3.3. Антагоністичний вплив *Saccharomyces boulardii* на розвиток *Saprolegnia*

Ймовірно, *S. boulardii* може виділяти антимікробні речовини, які спричинятимуть загибель або гальмувати розвиток *Saprolegniales*. Це можуть бути антибіотики, ензими або інші речовини. Як свідчать літературні джерела, *S. boulardii* може синтезувати екзополісахариди, які утворюють матрицю навколо клітин і можуть здійснювати захисну функцію щодо конкурентних мікроорганізмів.

На наступному етапі спостережень, вважаючи на відомі випадки успішного кокультивування *S. boulardii* та *Lactobacillus*, ми намагалися в

уніфікованому середовищі створити асоціації обидвох культур, які відрізнялися часткою посівного матеріалу кожного з них.

Для визначення компонентів середовища для спільного культивування, було проведено порівняння і співставлення ідентичних складових компонентів. В результаті оптимальним за складом та економічно доцільним по складу виявилось середовище, яке обов'язково містило (г/л): пептон – 5; глюкоза – 10; натрій хлорид – 5; агар-агар – 20.

Застосування методу відтермінованого антагонізму не виявило значного пригнічення взаємного розвитку обох культур (зона лізису, в середньому, складала 5 мм, рис. 3.5).



Рис. 3.4. Піст *Saccharomyces boulardii* і *Lactobacillus* на МПА через 24 год сумісного культивування

Апробовували наступні асоціації мікроорганізмів:

- *S. boulardii* : *Lactobacillus* – 10 % : 10 %;
- *S. boulardii* : *Lactobacillus* – 5 % : 5 %;
- *S. boulardii* : *Lactobacillus* – 5 % : 10 %;
- *S. boulardii* : *Lactobacillus* – 10 % : 5 %

Визначення оптичної густини культурального середовища, що опосередковано вказує на нагромадження біомаси показало, що найактивніше мікроорганізми розвиваються при комбінації – *S. boulardii* : *Lactobacillus* – 5 % : 5 %; *S. boulardii* : *Lactobacillus* – 10 % : 5 % (рис. 3.6).

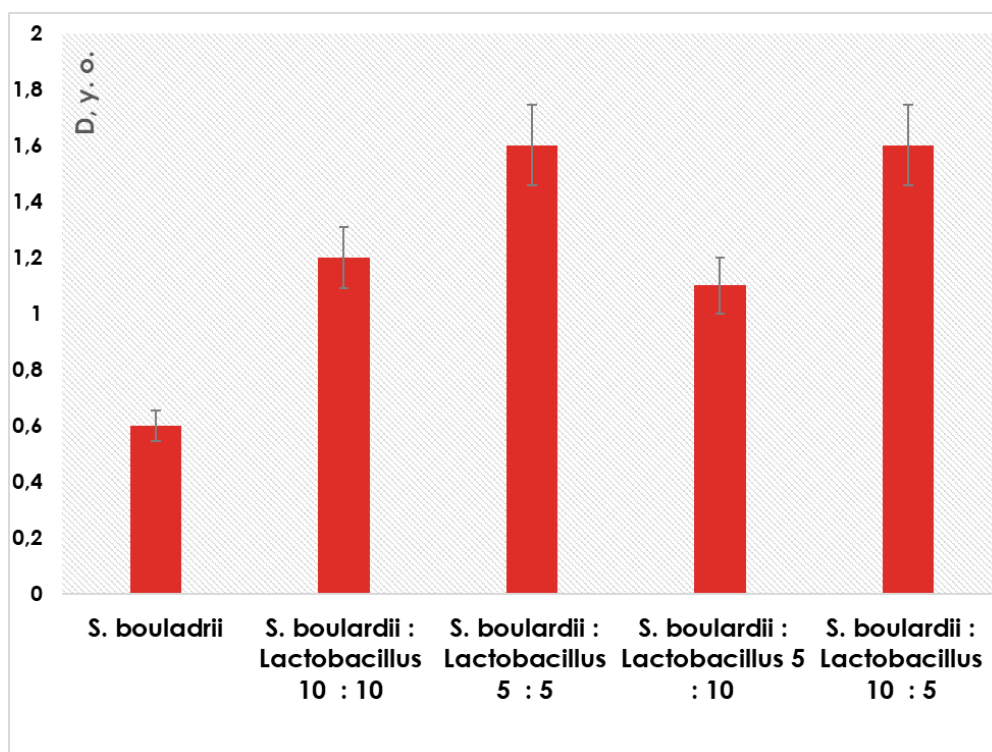


Рис. 3.5. Показники оптичної густини за умов моно- та кокультивування *S. boulardii* й *Lactobacillus*

Подібну тенденцію зафіксували й при підрахунку колонієутворюючих одиниць дріжджів (рис. 3.6). У випадку формування усіх типів асоціацій кількість живих нижчих еукаріот в 1,25-1,5 рази була вищою, ніж за умов монокультивування.

Очевидно, що компонентний склад поживного середовища виявився оптимальним для розвитку обох мікроорганізмів та сприяв їх синергічний взаємодії.

На жаль, не виявилось можливим провести подібний підрахунок у випадку лактобактерій, оскільки на середовищі MRS-агарі нами відзначався посилений глибинний ріст культури та утворення численних повзучих колоній.

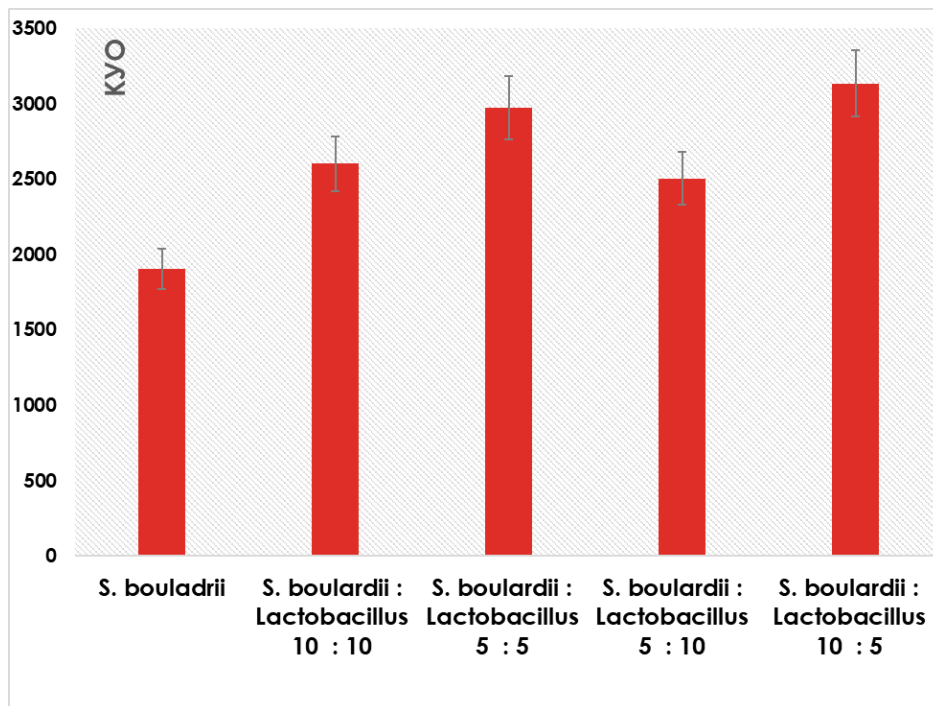


Рис. 3.6. Кількість КУО *S. boulardii* на елективному поживному середовищі за умов моно- та кокультивування

На третьому етапі експериментальних досліджень нами здійснена оцінка впливу модифікованого кормового субстрату на виживаність *Daphnia magna* (рис. 3.7). Дослідні контролі були представлені прісноводним зоопланктом, який вигодовували монокультурою *S. boulardii* чи асоціацією їх з лактобацилами. Як контрольний кормовий субстрат для зоопланктону використовували водну суспензію *Saccharomyces cerevisiae*.

Для отримання клітинної біомаси мікроорганізмів здійснювали центрифугування при 3000 g впродовж 20 хв. Надалі, кількість клітин дріжджів стандартизували шляхом підрахунку у камері Горяєва.

Дослідні групи вигодовували суспензією дріжджів і молочнокислих бактерій (чи лише дріжджів), стандартизовану у кількості $4 \cdot 10^6$ КУО дріжджів, об'ємом 200 мкл.

Показники виживаності дафній реєстрували на 48, 72, 120 год від початку насичення у контрольному та дослідних зразках. Проводилися вирахування кількості живих і мертвих особин.

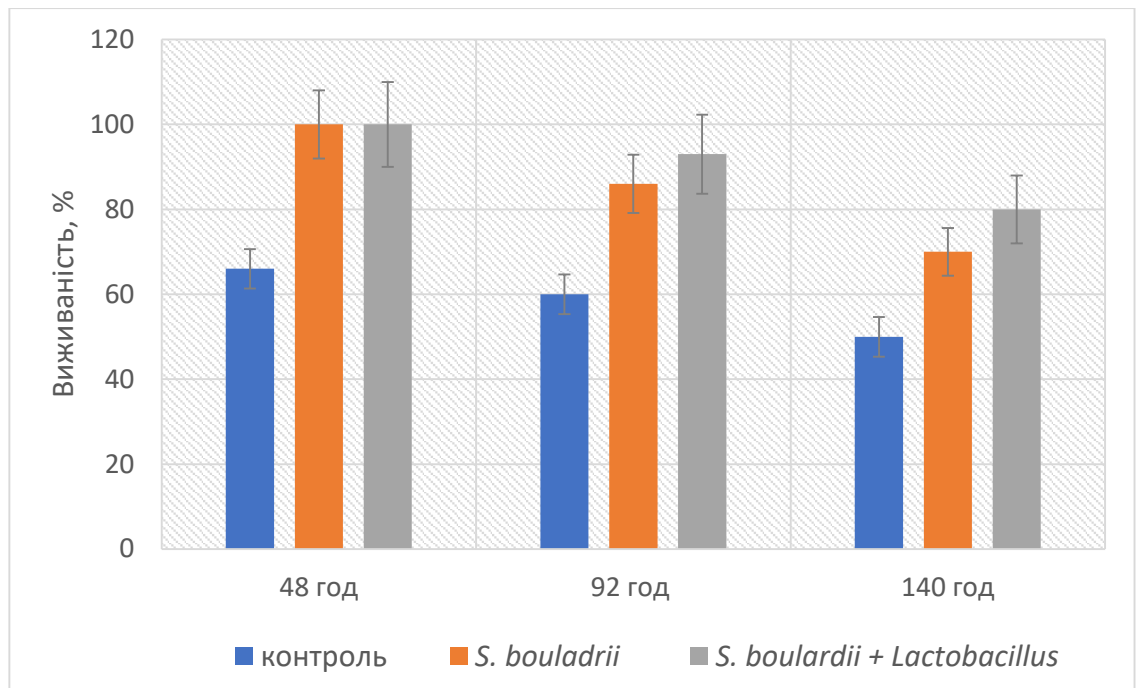


Рис. 3.7. Вживаність *Daphnia magna* за умов вигодовування модифікованим кормовим субстратом

Експериментальні дані вказують на однозначну позитивну дію використання модифікованого кормового субстрату на основі *S. boulardii*. Вживаність дрібних ракоподібних, що формують значну кількість прісноводного субстрату відрізнялася вже через 2 доби вигодовування – у випадку контролю кількість загинув особин *Daphnia magna* наближувалася до 35%, натомість у контрольних групах жодних негативних ефектів не відзначали.

Подальше використання зміненого корму демонструвало високий відсоток виживаності дафній – на 4 добу експерименту він складав близько 90%, а на шосту – 75%. При цьому у контрольній групі залишилося близько половини першочергової кількості особин дафній.

Слід зазначити відсутність достовірної різниці у випадку використання як монокультури *S. boulardii*, так і її асоціація з *Lactobacillus*. Проте, ймовірно, наступне використання такого збагаченого різними пробіотиками зоопланктону виявиться оптимальним для рідкісних та цінних сортів риби. Причиною цього є висвітлені в літературі чисельні дані

щодо локалізації *Lactobacillus* у різних біотопах риб, а також висока гідролітична активність даних мікроорганізмів, що сприятиме засвоюванню кормів.

Отже, результати експериментальних досліджень свідчать про можливість використання *S. boulardii* для потреб аквакультури як мікроорганізму, що проявляє значний фунгіцидний ефект щодо водної цвілі *Saprolegnia* та ефективно сприяє виживаності *Daphnia magna* за умов вигодовування її дріжджевмісним модифікованим кормовим субстратом.

ВИСНОВКИ

1. *Saccharomyces boulardii* виявляє інгібуючий вплив на розвиток *Saprolegnia*, на 100% пригнічуючи її ріст на середовищі Сабуро.
2. Кокультивування *S. boulardii* та досліджуваних представників роду *Lactobacillus* не демонструє ознак взаємного пригнічення розвитку мікроорганізмів (при застосуванні методу відтермінованого антагонізму зона лізису не перевищує 5 мм).
3. Визначення оптичної густини культурального середовища, що опосередковано вказує на нагромадження біомаси показало, що найактивніше мікроорганізми розвиваються в асоціаціях, де вміст посівного матеріалу складає – 5 % : 5 % та 10 % : 5 % (*S. boulardii* : *Lactobacillus*).
4. Застосування як кормового субстрату монокультури *S. boulardii* чи її асоціації з *Lactobacillus* для вигодовування *Daphnia magna* призводить до збільшення виживаності дрібних ракоподібних.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гопчук О. М., Герасимова Т. В., Морозова О. В. Пробиотики: сучасний погляд на терапевтичну ефективність. НМАПО імені П. Л. Шупика – 2015 р. № 6 (92), С. 56-61.
2. Радченко О. С. Фізіолого-біохімічні властивості мікроорганізмів та методи їх визначення. К: КНУ. 2011. 212 с.
3. Assefa A., Abunna F. Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. – 2018 – Mode of access: <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>
4. Bastide P., Leung W. L., Hintz W. E. Species composition of the genus *Saprolegnia* in fin fish aquaculture environments, as determined by nucleotide sequence analysis of the nuclear rDNA ITS regions. *Fungal Biology* – 2015. Vol. 119. № 1. P. 27-43.
5. Bullejos, F. J., P. Carillo, E. Gorokhova, J. M. Medina-Sanchez, and M. Villar-Argaiz. Nucleic acid content in crustacean zooplankton: Bridging metabolic and stoichiometric predictions. *PLoS One* – 2014. Vol. 9
6. Cheirsilp, B., Shimizu H., and Shioya S. Kinetic modeling of kefir production in mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry* - 2007. Vol. 42. P. 570-579
7. Chen C. Y., Chen S. W., and Wang H. T. Effect of supplementation of yeast with bacteriocin and *Lactobacillus* culture on growth performance, cecal fermentation, microbiota composition, and blood characteristics in broiler chickens. *Asian-Australas J Anim Sci.* – 2017. Vol. 30. № 2. P. 211–220.
8. Czerucka D., Piche T., Rampal P. Yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* Vol. 26 - 2007, P. 767–778.
9. Edwards-ingram L., Gent M., Hoyle D., Hayes A., Stateva L., Oliver S. Comparative Genomic Hybridization Provides New Insights Into the Molecular Taxonomy of the *Saccharomyces Sensu Stricto* Complex. *Genome Res.* – 2004. Vol.14. P. 1043–1051.

10. Embregts C.W.E, Forlenza M. Oral vaccination of fish: lessons from humans and veterinary species. *Dev Comp Immunol* Vol. 64. - 2016 P.118–137. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.024>
11. Fietto, J.L., Araújo R.S., Valadão F.N., Fietto L.G., Brandão R.L., Neves M.J., Gomes F.C.; Nicoli J.R., Castro I.M. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Can. J. Microbiol* Vol. 54. – 2004 P. 615–621.
12. Gogineni, V.K.; Morrow, L.E. Probiotics: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *J. Probiotics Heal.* - 2013, P. 1-2.
13. Hai N. V. The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology.* – 2015. P. 917-935.
14. Harikrishnan R., Balasundaram C., Heo M-S. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*– 2011. Vol. 317 P. 1–15. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.039>
15. Hwang J.Y., Kwon M.G., Seo J.S. et al. Current use and management of commercial fish vaccines in Korea. *Fish Shellfish Immunol* – 2020. Vol.102 P. 20–27. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.004>
16. L. Istiqomah, E. Damayanti, A. E. Suryani, M. F. Karimy, D. Maknuna and Lutfiani. Synergistic effect between *Lactobacillus plantarum* AKK30 and *Saccharomyces cerevisiae* B18 and the probiotic properties of microencapsulated cultures. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2018. Vol. 251
17. Kunasundari B., Kokila., Nor I. Beneficial Properties of Probiotics. *Trop Life Sci Res.* - 2016. Vol. 27. № 2. P. 73–90.
18. Liti G., Carter D.M., Moses AM, et al. Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature.* - 2009; Vol. 458. № 7236. P. 337–341.
19. McFarland L.V., Bernasconi P. *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. *Microbial Ecology in Health and Disease* 6. – 1993 P.157–171.

20. McFarland L.V. Common Organisms and Probiotics: *Saccharomyces boulardii*. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology* - 2017. P. 145–164.
21. McFarland L.V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J. Gastroenterol. WJG* – 2010. Vol. 16. P. 2202.
22. Mutoloki S., Munang'andu H.M., Evensen. Oral vaccination of fish - antigen preparations, uptake, and immune induction. *Front Immunol* – 2015. Vol. 6. P. 519. – Mode of access: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00519>
23. Pais P., Vanda A., Melike Y. Teixeira C., Fungi J. *Saccharomyces boulardii*: What Makes It Tick as Successful Probiotic? *J Fungi (Basel)* – 2020. Vol. №. 6. P. 78.
24. Plant K.P., Lapatra S.E. Advances in fish vaccine delivery. *Dev Comp Immunol* – 2011. Vol. 35. P. 1256–1262. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.007>
25. Plaza-Diaz J. Mechanisms of Action of Probiotics. / [Ruiz-Ojeda, F.J.; Gil-Campos, M.; Gil, A.] // *Adv. Nutr.* – 2019. Vol. 10. P. S49–S66.
26. Pontier-bres R., Rampal P., Peyron J., Munro P., Lemichez E., Czerucka D. The *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 Strain Shows Protective Effects against the *B. anthracis* LT Toxin. *Toxins (Basel)* – 2015. Vol. №. 7. P. 4455–4467
27. Rombout J., Yang G., Kiron V. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* – 2014. Vol. 40. P. 634–643. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.020>
28. Samat N., Yusoff F., Rasdi N., Karim M. Enhancement of live food nutritional status with essential nutrients for improving aquatic animal health: a review. *Animals (Basel)* – 2020. P.10. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/ani10122457>

- 29.Sandoval-Sierra, J.V.; Martín, M.P.; Diéguez-Uribeondo, J. Species identification in the genus *Saprolegnia* (Oomycetes): Defining DNA-based molecular operational taxonomic units. *Fungal Biol.* - 2014. P. 118, 559–578.
- 30.Schneider S., Girard-Pipau F., Filippi J., et al. Effects of *Saccharomyces boulardii* on fecal short-chain fatty acids and microflora in patients on long-term total enteral nutrition. *World J Gastroenterol.* – 2005. Vol. 11. № 39. P. 6165–6169.
- 31.F. Senne D., Bajic J., Vila A., Sánchez M. Complex yeast–bacteria interactions affect the yield of industrial ethanol fermentation. *Nature Communications.* – 2021. Vol. 12. № 1498
- 32.Sharifi-Rad J., Rodrigues C.F., Stojanovic-Radic Z., Dimitrijevic M., Aleksic A., Neffe-Skocinska K., Zielinska D., Kołożyn-Krajewska D., Salehi B., Milton P. S. Probiotics: Versatile bioactive components in promoting human health. *Medicina* – 2020. Vol. 56. P. 433.
- 33.Swidsinski A., Loening-Baucke V., Herber A.. Mucosal flora in Crohn’s disease and ulcerative colitis – an overview. *J Physiol Pharmacol.* - 2009. Vol. 60. P. 61–71.
- 34.C. Tafalla et al. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. *Fish Shellfish Immunol* – 2013.
- 35.Topp E., Larsson D., Miller D.N. Antimicrobial resistance and the environment: assessment of advances, gaps and recommendations for agriculture, aquaculture and pharmaceutical manufacturing. *FEMS Microbiol Ecol.* – 2018. P. 94.
- 36.Vacca I. Microbiome: The microbiota maintains oxygen balance in the gut. *Nat. Rev. Microbiol.* – 2017. P. 15, 574.
- 37.Zanello G., Meurens F., Berri M. *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. *Curr Issues Mol Biol.* - 2009. Vol. 11. № 1. P. 47–58.

ДОДАТКИ

Правила роботи і техніка безпеки в лабораторіях мікробіологічного та біотехнологічного профілів

Забороняється входити у верхньому одязі та класти на столи сумки, портфелі й інші особисті речі, які можуть заважати роботі.

У приміщенні лабораторії необхідно підтримувати порядок і чистоту, працювати в халатах.

Робоче місце має бути обладнане усім необхідним для проведення лабораторних занять: мікроскопом, лампою, штативом для пробірок з культурами, бактеріологічною петлею тощо.

Інструменти, які використовували для роботи з культурами мікроорганізмів (петля, пінцет), необхідно прожарювати на вогні.

5. У лабораторії заборонено споживати їжу, пити воду. У випадку попадання досліджуваного матеріалу на шкіру, халат, стіл необхідно негайно повідомити про це викладача і під його контролем провести дезінфекцію.

Усі живі препарати після мікроскопіювання, а також піпетки і шпателі, якими користувалися, необхідно занурити у склянку з дезінфікуючою рідиною (2%–ний розчин хлораміну).

Після закінчення занять необхідно навести порядок на робочому місці та провести стерилізацію використаного посуду, інструментів та елімінацію бактеріальних культур.

Вимоги безпеки під час виконання роботи

Дозволяється працювати тільки на заземлених об'єктах. Забороняється встановлювати запобіжники, що не відповідають номінальному значенню; виконувати заміну запобіжників при включеному обладнанні; виконувати ремонтні роботи об'єкту без зняття з нього напруги живлення.

При роботі на центрифугах:

- не працювати при частоті обертання, вищій максимальної для даного ротору;
- не працювати з неповними та нерівномірно заповненими стаканами роторів типу РПУ К та з неповністю завантаженим ротором РЗ–21Т;

- не центрифугувати препарат з густиною, більшою за $1,2 \cdot 10^3$ кг/м³ на максимальній частоті обертанні ротору;

- не працювати з роторами, що відпрацювали свій термін експлуатації.

Не запускати ні одного приладу без попередньої перевірки. Не залишати діючий прилад без догляду.

Для попередження нещасних випадків через можливий викид реакційної суміші не заглядати в пробірку або колбу зверху. Не виносити із лабораторії прилади, посуд та реактиви. Роботу з отруйними речовинами проводити у витяжній шафі. Дотримуватись запобіжних заходів при роботі з вибуховими та легкозаймистими речовинами. Не виливати у раковину залишки кислот, лугів вогнебезпечних рідин та ін. Зливати ці речовини у спеціальні склянки, що знаходяться під витяжною шафою. Не кидати у раковину пісок, папір та інші тверді речовини. Розчини, що містять кислоти та луги, перед тим, як вилити у каналізаційну систему, необхідно нейтралізувати. Різко пахнучі та отруйні речовини повинні бути знешкоджені хімічною обробкою або спалені в спеціально відведеному місці за межами лабораторії, бажано на повітрі. Не залишати ніяких речовин у посуді без етикеток.

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях

При виникненні пожежі негайно вимкнути газ у всій лабораторії, прибрати із помешкання всі горючі речовини, засипати піском або накрити ковдрою вогнище і повідомити черговому пожежної охорони про те, що сталося (тел.—101). Засвоїти і дотримуватися правил протипожежної безпеки.

Якщо в лабораторії за якихось причин пролита значна кількість легкозаймистої рідини, то необхідно загасити всі пальники та електронагрівачі прилади, відчинити вікна та зібрати пролиту рідину ганчіркою або рушником, місце розливу засипати піском, потім зібрати його дерев'яною лопаткою і винести у спеціально відведене місце.

При легких термічних опіках шкіру слід обмити спиртом, а потім змазати гліцерином або вазеліном. При більш сильних опіках обпечене місце після промивання концентрованим розчином перманганату калію та спиртом, необхідно змастити засобом від опіків (наприклад сульфідіновою емульсією). При опіках міцними кислотами потрібно промити обпалене місце великою кількістю води, а потім 3% розчином соди. При опіках міцними лугами, шкіру потрібно промити водою, а потім нейтралізувати 1% розчином борної кислоти. Аміак майже не діє на шкіру, але при попаданні в очі може викликати сильне пошкодження і навіть сліпоту.

При випадковому попаданні реактивів всередину, рекомендується випити побільше води. Поряд з цим необхідно: а) при отруєнні кислотами випити склянку 2% вуглекислої соди; б) при отруєнні лугами випити склянку 2% оцтової або лимонної кислоти.

При необережному згинанні трубок, вставленні трубок або термометра в отвір колби, можливі порізи та поранення. При порізах в першу чергу потрібно видалити з рани уламки скла, краї рани продезинфікувати 3% спиртовим розчином йоду, а потім накласти стерильну пов'язку.

У випадку загоряння горючої рідини слід погасити всі пальники, прикрити полум'я азбестовим рушником або засипати його піском, або скористатися вогнегасником з вуглекислим газом. Розчинні у воді вогнебезпечні речовини, такі як спирт, ацетон та інші, можна гасити водою. Якщо горить нерозчинна у воді речовина (наприклад: ефір, бензол, бензин, скипидар), то використовувати воду для гасіння пожежі не можна, оскільки пожежа не ліквідується, а навпаки може збільшитись. У цьому випадку полум'я слід гасити піском та використовувати вогнегасник.

Вимоги безпеки після закінчення роботи

По закінченню тієї чи іншої операції, необхідно вимкнути газ і електроприлади, що використовувалися при виконанні даної роботи.

Посуд, у якому проводили в роботу з вогнебезпечними реактивами, після закінчення роботи повинен бути негайно вимитий.

По закінченню роботи потрібно: привести до порядку робоче місце, прилади та апаратуру; виключити головний газовий кран, головний електрорубильник, вентиляцію та світло; перевірити, чи видалені з приміщення лабораторії надлишки горючих та легкозаймистих речовин, відпрацьовані рідини, сміття, промаслене ганчір'я; перевірити, чи весь посуд з реактивами закритий пробками та поставлений на відведені місця.