Wpływ efektywnych mikroorganizmów na nieswoistą odporność komórkową u sandacza¹⁾

ELŻBIETA TERECH-MAJEWSKA, EDYTA KACZOREK*, PATRYCJA SCHULZ*,
ZDZISŁAW ZAKĘŚ**, MACIEJ ROŻYŃSKI**, AGATA KOWALSKA**,
MONIKA ZEMBRZUSKA*, ANDRZEJ K. SIWICKI***

Katedra Epizootologii, *Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn

Zakład Akwakultury, *Zakład Patologii i Immunologii Ryb,
Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 10, 10-719 Olsztyn

Otrzymano 05.06.2017

Zaakceptowano 07.12.2017

Terech-Majewska E., Kaczorek E., Schulz P., Zakęś Z., Rożyński M., Kowalska A., Zembrzuska M., Siwicki A. K.
Influence of effective microorganisms on the non-specific cellular defence mechanisms of pikeperch

Summary

Effective Microorganisms (EM) technology uses microorganisms to work in the surrounding environment. Complex microbiological preparations show synergistic effects, combining the effects of probiotics, prebiotics and synbiotics. EMTM technology is well-known and used in 120 countries worldwide, mainly in agriculture, including aquaculture, and in environmental protection. Fish farmers use these preparations to enhance fish growth, condition and immunity. The aim of the study was to evaluate the effect of EM-Probiotic (Greenland) on the development of cellular non-specific resistance in pikeperch (*Sander lucioperca*) at the initial stage of rearing in a recirculating aquaculture system (RAS). The experimental diet was administered for 28 days with EM supplementation at 0% (control group), 2% and 4% of the feed. Water temperature in the RAS was maintained at 22.0°C. Hematopoietic organs (spleen and kidney) were collected twice, after 28 days of EM supplementation (first term) and 28 days after cessation of supplementation (second term). The respiratory burst activity (RBA) and potential killing activity (PKA) of macrophages, as well as the proliferative activity of T- and B-lymphocytes (MTT assay) were assessed. The results of the study show that EM at the initial stage of pikeperch development (body weight of 2 to 14 g) suppress cellular defence mechanisms, decreasing the activity of immunocompetent cells in RBA, PKA and MTT tests. The results from the first organ harvesting showed differentiated EM activity at a statistically insignificant level ($P > 0.05$). In samples collected 28 days later, the inhibitory effect was demonstrated at a statistically significant level ($P < 0.05$) in all parameters in both experimental groups. Non-specific cellular immunity in fish plays a key role in defence against damaging factors, including pathogenic ones. Since fish in an RAS are also susceptible to potentially pathogenic agents, immunosuppression of these mechanisms may aggravate the disease.

Keywords: pikeperch, non-specific cellular immunity, effective microorganisms

Wraz z rozwojem akwakultury oraz wprowadzaniem do podchowów kontrolowanych nowych gatunków ryb stale poszukuje się skutecznych metod ochrony zdrowia. To sprzyja rozwojowi badań nad oceną wpływu różnych preparatów na organizm ryb, zwłaszcza gatunków nowo wprowadzanych do podchowów kontrolowanych. Poszukuje się zwłaszcza preparatów naturalnych, bezpiecznych dla ryb, konsumenta oraz środowiska.

Za naturalną grupę środków uznaje się preparaty mikrobiologiczne, wykorzystujące Technologie

Efektywnych Mikroorganizmów – EMTM. Twórcą tej technologii jest Teruo Higa z Uniwersytetu w Ryukyus (Japonia), który skupiał się głównie na ich wykorzystaniu w bionawożeniu gleby i uprawach roślin. Ostateczną wersję składu EM ogłosił w 1982 r. W ich skład wchodzi 81 rodzajów mikroorganizmów nadających się jednocześnie do spożycia przez ludzi i zwierzęta. Oryginalne mikroorganizmy wykorzystane do opracowania preparatów EMTM pochodziły z gleby japońskiej wyspy Okinawa, ze żwaczy krów tam hodowanych, a także z mleczarni produkujących przetwory mleczarskie. EMTM działają dzięki synergii biologii i wzajemnych relacji organizmów wykorzystanych do opracowania preparatów. Zawierają bakterie

¹⁾ Wyróżnienie za najlepszą pracę przedstawioną przez młodych pracowników nauki w Sekcji Chorób Zwierząt Akwakultury podczas XV Kongresu PTNW w Lublinie 22-24 września 2016 r.

kwasy mlekowe (*Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *Streptococcus lactis*), bakterie fotosyntetyzujące (*Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodobacter apteroides*), drożdże (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*), promieniowce (*Streptomyces albus*, *S. gipseus*) oraz grzyby fermentujące (*Aspergillus oryzae*, *Penicillium* sp., *Mucor hiemalis*) (13).

Tak złożone preparaty mikrobiologiczne wykazują działanie synbiotyczne, łącząc w sobie działanie probiotyków, prebiotyków i synbiotyków. Według Higa, w przyrodzie funkcjonują trzy grupy mikroorganizmów: pozytywne – regeneratywne, negatywne – odpowiadające za rozkład oraz oportunistyczne, które włączają się w aktualnie aktywny proces. W każdym momencie w glebie, wodzie, powietrzu, ludzkim czy też zwierzęcym przewodzie pokarmowym o stanie zdrowia decyduje stosunek pozytywnych i negatywnych procesów w relacji do siebie. Wykorzystują to drobnoustroje oportunistyczne, które podłączają się do procesów zgodnie z przeważającą tendencją, do regeneracji lub degeneracji. Według tej teorii, pozytywny wpływ na środowisko zdegenerowane ma suplement „pozytywny” mikrobiologicznie, który uruchamia procesy odbudowy i regeneracji. W środowisku naturalnym, poddającym się antropopresji, obserwuje się znaczną aktywność procesów rozkładu/destrukcji (1, 7). Różne preparaty oparte na EMTM znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach życia, m.in. w: rolnictwie (regeneracja gleby, produkcja roślinna, produkcja zwierzęca, przemysł rolno-spożywczy, przechowywanie), ochronie środowiska (np. rewitalizacja wody, oczyszczanie akwenów i cieków wodnych), gospodarce komunalnej (oczyszczalnie ścieków, wysypiska śmieci, kompostownie), gospodarstwach domowych (dom, ogród przydomowy, szambo), medycynie ludzkiej i weterynaryjnej, wielu innych. Technologia jest znana i stosowana w ponad 120 krajach świata.

W wielu ośrodkach naukowych prowadzone są badania nad doskonaleniem tych preparatów oraz poszukiwaniem nowych zastosowań, także w akwakulturze (3, 14, 22, 25).

Sandacz (*Sander lucioperca*) należy do gatunków coraz bardziej popularnych w produkcji, gdyż w naturalnych odłowach odnotowuje się tendencję spadkową tych cennych ryb (ryc. 1, 4, <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>, 27). Gatunek ten może być produkowany w stawach ziemnych, także w polikulturze, np. z karpem hodowlanym (*Cyprinus carpio*) (26). W Polsce zostały opracowane podstawy technologii podchowu sandacza w systemach recyrkulacyjnych (RAS – Recirculation Aquaculture System), które są aktualnie wdrażane do praktyki (26, 28, http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sander_lucioperca/en). Metoda ta jest dalej rozwijana, szczególnie w obiektach akwakultury krajów Europy Zachodniej (20). Aktualny stan wiedzy pozwala przypuszczać, że podchów sandacza może się odbywać w różnym stopniu intensyfikacji, co dodatkowo sprzyja nasileniu prowadzenia badań służących opracowaniu i doskonaleniu metod ochrony przed chorobami w oparciu o metody naturalne, wykorzystujące preparaty naturalnego pochodzenia (18).

Celem podjętych badań była ocena wpływu preparatu EMTM-Probiotyk na kształtowanie się komórkowej odporności nieswoistej u sandacza (*Sander lucioperca*) w początkowym okresie podchowu kontrolowanego w obiektach typu RAS.

Materiał i metody

Do badań wykorzystano preparat EMTM – Probiotyk (Greenland, Polska). Podchów ryb prowadzono w obiektach doświadczalnych Zakładu Akwakultury Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie. Badania wykonano na młodocianym sandaczu (*S. lucioperca*), w początkowym okresie podchowu,

Ryc. 1. Odłowy sandacza z wód otwartych i produkcja w obiektach akwakultury w latach 1950-2014 (FAO 2016)

wym okresie podchowu, o wyjściowej masie ciała 3,21 g ($\pm 0,51$ g) i długości ciała l.c. 6,38 cm ($\pm 0,33$ cm), w liczbie 1170 osobników. Ryby podzielono na trzy grupy doświadczalne, po 390 ryb. Każdą grupę podchowowano w trzech powtórzeniach/basenach podchowowych, w każdym basenie umieszczono po 130 ryb (co stanowiło ok. 2 kg m⁻³). Zbiorniki o kubaturze 0,2 m³ wchodziły w skład systemu recyrkulacyjnego, z zamkniętym obiegiem wody (RAS).

W okresie podchowu kontrolowano parametry

try wody, najważniejsze dla prawidłowego rozwoju ryb i kształtowania się odporności, tj. temperaturę, koncentrację tlenu, poziom całkowitego azotu amonowego (CAA, mg l⁻¹), poziom azotynów (NO₂-N, mg l⁻¹), poziom pH (23). Temperaturę wody ($\pm 0,1^{\circ}\text{C}$) i koncentrację tlenu ($\pm 0,01$ mg O₂ l⁻¹) mierzono codziennie, na dopływie i odpływie z basenów podchowowych. Zawartość całkowitego azotu amonowego (CAA = NH₄⁺-N + NH₃-N; $\pm 0,01$ mg CAA l⁻¹) i azotynów (NO₂-N; $\pm 0,01$ mg NO₂-N l⁻¹) oraz pH ($\pm 0,01$) mierzono raz na tydzień na odpływie z basenów podchowowych. Średnia wartość temperatury wody w okresie trwania doświadczenia wynosiła $22,9 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$. Koncentracja tlenu na odpływie z basenów nie spadała poniżej 7,3 O₂ l⁻¹ (nasycenie 84%). Koncentracja amoniaku i azotynów na odpływie nie przekraczały 0,2 mg TAN l⁻¹ i 0,03 mg NO₂-N l⁻¹. Odczyn wody na odpływie mieścił się w przedziale pH 8,1-8,4.

Paszę doświadczalną przygotowano w oparciu o komercyjną paszę pstrągową Aller Performa EX 2GR (AllerAqua, Dania), której podstawowy skład chemiczny kształtował się następująco: białko (54%), tłuszcz surowy (15%), węglowodany (13%), celuloza (1,5%), popiół (8,5%) oraz zawartość energii strawnej 19,1 MJ kg⁻¹. Paszę suplementowano preparatem EMTM-Probiotyk (Greenland, Polska) w stężeniach 2 ml 100 g⁻¹ paszy (grupa 2%) i 4 ml 100 g⁻¹ (grupa 4%). Naważkę preparatu (8 ml) mieszano z 12 ml wody (pasza 2%) lub 16 ml preparatu z 4 ml wody (pasza 4%), a następnie dodano do 400 g paszy bazowej, dokładnie mieszano i zamykano metodą próżniową za pomocą urządzenia próżniowego (AGA Labor, Lublin, Polska). Tak przygotowane pasze doświadczalne suszono przez 24 h w temperaturze pokojowej, po czym przechowywano ją w szafie chłodniczej (+4°C). Kontrolę (grupa C) stanowiły ryby żywione wyłącznie paszą bazową z dodatkiem 20 ml wody do 400 g paszy. Żywienie ryb paszami doświadczalnymi trwało 28 dni, po czym przez kolejne 28 dni ryby otrzymywały paszę standardową, niemodyfikowaną (całkowity czas podchowu wynosił 56 dni).

Paszę zadawano za pomocą automatycznych karmników taśmowych (Fischtechnik GmbH, Niemcy) przez 18 h d⁻¹ (09:00–03:00). Dzienną dawkę paszy ustalano cotygodniowo i w miarę podchowu redukowano ją z poziomu 3,5% biomasy obsad (pierwsze 2 tygodnie podchowu) do 2,5% biomasy obsad (3.-8. tydzień podchowu).

Ocenę wpływu na komórkowe mechanizmy obronne wykonywano z wykorzystaniem komórek narządów krwiotwórczych, śledziony i nerki główowej zgodnie z metodyką opisaną przez Siwickiego i wsp. (17), przy uwzględnieniu wyników badań Małaczewskiej i wsp. (8) oraz Kazunia i Siwickiego (6).

W badaniu oceniano następujące parametry nieswoistej odporności komórkowej:

- RBA (Respiratory Burst Activity) – aktywność metaboliczna fagocytów, po stymulacji komórek PMA (Phorbol Myristate Acetate),
- PKA (Potential Killing Activity) – aktywność bójczą makrofagów, po stymulacji komórek bakteriami *Aeromonas hydrophila*, opisaną przez Siwickiego i Andersona (16),
- aktywność proliferacyjną limfocytów określono na podstawie poziomu odpowiedzi proliferacyjnej limfocy-

tów T (LyTP, Lymphocyte T Proliferation) stymulowanych konkanawaliną A (ConA, Sigma) oraz limfocytów B (LyBP, Lymphocyte B Proliferation) stymulowanych lipopolisacharydem (LPS) przy zastosowaniu metody MTT (Mitotic Transformic Test) opisaną dla ryb przez Siwickiego i Andersona (16).

Ryby przed pobraniem próbek były wprowadzane w stan znieczulenia ogólnego preparatem Propiscin (IRS Olsztyn) w stężeniu 1 ml l⁻¹ wody oraz przetrzymywane w pojemnikach plastikowych z napowietrzaniem, do momentu rozpoczęcia określonych procedur badawczych. Leukocyty do badań izolowano z nerki główowej i śledziony, tuż po pobraniu umieszczano w medium odżywczo-transportowym RPMI-1640 z dodatkiem L-glutaminy i dwuwęglanu sodu (Sigma-Aldrich). Narządy homogenizowano, a rozdział komórek z zawiesiny przeprowadzono w gradiencie Gradisolu L lub G. Interfazę z każdej próbki pobierano do odrębnych probówek i płukano medium RPMI-1640, poddając wirowaniu 400 obrotów przez 5 minut. Przed wykonaniem testów weryfikowano żywotność komórek, poddając je barwieniu błękitem trypanu (TB – trypan blue, Sigma). Następnie komórki zawieszano w RPMI-1640 z dodatkiem 10% bydlęcej surowicy płodowej oraz 1% mieszaniny antybiotyków i środków grzybobójczych. Testy przeprowadzano w 96-dołkowych płytkach titracyjnych Nunc, Dania, odczyn ekstynkcji (OD) prowadzono z wykorzystaniem czytnika MRX Dynatex Technology przy długości fali 570 nm czy 620. Próbkę do badań pobierano w okresie tuż po 28 dniach podawania EM (I termin, ryby o masie ciała ok. 9,5 g) oraz 28 dni po zakończeniu żywienia paszą z EM (II termin, ryby o masie ciała ok. 20,0 g). W obydwu terminach z każdego basenu podchowowego pobierano po 5 osobników (po 15 ryb z każdej grupy).

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej, określając wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) przy użyciu programu Statistica for Windows 7.1 (Stat-Soft, Inc 2004) oraz istotności różnic na poziomie *P < 0,05, **P ≤ 0,01; ***P ≤ 0,001 przy zastosowaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz wieloczynnikowej z wykorzystaniem testu Bonferoni.

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki badań zestawiono w tab. 1 oraz na ryc. 2-5.

W I pobraniu wykazano zróżnicowane działanie dodatku EMTM pomiędzy grupami, jednakże poziom różnic nie był istotny statystycznie (P > 0,05). Stwierdzono obniżenie RBA, przy czym najniższy poziom utrzymywał się w grupie 4% (OD 0,213 ± 0,02). Wykazano stymulację PKA w grupie 2% i 4%, natomiast najniższy poziom PKA stwierdzano w grupie kontrolnej (OD 0,173 ± 0,02). Odpowiedź proliferacyjną LyTB stymulowanych ConA była najniższa w grupie 4% (SI 0,57 ± 0,37), natomiast LyBP stymulowanych LPS była najniższa w grupie 2% (SI 0,44 ± 0,26).

W II pobraniu wykazano obniżenie badanych parametrów w obu grupach doświadczalnych, na poziomie statystycznie istotnym (P < 0,05). W zależności od testu najniższe wskaźniki stwierdzano w grupie 2% (RBA,

Tab. 1. Parametry nieswoistej odporności komórkowej u sandacza po podaniu paszy z dodatkiem efektywnych mikroorganizmów

Parametr	I pobranie				II pobranie			
	Grupa kontrolna	Grupa 2%	Grupa 4%	Efekt	Grupa kontrolna	Grupa 2%	Grupa 4%	Efekt
RBA (OD)	0,268 ± 0,06	0,244 ± 0,06	0,21 ± 0,02	–	0,485 ± 0,27	0,236 ± 0,04*	0,269 ± 0,07*	↓
PKA (OD)	0,173 ± 0,02	0,183 ± 0,07	0,20 ± 0,06	–	0,330 ± 0,06	0,165 ± 0,02***	0,206 ± 0,04***	↓↓↓
Limfocyty T (SI)	0,730 ± 0,28	0,750 ± 0,37	0,57 ± 0,41	–	1,042 ± 0,07	1,071 ± 0,18***	0,820 ± 0,06***	↓↓↓
Limfocyty B (SI)	0,720 ± 0,26	0,440 ± 0,26	0,89 ± 0,58	–	1,330 ± 0,17	1,169 ± 0,21	1,210 ± 0,20	–

Objaśnienia: * – $P \leq 0,05$; *** – $P \leq 0,001$ (Statistica, Anova. test Bonferoni)

PKA, LyBP) lub 4% (LyTP). W ocenianym okresie nie odnotowano śmiertelności ryb w żadnej z grup, jednocześnie obserwowano prawidłowy przebieg rozwoju ryb charakterystyczny dla sandacza w tym okresie. Na uwagę zasługuje także porównanie wielkości badanych parametrów immunologicznych pomiędzy pomiarami I i II w grupie kontrolnej, w II pobraniu wszystkie wartości były wyższe w stosunku do pobrania I (tab. 1, ryc. 2-5). Aktywność komórek immunokompetentnych stanowi pierwszą linię obrony, dlatego ocena ich funkcji (RBA, PKA) pozwala ocenić potencjalną sprawność całego układu immunologicznego (18, 23).

Uzyskane wyniki badań, których celem była ocena wpływu preparatu probiotycznego EMTM Probiotik

(Greenland) w początkowym okresie podchowu sandacza, wykazały zróżnicowany w zależności od grupy wpływ immunomodulujący na nieswoiste komórkowe mechanizmy obronne. W zależności od rodzaju aktywności odnotowano wpływ stymulujący lub supresyjny w stosunku do grupy kontrolnej (ryc. 2-5). Wielokierunkowy wpływ EMTM-Probiotyk na RBA, PKA oraz odpowiedź proliferacyjną (LyTP, LyBP) symulowanych limfocytów u młodocianego sandacza może wskazywać na ich ograniczoną przydatność w podchowcie u tego gatunku ryb, w ocenianym okresie podchowu. Porównanie tych wskaźników w grupie kontrolnej w pobraniu I i II wskazuje, że w okresie tym naturalny jest wzrost aktywności komórek im-

Ryc. 2. Kształtowanie się poziomu aktywności metabolicznej (RBA – Respiratory Burst Activity) u sandacza pod wpływem efektywnych mikroorganizmów

Objaśnienia: * $P \leq 0,05$ (Statistica, Anova. test Bonferoni); OD – optical density (gęstość optyczna)

Ryc. 3. Kształtowanie się poziomu aktywności bójczej (PKA – Potential Killing Activity) u sandacza pod wpływem efektywnych mikroorganizmów

Objaśnienia: *** $P \leq 0,001$ (Statistica, Anova. test Bonferoni); OD – optical density (gęstość optyczna)

Ryc. 4. Kształtowanie się poziomu odpowiedzi proliferacyjnej stymulowanych limfocytów T pod wpływem efektywnych mikroorganizmów

Objaśnienia: *** $P \leq 0,001$ (Statistica, Anova. test Bonferoni); SI – stimulation index (indeks stymulacji)

Ryc. 5. Kształtowanie się poziomu odpowiedzi proliferacyjnej stymulowanych limfocytów B pod wpływem efektywnych mikroorganizmów

Objaśnienia: brak istotności różnic (Statistica, Anova. test Bonferoni); SI – stimulation index (indeks stymulacji)

munokompetentnych wraz ze wzrostem masy ciała. Z uzyskanych wyników w grupach 2% i 4% oceniane parametry immunologiczne nie odzwierciedlały tej tendencji. Taką zależność RBA i PKA sugerują wyniki badań Siwickiego i wsp. (18) prowadzonych na sandaczu o masie ciała 50 g i 500 g. Uzyskane w tych badaniach średnie wartości OD dla tych parametrów wynosiły dla RBA 0,48 ($\pm 0,04$), PKA 0,46 ($\pm 0,05$). Nie potwierdzają tej zależności wyniki testów odpowiadzi proliferacyjnej (LyTP OD 0,48 $\pm$ 0,06 oraz LyBP OD 0,32 $\pm$ 0,06).

Od probiotyków i prebiotyków już z założenia oczekuje się aktywności immunostymulującej (12). Stymulujący wpływ na RBA u wielu gatunków zwierząt wodnych wykazywały bakterie *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* MS62, *Kocuria* SM1 oraz bakterie z grupy *Lactobacillaceae* spp. (LAB) (3, 5). Preparaty EMTM zawierają w sobie różne gatunki drobnoustrojów probiotycznych, co także może sprzyjać ich wielokierunkowemu działaniu, w zależności od gatunku ryb i technologii.

O korzystnym wpływie na humoralną odporność nieswoistą u karczka karpia dowiedziono w badaniach zespołu po kierunkiem Mirosława Cieśli, w których potwierdzono korzystny wpływ dodatku EM do paszy na wielkość produkcji ryb z ha, ogólną kondycję ryb oraz odporność (Raport z badań, dostęp <http://pir.sggw.pl/karp.html>). Dodatkowo w grupie tej wykazano najniższy stopień intensywności inwazji pasożytów, tj. *Trichodina*, *Chilodonella*, *Epistylis*, *Dactylogyrus*, *Botriocephalus* oraz pijawek, w porównaniu z badaniami ryb bez dodatku EM do paszy. Wysoką wartość wskaźników odporności nieswoistej potwierdzono w poziomie lizozymu, białka ogólnego oraz gammaglobulin. W świetle tych badań dodatek EM do paszy może być stosowany w produkcji ekologicznej nawet w zagęszczeniach zbliżonych do maksymalnych.

W obszarze produkcji zwierzęcej i medycynie weterynaryjnej istnieje wiele przesłanek korzystnie promujących technologię EMTM, szczególnie wobec zakazu od 1 stycznia 2006 r. stosowania w paszach dla zwierząt antybiotykowych stymulatorów wzrostu (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&from=PL>). Zakłada się, że zmiany w programach żywienia zwierząt powinny uwzględniać wzmacnianie naturalnej odporności oraz stabilizację korzystnej mikroflory przewodu pokarmowego poprzez stosowanie określonych pasz i dodatków paszowych oraz modyfikację poziomu niektórych składników pokarmowych. Aktualnie zaleca się stosowanie w żywieniu zwierząt dodatków paszowych, które korzystnie wpływają na mikroorganizmy bytujące w przewodzie pokarmowym. Probiotyki uznaje się za produkty stabilizujące populację mikroorganizmów, jak też aktywność enzymatyczną w przewodzie pokarmowym, przez co wywierają dodatni wpływ na wzrost i rozwój zwierząt. W produkcji zwierząt stałocielnych

za najważniejsze zadania dla drobnoustrojów probiotycznych uznaje się: zdolność szybkiego namnażania się w przewodzie pokarmowym i tworzenia naturalnej bariery dla bakterii szkodliwych; konkurencyjne działanie wobec bakterii typu *E. coli* i innych patogenów; obniżanie i utrzymanie optymalnej kwasowości oraz zwiększanie aktywności enzymów przewodu pokarmowego. EMTM Probiotyk (Greenland) w pełni odpowiada stawianym wymaganiom dla preparatów probiotycznych (<http://www.emgreen.pl/em-probiotyk-piwet-pulawy111.html>). Również w naszych warunkach klimatycznych możliwe jest wykorzystanie EM w akwakulturze. W hodowli ryb można stosować je dwojako: jako dodatek do wody w celu przyspieszenia rozkładu gromadzącej się materii organicznej oraz jako suplement do paszy dla ryb, gdzie dodatek EM optymalizuje także trawienie. Stosowanie EM jako dodatku do wody zasilającej aparaty, w których inkubuje się ikry, przyspiesza rozkład materii organicznej i poprawia warunki inkubacji. Dobre efekty obserwuje się podczas inkubacji ikry, aż do okresu zaoczkowania różnych gatunków ryb, co szczególnie istotne jest w hodowli ryb nieudomowionych, hodowanych w akwakulturze (Grudniewska, dane niepublikowane). Przez cały sezon hodowlany (oprócz zimy) można stosować dodatek EM do osadników (duże stawy poprodukcyjne) w celu przyspieszenia rozkładu materii organicznej i zmniejszenia zagniwania. Dodatek do paszy dla ryb poprzez jej spryskanie wpływa korzystnie na parametry wzrostu tak karmionych ryb. Wstępne obserwacje sugerują możliwość poprawy wzrostu i kondycji ryb, co potwierdzają prezentowane wyniki badań. Potwierdzono to także w badaniach własnych prowadzonych na narybku pstrąga tęczowego, u którego wykazano pozytywny wpływ na wzrost oraz potencjał adaptacyjny (21).

Efektywne mikroorganizmy budzą wiele kontrowersji i szereg wątpliwości, nazywane są „preparatami pseudomikrobiologicznymi”, a ich właściwości ocenia się także jako „niewiarygodne” (10). Wiele ośrodków podejmuje badania weryfikujące „nadmiernie wyidealizowane” informacje o tej technologii (9, 11, 14, 15). Zarzuca się im także niestabilność i niepowtarzalność ilości oraz jakości stosowanych szczepów drobnoustrojów, nieskuteczność wobec proponowanych zastosowań albo nieistotny statystycznie efekt działania (7, 10).

W akwakulturze także dyskutowane są efekty działania tych biopreparatów. Uważa się nawet, że mogą być przyczyną pojawiania się nowych jednostek chorobowych w hodowli pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*), jak również rozwoju odmiennej kliniki po zakażeniu eksperymentalnym *Yersinia ruckeri* (21, Pękala, dane niepublikowane). Uzyskane wyniki badań wykazały pozytywny wpływ dodatku do paszy EM na wzrost oraz potencjał adaptacyjny narybku pstrąga tęczowego, jednakże nie wykazały pozytywnej korelacji

na nieswoistą odporność przeciwwakażną. To może sugerować, że pod ich wpływem może zmieniać się obraz kliniczny u pstrąga tęczowego (21, 24).

W praktyce bezsporne jest ich stosowanie w osadnikach, w celu poprawy biodegradacji osadów, jednakże o skutkach długotrwałego stosowania EM dla ryb brak jest naukowych badań. Należy zatem stosować je z rozwagą, po uprzednim poznaniu środowiska, w którym hodowane są ryby. Efekty działania EM są widoczne, ale żeby potwierdzić ich skuteczność, wymagane są dalsze badania i opracowanie szczegółowych procedur podawania (14, 15, 21).

Złożone preparaty mikrobiologiczne (EMTM) mogą stanowić element żywienia ryb w podchowach kontrolowanych, podobnie jak u zwierząt stałocieplnych. Są wielofunkcyjnymi dodatkami do pasz, które wywierają korzystny wpływ zarówno na przeżywalność zwierząt, stan i poziom ich odporności, jak również wskaźniki produkcyjne (2, 21). Działanie preparatów probiotycznych jest szerokie i wielokierunkowe, jednakże ich stosowanie ma pewne ograniczenia, np. potrzebę opracowania programów ich stosowania do gatunku oraz rodzaju technologii i jakości środowiska.

Na podstawie uzyskanych wyników badań dotyczących ich wpływu na odporność komórkową w początkowym okresie podchowu sandacza można sformułować następujące wnioski:

– dodatek złożonego preparatu mikrobiologicznego EMTM – Probiotyk w ilości 2% i 4% masy paszy, podawany przez 28 dni nie powoduje osłabienia kondycji i przeżywalności w okresie 56-dniowego podchowu sandacza w obiegach typu RAS;

– EMTM – Probiotyk wykazuje zróżnicowane działanie na komórkowe mechanizmy obronne w zależności od dawki preparatu, stymulujące (4% na PKA, oraz MTT LyB) lub supresyjne (RBA i MTT LyT w obu dawkach), a uzyskany efekt nie jest trwały po zaprzestaniu podawania.

Piśmiennictwo

1. Badura L.: Czy znamy wszystkie uwarunkowania funkcji mikroorganizmów w ekosystemach lądowych. Kosmos 2004, 3-4, 264-265.
2. Brzozowski M., Rekiel A., Więcek J., Gajewska J.: Ocena programu profilaktycznego opartego o efektywne mikroorganizmy, stosowanego w tuczu świń. Med. Weter. 2013, 69, 248-251.
3. Demska-Zakęś K., Sikora A., Gomulka P.: Preparaty mikrobiologiczne w akwakulturze, [w:] Zakęś Z., Demska-Zakęś K., Kowalska A. (red.): Podchowcy organizmów wodnych – osiągnięcia, wyzwania, perspektywy. Wyd. IRS, Olsztyn 2015, s. 55-66.
4. FAO: Global aquaculture production 1950-2014 (<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>) (dostęp 12.08.2016).
5. Kaziński B., Kaziński K.: Probiotyki w akwakulturze. Med. Weter. 2014, 70, 25-29.
6. Kaziński K., Siwicki A. K.: Propiscin – a safe new anesthetic for fish. Arch. Pol. Fish. 2001, 9, 183-190.
7. Kucharski J., Jastrzębska E.: Rola efektywnych mikroorganizmów w kształtowaniu właściwości mikrobiologicznych gleby. Inż. Ekol. 2005, 12, 295-296.
8. Malaczewska J., Wójcik M., Wójcik R., Siwicki A. K.: The in vitro effect of bovine lactoferrin on the activity of organ leucocyte in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), European eel (*Anquilla anquilla*) and wels catfish (*Silurus glanis*). Pol. J. Vet. Sci. 2010, 13, 83-88.
9. Martyniak S., Księżak J.: Ocena pseudomikrobiologicznych biopreparatów stosowanych w uprawie roślin. Polish J. Agron. 2011, 6, 27-33.
10. Martyniak S.: Skuteczne i nieskuteczne preparaty mikrobiologiczne stosowane w ochronie i uprawie roślin oraz rzetelne i nierzetelne metody ich oceny. Post. Mikrobiol. 2011, 50, 321-328.
11. Mau F. P.: Efektywne mikroorganizmy w domu i w ogrodzie dla lepszego wzrostu roślin i dla zdrowia, niezwykle rezultaty stosowania. Wyd. Fundacja Źródła Życia, 2002, 1-202.
12. Mizak L., Gryko R., Kwiatek M., Parasian S.: Probiotyki w żywieniu zwierząt. Życie Wet. 2012, 87, 736-742.
13. Mustafa al. Bakri M. A., Hadi Ma Radzi A., Akmal Mohamad N. S., Zainul S. K., Diyana N. Y.: Production of effective microorganism using halalbased sources: A review. Afr. J. Biotechnol. 2011, 10, 18649-18652.
14. Qi Z., Zhang X. H., Boon N., Bossier P.: Probiotics in aquaculture of China – current state, problems and prospect. Aquacult. 2009, 290, 15-21.
15. Rapatsa M. M., Moyo N. A. G.: Haematological, histological and growth characteristics of *Oreochromis mossambicus* exposed to effective microorganisms in organically manured aquadams. Asian J. Anim. Vet. Adv. 2013, 8, 852-862.
16. Siwicki A. K., Anderson D. P.: Nonspecific defence mechanisms assay in fish. Fish Disease Diagnosis and Prevention's Methods. FAO-Project GCP/INT/526/JPN, IFI Olsztyn 1993, 105-112.
17. Siwicki A. K., Terech-Majewska E., Grudniewska J., Malaczewska J., Kaziński K., Lepa A.: Influence of deltamethrin on nonspecific cellular and defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 2010, 29, 489-491.
18. Siwicki A. K., Zakęś Z., Terech-Majewska E., Kowalska A., Malaczewska J.: Supplementing the feed of pikeperch [*Sander lucioperca* (L.)] with MacroGard and its influence on nonspecific cellular and humoral defense mechanism. Aquacult. Res. 2009, 40, 405-411.
19. Siwicki A. K., Zakęś Z., Trapkowska S., Terech-Majewska E., Czerniak S., Głabski E., Kaziński K.: Nonspecific cellular and humoral defence mechanisms in pikeperch (*Sander lucioperca*) grown in a intensive system of culture. Arch. Pol. Fish. 2003, 11, 207-212.
20. Steinfeldt S., Fontanie P., Overton J. L., Polcar T., Toner D., Falahatkar B., Horváth Á., Khemis I. B., Hamza N., Mhetli M.: Current status of Eurasian percid fishes aquaculture, [w:] Kestemont P., Dabrowski K., Summerfelt R. C. (red.): Biology and Culture of Percid Fishes – Principles and Practices. Springer, Netherlands 2015, 817-842.
21. Terech-Majewska E., Grudniewska J., Duchiewicz k., Pajdak J., Kaczorek E., Schulz P., Siwicki A. K.: Wpływ preparatu mikrobiologicznego EM-probiotyk na odporność nieswoistą oraz odporność przeciwwakażną pstrąga tęczowego. Komun. Ryb. 2016, 151, 10-15.
22. Terech-Majewska E., Pajdak J., Grudniewska J., Siwicki A. K.: Efektywne mikroorganizmy w środowisku człowieka, [w:] Skopińska-Różewska E., Siwicki A. K., Zdanowski R. (red.): Wybrane zagadnienia biologii i medycyny. Edycja, Olsztyn 2015, 195-205.
23. Terech-Majewska E., Schulz P., Kaczorek E., Siwicki A. K., Szarek J., Skibniewska K.: Non-specific cellular defence mechanisms of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in intensive and extensive rearing technologies. Aquacult. Res. 2016, 47, 3585-3592.
24. Tkachenko H., Kurhaluk N., Terech-Majewska E., Grudniewska J., Schulz P., Siwicki A. K.: Influence of effective microorganisms on oxidative stress biomarkers in rainbow trout. Abstract book 17th Internat. Conf. Diseases of Fish and Shellfish of the European Association of Fish Pathology. Las Palmas de Gran Canaria, Spain 2015, p. 430.
25. Vliet P. C. Van, Bloem J., de Goede R. G. M.: Microbial diversity, nitrogen loss and grass production after addition of Effective Microorganisms (EM) to slurry manure. Appl. Soil. Ecol. 2006, 32, 188-198.
26. Zakęś Z.: Sandacz. Chów i hodowla. Poradnik hodowcy. Wyd. IRS, Olsztyn 2009, s. 203.
27. Zakęś Z., Rożyński M.: Systemy recyrkulacyjne szansą rozwoju akwakultury sandacza. Komun. Ryb. 2015, 149, 20-23.
28. Zakęś Z., Rożyński M.: Akwakultura i rynek ryb okoniowatych w Europie, [w:] Zakęś Z., Demska-Zakęś K. (red.): Wylęgarnictwo, podchowcy ryb i zarybienia. Wyd. IRS, Olsztyn 2016, s. 277-290.

Adres autora: dr n. wet. Elżbieta Terech-Majewska, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn; e-mail: etam@uwm.edu.pl