

УДК 579.26:574.522

**Е. А. Богатыренко**

**ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА КИШЕЧНОЙ  
БАКТЕРИОФЛОРЫ АМУРСКОГО ОСЕТРА  
ACIPENSER SCHRENCKII И КАЛУГИ HUSO  
DAURICUS, ВЫРАЩЕННЫХ В ИСКУССТВЕННЫХ  
УСЛОВИЯХ**

Впервые изучен состав сообществ культивируемых гетеротрофных бактерий кишечника осетровых рыб *Acipenser schrenckii* и *Huso dauricus*, выращенных в искусственных условиях. Несмотря на одинаковые условия содержания и кормления животных, состав их кишечной бактериофлоры имел существенные различия. Установлено, что у больных рыб значительно уменьшалось таксономическое разнообразие кишечной микробиоты по сравнению со здоровыми особями. Показано, что кишечная микрофлора избирательно формируется за счет микрофлоры воды.

**Ключевые слова:** таксономический состав, нормальная микрофлора, амурский осетр *Acipenser schrenckii*, калуга *Huso dauricus*.

Калуга *Huso dauricus* (Georgi, 1775) и амурский осетр *Acipenser schrenckii* (Brandt, 1869) относятся к одним из наиболее ценных видов осетровых рыб, однако в настоящее время их промысел невозможен из-за значительного сокращения численности популяций в естественных местах обитания. Причиной этого является, в первую очередь, бесконтрольный браконьерский вылов [2]. Положение осложняется высокой требовательностью амурского осетра и калуги к качеству окружающей среды и поздним наступлением половозрелости [24]. В последнее время запасы этих рыб поддерживаются в основном за счет их искусственного разведения, но воспроизводством занимаются лишь несколько предприятий, влияние которых на пополнение биоресурсов незначительно [2]. К тому же одной из ключевых проблем для аквакультурных хозяйств является высокая смертность гидробионтов от различных инфекций. Такие факторы искусственной среды обитания, как низкое качество воды, температурные изменения, дефицит питания, повреждения, высокая плотность популяции животных, являются стрессовыми для рыб и могут серьезно влиять на состояние гидробионтов, в том числе на их нормальную кишечную микрофлору [8]. В настоящее время считается, что рыбы обладают специфической кишечной микрофлорой, состав которой меняется под действием различных эндогенных и экзогенных факторов. И хотя уже известно, что естественный микробиоценоз желудочно-кишечного тракта рыб имеет большое значение для формирования устойчивости к забо-

© Е. А. Богатыренко, 2017

леваниям и препятствует возникновению эпизоотий [13], в литературе отсутствуют данные по изучению состава нормальной микрофлоры осетровых и ее изменения под действием неблагоприятных факторов среды. Поскольку даже незначительные изменения в составе нормальной микрофлоры могут служить одним из первых сигналов неблагополучного состояния организма-хозяина, то результаты исследований в данном направлении позволили бы скорректировать и улучшить традиционные методы профилактики и лечения заболеваний рыб.

Цель работы — изучить и сравнить состав кишечной культивируемой бактериофлоры здоровых и больных особей калуги и амурского осетра выращенных в искусственных условиях.

**Материал и методика исследований.** *Район и объекты исследований.* Для проведения исследований была выбрана Научно-исследовательская рыбобоводная станция Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра (ТИНРО-Центр) в пгт. Лучегорск (Приморский край, Российская Федерация).

В конце мая 2014 г. для экспериментов были отобраны годовалые здоровые особи калуги *Huso dauricus* и амурского осетра *Acipenser schrenckii*, а также особи калуги с признаками патологических процессов: отсутствие аппетита, язвы на поверхности кожи, мелкие многочисленные опухоли вокруг рта, вялая консистенция тела рыбы; при вскрытии: увеличенные, вялые и бледные сердце и печень, раздутый вялый кишечник. На момент отбора материала нездоровых особей амурского осетра обнаружено не было.

До года всех этих рыб содержали в инкубационно-выростном комплексе рыбохозяйственного предприятия с установкой замкнутого водоснабжения. В начале мая 2014 г. годовалых особей осетровых рыб переместили в стандартные садки из капроновой дели площадью 10 м<sup>2</sup>, установленные в водозаборном канале Приморской ГРЭС на типовой понтонной линии на глубине 2 м. Для кормления рыб применяли одинаковые рецептуры производственных кормов производства ТИНРО-Центра с содержанием протеина 42—45% и одинаковые нормы кормления. Плотность посадки животных составляла 15 кг/м<sup>2</sup>. Температура воды на момент отбора проб была +19°C, содержание кислорода — 3,8 мг/л.

*Микробиологические исследования.* Отбор образцов желудочно-кишечного тракта рыб проводили по известной методике, применяемой для изучения кишечной микрофлоры различных видов рыб [19, 22]. Всего было получено 24 образца кишечника рыб: по восемь от каждой изучаемой группы (здоровые калуги, больные калуги, здоровые осетры). Одновременно с этим исследовали микробный состав воды из садков. Отбор проб производили стерильными одноразовыми шприцами из шести различных садков, сообщающихся между собой током воды, согласно МУК по санитарно-бактериологической оценке рыбохозяйственных водоемов [6]. Общий объем образцов воды составил 900 мл.

Гомогенат тканей и воду после серийных разведений высевали на мясопептонный агар и культивировали в термостате при температуре 22°C в течение двух суток [5]. Полученные на чашках колонии подсчитывали, численность микроорганизмов выражали в КОЕ/мл. Различные по морфологии одиночные колонии откальвали и пересевали на МПА для получения чистой культуры.

Идентификацию полученных изолятов проводили на основе морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств [7]. В работе также были использованы готовые тест-системы API компании BioMerieux (Франция).

### *Результаты исследований и их обсуждение*

В ходе исследований установлено, что общая численность гетеротрофных микроорганизмов в пищеварительном тракте здоровых особей обоих видов рыб была примерно одинакова (табл. 1). Это может быть связано с тем, что исследуемые рыбы были одного возраста и имели одинаковый режим и состав питания.

Интересно отметить, что численность бактериофлоры кишечника больных калуг (5,5·10<sup>6</sup> КОЕ/мл) оказалась на порядок ниже, чем у всех здоровых рыб (см. табл. 1). Уменьшение численности микроорганизмов в кишечнике больных особей, скорее всего, связано с развитием в организме исследуемых животных патологических процессов предположительно вирусной природы. Так, на примере атлантического лосося *Salmo salar L.* было показано, что под действием стресса, в том числе при снижении иммунитета, бактерии слабее закрепляются в кишечнике рыб, что сопровождается значительным увеличением количества бактерий в фекалиях [18].

Численность микроорганизмов в воде предприятия (6,3·10<sup>5</sup> КОЕ/мл) оказалась значительно ниже, чем в кишечнике рыб. Вероятнее всего, это объясняется способностью бактерий накапливаться в организме животных из объектов окружающей среды. Аналогичные данные были получены и другими исследователями. Установлено, что численность гетеротрофных микроорганизмов в пищеварительном тракте морских беспозвоночных выше, чем в воде и грунте из мест их обитания [11].

В ходе работы было выделено 245 штаммов бактерий, из них: 82 — из воды, 75 — из кишечника здоровых амурских осетров, 57 — из кишечника здоровых калуг и 31 — из кишечника больных калуг.

Идентификацию полученных штаммов бактерий проводили на основе морфологических, тинкториальных, культуральных и физиолого-биохимических свойств. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Как показывает анализ наших данных, во всех объектах исследования преобладали грамотрицательные бактерии (67—84%) палочковидной формы (74—100%). Из образцов воды было выделено 82 бактериальных штамма, отнесенных к 14 родам. В микробном сообществе воды доминировали пред-

## 1. Численность гетеротрофных микроорганизмов в исследованных пробах

Источники выделения	Численность гетеротрофных микроорганизмов, КОЕ/мл
Вода	$(6,3 \cdot 10^5) \pm 1,5$
Больные калуги <i>Huso dauricus</i>	$(5,5 \cdot 10^6) \pm 2,6$
Здоровые калуги <i>Huso dauricus</i>	$(8,9 \cdot 10^7) \pm 1,4$
Здоровые амурские осетры <i>Acipenser schrenckii</i>	$(5,7 \cdot 10^7) \pm 2,2$

## 2. Таксономическое разнообразие культивируемой бактериофлоры объектов исследования

Роды бактерий	Вода	Здоровые осетры <i>Acipenser schrenckii</i>	Здоровые калуги <i>Huso dauricus</i>	Больные калуги <i>Huso dauricus</i>
<i>Acinetobacter</i>	7	9	0	0
<i>Pseudomonas</i>	12	8	8	6
<i>Alcaligenes</i>	5	6	4	4
<i>Aeromonas</i>	5	5	4	4
<i>Xanthomonas</i>	2	0	0	0
<i>Bacillus</i>	8	8	6	5
<i>Flavobacterium</i>	7	6	5	0
<i>Arthrobacter</i>	5	6	0	0
<i>Micrococcus</i>	7	6	7	0
<i>Moraxella</i>	5	4	4	0
<i>Enterobacter</i>	3	3	6	6
<i>Proteus</i>	2	2	1	1
<i>Enterococcus</i>	6	5	5	0
<i>Vibrio</i>	8	7	7	5
Всего	82	75	57	31

ставители р. *Pseudomonas*, также были многочисленны бактерии родов *Bacillus* и *Vibrio*.

Из образцов кишечника здоровых амурских осетров было получено 75 штаммов бактерий, отнесенных к 13 родам. Стоит отметить, что таксономический состав бактериофлоры осетров почти полностью повторял состав воды. Исключением стали бактерии р. *Xanthomonas*, которые встречались только в воде рыбохозяйственного комплекса. В кишечной микробиоте *A. schrenckii*, как и в микрофлоре воды, были многочисленны бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Vibrio*. Кроме того, в микробном сообществе указанных животных часто встречались представители р. *Acinetobacter*.

Из бактериального сообщества кишечника здоровых особей калуги было выделено 57 штаммов, отнесенных к 11 родам. Доминантными были представители родов *Pseudomonas* и *Micrococcus*. В кишечнике *H. dauricus* было отмечено присутствие тех же групп микроорганизмов, что и в кишечнике амурских осетров, за исключением бактерий, отнесенных к родам *Acinetobacter* и *Arthrobacter*. Указанные микроорганизмы являются типичными представителями почв и грунтов [7], и их отсутствие среди нормальной микрофлоры калуги может быть связано с особенностями питания изучаемых рыб в природных условиях. Известно, что в дикой природе основу питания калуги составляет нектон, представленный различными видами рыб, а амурский осетр является типичным бентофагом, и основу его питания составляют моллюски [4]. Исходя из этого, неудивительно, что для микрофлоры *A. schrenckii*, питающегося в естественных условиях бентосом, будут характерны не только бактерии водной толщи, но и микроорганизмы, ассоциированные с грунтами, которые могут попадать в воду садкового хозяйства вместе с терригенными стоками. Таким образом, несмотря на одинаковые возраст, условия содержания и кормления гидробионтов в искусственных условиях, состав кишечной микрофлоры калуги и амурского осетра имеет различия, что может быть обусловлено эволюционно сложившимися симбионтными отношениями животных с определенными группами микроорганизмов.

Схожие результаты были получены и другими авторами при сравнении микрофлоры веслоноса *Polyodon spathala* и толстолобика *Aristichthys nobilis* [16], а также нескольких представителей семейства карповых [15]. В обеих работах отмечались существенные различия в составе микробных сообществ желудочно-кишечного тракта разных видов рыб, несмотря на одинаковые условия их содержания и кормления.

На определенную избирательность при формировании кишечной микрофлоры рыб указывает и тот факт, что, несмотря на присутствие в пробах воды представителей р. *Xanthomonas*, указанная группа микроорганизмов не была зафиксирована нами в образцах ни одного из видов рыб. При этом все группы микроорганизмов, выделенные из кишечника рыб, были обнаружены в воде, что свидетельствует о том, что микрофлора рыб избирательно формируется за счет микрофлоры воды.

Идея о том, что микрофлора водных животных не полностью повторяет состав и численность микробиоты окружающей среды, прослеживается у ряда авторов, что подчеркивает сложность механизма формирования нормальной микрофлоры организма-хозяина. Подобный вывод получен при изучении пресноводных [15] и морских [17] рыб, ракообразных [12, 23], двустворчатых моллюсков [1, 20] и иглокожих [3]. Так, при изучении микрофлоры четырех видов рыб семейства карповых были отмечены не только межвидовые различия в составе доминантных групп прокариотных организмов, но и существенные различия в бактериофлоре рыб и воды из прудов их искусственного воспроизводства [17]. В других исследованиях, посвященных изучению средиземноморских устриц, было показано, что, несмотря на схожий таксономический состав микробиоты моллюсков и воды из мест обитания животных, в бактериальном сообществе устриц доминировали представители р. *Vibrio* (65%), в то время как доля выделенных из

воды вибрионов составила менее 1% [20]. Стоит отметить, что среди выделенных из устрицы вибрионов не было обнаружено патогенных видов, что доказывает наличие симбиотных отношений между этими бактериями и моллюсками. Таким образом, высокое содержание вибрионов в сообществе устрицы объясняется активным накоплением этих микроорганизмов из воды.

В кишечнике исследуемых нами больных особей калуги наблюдалось резкое снижение таксономического разнообразия бактерий по сравнению со здоровыми особями этого вида. Из образцов этих животных был выделен всего 31 штамм бактерий, отнесенных к семи родам. Из состава кишечной микрофлоры больных калуг исчезли характерные для здоровых особей представители родов *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Enterococcus*. Возможно, отсутствие указанных микроорганизмов в микрофлоре больных калуг объясняется тем, что из-за воспалительных процессов, вызванных инфекционным агентом, в макроорганизме происходит усиление сползания кишечной слизи, вместе с которой удаляются представители нормальной микрофлоры, позволяя оставшимся и наиболее адаптированным бактериям колонизировать поверхность энтероцитов [18]. Другим возможным объяснением может быть негативное действие на микробные сообщества рыб смены условий выращивания животных при их перемещении из бассейнов предприятия в садки. Стресс, вызванный подобными изменениями, мог привести к исчезновению у некоторых особей калуги бактерий, ответственных за резистентность к патогенным микроорганизмам, что и привело к инфицированию ослабленных рыб [14, 18]. Ведь известно, что важнейшими функциями нормальной микрофлоры являются формирование иммунологической резистентности макроорганизма и обеспечение «первой линии защиты» против инвазии патогенных организмов [13].

Изменения в составе нормальной микрофлоры под действием различных факторов стресса и их влияние на свойства иммунной системы организма-хозяина хорошо изучены на примере человека и некоторых наземных животных [9, 10]. Что же касается рыб, то в литературе имеются ограниченные сведения о негативном влиянии на симбиотную микробиоту таких факторов, как голод [22], изменения в составе питания [19], колебания температуры воды [21], действие поллютантов [8], что указывает на необходимость проведения более детальных исследований.

Полученные нами данные о снижении численности и уменьшении таксономического разнообразия бактерий в кишечнике осетровых рыб свидетельствуют о неблагоприятном физиологическом состоянии макроорганизмов, что может быть связано как с резким изменением условий выращивания рыб, так и с неудовлетворительным состоянием воды и кормов, спровоцировавшим развитие инфекционного процесса. Для разработки эффективной системы предотвращения вспышек заболеваний осетровых рыб на основе контроля состояния нормальной микрофлоры животных, несомненно, требуются дальнейшие исследования. При этом одним из направлений, заслуживающих особого внимания, является разработка пробиотических препаратов микробного происхождения из представителей бактериального сообщества здоровых особей рыб. В настоящее время в аквакультуре широ-

ко применяются различные виды пробиотиков, положительный эффект которых заключается в снижении смертности и повышении выживаемости животных за счет усиления их резистентности к патогенным микроорганизмам, синтеза биологически активных веществ, в том числе стимулирующих рост индигенной микрофлоры, продукции ферментов, улучшающих пищеварение, а также за счет очистки и улучшения качества воды [13].

### Заключение

Установлено, что в состав кишечной бактериофлоры здорового амурского осетра *Acipenser schrenckii* входят представители следующих родов: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Vibrio*. В состав кишечной бактериофлоры здоровой калуги *Huso dauricus* входят представители следующих родов: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Vibrio*. У больных калуг отмечено значительное снижение численности и таксономического разнообразия кишечных симбионтных бактерий по сравнению со здоровыми особями этого вида.

Показано, что бактериальные сообщества желудочно-кишечного тракта осетровых рыб избирательно формируются за счет бактериального сообщества воды из садков рыбоводной станции. Тем не менее, несмотря на одинаковые возраст, условия содержания и кормления гидробионтов, состав кишечной микрофлоры этих видов рыб имеет различия, что может быть связано с физиологическими и экологическими особенностями двух видов.

Дальнейшее изучение биологических свойств полученных штаммов бактерий может стать основой разработки пробиотических препаратов для использования при разведении осетровых рыб.

\*\*

*Вперше вивчено склад угруповань гетеротрофних бактерій, що культивуються, кишечника осетрових риб *Acipenser schrenckii* і *Huso dauricus*, яких було вирощено в штучних умовах. Незважаючи на однакові умови утримання і годівлі тварин, склад їхньої кишкової бактеріофлори мав суттєві відмінності. Встановлено, що у хворих риб значно зменшувалось таксономічне багатство кишкової мікробіоти порівняно зі здоровими особинами. Показано, що кишкова мікрофлора вибірково формується за рахунок мікрофлори води.*

\*\*

*Composition of cultivated heterotrophic bacteria of intestine of artificially bred sturgeons *Acipenser schrenckii* and *Huso dauricus* was investigated for the first time. Regardless of similar farming and feeding conditions composition of their intestinal bacterioflora was notably different. It was stated that in ill specimens taxonomic diversity of intestinal bacterioflora decreased as compared with healthy specimens. Intestinal bacterioflora was shown to be selectively formed by the aquatic bacterioflora.*

\*\*

1. Беленева И.А., Жукова Н.В., Масленникова Э.Ф. Сравнительное изучение структуры микробных сообществ мидии *Mytilus trossulus* из культивируемой и природной популяции залива Петра Великого // Микробиология. — 2003. — Т. 72, № 4. — С. 528—534.
2. Беляев В.А., Иванов С.А. Искусственное воспроизводство амурских осетровых рыб // Осетровые на рубеже 21 века. — Астрахань: КаспНИРХ, 2000. — С. 220—222.
3. Богатыренко Е.А., Бузолева Л.С. Характеристика бактериального сообщества кишечника дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* // Микробиология. — 2016. — Т. 85, № 1. — С. 92—99.
4. Кошелев В.Н., Колобов В.Ю. Питание молоди калуги и амурского осетра в устье Амура // Вестн. АГТУ. Сер. Рыбное хозяйство. — 2013. — Т. 1. — С. 20—28.
5. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие. — М.: Медицина, 2004. — 575 с.
6. Методические указания по санитарно-бактериологической оценке рыбохозяйственных водоемов №13-4-2/1742, утв. 27.09.1999 г. // Сборник инструкций по борьбе с инфекциями рыб. — М.: АМБ-Агро, 1999. — Ч. 2. — С. 161—177.
7. Определитель бактерий Берджи в 2-х томах / Под ред. Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит. — М.: Мир, 1997. — 800 с.
8. Шивокене Я., Мицкенене Л., Восилене З. Влияние сырой нефти на бактериоценоз кишечника радужной форели // Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных: Материалы междунар. науч. конф. — Саранск, 2005. — С. 273—276.
9. Arne C., Bridges J.F., Hoole D. Infections in the vertebrate host // Biology of Eucestoda. — 1983. — Vol. 2. — P. 449—538.
10. Brown K., DeCoffe D., Molcan E., Gibson D.L. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease // Nutrients. — 2012. — Vol. 4 (11). — P. 1552—1553.
11. Cavallo R.A., Acquaviva M.I., Stabili L. Culturable heterotrophic bacteria in seawater and *Mytilus galloprovincialis* from a Mediterranean area (Northern Ionian Sea—Italy) // Environ. monitoring and assessment. — 2009. — Vol. 149 (1). — P. 465—475.
12. Chaiyapechara S., Rungrassamee W., Suriyachay I. et al. Bacterial community associated with the intestinal tract of *P. monodon* in commercial farms. // Microb. Ecol. — 2012. — Vol. 63, N 4. — P. 938—953.
13. Cruz P.M., Ibanez A.L., Hermosillo O.A., Saad H.C. Use of probiotics in aquaculture // ISRN Microbiology. — 2012. [Http://doi.org/10.5402/2012/916845](http://doi.org/10.5402/2012/916845).
14. Li T., Long M., Ji C. et al. Alterations of the gut microbiome of largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*) suffering from furunculosis // Sci. Rep. — 2016 — Vol. 6. — Article number: 30606.
15. Li X., Yu Y., Feng W. et al. Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae // J. microbiology. — 2012. — Vol. 50 (1). — P. 29—37.



16. Li X.M., Zhu Y.J., Yan Q.Y. et al. Do the intestinal microbiotas differ between paddlefish (*Polyodon spathala*) and bighead carp (*Aristichthys nobilis*) reared in the same pond? // J. Appl. Microbiol. — 2014. — Vol. 117. — P. 1245—1252.
17. Martins P., Cleary D.F., Pires A.C. et al. Molecular analysis of bacterial communities and detection of potential pathogens in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis* // PLoS One. — 2013. — 8 (11):e80847.
18. Olsen R.E., Sundell K., Hansen T. et al. Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: An electron microscopical study // Fish Physiology and Biochem. — 2002. — Vol. 26. — P. 211—221.
19. de Paula Silva F.C., Nicoli J. R., Zambonino-Infante J.L. et al. Influence of the diet on the microbial diversity of faecal and gastrointestinal contents in gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*) // FEMS Microbiol. Ecol. — 2011. — Vol. 78. — P. 285—296.
20. Pujalte M.J., Ortigosa M., Macian M.C., Garay E. Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater // Intern. microbiol. — 1999. — Vol. 2. — P. 259—266.
21. Tang Y., Tao P., Tan J. et al. Identification of bacterial community composition in freshwater aquaculture system farming of *Litopenaeus vannamei* reveals distinct temperature-driven patterns // Intern. J. Mol. Sci. — 2014. — Vol. 15. — P. 13663—13680.
22. Xia J.H., Lin G., Fu G.H. et al. The intestinal microbiome of fish under starvation // BMC Genomics. — 2014. — Vol. 15 (266).
23. Zhang M., Sun Y., Chen L. et al. Symbiotic bacteria in gills and guts of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) differ from the free-living bacteria in water // PLoS One. — 2016. — 11(1):e0148135.
24. Zhuang P., Kynard B., Zhang L. et al. Comparative ontogenetic behavior and migration of kaluga, *Huso dauricus*, and Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*, from the Amur river // Envir. Biol. Fish. — 2003. — Vol. 66. — P. 37—48.

Дальневосточный университет,  
Владивосток, РФ

Поступила 06.09.16