

СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ ПРИ ИХ ВЫРАЩИВАНИИ В АКВАПОНИЧЕСКОЙ УСТАНОВКЕ

Гридина Т.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук», г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Аннотация. Статья посвящена изучению микрофлоры осетровых видов рыб (гибрид стерляди и белуги) при выращивании их в аквапонической установке, совместно с растениями и бактериальным штаммом. Добавление бактериального штамма может оказывать влияние на развитие микрофлоры на поверхности рыбы, приводить к развитию патогенной флоры, а в дальнейшем – к появлению заболеваний. Проведено исследование микрофлоры поверхности рыбы, микробиоты кишечника, жабр. Установлено, что слизистая оболочка желудка осетровых рыб обсеменена разнообразными микроорганизмами. Большая часть микробиоты осетровых представлена кокковидными клетками (51 % от общего количества), коккопалочками (19 %) и палочковидными клетками с закругленными концами (30 %). Видовой состав и численность микрофлоры поверхности рыбы зависит от условий культивации. В посевах были отмечены палочковидные и кокковидные формы клеток, грамположительные по Граму. Микрофлора в пробах была разнообразной, развитие патогенной флоры отмечено не было. Микрофлора соответствовала данным посевов в экспериментах без добавления бактериального штамма. Это свидетельствует о том, что применение бактериального штамма *Serratia ficaria* TP3 безопасно и не оказывает влияние на микрофлору рыбы. Данные факторы позволили сделать вывод, что добавление штамма не оказывает влияние на микрофлору осетровых рыб, развивающихся в аквапонической установке.

Ключевые слова. Аквапоника, осетровые, микрофлора, выращивание, штаммы.

MICROFLORA COMPOSITION IN STURGEON FISH SPECIES CULTIVATED IN AN AQUAPONIC SYSTEM

Gridina T.S.

Federal State Budgetary Institution of Science "Federal Research Centre The Southern Scientific Centre of the Russian Academy of The Sciences", Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. This article is dedicated to the investigation of the microflora in sturgeon fish species (the hybrid of sterlet and beluga sturgeon), cultivated in the environment of an aquaponic system together with plants and a bacterial strain. The addition of a bacterial strain can affect the development of microflora on the fish exterior, lead to the development of pathogenic flora, and, later on, diseases. The microflora of the fish exterior, intestines and gills has been investigated. It has been established that the mucous lining of the stomach in sturgeon fish species is contaminated with various microorganisms. Most of the microbiota in sturgeons is represented by cocci-shaped cells (51% of the total), coccobacilli (19%) and rod-shaped cells with rounded ends (30%). The species composition and number of microflora on the fish exterior depends on the conditions of cultivation. In the inoculated cultures, rod-shaped and coccoid forms of cells, gram-positive according to Gram, have been recorded. The microflora in the samples was diverse; the development of pathogenic flora was not observed. The microflora corresponded to the inoculation data collected during the experiments without the addition of a bacterial strain. This indicates that the use of the bacterial strain *Serratia ficaria* TP3 is safe and does not affect the microflora of fish. These factors led to the conclusion that the addition of the strain does not affect the microflora of sturgeon species reared in the environment of an aquaponic system.

Keywords. aquaponics, sturgeons, microflora, aquaculture techniques, strains.

Аквапоническая система представляет собой искусственно созданную систему, в которой ключевыми являются три типа живых организмов: рыбы, растения и бактерии.

Добавление в среду микробиологических препаратов, позволяет создать благоприятную среду в аквапонных системах и добиться более высоких урожаев. В аквапонике не используются гербициды и пестициды, что позволяет получать экологически чистые продукты. Однако влияние добавление в

среду микробиологических препаратов не исследовано, что заставляет проводить опыты по изучению микрофлоры рыбы в аквапонической системе.

Состав микрофлоры рыб весьма разнообразен и может зависеть от различных факторов, таких как условия обитания, состояние ила, виды рыб. Значительное влияние оказывает характер водоема и время вылова рыбы [1, 2].

Разнообразные микроорганизмы развиваются на поверхности рыб, попадая через жабры, со слизью.

В ходе выращивания была исследована рыба, выращиваемая в аквапонической установке. Рыбы осетровых пород были обсеменены различными микроорганизмами, которые развиваются в зависимости от содержания органических веществ, аэрации, слабощелочной реакции и воды в установке [3, 4, 5]. В желудочно-кишечном тракте обитают различные микроорганизмы, которые могут привести к развитию инфекции. В ходе исследования было необходимо изучить особенности развития микрофлоры рыбы (гибрид стерляди и белуги) в аквапонической установке при выращивании совместно с растениями при добавлении бактериального штамма. Внесение штамма может оказать различное влияние на развитие микрофлоры, способствовать развитию патогенной флоры, инфекций или же подавить часть собственной микрофлоры рыбы. Поэтому необходимо провести исследования по изучению влияния экспериментального штамма на развитие микрофлоры при совместном выращивании осетровых и растений в аквапонической системе. В ранее проведенных экспериментах установлено, что бактериальный штамм показал положительные результаты при совместном выращивании осетровых рыб и растительных культур [5], поэтому было необходимо проверить действие препарата на состав микрофлоры осетровых видов рыб.

В модульных системах с бассейнами объемом 3,2 м³, при температуре воды 24 ± 1 °С, с содержанием кислорода 5 ± 1 мг/л, рН – 7 ± 1, нитритов – 0,1–0,2 мг/л, аммиака-аммония – 0,5–1 мг/л выращивали гибрид стерляди и белуги. Плотность посадки рыбы в бассейнах для выращивания составила не более 40 кг/м³ в опыте и контроле. Совместно с осетровыми методами аквапоники выращивали зеленый салат сорта «Витаминный» и добавляли бактериальный изолят *Serratia ficaria* TP3. Бактериальный изолят вносили путем обработки растений опрыскиванием, каждые 10 дней с начала эксперимента.

Для исследования были отобраны 30 рыб. Стерильным скальпелем делали соскоб с поверхности тела рыб, полученный материал помещали на твердые питательные среды и растирали шпателем. Соскобы с жабр и поверхности тела, внутренние органы и желудочно-кишечный тракт исследовали методом высева на плотные среды. Методом отпечатков проводили посев на плотные питательные среды, такие как МПА (мясопептонный агар), соблюдая правила асептики. Количество повторений составило 30 шт. Среды разливали в чашки и делили на сектора. Инкубация проходила в термостате при температуре в 26 °С. Определение в посевах аэробных и анаэробных форм клеток основано на одновременном их выращивании на плотных питательных средах в чашках Петри, герметично закрытых после посева. Вначале кислород поглощается растущими аэробами, а затем начинается рост анаэробов. Подсчет производят по видимым признакам.

Для проведения посевов разведенной суспензии из кишечника осетровых рыб в 30 повторностях на плотные питательные среды брали после вскрытия, используя метод разведений. Определение количества микроорганизмов методом предельных разведений включает приготовление разведений, посев в жидкую среду, регистрацию наличия или отсутствия роста после инкубации и расчет наиболее вероятного числа клеток в единице объема исходного субстрата. Разведения исходной суспензии готовят так же, как и для чашечного метода. В 9 мл дистиллированной воды добавляли 1 мл суспензии. Питательную среду предварительно разливали в чашки Петри и стерилизовали. Посев проводили из каждого разведения или из четырех-пяти последних, причем каждое разведение высевали в 3-5 параллельных пробирок. Количество посевного материала было везде одинаково и составляло 1 мл. Засеянные пробирки помещали в термостат. Время инкубации варьировало от 3 до 10 суток и зависело от скорости роста микроорганизмов, численность которых определяли. Посев проводили с разведениями 10⁻³, 10⁻⁵ и цельной пробой на мясопептонный агар. После инкубации в термостате при температуре в 26 °С делали подсчет выросших колоний клеток. До добавления в систему бактериального изолята и по окончании исследования делали мазки из слизи поверхности тела, участков жабр, а также мазки-отпечатки из внутренних органов, окрашивая их по Граму. Применение сложного метода окрашивания предполагает использование как минимум двух красителей со стадией отмывки между ними. Обесцвечивание проводили водой. В зависимости от строения клеточной стенки бактерии разделялись на две группы (грамположительные и грамотрицательные). Определение мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов проводили при помощи высева разведений навески продукта в жидкую питательную среду, инкубирования посевов, учета видимых признаков роста микроорганизмов, пересеве, при необходимости культуральной жидкости на агаризованные питательные среды для подтверждения роста микроорганизмов, подсчете их

количества. Проводили исследования разведений с поверхности рыбы и с последующим высевом их на твердые питательные среды. Идентификация микроорганизмов до рода проводили при помощи определителя Берджи. Микроскопирование мазков осуществляли с помощью микроскопа и видеоокуляра. Для статистической обработки всех полученных данных использовали программу Microsoft Office Excel. Статистическую обработку результатов исследования проводили, используя критерий Стьюдента. Достоверно значимыми считались изменения при $p \leq 0,95$.

Состав микромиры кишечника, внутренних органов, крови и мышц осетровых рыб может претерпевать изменения из-за воздействия различных факторов [5]. При развитии заболеваний микрофлора может увеличиваться, что существенно отражается при высевах посевов на плотные питательные среды.

Таблица 1 – Микрофлора гибрида стерлядь x белуга из кишечника до применения бактериального изолята и после

Отделы кишечника	Передний		Средний		Задний	
	До	После	До	После	До	После
Обработка бактериальным штаммом						
Аэробные клетки	6×10^7	$5,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$1,9 \times 10^2$	$1,82 \times 10^2$
Анаэробные	$4,2 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$	$1,54 \times 10^4$	$1,8 \times 10^2$	$1,83 \times 10^2$

Из таблицы 1 можно сделать вывод, что существенного воздействия на развитие микрофлоры в трех отделах кишечника гибрида стерляди и белуги не отмечается. В посевах наблюдается примерно одинаковая общая численность клеток.

При исследовании мазков были обнаружены палочковидные и кокковидные формы клеток, грамположительные по Граму. Возможно, не все микроорганизмы были высеяны на среду МПА [7, 8]. Согласно литературным данным, у осетровых рыб общее микробное число клеток микроорганизмов варьирует от 10^8 до 10^{12} г/мл смыва.

Предположительно, доминирующими в кишечнике осетровых рыб явились виды рода *Vibro*, *Aeromonas* и *Edwardsiella*.

Результаты микрофлоры русского осетра представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Микрофлора кишечника русского осетра в трех разведениях

Отделы кишечника	Передний, 10-3		Средний, 10-8		Цельная проба 10-12	
	До	После	До	После	До	После
Обработка бактериальным штаммом						
Аэробные клетки	2,9	2,7	3,2	3,3	9,2	8,2
Анаэробные	1,8	1,7	1,9	1,2	11,2	13,2

Из таблицы 2 можно заключить, что до и после обработки бактериальным штаммом наблюдается развитие бактериальных клеток в трех разведениях приблизительно одинакового общего количества. В разведении 10-8 численность анаэробных клеток снижается после обработки бактериальным штаммом. В цельной пробе численность аэробных клеток после обработки чуть увеличивается и возрастает численность анаэробных клеток на 17 %. Во всех посевах были отмечены палочковидные и кокковидные формы клеток, грамположительные по Граму. Предположительно, доминирующими в кишечнике осетровых рыб явились виды рода *Vibro*, *Aeromonas* и *Edwardsiella*.

Также встречались единичные клетки представителей родов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*.

Морфологические (рис. 1) и культуральные свойства выделенных микроорганизмов представлены в таблице 3. Отмечено, что слизистая оболочка желудка осетровых рыб обсеменена

разнообразными микроорганизмами. В более глубоких слоях (микроворсинках) количество бактерий будет значительно выше, чем в верхних слоях.

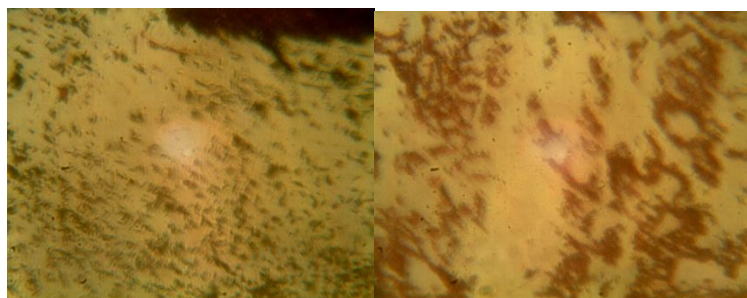


Рисунок 1 – Микроскопические данные мазков грамположительных палочек окрашенных по Граму (увеличенный в 40 раз)

Количество микротрихий на 1 мм² первого отдела составляло 9,2-2,9 млн. Численность бактериальных клеток, наиболее часто встречающихся в первом отделе, составляет 3,2*10⁸, во втором отделе и третьем отделе – 1,9*10⁵ и 3,7*10³, соответственно.

Большинство бактерий сосредоточены отдельно, однако встречаются ярко выраженные конгломераты, образующие микроколонии. Большая часть представлена кокковидными клетками (51 % от общего количества), коккопалочками (19 %) и палочковидными клетками с закругленными концами (30 %). Эти бактерии прикреплены к микротрихиям.

Изучение поверхности тела осетровых рыб также проводили методом отпечатков и смыва. Поверхностный слой рыб может меняться постоянно и зависит от условий культивирования рыб. Основное место обитания микроорганизмов – слизь и жабры. Любые поверхностные нарушения рыб приводят к развитию патогенной микрофлоры.

Видовой состав и численность микрофлоры поверхности рыбы зависит от условий культивирования. Регулярная микрофлора формируется постепенно и требует времени на формирование. Высев микроорганизмов производили на среды МПА, соблюдая основные правила асептики. Использован метод отпечатков. Среды разливали в чашки Петри и делили на четыре сектора. По окончании инкубации чашек в термостате при температуре в 26 °С производили подсчет клеток микроорганизмов.

Таблица 3 – Численность аэробных и анаэробных клеток на жабрах и поверхности рыб

Тип клеток	Жабры		Поверхность рыбы	
	До	После	До	После
Обработка бактериальным штаммом				
Аэробные	1,9×10 ²	1,82×10 ²	1,9×10 ³	1,67×10 ³
Анаэробные	3,7×10 ⁷	4,5×10 ⁷	5,4×10 ⁷	4,7×10 ⁷

Из таблицы 3 можно заключить, что на жабрах рыб численность анаэробных и аэробных форм клеток до и после применения бактериального изолята примерно одинаковая. Незначительно возрастает количество анаэробных клеток. На поверхности рыб численность остается примерно одинаковой и составляет 5,4×10⁷ и 4,7×10⁷ анаэробных клеток. В посевах были отмечены палочковидные и кокковидные формы клеток, грамположительные по Граму. Предположительно, доминирующими в кишечнике осетровых рыб явились виды рода *Vibro*, *Aeromonas* и *Edwardsiella*. Также встречались единичные клетки представителей родов *Escherihia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacillus*, *Staphilococcus*, *Trichococcus*, *Aquaspirillum fasciculus*, *Pseudomonas*.

Изучение морфологических и культуральных свойств выделенных микроорганизмов с поверхности жабр осетровых рыб показало, что микрофлора разнообразна и представлена грамположительными и грамотрицательными палочками.

В посевах были отмечены палочковидные и кокковидные формы клеток, грамположительные по Граму. Предположительно, доминирующими в кишечнике осетровых рыб явились виды рода *Vibro*,

Aeromonas и *Edwardsiella*. Также встречались представители единичные клетки родов *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Trichococcus*, *Aquaspirillum fasciculus*

Данная работа показывает, что добавление бактериального штамма не оказывает влияние на развитие микрофлоры осетровых рыб, что позволяет использовать изолят *Serratia ficaria* TP3 при выращивании растений и осетровых рыб в аквапонической установки. В ходе исследований было обнаружено, что слизистая оболочка желудка осетровых рыб обсеменена разнообразными микроорганизмами. В более глубоких слоях (микроросинках) количество бактерий будет значительно выше, чем в верхних слоях.

Количество микротрихий на 1 мм² первого отдела составляло 9,2-2,9 млн. Численность бактериальных клеток, наиболее часто встречающихся в первом отделе, составляет $3,2 \cdot 10^8$, во втором отделе и третьем отделе – $1,9 \cdot 10^5$ и $3,7 \cdot 10^3$, соответственно.

Большинство бактерий сосредоточены отдельно, однако встречаются ярко выраженные конгломераты, образующие микроколонии. Большая часть представлена коккивидными клетками (51 % от общего количества), коккопалочками (19%) и палочковидные клетки с закругленными концами (30%). Видовой состав и численность микрофлоры поверхности рыб зависит от условий культивирования. В посевах были отмечены палочковидные и кокковидные формы клеток, грамположительные по Грамму. Предположительно, доминирующими в кишечнике осетровых рыб явились виды микроорганизмов родов *Vibro*, *Aeromonas* и *Edwardsiella*. Также встречались единичные клетки представителей микроорганизмов родов *Escherihia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Trichococcus*, *Aquaspirillum fasciculus*, *Staphylococcus*. Высев микроорганизмов с поверхности рыб производили на среды МПА, соблюдая основные правила асептики. При исследовании метода отпечатков отмечены палочковидные и кокковидные формы клеток, грамположительные по Граму. Микрофлора в пробах была разнообразной. Микрофлора в посевах соответствовала полученным данным без добавления бактериального изолята. Применение бактериального изолята *Serratia ficaria* TP3 безопасно и существенно не влияет на изменение микрофлоры рыб.

Список использованных источников

1. Воронина М.В. Использование методов гидропоники в сельском хозяйстве // Научное обеспечение агропромышленного комплекса: сб. ст. по матер. XII Всерос. конф. молодых ученых (г. Краснодар, 5–8 февраля 2019 г.) / Под ред. А.Г. Кощаева. Краснодар: Изд-во Кубанского государственного аграрного университета им. И.Т. Трубилина, 2019. С. 219–220.
2. Евграфова Е.М., Лагуткина Л.Ю., Кузьмина Е.Г. Перспектива использования линя и австралийского рака в суперэффективных системах — аквапонике // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2019. № 9 (164). С. 62–71.
3. Гинятов, Н.С. Идентификация возбудителя инфекционной патологии осетровых рыб в условиях УЗВ / Н.С. Гинятов, И.Н. Залялов, Г.Г. Абсатиров // Материалы международной научной конференции «Современные проблемы ветеринарной и аграрной науки и образования», посвященной 150-летию образования Государственной ветеринарной службы России, 2016. – С.42-45.
4. Гинятов, Н.С. Микробный пейзаж в УЗВ и их чувствительность к антибиотикам in vitro / Н.С. Гинятов, Г.Г. Абсатиров, Б.Т. Сариев // Материалы международной научно-практической конференции «Наука и образование XXI века: опыт и перспективы», – Уралск: РИО ЗКАТУ им. Жангир хана, 2015, – С. 111-114.
5. Данилова А.А., Юрина Н.А., Юрин Д.А., Максим Е.А. Аквапоника как перспективное направление сельского хозяйства // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки: матер. IV Междунар. науч.-практ. конф. (г. Ялта, 9–13 сентября 2019 г.) / Под ред. В.С. Паштецкого. Симферополь: Изд-во Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма, Ариал, 2019. С. 36–37.