

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ГИДРОМЕТЕОРОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Кафедра водных биоресурсов и аквакультуры и гидрохимии

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

На тему: Применение пробиотиков на основе бактерий в рыбном  
хозяйстве

Исполнитель: Капранов Максим Константинович

Руководитель: канд. техн. наук, Королькова Светлана Витальевна

«К защите допускаю»

Заведующая кафедрой



(подпись)

канд. техн. наук, Королькова Светлана Витальевна

«22» 06 2022 г.

Санкт-Петербург

2022

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	3
Глава 1. Свойства пробиотиков.....	7
1. 1. Роль микроорганизмов пищеварительного тракта рыб в пищеварении.....	7
1. 2. Пробиотики в аквакультуре.....	12
1. 2. 1. Пробиотик и среда.....	12
1. 2. 2. Взаимодействие микробиоты и хозяина .....	14
1.3. Пробиотики как полезные микроорганизмы в аквакультуре: способы действия .....	15
1. 3. 1. Функции основных групп бактерий .....	15
1. 3. 2. Потенциал пробиотических препаратов: возможные способы действия .....	19
Глава 2. Примеры исследований на пробиотиках .....	24
2. 1. Материалы и методы исследований .....	24
2.2. Результаты и обсуждение исследования .....	28
2.3. Выводы по разделу .....	38
Глава 3. Значение местных бактерий в усовершенствовании действия пробиотических препаратов.....	40
3.1. Обсуждение результатов исследования применения пробиотиков .....	43
3. 2. Выводы по сравнительному анализу пробиотиков.....	43
Заключение и выводы.....	47
Исходя из поставленных задач были сделаны следующие выводы:..	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	50

## ВВЕДЕНИЕ

Ведение рационального и эффективного рыбного хозяйства – главная задача рыбовода. Для обеспечения большими объемами производства живой рыбы и рыбной продукции, происходит тенденция перехода от традиционных методов выращивания к индустриальным. Такой переход можно описать уходом от естественного выращивания к биологически обоснованному технологичному культивированию, характеризуемое увеличением плотности посадки, переходом на сбалансированные комбикорма, высоким уровнем механизации и автоматизацией производственных процессов.

Однако, индустриальные условия выращивания кардинально отличаются от природной среды их обитания: рыбы лишены естественной пищи, нарушены процессы самоочищения воды, увеличен уровень органического загрязнения воды и число условно-патогенных бактерий в водной среде. Такие изменения, как правило, носят негативный характер: приводят к снижению темпа роста и устойчивости рыб к заболеваниям, увеличивают смертность. Стрессы различного происхождения, неизбежные при интенсивном культивировании, ещё более усугубляют ситуацию [7].

Помимо биолого-экологических факторов пресса на выращиваемых рыб, так же существуют и технико-технологические, характеризуемые широким использованием антибактериальных препаратов и загрязненностью кормов ксенобиотиками.

Все эти факторы влияют в первую очередь на иммунную систему рыб, в частности через желудочно-кишечный тракт. Через ЖКТ происходит постоянный обмен с внешней средой, поэтому необходимо следить за его состоянием. В первую очередь, это связано с уровнем баланса микрофлоры. Микрофлора – совокупность организмов, находящиеся в симбиозе с организмом. Нарушение её баланса приводит к развитию заболеваний и увеличению смертности. Ранее, при клинических признаках болезни, в аквакультуре использовались антибиотики.

Клинические признаки неясно отображают специфику болезни, особенно на ранних этапах ее развития, и выражается в общих чертах в виде пониженного аппетита и активности. Это происходит в связи со снижением функциональной активности систем органов, в том числе и иммуннокомпетентных, за счет их патологических изменений и поражения микрофлорой, проникающей из кишечника вследствие дегенеративно-дистрофических изменений его слизистой оболочки. В связи с тем, что антибиотики узконаправленны и подавляют естественную микрофлору, их роль в защите рыб от заболеваний неоднозначна. К негативным последствиям относится их накопление в среде культивирования и образовании антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов.

Альтернативным решением проблемы является воздействие на организм, повысив его резистентность и сохранив при этом местную микрофлору. Пробиотики – относительно новое и быстроразвивающееся направление в аквакультуре. В целом, они давно используются в медицине и сельском хозяйстве и имеют большую доказательную базу полезности, в рыбном хозяйстве они так же стали неотъемлемой частью повышения продуктивности воспроизводства. Внедрение полезных бактерий в организм рыб, полученных на основе или выделенных из теплокровных наземных животных, оказывает положительное влияние на желудочно-кишечный тракт, повышая его резистентность к патогенам и увеличивая эффективность комбикормов.

В данной динамически развивающейся области, не смотря на неоспоримую пользу бактерий, основанных на опыте работы с теплокровными сельскохозяйственными животными и людьми, мало внимания уделяется использованию местных бактерий из ЖКТ здоровых рыб. Вероятней всего, что они в будущем станут не менее востребованными, так как они также имеют ряд преимуществ, особенно в отношении некоторых биотехнологических проблем (например, температура, соленость, знакомая среда).

Актуальность работы: существует потребность в выращивании здоровой, экологически чистой рыбы и рыбной продукции, однако тенденция к индустриализации ведет к рискам распространения заболеваний, ухудшению роста и развития рыб. На текущий момент эффективность пробиотиков неоднозначна в связи с тем, что большинство бактерий – результат опыта с теплокровными животными. Неизвестно досконально, будут ли пробиотики на основе бактерий желудочно-кишечного тракта рыб работать лучше, а также какими методами возможен отбор бактерий-кандидатов в пробиотики, специализирующейся на достижение абсолютных результатов. Данная работа была выполнена для того, чтобы показать значимость усовершенствования пробиотических препаратов и, на основе последних научных данных, доказать преимущества введения специализированных разработок отбора новых бактерий-кандидатов в пробиотики.

**Объект исследования:** объекты аквакультуры, микроорганизмы, пробиотики

**Предмет:** использование, направления развития, разработка пробиотиков на основе бактерий в аквакультуре.

**Цель работы** – оценка эффективности использования текущих пробиотиков на основе бактерий в аквакультуре и выделение новых подходов их использования с учетом последних научных достижений.

Для достижения поставленной цели были выделены следующие задачи:

1. Оценить влияние индустриализации аквакультуры на микрофлору пищеварительного тракта рыб нормального физиологического состояния;
2. Привести данные о пробиотиках на основе бактерий в аквакультуре и рассмотреть их перспективы;
3. Описать основные и потенциальные функции пробиотиков, представителей бактерий, использующиеся на данный момент в аквакультуре;

4. Получить научные доказательства пользы пробиотических препаратов на примере бестера в стрессовых условиях среды;
5. Выделить положения, выдвигаемые на защиту, для доказательства возможности улучшения пробиотических препаратов и обосновать их;
6. Проанализировать научные достижения в этой области и аргументировать пользу получения специализированных пробиотиков.

**Практическая ценность** выпускной квалификационной работы материалы исследования можно использовать в рыбных хозяйствах при обсуждении темы приобретения пробиотиков для рыб; также материал работы можно использовать в преподавании учебных дисциплин по направлению обучения Водные биоресурсы и аквакультура.

**Структура выпускной квалификационной работы:** Выпускная квалификационная работа на 55 страницы. Состоит из введения, 3 глав с 8 подглавами, заключения, в котором содержатся выводы, списка использованной литературы в количестве 55 наименований.

## Глава 1. Свойства пробиотиков

### 1. 1. Роль микроорганизмов пищеварительного тракта рыб в пищеварении

С развитием интенсивных методов аквакультуры, где основой рациона являются комбикорма, все большее внимание уделяется симбионтному пищеварению с участием микрофлоры. К настоящему времени определена важная роль микрофлоры кишечника в пищеварительном процессе рыб. Потребляя определенное количество питательных веществ химуса кишечника, микрофлора поставляет организму продукты своего метаболизма. Микрофлора синтезирует некоторые аминокислоты и витамины, необходимые для нормального роста и развития самих рыб. Незаменима роль микрофлоры в расщеплении клетчатки, хитина, пигментов и желчных кислот, практически недоступных ферментам самих рыб. Известно, что переваримость (или физиологическая доступность) углеводов, особенно растительных, незначительна. В комбикормах же, как правило, их количество достигает 30 %, из которых около половины приходится на трудногидролизуемые углеводы. Кроме того, микрофлора, препятствуя развитию патогенных микроорганизмов, выполняет защитную функцию. Материалы по данному вопросу достаточно широко освещены в мировой литературе [16, 36, 37].

Анализ литературных данных свидетельствует о существенной роли в жизнедеятельности хозяина микрофлоры кишечника. Выявлено, что микроорганизмы пищеварительного тракта рыб синтезируют такие незаменимые аминокислоты как лизин, гистидин, аргинин, и заменимые - цистин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, серин, глутаминовую кислоту, аланин и тирозин, а также ферменты и дефицитные витамины группы В, С, К и др.

Для кишечной микрофлоры характерна высокоспецифичная ферментная система, определяющая их участие в расщеплении трудногидролизуемых пищевых веществ.

Численность физиологической группы микроорганизмов соответствует пищевому субстрату организма-симбионта. В тоже время, нормальная кишечная флора рыб подвержена существенным качественным и количественным изменениям под воздействием различных абиотических и биотических факторов, что является физиологической нормой.

Также доказано, что пищеварение рыб определяется не только качественным составом и химизмом кормов, ферментными системами органов пищеварения, но и характером эндосимбиотических взаимоотношений между организмом-симбионтом и населяющими его пищеварительный тракт микрофлорой. Важное значение последних, как отмечали выше, определяется их способностью образовывать и обеспечивать организм хозяина жизненно необходимыми метаболитами, в том числе гормоноподобными веществами, антибиотиками и т.д.

В исследованиях микрофлоры пищеварительного тракта скумбрии, бонито, желтохвоста и других видов морских рыб было показано, что доминирующие в кишечнике штаммы (на примере рода *Vibrio*) морфологически и биохимически идентичны при всех видах кормов [36].

Изучая синтез свободных аминокислот микроорганизмами пищеварительного тракта сеголетков, двухлетков и трехлетков карпа, белого амура и 17 линия были отмечены различия состава синтезируемых аминокислот в зависимости от качества пищи и возраста рыб. На примере карповых рыб было установлено следующее [1]:

1. Наиболее интенсивный микробный синтез аминокислот характерен для рыб, питающихся комбикормами: у трехлетнего линя в 25, трехлетнего амура в 9.6 и у сеголетков карпа в 3.7 раза интенсивнее, чем при выращивании на естественной пище [1].
2. Микроорганизмы пищеварительного тракта линя при выращивании на комбикормах синтезировали в больших количествах метионин, фенилаланин, валин, лейцин, треонин, триптофан, что, по-видимому, связано с их недостатком в рационе. А у линя, питающегося

естественной пищей, микроорганизмы синтезировали в основном аланин, глутаминовую кислоту, фенилаланин, метионин и тирозин [1].

3. У одновозрастных карпов при питании комбикормом, микроорганизмы синтезировали главным образом в больших концентрациях аргинин, глутаминовую кислоту и аланин, а при питании естественной пищей у сеголеток карпа микроорганизмы пищеварительного тракта преимущественно синтезировали аланин, фенилаланин, глутаминовую кислоту, треонин, у двухлетков - аланин, глутаминовую кислоту, лейцин [1].
4. Осенью, со снижением пищевой активности синтетическая активность микроорганизмов пищеварительного тракта рыб резко возрастает [1].

На основании этих данных можно утверждать о немаловажном значении кишечной микрофлоры в обмене веществ организма хозяина, в содержании стабильности витаминов и аминокислот при неблагоприятных условиях питания рыб.

Как отмечали ранее, микроорганизмы отдельных физиологических групп обладают специфичностью в расщеплении пищевых субстратов. Функциональная деятельность кишечных бактерий разнообразна и зависит от характера и типа питания рыбы.

В расщеплении углеводсодержащих пищевых субстратов принимают участие такие группы микроорганизмов, как амилолитические, молочнокислые и целлюлозолитические бактерии. Согласно литературным данным, молочнокислые бактерии являются облигатными представителями кишечной микрофлоры рыб. Причём, молочнокислые бактерии в максимальных количествах обнаруживаются в кишечниках рыб, питающихся естественной пищей, а бактерии, расщепляющие белковые вещества, в кишечниках рыб, питающихся комбикормами.

Расщепляя в полости кишечника животных белки, углеводы и другие органические соединения, микроорганизмы выполняют весьма важную роль в обеспечении себя и организма-симбионта необходимыми веществами. Однако

их функциональная деятельность зависит от ряда экзофакторов - составом пищи, спектром и интенсивностью питания, возрастом и физиологическим состоянием организма - симбионта, в том числе возрастными изменениями функционирования пищеварительного тракта. Важное значение для нормального состояния кишечной микрофлоры имеет также организация кормления.

Известно, что всякое значительное искусственное вмешательство во взаимодействие организма животного и его микробного населения, в результате которого резко подавляются или исчезают микробы отдельных видов, может привести к снижению темпа роста и увеличению потерь при выращивании, а также патологии (Рис. 1). Следовательно, восстановление симбиотического равновесия в организме животных, нарушенное неправильно организованным кормлением, является залогом повышения темпа роста и выживаемости рыб в интенсивной аквакультуре.



Рис. 1. Факторы пресса рыб и способы влияния на баланс микрофлоры в условиях интенсивной аквакультуры.

\*В зависимости от метода выращивания, может относиться к биолого-экологическим факторам, выражается в гипоксии, резких скачках температуры, нарушении солености и др.

\*\*Факторы стресса, такие как физические травмы, загрязнение различными химическими веществами, воздействие анестезирующих веществ, вакцинирование и др.

Обобщая литературные данные о значении микрофлоры пищеварительного тракта рыб в их жизнедеятельности, следует отметить факторы, контролирующие ее численность. Эти факторы, следующие:

- 1) пища, которая является основным экзофактором, влияющим на микробиоценоз пищеварительного тракта;
- 2) интенсивное кормление рыб, так как способствует значительным изменениям бактериальной флоры, количественное и качественное соотношение которой в популяции содержимого кишечника зависит от биохимического состава пищи организма-симбионта;

- 3) групповой состав микроорганизмов, на который влияет специфическая секреция пищеварительных желез и слизистой пищеварительного тракта;
- 4) численность кишечной микрофлоры рыб, которая зависит от температуры воды и интенсивности питания рыб. Максимальное количество бактерий характерно в период интенсивного питания организма-симбионта.

Следовательно, для более полного познания микрофлоры пищеварительного тракта рыб, ее качественных и количественных изменений и функциональной деятельности необходимо обратить особое внимание на факторы, контролирующие ее проявления.

## **1. 2. Пробиотики в аквакультуре**

### **1. 2. 1. Пробиотик и среда**

По мере появления новых данных было предложено несколько определений пробиотиков. Наиболее широко используемым до сих пор является определением, как пробиотик - живая микробная кормовая добавка, которая благотворно влияет на животное-хозяина, улучшая его кишечный баланс [21].

Исторически интерес был сосредоточен на наземных организмах, и термин "пробиотик" неизбежно относился к грамположительным бактериям, относящимся к роду *Lactobacillus*. Но для аквакультуры данное определение требует некоторого пересмотра. Подобно человеку и наземным животным [21], в аквакультуре можно предположить, что кишечная микробиота не существует как единое целое сама по себе, а находится в постоянном взаимодействии с окружающей средой и функциями хозяина. Многие исследователи уже изучали связь кишечной микробиоты с водной средой обитания или пищей. Обобщая результаты этих исследований на рыбах, приведены доказательства того, что бактерии, присутствующие в водной среде, влияют на состав микробиоты кишечника и наоборот. Роды,

присутствующие в кишечном тракте, как правило, представляются теми из окружающей среды или рациона, которые могут выживать и размножаться в кишечном тракте. Однако можно утверждать, что в системах аквакультуры непосредственная окружающая среда оказывает гораздо большее влияние на состояние здоровья, чем у наземных животных или людей.

Действительно, взаимодействие хозяина и микроба часто качественно и количественно отличается для водных и наземных видов. В водной среде хозяева и микроорганизмы живут в одной экосистеме. В отличие от этого, в большинстве наземных систем кишечник представляет собой влажную среду обитания в среде с ограниченным количеством воды. В некотором смысле, у микробов в водной среде есть выбор жить в ассоциации с потенциальным хозяином (кишечный тракт, жабры или кожа) или нет, в то время как в наземной среде заметная активность может быть ограничена водными нишами, такими как те, которые предоставляются кишечником животных-хозяев [26].

В гораздо большей степени, чем наземные животные, водные сельскохозяйственные животные окружены средой, которая поддерживает их патогены независимо от животных-хозяев, и поэтому (оппортунистические) патогены могут достигать высокой плотности вокруг животного [33]. Окружающие бактерии постоянно попадают в организм либо с кормом, либо при питье хозяина. Это особенно характерно для фильтрующих кормушек, которые заглатывают бактерии с высокой скоростью из воды культуры, вызывая естественное взаимодействие между микробиотой окружающей среды и живым кормом.

Если вначале исследования пробиотиков в аквакультуре фокусировались на молоди рыб, то в последнее время больше внимания уделяется личинкам рыб и моллюсков, а также живым кормовым организмам. Наземные животные (млекопитающие) наследуют важную часть первоначально колонизирующих бактерий через контакт с матерью, в то время как водные виды обычно выметывают аксеничные икринки в воду, без

дальнейшего контакта с родителями. Это позволяет бактериям окружающей среды колонизировать поверхность яйца. Кроме того, свежесвылупившиеся личинки или новорожденные животные не имеют полностью развитой кишечной системы и не имеют микробного сообщества в кишечном тракте, на жабрах или на коже, поскольку на ранних стадиях развития водных личинок их первичная микробиота частично зависит от воды, в которой они выращиваются [25].

### **1. 2. 2. Взаимодействие микробиоты и хозяина**

Выше было сказано, что взаимодействие между микробиотой, включая пробиотики, и хозяином не ограничивается кишечным трактом. Пробиотические бактерии также могут быть активны на жабрах или коже хозяина, а также в окружающей среде. Интенсивное взаимодействие между культуральной средой и хозяином в аквакультуре подразумевает, что большое количество пробиотиков получается из культуральной среды, а не непосредственно из корма, как это предусмотрено определением.

Поэтому предлагается следующее модифицированное определение, которое позволяет более широко применять термин «пробиотик» и учитывает возражения, высказанные ранее. Пробиотик определяется как живая микробная добавка, которая оказывает благоприятное воздействие на хозяина путем изменения микробного сообщества, связанного с хозяином или окружающей средой, путем обеспечения лучшего использования корма или повышения его питательной ценности, путем усиления реакции хозяина на болезнь или путем улучшения качества окружающей среды.

Исходя из этого определения, пробиотики могут включать в себя микробные добавки, которые предотвращают размножение патогенов в кишечном тракте, на поверхностных структурах и в культуральной среде культивируемых видов, обеспечивают оптимальное использование корма путем содействия его перевариванию, улучшают качество воды или стимулируют иммунную систему хозяина. Бактерии, доставляющие необходимые питательные вещества хозяину (одноклеточный белок), не

будучи активными в организме хозяина или не взаимодействуя с другими бактериями, с окружающей средой хозяина или с самим хозяином, не включены в это определение. Хотя пробиотики могут также вносить существенный вклад в здоровье и зоотехнические показатели пищевым путем и хотя иногда невозможно отделить кормление водных организмов от контроля окружающей среды, данный обзор ограничен использованием пробиотиков в качестве агентов биологического контроля протекания заболеваний в аквакультуре.

### **1.3. Пробиотики как полезные микроорганизмы в аквакультуре: способы действия**

#### **1.3.1. Функции основных групп бактерий**

Нормальная микрофлора выполняет функцию барьера и предполагается, что резидентная микрофлора предупреждает колонизацию кишечника патогенными бактериями (Рис. 2) [8]. Это объясняется тем, что многие патогенные бактерии требуют прикрепления к слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта хозяина, чтобы инициировать развитие заболевания [55]. Важным механизмом действия пробиотических бактерий является конкуренция за места адгезии, также известная как "конкурентное исключение".

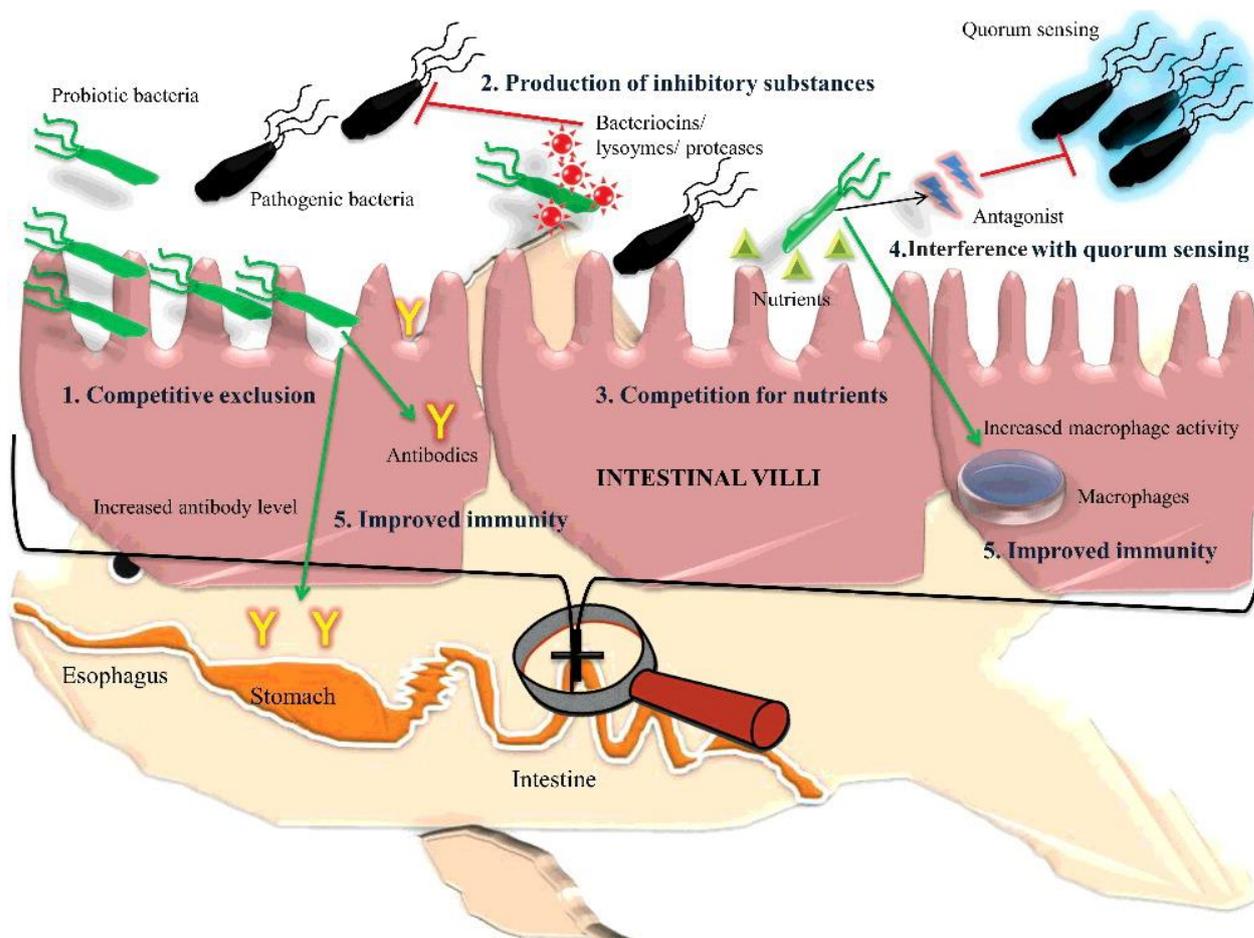


Рис. 2. Общий механизм действия пробиотиков. (1) Конкуренентное исключение - пробиотический организм колонизирует кишечник, тем самым подавляя колонизацию патогенных бактерий. (2) Пробиотические организмы вырабатывают определенные ингибирующие вещества, которые препятствуют развитию патогенных организмов. (3) Конкуренция за питательные вещества - пробиотические организмы используют питательные вещества, что приводит к недоступности питательных веществ для патогенных организмов. (4) Вещества, вырабатываемые пробиотиками, действуют как антагонисты механизма кворум сенсинга. (5) Улучшение иммунитета - повышение активности макрофагов и уровня антител [55].

Наиболее успешными в этом смысле являются спорообразующие *Bacillus sp.* и дрожжи.

Сенная палочка (*Bacillus subtilis*) – аэроб, растущий и размножающийся при доступе молекулярного кислорода, относится к транзитным микроорганизмам. Эти бактерии продуцируют большое количество

антибиотических и других веществ, подавляющих многие патогенные микроорганизмы. Количество описанных на данный момент антибиотиков, продуцируемых аэробными спорообразующими бактериями рода *Bacillus*, приближается к 200, а видом *B. subtilis* к 70. *B. subtilis* используют в промышленности при производстве антибиотиков класса полимиксинов (с бактерицидным действием в отношении грамотрицательных бактерий). Обладая антагонистическим эффектом к патогенным микроорганизмам, бактерии рода *Bacillus* в то же время продуцируют целый ряд ферментов, лизирующих крахмал, пектины, целлюлозу, жиры, белки, производят различные аминокислоты. Все это определяет высокую эффективность пробиотических препаратов, полученных на их основе [2].

Многие исследователи отмечают высокую антагонистическую активность споровых пробиотических бактерий в отношении *Staphylococcus*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Klebsiella*, дрожжей (из рода *Candida*) и *Helicobacter pylori* [11, 14, 29]. Важно отметить и то, что споровые бактерии относятся к группе «аллохтонных микроорганизмов», т. е. они не способны длительное время колонизировать кишечник, и после прекращения применения пробиотического препарата постепенно выводятся из организма, что создает условия для бесконкурентного восстановления аутофлоры хозяина. Поэтому препараты на основе споровых бактерий занимают промежуточное положение между про- и синбиотиками (комбинация пробиотиков с пребиотиками) [12].

Помимо конкурентного исключения, еще одной способностью пробиотиков является выработка ингибирующих веществ путем влияния на микробиоциноз кишечника (не связанные преимущественно с производством бактерицинов). Наиболее безопасные и успешные в этой группе являются молочнокислые бактерии, рода *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, вид *Enterococcus faecium*. Они являются представителями нормальной микрофлоры как человека, так и рыб, отличие лишь в том, что у рыб молочнокислые бактерии не являются доминантными видами в ЖКТ.

Основной продукт жизнедеятельности гомоферментативных МКБ – молочная кислота. Гетероферментативные молочнокислые бактерии в процессе ферментации гексоз образуют эксимоллярные количества молочной кислоты, уксусной кислоты/этанола и диоксид углерода (CO<sub>2</sub>). Антимикробная активность молочной кислоты при низких концентрациях невысока, особенно при нейтральном pH [15]. Уксусная кислота – более сильный ингибитор по сравнению с молочной кислотой в отношении бактерий, плесеней и дрожжей, тогда как пропионовая кислота обладает высокой антимикробной активностью. Из смеси кислот, производимых МКБ, молочная кислота, в основном, снижает кислотность, в то время как остальные кислоты (уксусная кислота и пропионовая кислота) работают как противомикробные средства путем воздействия на клеточную мембрану патогенов [17]. Спектр ингибирования антимикробными соединениями МКБ включает такие микроорганизмы, вызывающие болезни рыб и моллюсков, как *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Pasteurella piscicida*, *Vibrio anguillarum*, *V. salmonicida*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* и *Yersinia ruckeri*, *Lc. garvieae*, *S. iniae*, патогенная *E.coli*, грибы рода *Candida*, плесневые грибы и др. [40, 41, 50].

На графике (Рис. 3) видно, что молочнокислые и спорообразующие бактерии на данный момент являются доминантными для использования в пробиотиках. За основу данной статистики взяты самые популярные препараты, используемые в аквакультуре, такие как «Субтилис», «Зоонорм», «Пролам», «Моноспорин», «Интенсивит», «СУБ-ПРО», «Бифидум-СХЖ». Важно отметить, что пробиотики могут содержать несколько видов бактерий или с добавлением пребиотиков, что делает их синбиотиками.

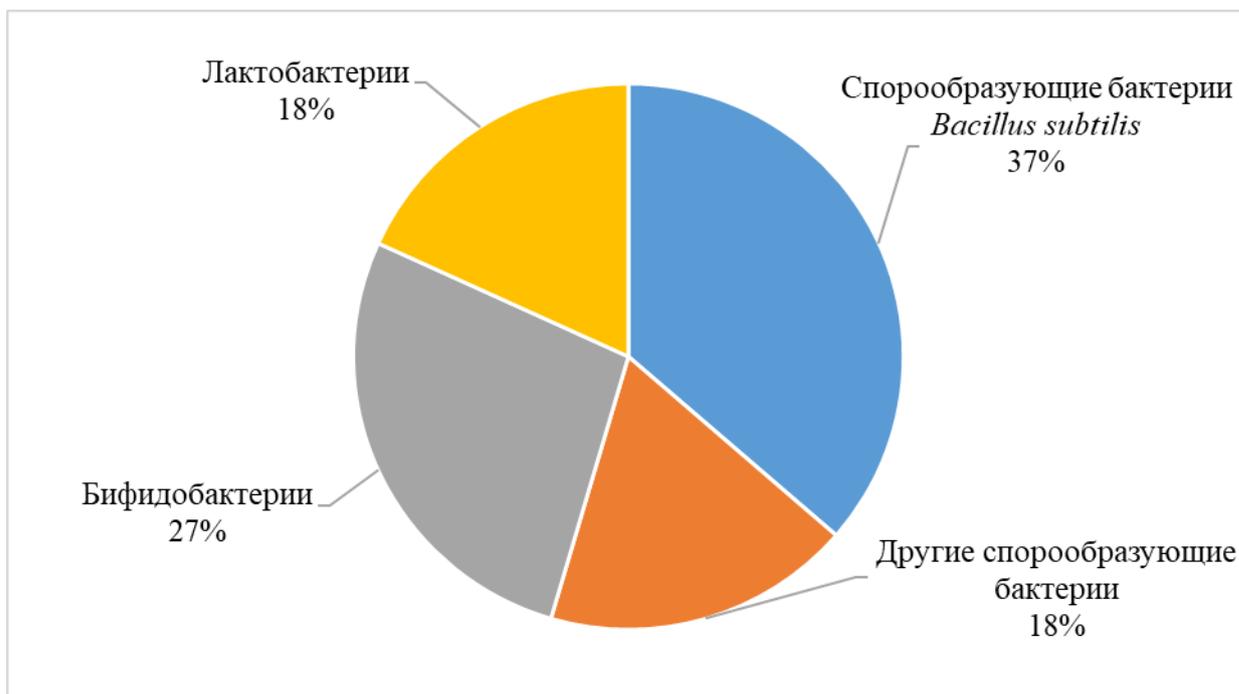


Рис. 3. Процентное соотношение использования пробиотических бактерий в пробиотиках.

### 1. 3. 2. Потенциал пробиотических препаратов: возможные способы действия

#### *Кворум сенсинг*

Остальные полезные свойства не имеют специфики при выборе пробиотика в данный момент или используются нешироко, наименее изученным еще остается механизмы кворум сенсинга. Кворум сенсинг – способность, связанная с глубокими изменениями в метаболизме бактериальных клеток при достижении ими определенной критической плотности.

Уже существуют первые исследования, но связанные с фитопробиотиком, способным проявлять антибиотическую активность в отношении патогенной микрофлоры, содержащим экстракт *Quercus cortex* (коры дуба), проведенный на годовиках карпа [10].

#### *Ингибирующие вещества.*

Бактериоцины – это антимикробные пептиды, которые действуют как антибактериальные соединения против бактериальных патогенов.

Бактериоцины могут подавлять грамположительные и грамотрицательные бактерии, такие как *Salmonella species (sp.)*, *Escherichia coli*, *Vibrio sp.*, *Shigella sp.*, *Aeromonas sp.* и *Pseudomonas sp.* Они играют важную роль в борьбе с микробами в качестве бактерицидного средства, так как они устойчивы к нагреванию и сохраняют активность в кислой среде, а низкая температура при хранении не влияет на активность бактериоцинов. Бактериоцины могут быть повреждены в результате деградации под действием протеолитических ферментов [20].

### **Конкуренция за свободное железо**

Практически всем микроорганизмам для роста необходимо железо. Сидерофоры – это низкомолекулярные (<1 500), специфические хелатирующие агенты, содержащие ионы железа, которые могут растворять осажденное железо и делать его доступным для роста микроорганизмов [35]. Экологическое значение сидерофоров заключается в их способности извлекать из окружающей среды необходимые питательные вещества и лишать их конкурентов. Успешные бактериальные патогены способны успешно конкурировать за железо в условиях сильного дефицита железа в тканях и жидкостях организма хозяина.

Исключение железа из рациона ранних отнятых личинок сибаса (*Dicentrarchus labrax*) не оказало пагубного влияния на выживаемость или скорость роста рыбы, но значительно ограничило бактериальную нагрузку личинок и увеличило разнообразие микробиоты. Потребность в железе высока для многих патогенов, включая *Vibrio anguillarum* [23]. При испытании этой бактерии смертность лосося линейно увеличивалась в зависимости от содержания железа в рационе. Оба наблюдения указывают на важность и биологическую роль железа в становлении микробиоты, связанной с культивируемыми водными видами [23, 42].

Безвредные бактерии, способные продуцировать сидерофоры, могут быть использованы в качестве пробиотиков для конкуренции с патогенами,

патогенность которых, как известно, обусловлена производством сидерофоров и конкуренцией за железо, или для конкуренции со всеми видами организмов, требующих железа из раствора. Возможную эффективность сидерофорпродуцирующих пробиотиков можно проиллюстрировать на примере исследования, в котором добавление бактериального сидерофора дефероксамина к живому корму (коловраткам) повысило устойчивость личинок тюрбо, зараженных патогенным штаммом *Vibrio parahaemolyticus* [22].

В одном из таких исследований протестировали тридцать штаммов *V. anguillarum* в качестве потенциальных пробиотиков против патогена лосося *V. ordalii* с помощью теста отложенного антагонизма. Только один штамм (*V. anguillarum* VL4335) ингибировал штаммы *V. ordalii* *in vitro*, и этот эффект блокировался при добавлении в среду солей железа, что указывает на то, что ингибирование роста связано с дефицитом железа. При использовании хромазуrolсульфатного анализа для измерения продукции сидерофоров, *V. anguillarum* VL4335 показал значительно более высокие значения, чем другие штаммы *V. anguillarum*.

Как и в случае с производством ингибирующих соединений, доказательства участия конкуренции за химические вещества или доступную энергию и, более конкретно, свободного железа или сидерофоров в способе действия пробиотиков все еще остаются косвенными.

#### ***Усиление иммунного ответа.***

Иммуностимуляторы – это химические соединения, которые активируют иммунную систему животных и делают их более устойчивыми к инфекциям, вызванным вирусами, бактериями, грибами и паразитами. У личинок рыб, креветок и других беспозвоночных иммунная система развита хуже, чем у взрослых рыб, и их устойчивость к инфекциям зависит в основном от неспецифических иммунных реакций [46].

Наблюдения, полученные в экспериментах с теплокровными животными, показывают, что пробиотические (молочнокислые) бактерии, вводимые перорально, могут вызывать повышение устойчивости к энтеральным инфекциям [28]. Имеется много сообщений о том, что бактериальные соединения действуют как иммуностимулятор у рыб и креветок, как было рассмотрено [43], в этих исследованиях использовались только специфические клеточные соединения или неживые клетки. Также было высказано предположение, что проглатывание бактерий и последующий эндоцитоз у личинок трески и сельди участвуют в стимуляции развивающейся иммунной [38]. Однако в настоящее время неясно, могут ли бактерии, применяемые в качестве пробиотиков, оказывать благоприятное воздействие на иммунный ответ культивируемых водных видов, но такой способ действия нельзя исключать априори.

Хотя это не совсем пробиотическая обработка, были предприняты попытки оптимизировать воду для выращивания личинок нескольких морских видов путем так называемого микробного созревания [45, 49]. Микробное созревание морской воды, подготовленной путем переходного содержания в резервуаре для созревания с биофильтром, привело к значительно более высокой начальной скорости роста личинок тюрбо (*Scophthalmus maximus*), чем в воде с мембранной фильтрацией. Распространение условно-патогенных бактерий наблюдалось в воде для выращивания после выклева икры тюрбо, но оно происходило в меньшей степени в воде, подвергшейся микробиологическому созреванию [45]. Также наблюдались четкие различия в выживании личинок желточного мешка палтуса [49]. Эти эксперименты подтвердили гипотезу о том, что микробное созревание отбирает бактерии, которые защищают морские личинки от размножения вредных условно-патогенных бактерий [45].

### *Взаимодействие с фитопланктоном.*

Недавние сообщения показывают, что многие штаммы бактерий могут оказывать значительное альгицидное действие на многие виды микроводорослей, особенно на планктон красного прилива [19]. Из 41 протестированного штамма бактерий 23 в разной степени ингибировали рост одноклеточной водоросли *Pavlova lutheri* [34]. Бактерии, антагонистичные к водорослям, были бы нежелательны при выращивании личинок, когда добавляются одноклеточные водоросли (например, при использовании метода зеленой воды), но были бы полезны, когда в культурном пруду развиваются нежелательные виды водорослей.

Заявления о бактериальных поправках включают снижение доли цианобактерий. Одна из таких бактериальных суспензий состояла из бактерий *Bacillus*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Cellulomonas* и *Rhodopseudomonas spp.* и применялась в прудах с канальным сомом [34]. Однако процентное содержание цианобактерий не отличалось между обработкой и контролем ни в одну из дат отбора проб.

Также было отмечено положительное влияние бактерий на культивируемые микроводоросли [19, 27, 34, 39]. Можно предположить, что бактерии могут косвенно влиять на здоровье или зоотехнические показатели культивируемых водных животных через их воздействие на микроводоросли, используемые в качестве пищи или в технике «зеленой воды» Когда пробиотические бактерии выбираются для использования в культуральной среде, включающей водоросли, их возможное взаимодействие с этими одноклеточными водорослями должно быть принято во внимание при изучении способа действия.

## Глава 2. Примеры исследований на пробиотиках

### 2. 1. Материалы и методы исследований

Для сравнительного анализа результатов применения пробиотиков на практике были выбраны три исследования:

1. Исследование применения препарата «Интестевит» на основе комплекса культур бифидобактерий *Bifidobacterium globsum*, стрептококков *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis* у осетров [3].

2. Исследование, проведенные на здоровых годовиках карпа (*Cyprinus carpio L.*), для изучения иммуностимулирующего действия «СУБ-ПРО» (на основе *Bacillus subtilis* ВКМП 2335) [13].

3. Получение и потенциал местных культур бактерий из желудочно-кишечного тракта рыб [49].

#### *Исследование препарата «Интестевит» у осетров*

Исследование выполняли на старших возрастных группах бестера бурцевской породы. Рыбы имели массу от 1,5 до 6,0 кг. Выращивание велось в бассейнах опытно-промышленного модуля ВНИРО с замкнутым циклом водообеспечения при нагрузке биомассы рыб 40-60 кг/м<sup>3</sup> и крайне неблагоприятном микробиологическом фоне кормов и воды. Обсемененность корма составляла  $1 \times 10^6$  КОЕ/г (преимущественно стафилококк) [3]. Уровень обсемененности воды –  $2,7 \times 10^4$  КОЕ/мл (из них более половины микроорганизмов было представлено бактериями кишечной группы), что повлекло заражение ими печени и почек, а также гибель части рыб.

Все рыбы имели внешние признаки заболевания: слабую подвижность, потерю аппетита, множественные поражения кожи и внешних скелетных образований (жучек), рострума, плавников. Почти у всех рыб была воспалена область анального отверстия. При микробиологическом исследовании до применения пробиотиков из химуса толстого отдела кишечника рыб были выделены эшерихии, стрептококки, спорообразующие бактерии *Bac. mesentericus* и неидентифицируемые микроорганизмы. Последние - в среднем

до 40 %. Полезная микрофлора – лактобактерии, бифидобактерий и спорообразующие бактерии *B. subtilis* до начала введения пробиотиков в пробах химуса осетров отсутствовали. Результаты этих исследований представлены в таблице 1. Для испытаний были избраны два препарата, разработанные Центром медико-ветеринарных экологических исследований (ЦМВЭИ) совместно с ВГНЖИ. Препарат «Интестевит» содержит комплекс лиофильно высушенных культур бифидобактерий *Bifidobacterium globsum*, стрептококков *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis*. Две первые группы бактерий, входящие в этот препарат и являющиеся представителями нормальной микрофлоры теплокровных животных, способны к активной колонизации слизистой оболочки кишечника и образованию на ней биопленки. Ассоциация микроорганизмов препарата характеризуется взаимным усилением антагонистического эффекта по отношению к условно-патогенным микроорганизмам. Образующие бактериями метаболиты, активно участвуют в процессах переваривания пищи, синтезе витаминов, аминокислот и других жизненно важных элементов, повышают естественную резистентность организма и способствуют восстановлению популяционного уровня представителей нормальной микрофлоры кишечника. Препарат с успехом используется в ветеринарии для теплокровных животных и птиц. Также был получен положительный эффект их применения на молоди осетровых при лечении обменных заболеваний, связанных с питанием некачественными кормами и при выводе молоди из зимнего голодания [5].

Второй пробиотик «Аквалакт» – новый препарат, предназначенный для осетровых рыб. Он разработан на основе кишечной микрофлоры осетров из естественных водоемов. В его состав включены видоспецифичные лактобактерии. Препарат испытывали впервые. Корма, обогащенные пробиотиками из расчета  $10^7$  КОЕ/г корма, применяли в течение 10 дней. Оценку состояния рыб проводили прижизненно путем учета изменений комплекса морфологических признаков по оригинальной, разработанной методике [4], а также по результатам микробиологических анализов

содержимого кишечника. Учитывали степень повреждения спинных и брюшных жучек, воспалительное покраснение области анального отверстия, поражения каймы плавников и рострума. Образцы химуса отбирали из толстого отдела кишечника стерильными тампонами. Для сравнения использовали данные микробиологических исследований образцов содержимого кишечника, взятых от рыб перед началом их питания кормом с пробиотиками, а также через 5 дней после прекращения применения пробиотиков (т.е. через 15 суток после начала опытов). Материал для исследований отбирали от 5 рыб каждой группы, через 5, 10 и 15 дней после начала кормления кормом с пробиотиком. Учитывали число положительных находок основных представителей микрофлоры кишечника и бактерий, входящих в состав пробиотических препаратов.

#### ***Иммуностимулирующее действие пробиотика «СУБ-ПРО»***

Исследования проводились в аквариальной лаборатории иммунологии ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН [13]. Объектами исследования служили клинически здоровые годовики карпа средней массой  $150 \pm 10$  г, доставленные из ООО «Рыбхоз Нарские острова» Московской области. Рыб после акклимации содержали в принудительно аэрируемых аквариумах при температуре воды  $18 \pm 1 - 2^\circ\text{C}$ . Основные гидрохимические параметры соответствовали рыбохозяйственным нормативам [13]. В качестве антибактериального препарата использовали Антибак 100, а в качестве пробиотика – СУБ-ПРО на основе *Bacillus subtilis*. Лечебные корма с вышеуказанными препаратами рыбы получали в течение 5 сут. в дозировках согласно инструкциям. При исследовании иммунологических показателями дополнительно 4-ую группу заражали 1 млрд. микробных тел агаровой культуры *Aeromonas hydrophila* на особь путём внутрибрюшинной инъекции, оценивая способность рыб формировать специфический иммунный ответ на бактериальный антиген. Отбор материала производили через 1, 3 и 7 суток

после окончания дачи препаратов [13]. Из каждой опытной группы отбирали по 5 особей для исследования. Оценку иммунобиохимического состояния организма рыб проводили по динамике антителообразования, уровню бактериостатической активности сыворотки крови (БАСК) [13].

Этот показатель отражает функционирование всего комплекса механизмов естественного иммунитета (системы комплемента, пропердина, иммуноглобулинов, лизоцима, протеасом, С-реактивного белка, бактериолизинов и т.д.), заражённость и устойчивость к паразитам и физиолого-биохимический статус организма рыб. Антимикробный эффект сыворотки крови зависит от условий нагула, обеспеченности пищей и её состава. В настоящее время БАСК широко применяется при оценке последствий влияния паразитарных и токсических агентов на естественную резистентность и иммунный статус [13].

### ***Методика получения местных культур бактерий***

Методика, разработанная Wanka, направлена на получение местных кандидатов в пробиотики и может быть применима к другим видам рыб [49].

В основу метода лежит получения чистых культур бактерий из здоровых рыб по схеме:

- 1) разделение полученного ЖКТ из умерщвлённой рыбы на 5 сегментов: а) желудок, б) пилорическая цека, в) передняя, г) средняя и д) задняя кишка [49];
- 2) удаление кишечного содержимого шпателем для получения образцов свободно ассоциированных бактерий [49];
- 3) после промывания ткани 0,9 % -ым физиологическим раствором, выделялись прочно связанные с ЖКТ бактерии с помощью моющего раствора (0,9 % -ый физиологический раствор с 1 % -ым Triton X 100) и собирались пипеткой примерно через 15 минут после инкубации [49];

- 4) распределение всех образцов на двух неселективных и одной селективной средах: Триптице-соевый агар, дополненный 2% NaCl (TSA 2%, Carl Roth, Карлсруэ, Германия), использовался для культивирования галотолерантных бактерий, а морской агар 2216 (MA, Difco™, Becton Dickinson, Гейдельберг, Германия) - для галофильных бактерий. Морские молочнокислые бактерии селективно культивировали на агаре Де Мана, Рогозы и Шарпа, дополненном 2% NaCl (Carl Roth, Германия). Агаровые пластины инкубировали при 18 °С в течение двух-семи дней в аэробных условиях [49];
- 5) морфологический отбор различных колоний и перенос выделенных из них культур методом отбора и повторного отсева на свежую среду [49];
- 6) чистые культуры хранили в двух экземплярах в крио-флаконах (Roti®-Store cryo-vials, Carl Roth) при 80 °С [49];
- 7) далее бактериальные изоляты были идентифицированы путем прямого секвенирования частичного гена 16S рРНК и BLAST-анализа [49].

## **2.2. Результаты и обсуждение исследования**

### ***Результаты сравнения применения пробиотиков «Аквалакт» и «Интенсивит»***

Как можно видеть на таблице 1, 10-и дневное питание рыб комбикормом с пробиотиком «Интестевит» вызвало существенное улучшение их состояния по внешним признакам. Число особей с нормальными спинными и брюшинными жучками возросло более чем в 2 раза, при уменьшении их количества с максимальным поражением на 10-17%. Количество рыб без повреждений рострума возросло в 1,5 раза, однако число особей с максимальным поражением осталось почти на прежнем уровне. Более чем в два раза снизилась интенсивность воспалительных поражений ануса, причем в той же степени сократилось количество рыб с его максимальным поражением. На состояние каймы плавников пробиотик не оказал подобного действия. Количество рыб с максимальным поражением осталось без

изменений, с небольшим - несколько уменьшилось. Включение в комбикорма препарата «Аквалакт» оказало сходный эффект по всем признакам. Количество рыб с нормальными жучками возросло почти в два раза, так же, как и в первом случае, в основном за счет особей с их минимальным поражением. Число рыб с нормальным состоянием ануса увеличилось так же в два раза (Рис. 4).

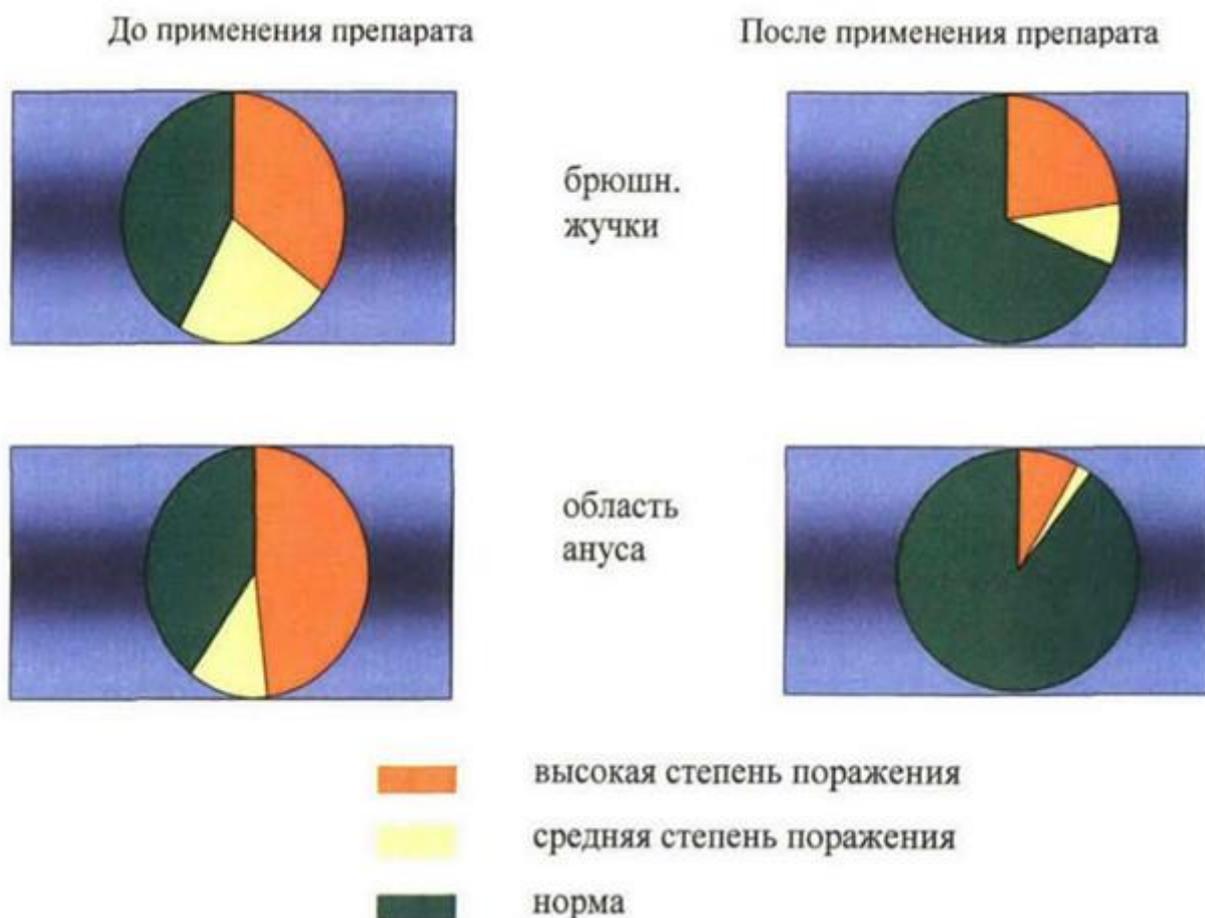


Рис. 4. Эффект применения препарата «Аквалакт» для оздоровления бестера [4].

Небольшие отличия от варианта с «Интестевитом» отмечены в исчезновении патологий рострума. Количество особей с нормальным рострумом увеличилось в 1,7 раза. Интересно отметить, что оздоровление этого образования головы, наиболее часто вступающего в контакт с внешними поверхностями рыбоводных емкостей, оказалось наиболее выраженным у сильно пораженных рыб. Препарат «Аквалакт» лучше залечил поражения каймы плавников.

**Характеристика состояния внешних покровов бестера до и после  
питания комбикормом с пробиотическим препаратом «Интестевит» и  
«Аквалакт», % обследованных рыб (продолжительность опыта— 10  
суток) [3]**

Количество и средняя масса рыб, экз./кг	Внешние костные образования (жучки)		рострум			анус			кайма плавников						
	спинные			брюшные											
Степень повреждений															
	max	min	N	max	min	N	max	min	N	max	min	N	max	min	N
Вариант с "Интестевитом"															
<u>360</u>	<u>40*</u>	<u>27</u>	<u>33</u>	<u>40</u>	<u>40</u>	<u>20</u>	<u>46</u>	<u>13</u>	<u>40</u>	<u>7</u>	<u>56</u>	<u>37</u>	<u>24</u>	<u>16</u>	<u>60</u>
2,5	33	0	67	36	7	53	43	0	57	13	4	83	24	10	66
%**	83		203	90	17,5	265	93		143	186	7	224	100	63	110
Вариант с "Аквалактом"															
<u>300</u>	<u>38</u>	<u>29</u>	<u>33</u>	<u>48</u>	<u>12</u>	<u>40</u>	<u>28</u>	<u>30</u>	<u>42</u>	<u>35</u>	<u>23</u>	<u>42</u>	<u>42</u>	<u>11</u>	<u>47</u>
4,5	18	9	73	23	8	69	0	29	71	8	2	90	27	0	73
%	47	31	221	48	67	173		97	169	23	9	214	64		155

\* над чертой – до применения пробиотиков, под чертой – после.

\*\* к началу опыта.

Существенная нормализация окраски тканей вокруг ануса при применении обоих препаратов свидетельствовала о снижении интенсивности воспалительных процессов в кишечнике.

Согласно таблице 2 в пробах материала, взятого из кишечника через 5 дней после начала введения пробиотических препаратов, у 60% обследованных бестеров, получавших корм с «Интестевитом», были обнаружены бифидобактерии, а у 100% – спорообразующие бактерии *Bac. subtilis*. В то же время частота обнаружения в образцах химуса бактерий группы кишечной палочки, стрептококков, различных видов *Bacillus sp.* и неидентифицируемой микрофлоры значительно снизилась.

В химусе второй группы бестеров, получавших корм с препаратом «Аквалакт» они были выделены в 80 % исследованных образцов, что свидетельствовало об активном заселении кишечника рыб молочнокислыми бактериями. Частота встречаемости эшерихий, стрептококков и другой неидентифицируемой микрофлоры в химусе рыб обоих вариантов применения пробиотиков составила всего 20-40%.

При исследовании проб химуса, взятых после 10-дневного курса применения пробиотиков, было установлено, что частота выделения условнопатогенных бактерий из кишечника снизилась в 2-3 раза, по сравнению с аналогичными данными до начала применения пробиотиков. Количество положительных находок лактобактерий, бифидобактерий и спорообразующих бактерий *Bac. subtilis* в образцах химуса обеих групп исследованных рыб составило от 60 до 100% случаев.

На 15-е сутки, т.е. после 10 дней применения пробиотиков и спустя 5 суток после его прекращения, было отмечено снижение частоты выделения лактобацилл до 20%. Изоляты бифидобактерий в исследованных образцах не обнаружены. Напротив, спорообразующие бактерии *Bac. Subtilis* были выделены из 100% образцов, взятых от бестеров из варианта с «Интестевитом».

**Динамика численности основных групп микроорганизмов в  
кишечниках бестеров, питавшихся комбикормами с пробиотиками (%  
от общего числа обследованных рыб) [4]**

Пробиотик, вводимый в корм	Частота встречаемости микроорганизмов													
	Lac.		Bif.		Bac. sub.		Esch. coli		Strept.		Бациллюс sp.		Und.	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
До начала опытов														
"Интенсивит"	0	0	0	0	0	0	4	80	4	80	4	80	2	40
"Аквалакт"	0	0	0	0	0	0	3	60	5	100	4	80	2	40
Через 5 дней применения пробиотиков														
"Интенсивит"	0	0	4	80	5	10	0	0	1	20	0	0	1	20
"Аквалакт"	4	80	0	0	0	0	1	20	2	40	0	0	1	20
Через 10 дней применения пробиотиков														
"Интенсивит"	0	0	3	60	5	100	0	0	1	20	0	0	0	0
"Аквалакт"	4	80	0	0	0	0	0	0	1	20	0	0	0	1
Через 15 дней от начала применения пробиотиков и спустя 5 суток после его прекращения														
"Интенсивит"	0	0	0	0	5	100	0	0	1	20	1	20	2	40
"Аквалакт"	2	40	0	0	0	0	2	40	2	40	1	20	2	40

\*По порядку слева направо: лактобактерии, бифидобактерии, *Bacillus subtilis*; эшерихии, стрептококки, виды *Bacillus*, неинфицированные виды.

Изменения в микробиоценозе кишечника бестера, происходившие под действием препарата «Аквалакт», в схематическом виде приведены на графике (Рис. 5).



Рис. 5. Микробиоценоз кишечника бестера до и после применения препарата «Аквалакт» [4].

Как видно на графике (Рис. 5), после окончания курса пробиотиков в микрофлоре кишечной популяции было отмечено постепенное увеличение количества условно-патогенных бактерий. Так, частота выделения эшерихий, стрептококков, обнаружение картофельной палочки, а также неидентифицируемых бактерий в количестве, достигающем 40% от исследованных образцов, свидетельствовало о высоком прессинге условно-патогенной микрофлоры на микробиоценоз кишечника бестера со стороны комбикорма и окружающей среды выращивания рыб.

#### ***Сравнение антибактериального и пробиотических препаратов по влиянию на неспецифический иммунитет***

Уровень БАСК изменялся под влиянием препаратов и бактериального антигена. Введение Антибак 100 в корм рыбам группы № 2 усиливало протективные свойства сыворотки крови (Рис. 6).

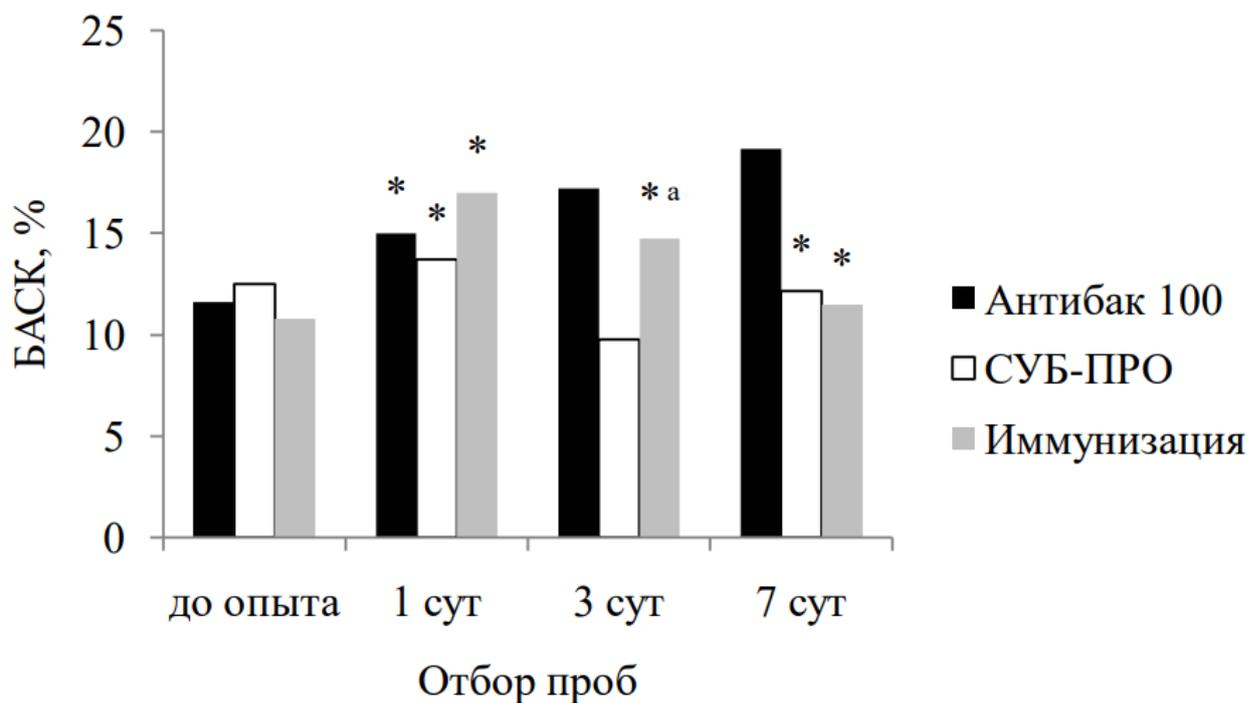


Рис. 6. Уровень БАСК, % [13].

\* достоверные отличия от контрольных данных до опыта; а – достоверные отличия от группы 3 (СУБ-ПРО).

### ***Отбор бактерий-кандидатов в пробиотики на примере тюрбо (Scophthalmus maximus)***

Белки растительного происхождения все чаще используются в качестве альтернативы рыбной муке в аквакормах, но часто оказывают пагубное влияние на здоровье и производительность рыбы [30]. Среди них соевый белок представляет собой основной источник белка для питания животных, но особенно сложен для плотоядных плавниковых рыб из-за наблюдаемых неблагоприятных эффектов. Хотя соевая мука имеет благоприятный аминокислотный состав, уровень замещения поддерживается на относительно низком уровне, чтобы избежать негативного влияния на показатели роста, конверсию корма или даже тяжелого энтерита, в основном связанного с вторичным метаболитом сапонином [76]. Поэтому в качестве модельного вещества была рассмотрена способность бактерий метаболизировать сапонин в скрининговом тесте. Было выявлено семь изолятов, которые были способны

метаболизировать сапонин как единственный источник углерода и энергии при обычных концентрациях синтетических питательных растворов. Таким образом, кажется правдоподобным, что соответствующие изоляты могут улучшить деградацию сапонины в кишечнике хозяина, противодействуя пагубным последствиям соевой муки в питании рыб [49].

Следующей после рыбной муки и в настоящее время еще более актуальной проблемой в питании рыб является ограничение рыбьего жира в контексте быстро растущей аквакультуры во всем мире. Здесь замена его растительными ингредиентами является более проблематичной, особенно с точки зрения потребителя, поскольку рыбий жир является основным источником основных жирных кислот, таких как ДГК или ЭПК. Учитывая незначительный эндогенный синтез у позвоночных животных и выдающуюся роль этих жирных кислот в питании человека, сокращение использования рыбьего жира серьезно влияет на качество продукции, если только другие источники (например, генетически модифицированные организмы) не гарантируют поставку выращенной рыбы. В качестве альтернативы были попытки найти пробиотики, характеризующиеся высоким содержанием ДГК, ЭПК и предшественников линолевая кислота,  $\alpha$ -линолевая кислота и эйкозатетраеновая кислота. Такие пробиотики после переваривания могли бы обеспечить выращиваемую рыбу этими необходимыми ЖК.

Отбор проводился с целью получения бактерий, способных:

- 1) производить ингибиторные вещества против трех наиболее значимых патогенов рыб *Tenacibaculum maritimum*, *Edwardsiella tarda*, *Listonella anguillarum* [49];
- 2) синтез незаменимых жирных кислот ДГК, ЭПК (омега-3 жирные кислоты) и предшественников, таких как  $\alpha$ -линолевая кислота (омега-3 ЖК), линолевая кислота (омега-6 ЖК), эйкозатетраеновая кислота (омега-3 ЖК) [49];
- 3) метаболизм сапонины как примера антипитательного вещества растительного происхождения [49];

4) в идеале, демонстрировать высокую скорость роста при соответствующих температурах выращивания, легко храниться в криокультурах, быть кислородоустойчивыми и эффективно добавляться в рацион, обеспечивая достаточную жизнеспособность [49].

Также был оценен экономически эффективный метод добавления пробиотиков в корм для рыб, оценивалась жизнеспособность соответствующих бактерий после нанесения верхнего покрытия во время хранения [49].

Результаты исследования приведены в Таблице 3.

*Таблица 3*

**In vitro характеристика отобранных пробиотиков-кандидатов по основным показателям [49]**

Классификация	Происхождение	Сегмент ЖКТ полученных образцов	Связь с поверхностью кишечника	Результаты in vitro		
				ИП* <sup>а</sup>	МС <sup>б</sup>	Синтез НЖК <sup>в</sup>
<i>Psychrobacter</i> sp.	Дикий тюрбо ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	Желудок	Умеренная	+		
<i>Psychrobacter</i> sp.		Желудок	Умеренная		+	+
<i>P. alimentarius</i>		Желудок	Умеренная			+
<i>P. alimentarius</i>		Желудок	Умеренная			+
<i>Psychrobacter</i> sp.		Желудок	Умеренная		+	++
<i>Psychrobacter</i> sp.		Средняя кишка	Сильная	+		
<i>Paracoccs</i> sp.		Средняя кишка	Умеренная			++
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		Средняя кишка	Нет		+	
<i>Psychrobacter</i> sp.		Желудок	Сильная		+	
<i>Psychrobacter</i> sp.		Средняя кишка	Сильная	+		
<i>Psychrobacter</i> sp.		Средняя кишка	Сильная	+		
<i>Psychrobacter alimentarius</i>		Желудок	Сильная		+	+
<i>Psychrobacter</i> sp.		Желудок	Сильная		+	
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Выращенный на фермах тюрбо ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	Средняя кишка	Нет	+		
<i>A. haemolyticus</i>		Желудок	Нет	+		
<i>A. haemolyticus</i>		Желудок	Нет	+		
<i>A. haemolyticus</i>		Желудок	Нет	+	+	+
<i>A. haemolyticus</i>		Желудок	Нет	+		
<i>A. haemolyticus</i>		Желудок	Нет	+		
<i>Enterovibrio calviensis</i>	Дикая европейская камбала ( <i>Platichthys flesus</i> )	Средняя кишка	Умеренная	+		
<i>E. calviensis</i>		Средняя кишка	Умеренная	+		

\* ИП – ингибитор патогена *Tenacibaculum maritimum*; а - легко определяются на агаре; б – метаболизм сапонины; в – синтез незаменимых жирных кислот.

### 2.3. Выводы по разделу

Данные микробиологических исследований показали, что продолжительность положительного влияния пробиотических препаратов на состав кишечной популяции у бестеров сохранялась еще в течение 6-7 суток. Продолжительность действия пробиотиков у рыб оказалась такой же, как и у теплокровных животных, - около 10 суток. Именно поэтому в ветеринарии пробиотики применяются десятидневными курсами, с интервалом не более 10 дней [9].

Таким образом, анализ совокупности результатов морфологических и микробиологических исследований позволил заключить, что введение пробиотических препаратов в корм и питание ими рыб в течение 10 суток вызывает изменения в микрофлоре кишечника, которые сопровождаются прекращением отхода и появлением внешних признаков оздоровления рыб. Сравнение действия обоих пробиотических препаратов дает основание говорить о некотором преимуществе перед ветеринарным препаратом «Интестевит» нового видоспецифичного пробиотика «Аквалакт».

По данным эксперимента на влияние антибактериального и пробиотического препаратов на специфический и неспецифический иммунитет, проведенных на здоровых годовиках карпа (*Cyprinus carpio L.*), показано положительное действие пробиотиков, однако, вместо ожидаемого длительного эффекта, иммуностимулирующее действие «СУБ-ПРО» (на основе *Bacillus subtilis* ВКМП 2335) оказалось менее выраженным, чем у антибиотика. Вероятно, это объясняется тем, что пробиотики не становятся членами нормальной микрофлоры и достаточно быстро выводятся из организма, что доказывается первым опытом.

В последнем исследовании были определены несколько кандидатов в пробиотики, обладающие антагонизмом по отношению к основному патогенному микроорганизму тюрбо, *Tenacibaculum maritimum*, синтезу основных жирных кислот и метаболизму растительных антипитательных

веществ, используя сапонин в качестве модельного вещества. Согласно, исследованию, среди автохтонного микробного сообщества, тесно связанного с тканевой поверхностью кишечника рыбы, здесь было выявлено несколько патогенов. Это подтверждает, что патогены являются частью микробиома костистых рыб, даже у рыб, которые не проявляют никаких симптомов болезни [53].

Молекулярная характеристика может позволить исключить патогенные таксоны, но в некоторых группах секвенирование 16S рРНК часто не обеспечивает видоспецифичной идентификации, как это наблюдалось в исследовании (Табл. 4). Например, изоляты, отнесенные к *Acinetobacter* и *Psychrobacter*, включают как полезных кандидатов, так и зарегистрированных патогенов [49].

Также бактериальные изоляты рассматривались как тесно связанные с кишечной стенкой (автохтонные), поскольку фекалии были удалены, а рыхло связанные, транзитные бактерии были смыты до отделения бактерий-кандидатов с помощью неионного поверхностно-активного вещества (Triton X 100), которое обычно используется для этой цели. Способность прикрепляться к поверхности слизистой оболочки, рН и устойчивость к желчным кислотам особенно важны для успешной колонизации кишечника [49].

### Глава 3. Значение местных бактерий в усовершенствовании действия пробиотических препаратов

Хотя существуют доказательства существования основной микробиоты кишечника у рыб, разнообразие идентифицированных кишечных бактерий огромно и зависит от различных биотических и абиотических факторов, таких как тип питания, о котором говорилось в первой главе. Согласно сходному исследованию на идентификацию бактерий, преобладающим филумом бактерий у тюрбо является *Proteobacteria*, составляющий 93% в секвенировании гена 16S рРНК [53]. Это согласуется с результатами, поскольку 89,7% были представителями протеобактерий. Учитывая, что большинство бактерий в кишечнике могут быть не культивируемы на средах и в условиях, использованных здесь, будет наблюдаться значительное расхождение с реальным микробиомом.

Среди изолятов кандидаты *Psychrobacter* были особенно интересны в связи с тем, что виды *Psychrobacter* часто наблюдаются в водной среде, а также в коммерчески важных пресноводных [24] и морских видах, например, атлантическая треска (*Gadus morhua*) [52], скумбрия (*Scomber scombus*) [47], мелкая камбала (*Paralichthys adspersus*) [44]. В данном исследовании наиболее часто встречающимся родом был *Psychrobacter*, на который приходится 70 из 195 (35,9%) изолятов, основанных на информации о 16S рРНК, но, к сожалению, это не позволяет провести видоспецифическое различие. Для определения конкретных кандидатов из этого рода, в будущем будут использоваться более точные методы.

Более того, *Psychrobacter* уже был оценен как пробиотическая добавка в кормлении рыбы. В другом исследовании на эту тему сообщили об антагонистической активности *Psychrobacter sp.*, выделенных из кишечника атлантической трески, против двух важных рыбных патогенов *Listonella anguillarum* и *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*. Кроме того, те же авторы сообщили о повышении активности пищеварительных ферментов, что

указывает на возможность улучшения пищеварения при кормлении пробиотическими добавками [31].

Как и в данном случае, было отмечено дифференцированное воздействие на три патогена. Удивительно, но во всех изолятах не наблюдалось антагонистического эффекта против двух других патогенов, часто встречающихся в культуре тюрбо, *Edwardsiella tarda* и *Listonella anguillarum*, тогда как в параллельном исследовании продемонстрировали ингибирующую активность против этих двух патогенов. Это указывает на то, что штаммы *Psychrobacter* могут быть способны производить и выделять эффективные антимикробные вещества.

Использование в качестве пробиотика в питании рыб также было рассмотрено в классическом исследовании по кормлению оранжево-пятнистого групера (*Epinephelus coioides*) [48]. Здесь *Psychrobacter sp.* в качестве автохтонного кишечного изолята вызвал значительное повышение конверсии корма и показателей роста, что коррелировало с увеличением активности пищеварительных ферментов (например, гепатопанкреатической протеазы и липазы, кишечной амилазы). Более того, параметры, связанные с окислительным стрессом, такие как супероксиддисмутаза, были немного повышены.

В еще одном исследовании, проведенном с целью изучения данного рода бактерий уже на нильской тилляпии (*Oreochromis niloticus*), наблюдали увеличение темпов роста и использования корма, а также стимуляцию иммунитета (например, значительное увеличение активности IgM, фагоцитов и лизоцима) [32]. В заключении следует отметить, что изоляты *Psychrobacter* должны быть исследованы более глубоко и могут быть достаточными кандидатами для будущей оценки *in vivo* у тюрбо.

Одним из наиболее перспективных изолятов настоящей коллекции культур является *Acinetobacter haemolyticus*, обнаруживающий сильный антагонизм по отношению к *T. maritimum*, интересный профиль незаменимых жирных кислот и способность метаболизировать сапонин (Табл. 3).

В экспериментах над способностью бактерий-пробиотиков колонизировать кишечник рыб, в одном из исследований был выделен штамм *Bacillus paralicheniformis* FA6, примененный на белом амуре (*Stenopharyngodon idellus*). Обнаружилась высокая способность к адгезии во всех отделах кишечника и державшаяся до 80, достигнув плато с между 40 и 60 днями. Схожий вид бактерий *Bacillus licheniformis* есть в пробиотике «Субтилис», оба они показывают положительные свойства, такие как усиленный рост, иммунный ответ и общее сопротивление к заболеваниям у молоди рыб [6], но *Bacillus licheniformis* – почвенный организм-сапрофит, который быстрее выводится из организма.

Переходя к заключению, в конечном итоге для такой экспериментальной оценки необходим любой простой и дешевый способ составления экспериментальных рационов, но оценка в кормовых испытаниях резко ограничивает число кандидатов [51].

Информация о приготовлении пробиотической диеты часто недостаточна, включая культивирование пробиотиков и их дозировку, подробности процесса сушки и оценку срока хранения. Поиск сопоставимой жизнеспособности различных видов пробиотиков при нанесении их сверху на любой составленный рацион важен для приготовления недорогостоящих и несложных процессов, а также для длительного хранения, обеспечивающего высокую выживаемость пробиотика. При добавлении пробиотиков в экспериментальные рационы для проведения кормовых испытаний возникает необходимость в увеличении масштабов культивирования клеток. В данном случае бактериальные клетки должны быть собраны в конце логарифмической фазы роста, поскольку задержка сбора может привести к самоингибированию бактерий или производству нежелательных вторичных метаболитов. Потенциальная потеря живых и активных пробионтов подрывает оценку. Поэтому при любой оценке жизнеспособность должна быть оценена экспериментально [52].

### **3.1. Обсуждение результатов исследования применения пробиотиков**

Предыдущий опыт показал, что, несмотря на положительное действие обоих пробиотиков, «Аквалакт» показал себя лучше для осетровых, что говорит о предпосылке увеличения спектра используемых бактерий и создания штаммов, предназначенных для конкретных видов рыб. Данный подход позволит повысить продуктивность пробиотических препаратов. Настоящей целью данной работы является демонстрация, какими способами можно улучшить применения бактерий и метод их выделения из организма здоровой рыбы, руководствуясь иностранными источниками, так как отечественных исследований по данному вопросу недостаточно.

Для доказательства суждения о том, что пробиотики, созданные из местных бактерий здоровых особей выращиваемого вида, лучше влияют на рост, развитие и здоровье рыб, были проанализированы новейшие данные о сравнительной эффективности, а именно:

1. Может ли специализированный пробиотик прикрепляться к стенке кишечника и функционировать долгое время.
2. На сколько эффективно будет работать неспецифический иммунитет, т. е. будут ли ингибироваться патогенные бактерии, которые влекут опасность для каждого конкретного вида рыб.
3. Техническая возможность для производства и хранения полученного пробиотика.
4. Влияют ли специализированные штаммы бактерий на эффективность потребляемых комбикормов.

### **3.2. Выводы по сравнительному анализу пробиотиков**

В ходе работы были продемонстрированы и обоснованы параллельные действия бактерий разного происхождения, отвечая выделенным положениям. Несмотря на тот факт, что в еще зарождающемся направлении по созданию специализированных пробиотиков на основе

бактерий для целей аквакультуры недостаточно широкой научной базы и еще не доказано, какие роды, виды или штаммы бактерий могут стать основными для создания пробиотиков, данные по использованию, например, *Psychrobacter* показывают, что имеет смысл использовать данный род на разных видах рыб без потери основных полезных функций взамен привычных в наземном животноводстве. Обобщенный материал предложен в таблице (Табл. 4).

Таблица 4

**Сравнительная характеристика бактерий, использующихся в настоящих пробиотиках, и их аналогов – бактерий-кандидатов в пробиотики**

Функции	Настоящие пробиотики		Бактерии-кандидаты в пробиотики	
	Lac.	Bacillus	<i>Psychrobacter sp.</i> , <i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Bacillus paralicheniformis</i>
	Связь с кишечником			
Колонизация кишечника	+	+	+	+
Конкуренция за питательные вещества	-	+	+	+
Адгезия в кишечнике	-	-	Нет данных	+
	Противодействие			
Стимуляция иммунитета*	-	-	+	+
Ингибирование патогенов	+	+	+	+
Продуцирование антибиотиков	+	+	+	+
Продуцирование бактериоцинов	-	-	+	-
	Рост и развитие			
Улучшение показателей роста	-	+	+	+
Продуцирование витаминов, аминокислот, ферментов	-	+	+	+
Способность продуцировать НЖК	-	-	+	-

Lac. sp. – виды лактобактерий, *Bacillus sp.* – виды спорообразующих бактерий.

\* значительное увеличение активности IgM, фагоцитов и лизоцима. У *Bacillus subtilis* стимуляция иммунитета невыражена в связи с быстрым выводом из организма.

Как видно из таблицы, пробиотики настоящего времени удовлетворяют требованиям к улучшению общего состояния рыб, но их

использование ограничивается временем, за которое бактерии вскоре выйдут из кишечника. Так как явственные функции выражаются лишь в определенный промежуток времени, поскольку адгезия в кишечнике не обнаружена, рационально использовать пробиотики получится лишь в случае употребления курсами или единожды в качестве профилактики в экстремальные периоды (например, вспышке заболеваний).

Также стоит отметить тот факт, что современные пробиотики имеют ключевые особенности, из чего можно сделать вывод, что для лучшего результата эффективней будет принимать комплекс из разных родов бактерий, но данная практика ведет к проблеме слежения за микробиотой кишечника рыб. В условиях интенсивной аквакультуры и меняющихся параметров среды, встает вопрос о взаимоотношениях окружающей среды и организмом. Логично предположить, что предприятия, вынужденные пользоваться пробиотиками «общего назначения», для лучшего результата будут прибегать к курсам пробиотиков, чье действие выражается в морфологических признаках и показателях роста, но проследить за состоянием кишечника *in vivo* – проблематичная задача. В следствии этого целесообразность затрат на постоянное поддержание микрофлоры неясна, так как существует много неизвестных, косвенно или напрямую влияющих на микрофлору.

С другой стороны, существуют бактерии, способные к адгезии в кишечнике на долгий период времени. По отношению к настоящим пробиотикам – это достаточное основание для того, чтобы продолжать дальнейшее их изучение, особенно в условиях растущей потребности в выращивании рыбы. К особенностям рода *Psychrobacter* и виду *Acinetobacter haemolyticus* так же относится переработка трудноперевариваемых растительных компонентов, производство незаменимых жирных кислот и продуцирование бактериоцинов против, на примере тюрбо, трех основных их заболеваний, что, несомненно, является неоспоримым преимуществом. Близкородственный *Bacillus paralicheniformis* виду *Bacillus subtilis*,

выделенный из белого амура, вовсе не уступает по полезности, что напрямую говорит о преимуществе первого.

Исходя из этих двух фактов, можно предположить, что их использование в условиях интенсивной аквакультуры является более обоснованным как с точки зрения профилактики заболеваний, так и с точки зрения показателей роста.

## Заключение и выводы

На основании проанализированной литературы и результатах эксперимента на бестерах, пробиотические препараты на основе бактерий считаются, в своих пределах, оправданным средством для поддержания показателей иммунитета, роста и развития выращиваемых видов рыб. Однако, текущий подход к их употреблению ограничен, потому не могут в полной мере использоваться, как полноценный метод предотвращения патологий, т. е. носят профилактический характер. Приведенный к анализу эксперимент на бестерах лишь выявил проблему и помог лучше сформировать положения, по которым бы значилось, что пересмотр текущих недостатков пробиотиков можно избежать, если прибегнуть к новому виду пробиотиков – бактериям, которые были выделены из здоровых рыб, имеющие в себе полезные свойства и с возможностью их выращивания на питательных средах.

В аквакультуре, особенно в коммерческом контексте, пробиотики в основном происходят от наземного скота и часто являются представителями молочнокислых или спорообразующих бактерий. Однако успешная и, следовательно, устойчивая колонизация этих пробиотиков никогда не была продемонстрирована. Нативные пробиотические бактерии адаптированы к окружающей среде целевого вида и поэтому считаются более эффективными, оказывая более длительное благоприятное воздействие после применения. Следовательно, скрининг нативных изолятов должен быть приоритетным в будущем. Кроме того, местные бактерии априори могут считаться адаптированными к условиям окружающей среды в кишечнике, что исключает необходимость проведения дополнительных испытаний, как это требуется для неродных пробиотиков. Стратегии скрининга *in vivo*, включающие анализы, подобные использованным здесь, будут способствовать отбору потенциальных кандидатов.

**Исходя из поставленных задач были сделаны следующие  
выводы:**

1. Индустриализация хозяйств чаще приводит выращиваемые виды рыб в стрессовые условия, а вода, при больших плотностях посадки и несовершенных методах очистки, может содержать большое количество условно-патогенной микрофлоры, что приводит к ухудшению усвояемости кормов, в которых из-за недостатка рыбной муки процент содержания непитательных веществ может достигать до 30%, и патологиям;
2. Влияние микробиоты в аквакультуре шире, чем в остальных видах животноводства, и характеризуется неразрывной связью между организмом, его желудочно-кишечным трактом и средой, в которой обитают микроорганизмы, к числу которых может относиться большое количество условно-патогенных видов. В этой связи пробиотик по степени влияния может быть шире, чем он является в остальных видах животноводства;
3. Основные функции пробиотиков широко описаны во многих источниках и базируются на свойствах лакто-, бифидо- и спорообразующих бактерий, из чего состоят большинство современных пробиотиков. Однако, на анализе научных публикаций можно утверждать, что пробиотики на основе бактерий в аквакультуре потенциально могут воздействовать другими способами: конкуренцией за свободное железо, созданием ингибирующих веществ против основных видов патогенной микрофлоры, влиянием на их кворум-сенсинг, иммуномодуляцией и др.
4. На примере исследования по лечению бестеров двумя пробиотическими препаратами, из которых один состоял из бактерий, содержащихся в ЖКТ здоровой рыб, можно выявить некоторые преимущества

использования местных бактерий по внешним признакам вылеченных рыб от разных проявлений заболевания;

5. На основании анализа данных примеров использования пробиотиков были выделены основные положения, послужившие для доказательства возможности усовершенствования пробиотических препаратов на основе бактерий. Инновационное значение имеет применение пробиотиков, специализированных на достижение тех свойств, которых не было у пробиотиков «общего назначения».

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абросимова К. С. Оптимизация кормов и кормления молоди осетровых рыб для профилактики и лечения тимпани в интенсивной аквакультуре: дис. – Ростов-на-Дону, 2015, 2015.
2. Бакулина Л.Ф., Перминова Н.Г., Тимофеев И.В. [и др.]. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Vacillus* и их использование в ветеринарии // Биотехнология. 2001. № 2. С. 48–56.
3. Бурлаченко И. В. Теоретические и прикладные аспекты повышения резистентности осетровых рыб в аквакультуре. – 2007.
4. Бурлаченко К.В., Аветисов К.Б., Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И. Бактериальная обсемененность комбикормов и ее влияние на молодь стерляди / Тр. ВНИРО. Т.141.-М.; ВНИРО. 2002 с.194-208.
5. Бурлаченко И.В., Бычкова Л.И. Способ клинической оценки состояния осетровых рыб при их культивировании в установках с замкнутым циклом водообеспечения // Рыбное хозяйство. - 2005. - № 6. - С. 70-72.
6. Суворова Т. А., Силкина Н. И. Влияние антибактериального и пробиотического препаратов на специфический и неспецифический иммунитет и окислительные процессы в организме рыб //Труды Института биологии внутренних вод РАН. – 2019. – №. 87 (90). – С. 62-70.
7. Зуенко В. А. и др. Влияние кормового пробиотика на основе бактерий *Vacillus subtilis* на пищеварение рыб при садковом выращивании //Вопросы ихтиологии. – 2017. – Т. 57. – №. 1. – С. 112-117.;
8. Извекова Г. И. Функциональное значение микрофлоры кишечника для рыб и паразитирующих в их пищеварительном тракте цестод //Успехи современной биологии. – 2008. – Т. 128. – №. 5. – С. 497-507.
9. Малик Е.В. Пробиотики как способ профилактики желудочно-кишечных болезней свиней // Животновод для всех. 2002. С. 7-9
- 10.Мирошникова Е. П. и др. Элементный статус карпов при использовании в кормлении веществ «Anti-Quorum» //Университетский комплекс как

- региональный центр образования, науки и культуры. – 2020. – С. 1732-1735.
- 11.Осипова И.Г., Михайлова Н.А., Сорокулова И.Б., Васильева Е.А., Гайдеров А.А. Споровые пробиотики // Журн. микробиол. 2003. № 3. С. 113–119.
  - 12.Севрюков А. В. Спорообразующие пробиотические бактерии в ветеринарии и медицине //Валеология. – 2013. – №. 2. – С. 49-55.
  - 13.Суворова Т. А. и др. Влияние антибактериального и пробиотического препаратов на морфо-физиологические показатели иммунокомпетентных органов у карпа *Cyprinus Carpio* //Проблемы биологии продуктивных животных. – 2014. – №. 4. – С. 72-79.
  - 14.Похиленко В.Д., Перелыгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность / ВИНТИ РАН, ФГУП «ЦНИИХМ». 2007. № 32–33. С. 20–41.
  - 15.Чижаева А. В. и др. Преимущества использования пробиотиков на основе молочнокислых бактерий в аквакультуре //Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2021. – №. 9. – С. 12-16.
  - 16.Шивокене Я. Симбионтное пищеварение у гидробионитов и насекомых: Монография. – Мокслас, 1989.
  - 17.Akbar A., Anal A.K. Food safety concerns and foodborne pathogens, Salmonella, Escherichia coli and Campylobacter. FUUAST. J. Biol. 2011. vol.1. No. 1. P. 5–17.
  - 18.De Vuyst L., Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications //Microbial Physiology. – 2007. – Vol. 13. – №. 4. – P. 194-199.
  - 19.Fukami K., Nishijima T., Ishida Y. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae //Hydrobiologia. – 1997. – Vol. 358. – №. 1. – P. 185-191.

20. Feliatra F. et al. Potential of bacteriocins produced by probiotic bacteria isolated from tiger shrimp and prawns as antibacterial to *Vibrio*, *Pseudomonas*, and *Aeromonas* species on fish // *F1000Research*. – 2018. – Vol. 7.
21. Fuller R. Probiotics in man and animals // *The Journal of applied bacteriology*. – 1989. – Vol. 66. – №. 5. – P. 365-378.
22. Gatesoupe F. J. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus* // *Aquatic Living Resources*. – 1997. – Vol. 10. – №. 4. – P. 239-246.
23. Gatesoupe F. J. et al. Early weaning of seabass larvae, *Dicentrarchus labrax*: the effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes // *Aquaculture*. – 1997. – Vol. 158. – №. 1-2. – P. 117-127.
24. Gonzalez C. J. et al. Psychrobacters and related bacteria in freshwater fish // *Journal of Food Protection*. – 2000. – Vol. 63. – №. 3. – P. 315-321.
25. Hagiwara A. et al. Increased sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera) with the addition of bacteria and rotifer extracts // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. – 1994. – Vol. 181. – №. 1. – P. 1-8.
26. Harris J. M. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis // *Microbial ecology*. – 1993. – Vol. 25. – №. 3. – P. 195-231.
27. Hirayama K. et al. Application of a growth-promoting bacteria for stable mass culture of three marine microalgae // *Live Food in Aquaculture*. – Springer, Dordrecht, 1997. – P. 223-230.
28. Holzapfel W. H. et al. Overview of gut flora and probiotics // *International journal of food microbiology*. – 1998. – Vol. 41. – №. 2. – P. 85-101.
29. Hong H. A., Duc L. H., Cutting S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics // *FEMS microbiology reviews*. – 2005. – Vol. 29. – №. 4. – P. 813-835.

30. Krogdahl Å. et al. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids //Aquaculture research. – 2010. – Vol. 41. – №. 3. – P. 333-344.
31. Lazado C. C. et al. Characterization of GP21 and GP12: two potential probiotic bacteria isolated from the gastrointestinal tract of Atlantic cod //Probiotics and antimicrobial proteins. – 2010. – Vol. 2. – №. 2. – P. 126-134.
32. Makled S. O. et al. Evaluation of marine psychrophile, *Psychrobacter namhaensis* SO89, as a probiotic in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets //Fish & shellfish immunology. – 2017. – Vol. 61. – P. 194-200.
33. Moriarty D. J. W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds //Aquaculture. – 1998. – Vol. 164. – №. 1-4. – P. 351-358.
34. Munro P. D., Barbour A., Birkbeck T. H. Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a marine *Aeromonas* sp //Applied and Environmental Microbiology. – 1995. – Vol. 61. – №. 12. – P. 4425-4428.
35. Neilands J. B. Iron absorption and transport in microorganisms //Annual review of nutrition (USA). – 1981.
36. Okutani K., Kitada H. Studies on chitin decomposing bacteria present in digestive tracts of aquatic animals. III. Formation of organic acids //Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. – 1968. – Vol. 34. – C. 1141-1146.
37. Okuzumi M. Studies on the bacterial flora in the intestines of various marine fish //Bull. Japan Soc. Sci. Fish. – 1969. – Vol. 35. – P. 93-99.
38. Olafsen J. A., USA dEC. Interactions between hosts and bacteria in aquaculture //Proceedings from the US-EC Workshop on Marine Microorganisms: Research Issues for Biotechnology. European Commission, Brussels, Belgium. – 1998. – P. 127-145.

39. Rico-Mora R., Voltolina D., Villaescusa-Celaya J. A. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures //Aquacultural Engineering. – 1998. – Vol. 19. – №. 1. – P. 1-6.
40. Ringø E. et al. Lactic acid bacteria in finfish—An update //Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol. 9. – P. 1818.
41. Ringø E. Probiotics in shellfish aquaculture //Aquaculture and Fisheries. – 2020. – Vol. 5. – №. 1. – P. 1-27.
42. Rørvik K. A. et al. Effects of dietary iron and n-3 unsaturated fatty acids (omega-3) on health and immunological parameters in farmed salmon //Proceedings of the Fifth International Conference of the European Association of Fish Pathologists. European Association of Fish Pathologists, Budapest, Hungary. – 1991. – P. 86.
43. Sakai M. Current research status of fish immunostimulants //Aquaculture. – 1999. – Vol. 172. – №. 1-2. – P. 63-92.
44. Salas-Leiva J. et al. Characterization of the intestinal microbiota of wild-caught and farmed fine flounder (*Paralichthys adspersus*) //Latin american journal of aquatic research. – 2017. – Vol. 45. – №. 2. – P. 370-378.
45. Skjermo J. et al. Microbially matured water: a technique for selection of a non-opportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae //Aquaculture International. – 1997. – Vol. 5. – №. 1. – P. 13-28.
46. Söderhäll K., Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity //Current opinion in immunology. – 1998. – Vol. 10. – №. 1. – P. 23-28.
47. Svanevik C. S., Lunestad B. T. Characterisation of the microbiota of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) //International journal of food microbiology. – 2011. – Vol. 151. – №. 2. – P. 164-170.
48. Sun Y. Z. et al. Effect of dietary administration of *Psychrobacter* sp. on the growth, feed utilization, digestive enzymes and immune responses of grouper

- Epinephelus coioides* //Aquaculture Nutrition. – 2011. – Vol. 17. – №. 3. – P. e733-e740.
49. Vadstein O. et al. Skjk-Brk G.(1993) A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish //Proceedings of the First International Conference on Fish Farming Technology. – P. 69-75.
50. Van Doan H., Soltani M., Ring E. In vitro antagonistic effect and in vivo protective efficacy of Gram-positive probiotics versus Gram-negative bacterial pathogens in finfish and shellfish //Aquaculture. – 2021. – Vol. 540. – P. 736581.
51. Wanka K. M. et al. Isolation and characterization of native probiotics for fish farming //Bmc Microbiology. – 2018. – Vol. 18. – №. 1. – P. 1-13.
52. Wilson B., Danilowicz B. S., Meijer W. G. The diversity of bacterial communities associated with Atlantic cod *Gadus morhua* //Microbial ecology. – 2008. – Vol. 55. – №. 3. – P. 425-434.
53. Xing M. et al. Taxonomic and functional metagenomic profiling of gastrointestinal tract microbiome of the farmed adult turbot (*Scophthalmus maximus*) //FEMS microbiology ecology. – 2013. – Vol. 86. – №. 3. – P. 432-443.
54. Yang S. C. et al. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals //Frontiers in microbiology. – 2014. – Vol. 5. – P. 241.
55. Zorriehzahra M. J. et al. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review //Veterinary quarterly. – 2016. – Vol. 36. – №. 4. – P. 228-241.