



Издатель

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет»
Российская Федерация, г.Петрозаводск, пр.Ленина,33

Научный электронный журнал

ПРИНЦИПЫ ЭКОЛОГИИ

<http://ecopri.ru>

№ 4 (50). Декабрь, 2023

Главный редактор

А. В. Коросов

Редакционный совет

В. Н. Большаков
А. В. Воронин
Э. В. Ивантер
Н. Н. Немова
Г. С. Розенберг
А. Ф. Титов
Г. С. Антипина
В. В. Вапиров
А. М. Макаров

Редакционная коллегия

Т. О. Волкова
Е. П. Иешко
В. А. Илюха
Н. М. Калинкина
J. P. Kurhinen
А. Ю. Мейгал
J. B. Jakovlev
В. Krasnov
А. Gugotek
В. К. Шитиков
В. Н. Якимов

Службы поддержки

А. Г. Марахтанов
Е. В. Голубев
С. Л. Смирнова
Н. Д. Чернышева
М. Л. Киреева

ISSN 2304-6465

Адрес редакции

185910, Республика Карелия, г.Петрозаводск, пр. Ленина, 33. Каб. 453

E-mail: ecopri@psu.karelia.ru

<http://ecopri.ru>





УДК 579.26:579.262

ОСОБЕННОСТИ АССОЦИАТИВНОГО СИМБИОЗА НА ПРИМЕРЕ ИНТЕСТИНАЛЬНОЙ БАКТЕРИОФЛОРЫ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*PARASALMO MYKISS* WALBAUM)

СИДОРОВА
Наталья Анатольевна

кандидат биологических наук, Петрозаводский государственный университет, 185910, Петрозаводск, пр. Ленина, 33, fagafon@yandex.ru

КУЧКО
Александр Алексеевич

Петрозаводский государственный университет, 185910, Петрозаводск, пр. Ленина, 33, ufer1996@yandex.ru

Ключевые слова:
ассоциативный симбиоз
доминанты
субдоминанты
интестинальная
бактериофлора
минорные микросимбионты
радужная форель

Аннотация: Изучение особенностей ассоциативного симбиоза выполнено на примере кишечной бактериофлоры трех возрастных групп радужной форели, выращенной в условиях садкового содержания в акватории Ладожского озера. Для описания структуры ассоциативного симбиоза кишечника форели использованы методы микробиологического анализа и полногеномное секвенирование по Сенгеру. Для выявления значимости различных таксонов бактерий в ассоциативном симбиозе выполнена серия экспериментов по сокультивированию и оценка жизнеспособности ассоциантов. В результате микробиологического анализа и генотипирования описано 310 видов бактерий, принадлежащих к 37 родам. Благодаря сравнительному изучению состава интестинальной микрофлоры обнаружено, что в возрастной группе 1+ доминируют фирмикутные бактерии, а в возрастных группах 2+ и 3+ – протеобактерии. К константным таксонам отнесены представители 11 родов, для которых описана последовательная смена доминантных, субдоминантных и минорных микросимбионтов в зависимости от возрастной группы форели. Для возрастной группы 1+ очередность смены таксонов состояла из последовательности *Eubacterium* > *Bacteroides* > *Micrococcus* > *Proteus* > *Fusobacterium*, для возрастной группы 2+ *Bacillus* > *Propionibacterium* > *Bacteroides* > *Fusobacterium* > *Citrobacter*, а для возрастной группы 3+ *Bacillus* > *Proteus* > *Flexibacter* > *Campylobacter* > *Cetobacterium*. В результате эксперимента по сокультивированию кишечной бактериофлоры однолетних и двухлетних особей форели описан взаимостимулирующий эффект между ассоциантами, о чем свидетельствуют высокие значения оптической плотности культурального раствора, длительный линейный характер роста, постоянство скорости накопления биомассы и достижение большого числа жизнеспособных клеток в ассоциации.

© Петрозаводский государственный университет

Получена: 13 ноября 2023 года

Подписана к печати: 11 января 2023 года

Введение

Симбиоз у рыб встречается повсеместно и, согласно современной интерпретации, не всегда предполагает наличие специализированных облигатных связей между партнерами (Helfman et al., 2009; Немцева, 2015). Благодаря достижениям в области симбиологии, в литературе все чаще стал встречаться термин «ассоциативный симбиоз» (Проворов, 2001), а микроорганизмы, обитающие на поверхности и во внутренних средах растительных и животных организмов, рассматриваются как представители «ассоциативного симбиоза» (Чёрная, 2017). Согласно первоисточникам (Лобакова, 2006; Бухарин и др., 2007; Яценко-Степанова, Немцева, 2009), к основным компонентам ассоциативного симбиоза относятся макропартнер или хозяин, доминантный симбионт и минорные микросимбионты с функциями, отвечающими за формирование и стабильность существования симбиотических отношений. Функции в основном связаны с биосинтезом широкого спектра метаболитов, с иммунологическими, эволюционными и экологическими процессами (Bordenstein et al., 2015; Woodhams et al., 2020). В составе интестинальной микрофлоры рыб ассоцианты на уровне кишечника обеспечивают относительное постоянство, что во многом зависит от колонизационной резистентности организма хозяина и от многообразных биологических характеристик микроорганизмов. Это способность к адгезии за счет взаимодействия лектинов с гликопротеинами и гликолипидами эпителиальных клеток кишечника или пищевых субстратов, колонизационная активность, конкуренция за питательный субстрат, антагонистическая активность, способность к биопленкообразованию и созданию на уровне желудочно-кишечного тракта специализированных микробных сообществ. В свою очередь колонизация бактериями пищеварительного тракта зависит от pH среды в кишечнике, перистальтики, содержания желчных кислот и пищеварительных ферментов, иммунного ответа хозяина на бактериальную инвазию, а также от присутствия автохтонных бактерий и выраженных антагонистов, способных к биосинтезу антибиотикоподобных соединений (Hansen, Olafsen, 1999; Ringo et al., 2003). В исследованиях, посвященных ассоциативным микроорганизмам (Minich et al., 2020a, б; Riiser et al., 2020), указывается также на важность экзогенных и эндогенных факто-

ров, которые существенно влияют на качественное и количественное разнообразие микрофлоры кишечника рыб. К экзогенным относят особенности водоемов, биоразнообразие микрофлоры воды, рацион питания, а к эндогенным, связанным с организмом хозяина, особенности генетики, физиологии и иммунитета.

Установлено, что среди представителей ассоциативного симбиоза у рыб преобладают аэробные и факультативно-анаэробные виды (Ringo, Birkbeck, 1999). Доминируют виды родов *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Cytophaga* / *Flexibacter*, *Enterobacter*, *Eikenella*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus* (Austin, 2002). В составе интестинальной аутофлоры рыб обнаружено присутствие молочнокислых бактерий *Lactobacillus casei*, *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. brevis*, *L. fermentum*, которые, по мнению некоторых авторов, не являются доминантными, но тем не менее относятся к важным компонентам микрофлоры кишечника за счет способности продуцировать органические кислоты, перекись водорода, широкий спектр бактериоцинов, подавляющих рост патогенных и условно-патогенных видов бактерий (Jankauskiene, 2000). При изучении роли бактерий рода *Lactobacillus* в развитии защитных механизмов у рыб обнаружено, что в зимний период численность лактобактерий в составе микрофлоры кишечника не изменяется, а частота встречаемости основного доминанта *L. casei* может увеличиваться в разы (Jankauskiene, 2000).

Радужная форель относится к традиционным объектам исследований в аквакультуре. Считается, что разнообразие кишечной микрофлоры у представителей вида особенно велико (Sugita et al., 1992, 1997). Бактерии в составе интестинальной микрофлоры кишечника отвечают за колонизационную резистентность ЖКТ форели, обладают прямой антагонистической активностью и способны подавлять возможную персистенцию условных патогенов, а также контролировать взаимодействие доминантных видов с другими представителями ассоциативного симбиоза ЖКТ радужной форели (Izvekova et al., 2007). Перечисленные свойства ассоциантов чрезвычайно важны для понимания закономерностей формирования ассоциативного симбиоза на примере интестинальной ми-

крофлоры, описания бактериальных механизмов колонизационной резистентности ЖКТ рыб с акцентом на последующую разработку альтернативных форм пробиотических препаратов с комплексным воздействием на аллохтонную микрофлору. С учетом того, что снижение колонизационной резистентности организма форели часто сопровождается воспалительными процессами в ЖКТ, проблема исследования ассоциативного симбиоза ЖКТ рыб считается актуальной еще и потому, что открывает новые способы диагностики инфекций объектов аквакультуры и контроля микробиологических нарушений различной этиологии. Вышеизложенное явилось основанием для формулировки цели настоящего исследования, связанного с изучением особенностей ассоциативного симбиоза радужной форели, – описание структуры и выявление значимости отдельных представителей ассоциативного симбиоза интестинальной бактериофлоры форели разных возрастных групп.

Материалы

Для изучения структуры сообщества интестинальной аутофлоры обследовано 36 особей радужной форели *Parasalmo mykiss* (Walbaum, 1792) семейства лососевые Salmonidae, род лососи *Salmo* Linne в возрасте 1+, 2+ и 3+, выращенных в условиях форелевого хозяйства, расположенного в акватории Ладожского озера. В каждой возрастной группе микробиологический анализ был выполнен для 12 особей форели. Исследования проведены в июле – августе 2023 г., на момент исследования форель содержалась в условиях садкового разведения согласно технологическим требованиям, указанным в Руководстве по ветеринарно-санитарному контролю (2018). Все эксперименты с рыбой выполнены в соответствии с международным этическим стандартом, изложенным в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в других научных целях, а также согласно требованиям, указанным в Приказе Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных» и других нормативных документах, включая заключение Комитета по этике в области исследований на животных Петрозаводского государственного университета от 7 мая 2020 г. № 274.

Методы

Для изучения состава интестинальной аутофлоры форели в стерильных условиях отбирали образцы кишечника и для неселективного накопления бактерий помещали в среду первичного обогащения следующего состава, г/л: пептон – 10.0; NaCl – 5.0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 9.0; KH_2PO_4 – 1.5. Чистые штаммы пересеивали на скошенный агар для получения биомассы клеток, необходимой для идентификации по фенотипическим признакам согласно Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2001). При микроскопическом анализе основных морфологических признаков применяли методы окраски по Граму, Бурри – Гинсу и Пешкову. С помощью питательных сред общего, селективного и дифференциально-диагностического назначения (Гисса, Кларка, Кесслера, кровавого агара, висмут-сульфит агара, Плоскирева, Левина и др.) исследовали культуральные, биохимические и физиологические свойства микроорганизмов (Методы общей бактериологии, 1983; Методические указания..., 1998). Для полногеномного секвенирования выделенных бактерий использовали метод Сенгера (Sanger et al., 1977). Генотипирование выполняли с помощью набора реактивов BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc., USA) на генетическом анализаторе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Inc., USA) согласно инструкциям производителя.

Для выявления значимости различных таксонов бактерий в ассоциативном симбиозе выполнена серия экспериментов по совместному культивированию доминантных, субдоминантных и минорных микросимбионтов. В эксперименте участвовали только константные таксоны. Согласно методам количественной оценки доминирования в экологических сообществах (Баканов, 2005), к константным относили таксоны, обнаруженные в более 50 % проб интестинальной микрофлоры, к второстепенным – 25–50 %, к случайным – меньше 25 %. Отобранные таксоны сокультивировали на питательной среде, содержащей 3.4 г панкреатического гидролизата рыбной муки и 5.4 г хлористого натрия. Доза вносимого инокулята составляла 5 % от объема питательной среды. Сокультивирование выполняли на бактериальном биореакторе RTS-1C (BioSan Ltd., Латвия) при температуре 37 ± 0.1 °C. Характер взаимоотношений между бактериями в ассоциации оценивали по достижению максимальных значений оптической плотности

(OD) культурального раствора и жизнеспособности ассоциантов. OD измеряли в режиме реального времени при длине волны 850 нм и точности измерения ± 0.3 OD. Жизнеспособность бактерий оценивали по способности к росту на агаризованной питательной среде с ферментативным гидролизатом. Для этого бульонную культуру исследуемых бактерий в объеме 1 мл смешивали с 9 мл стерильного солевого раствора и выполняли серию разведений от 10^{-1} до 10^{-10} . Для получения статистически значимых результатов из последних трех разведений 0.1 мл культурального раствора диспергировали в чашках Петри с агаризованной питательной средой. Посевы инкубировали при 38 °С в течение 48 часов, после чего подсчитывали количество колоний. Результаты выражали в колониеобразующих единицах в 1 мл среды (КОЕ/мл) (Луста, Фихте, 1990). Полученные данные обрабатывали статистически с использованием программ Excel 2003 и Statistica 6.0 для Windows XP.

Результаты

В результате микробиологического анализа и генотипирования из интестинальной микрофлоры радужной форели было выделено и идентифицировано 310 видов, принадлежащих к домену / Domain Bacteria, 5 филумам / Phylum, 12 классам / Class, 14 порядкам / Order, 27 семействам / Family и 37 родам / Genus. Выполнен сравнительный анализ интестинальной микрофлоры в зависимости от возраста форели, результаты которого представлены на гистограмме с группировкой (рис. 1). При сравнительном анализе структурных особенностей сообщества обнаружено, что с увеличением возраста происходит существенное изменение качественного и количественного состава кишечной бактериофлоры. Так, в составе интестинальной микрофлоры однолеток доминировали фирмикутные бактерии (44.7 %), а в возрастных группах 2+ и 3+ – протеобактерии. Встречаемость протеобактерий у двухлеток достигала 36.4 %, а у трехлеток возрастала до 55.8 %.

Согласно рекомендациям (McGrady-Steed et al., 1997) для оценки объективной функциональной значимости представителей ассоциативного симбиоза в эксперименте по сокультивированию были отобраны таксоны выше видового ранга (род), как более стабильные таксономические единицы (Яценко-Степанова, Немцева, 2009). Из 45 родов отобрано 11 представителей константных (*Bacillus*, *Bacteroides*, *Campylobacter*,

Cetobacterium, *Citrobacter*, *Eubacterium*, *Flexibacter*, *Fusobacterium*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Proteus*). Встречаемость остальных представителей (34 рода) в сообществе изменялась от 2.4 до 46.7 %, поэтому они были исключены из эксперимента по сокультивированию.

Матрица эксперимента по сокультивированию представлена в табл. 1.

В зависимости от возраста форели для отобранных таксономических единиц выявлена общая закономерность в смене последовательности доминантных, субдоминантных и минорных микросимбионтов. Для возрастной группы 1+ очередность смены таксонов состояла из последовательности *Eubacterium* > *Bacteroides* > *Micrococcus* > *Proteus* > *Fusobacterium*, для возрастной группы 2+ *Bacillus* > *Propionibacterium* > *Bacteroides* > *Fusobacterium* > *Citrobacter*, а для возрастной группы 3+ *Bacillus* > *Proteus* > *Flexibacter* > *Campylobacter* > *Cetobacterium*. Характерным оказалось стабильное замещение доминантов рода *Eubacterium* на *Bacillus* в составе интестинального сообщества форели возрастных групп 1+ и 2+, выпадение представителей рода *Micrococcus* из кишечной бактериофлоры старших возрастных групп, исключение бактериоидов и фузобактерий из кишечной бактериофлоры возрастной группы 3+ и замещение их на *Flexibacter*, *Campylobacter* и *Cetobacterium*. Также обнаружено полное выпадение представителей гнилостной микрофлоры рода *Proteus* из микрофлоры кишечника форели в возрасте 2+.

Результаты по сокультивированию ассоциантов приведены на типовых графиках RTS-1С (рис. 2–4). Обнаружено, что ассоцианты в составе бактериофлоры кишечника форели в возрасте 1+ и 2+ обладали взаимостимулирующим эффектом (см. рис. 2, 3). Для них прослеживается последовательная смена фаз клеточного роста, в течение которых оптическая плотность культурального раствора вырастала от 0.4 до 1.6–2.2 OD и сохранялась на высоком уровне в течение 160 ч культивирования. Максимальная плотность микробной культуры была зарегистрирована для возрастной группы 1+ (2.2 OD), где ассоциация интестинальной микрофлоры кишечника состояла из доминантных родов *Eubacterium* и *Bacteroides*, субдоминантов *Micrococcus* и *Proteus* и минорных микросимбионтов рода *Fusobacterium*. В данном варианте эксперимента плотность клеток в ассоциации достигла своего максимума к 3-м суткам культивирования и далее сохра-

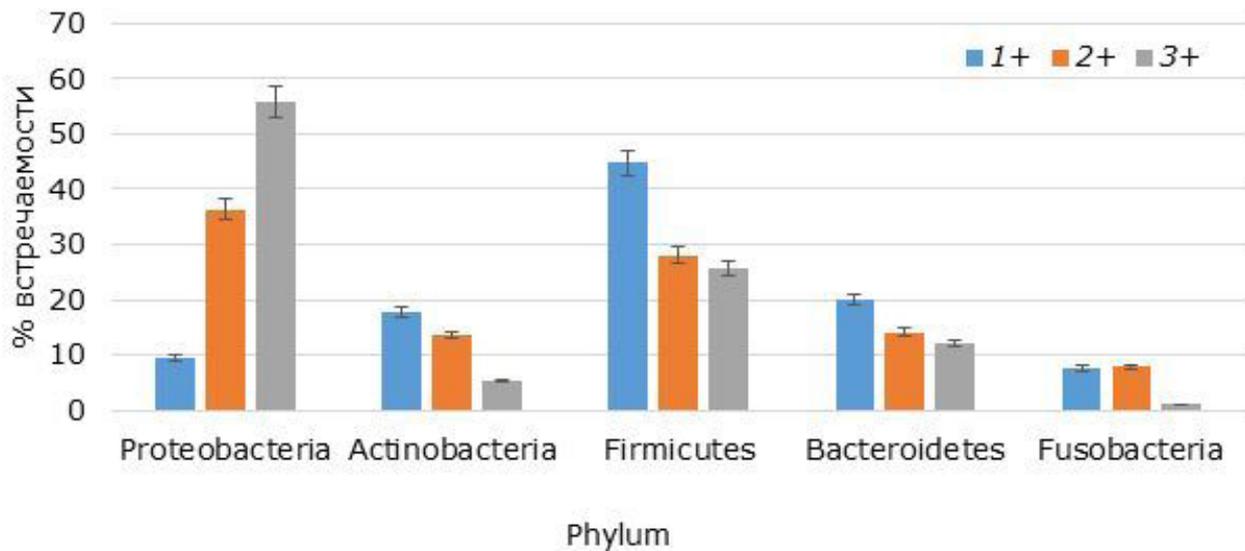


Рис. 1. Структура интестинальной микрофлоры форели исследуемых возрастных групп

Fig. 1. The structure of the intestinal microflora of trout of the studied age groups

Таблица 1. Представители ассоциативного симбиоза интестинальной микрофлоры радужной форели исследуемых возрастных групп

	Возраст исследуемых групп форели		
	1+	2+	3+
Состав ассоциативного симбиоза	<i>Eubacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
	<i>Bacteroides</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Proteus</i>
	<i>Micrococcus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Flexibacter</i>
	<i>Proteus</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Campylobacter</i>
	<i>Fusobacterium</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Cetobacterium</i>

няла линейный характер, что связано с постоянством скорости накопления биомассы и образованием важных для бактерий вторичных метаболитов в виде внеклеточных ферментов или антибиотикоподобных соединений. В варианте по сокультивированию поликультуры бактериофлоры кишечника форели в возрасте 3+, представленной доминантами *Bacillus* и *Proteus*, субдоминантами рода *Flexibacter* и минорными микросимбионтами *Campylobacter* и *Cetobacterium*, плотность клеток в ассоциации была минимальной 0.4–0.6 OD и в течение эксперимента не увеличивалась из-за приостановки процессов метаболизма ассоциантами (см. рис. 3).

Результаты оценки жизнеспособности ассоциантов, полученные по данным сокультивирования в ферментере в зависимости от структуры ассоциативного симбиоза и возраста форели, представлены в табл. 2. Максимальное количество жизнеспособных бактериальных клеток выявлено в эксперименте по изучению жизнеспособности ассоциантов кишечной бактериофлоры форели в возрасте 1+. Средние значения численно-

сти бактериоидов в ассоциации достигали $7.2 \pm 1.9 \times 10^8$ КОЕ/мл, эубактерий – $6.5 \pm 2.1 \times 10^6$ КОЕ/мл, а микрококков – $2.8 \pm 1.1 \times 10^4$ КОЕ/мл. Количество жизнеспособных клеток протей и фузобактерий оставалось на уровне $1.4\text{--}4.6 \pm 1.2 \times 10^2$ КОЕ/мл. Характерно, что по сравнению с возрастной группой форели 1+, количество жизнеспособных бактериоидов в кишечнике форели в возрасте 2+ существенно снизилось до $4.9 \pm 1.3 \times 10^3$ КОЕ/мл, количество фузобактерий практически не изменилось, а наибольшее число жизнеспособных клеток пришлось на представителей родов *Bacillus* ($5.4 \pm 1.3 \times 10^4$ КОЕ/мл) и *Propionibacterium* ($1.2 \pm 1.1 \times 10^4$ КОЕ/мл). В варианте с ассоциативным симбиозом бактериофлоры кишечника форели в возрасте 3+ после субкультивирования жизнеспособность сохранили только представители трех родов из пяти. Это бациллы, протей и кампилобактер. Средние значения численности бацилл в ассоциации не превышали $1.5 \pm 1.1 \times 10^2$ КОЕ/мл, протей – $2.1 \pm 1.3 \times 10^4$ КОЕ/мл, а кампилобактерий – $2.4 \pm 1.3 \times 10^2$ КОЕ/мл.

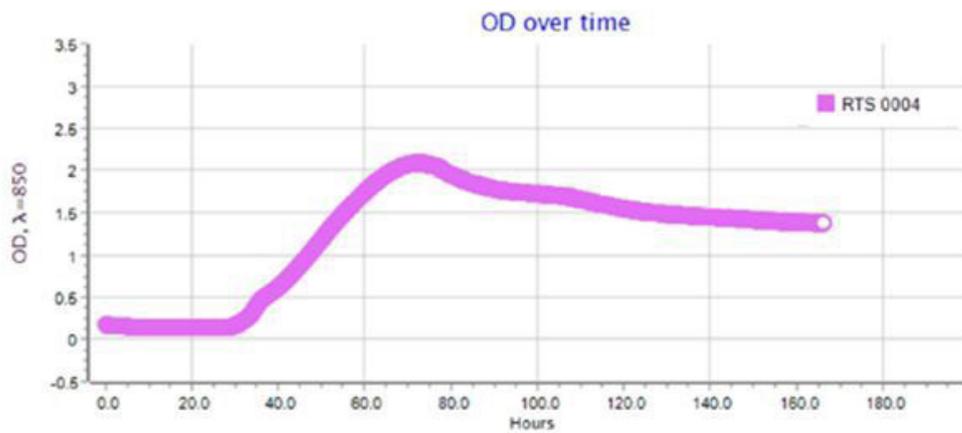


Рис. 2. Типовой график по сокультивированию бактерий в составе интестинальной бактериофлоры радужной форели в возрасте 1+

Fig. 2. A typical schedule for the co-culture of bacteria in the intestinal bacteriome of rainbow trout aged 1+

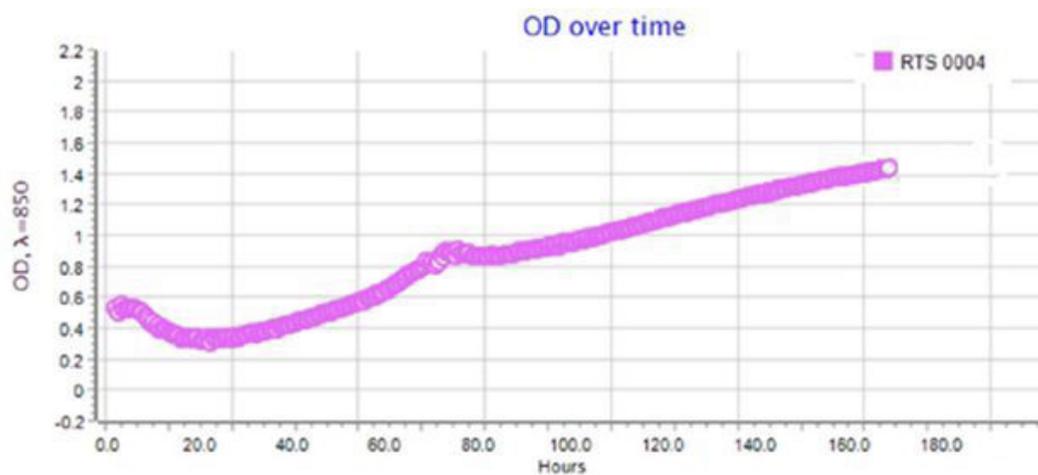


Рис. 3. Типовой график по сокультивированию бактерий в составе интестинальной бактериофлоры радужной форели в возрасте 2+

Fig. 3. A typical schedule for the co-culture of bacteria in the intestinal bacteriome of rainbow trout aged 2+

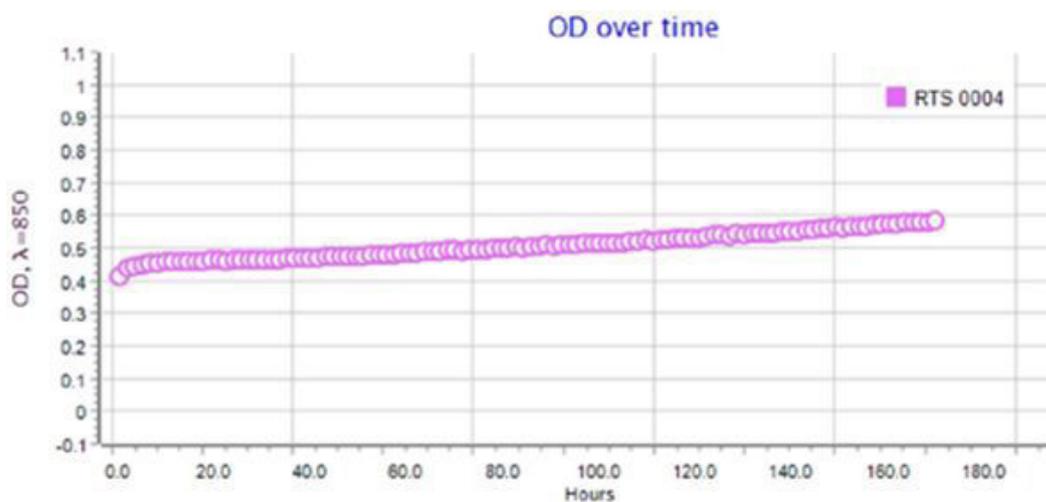


Рис. 4. Типовой график по сокультивированию бактерий в составе интестинальной бактериофлоры радужной форели в возрасте 3+

Fig. 4. A typical schedule for the co-culture of bacteria in the intestinal bacteriome of rainbow trout aged 3+

Таблица 2. Жизнеспособность бактерий в составе интестинальной бактериофлоры радужной форели

Структура ассоциативного симбиоза				
Количество жизнеспособных клеток (КОЕ/мл), возраст форели 1+				
<i>Eubacterium</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Proteus</i>	<i>Fusobacterium</i>
$6.5 \pm 2.1 \times 10^6$	$7.2 \pm 1.9 \times 10^8$	$2.8 \pm 1.1 \times 10^4$	$1.4 \pm 1.2 \times 10^2$	$4.6 \pm 1.2 \times 10^2$
Количество жизнеспособных клеток (КОЕ/мл), возраст форели 2+				
<i>Bacillus</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Citrobacter</i>
$5.4 \pm 1.3 \times 10^4$	$1.2 \pm 1.1 \times 10^4$	$4.9 \pm 1.3 \times 10^3$	$6.8 \pm 1.6 \times 10^2$	$2.1 \pm 1.1 \times 10^2$
Количество жизнеспособных клеток (КОЕ/мл), возраст форели 3+				
<i>Bacillus</i>	<i>Proteus</i>	<i>Flexibacter</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Cetobacterium</i>
$1.5 \pm 1.1 \times 10^2$	$2.1 \pm 1.3 \times 10^4$	0	$2.4 \pm 1.3 \times 10^2$	0

Обсуждение

В результате выполненного исследования структурной организации ассоциативного сообщества интестинальной бактериофлоры радужной форели обнаружено, что в его состав входит 310 видов бактерий, принадлежащих к 37 родам. В возрастной группе форели 1+ доминируют фирмикутные бактерии (44.7 %), а в возрастных группах 2+ и 3+ – протеобактерии (36.4 % и 55.8 % соответственно). В зависимости от возраста форели наблюдается замещение фирмакутов (возрастная группа 1+) на протеобактерии (возрастные группы 2+ и 3+). Установлено, что среди представителей идентифицированных родов только 11 из 37 принадлежат к константным таксономическим единицам и встречаются в более 50 % проб интестинальной микрофлоры. Это представители родов *Bacillus*, *Bacteroides*, *Campylobacter*, *Cetobacterium*, *Citrobacter*, *Eubacterium*, *Flexibacter*, *Fusobacterium*, *Micrococcus*, *Propionibacterium* и *Proteus*. В результате выявления значимости отдельных таксонов в пределах исследуемого ассоциативного симбиоза обнаружена сложная перестройка ассоциантов с последовательной сменой доминантных, субдоминантных и минорных таксонов. При заданных условиях сокультивирования в вариантах эксперимента с кишечной бактериофлорой однолетних и двухлетних особей форели представители константных таксонов оказались способными за счет комплекса биологических факторов к формированию стойких симбиотических связей, включающих взаимодействие

доминантных видов с постоянными микропартнерами, о чем свидетельствуют не только высокие значения оптической плотности культурального раствора ассоциантов (до 2.2 OD), но и длительный линейный характер роста (до 160 ч), постоянство скорости накопления биомассы, а также высокие значения количества жизнеспособных клеток в ассоциации ($7.2 \pm 1.9 \times 10^8$ КОЕ/мл). Согласно исследованиям симбиотической микрофлоры рыб (Izvekova et al., 2007), подобные свойства ассоциантов в пределах сообщества связаны с целым комплексом абиотических и биотических факторов, в т. ч. с типом питания и образом жизни макроорганизма.

Заключение

Таким образом, полученные данные являются основой для более подробного изучения структуры и причин возникновения ассоциативного симбиоза между представителями кишечной бактериофлоры форели, включая и зависимость от средовых факторов различного генеза. Благодаря данным о структурных особенностях ассоциативного симбиоза интестинальной микрофлоры радужной форели станет возможным не только объективно оценивать состояние организма рыбы на момент исследования, но и получать долгосрочный прогноз о патологических изменениях, вызванных соматическими и инфекционными агентами. Для этого следует комплексно и детально исследовать не только видовой состав аутофлоры рыб, но и выявлять закономерности образования сложных симбиотических связей.

Библиография

- Баканов А. И. Количественная оценка доминирования в экологических сообществах // Количественные методы экологии и гидробиологии. Тольятти: СамНЦ, 2005. С. 37–67.
- Бухарин О. В., Лобакова Е. С., Немцева Н. В., Черкасов С. В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. 264 с.
- Лобакова Е. С. Ассоциативная симбиология на примере растительных симбиозов // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. 2006. № 4. С. 9–16.
- Луста К. А., Фихте Б. А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. Пушино: ОНТИ НЦБИ, 1990. 186 с.
- Методические указания по лабораторной диагностике псевдомонозов рыб. М.: Министерство сельского хозяйства и продовольствия РФ, 1998. 16 с.
- Методы общей бактериологии / Под. ред. Ф. Герхарда. Т. 1. М.: Мир, 1983. 340 с.
- Немцева Н. В. Симбиотические взаимодействия гидробионтов и их использование для оценки экологического состояния водоемов в системе мониторинга // Вестник Оренбургского государственного университета. 2015. № 10 (185). С. 229–231.
- Проворов Н. А. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе // Журнал общей биологии. 2001. Т. 62. С. 472–495.
- Руководство по ветеринарно-санитарному контролю племенных рыбоводных хозяйств. М.: Изд-во ФГБНУ «Росинформагротех», 2018. 52 с.
- Чёрная Л. В. Особенности желудочного пищеварения у жвачных животных // Научное обозрение. Биологические науки. 2017. № 2. С. 153–156.
- Яценко-Степанова Т. Н., Немцева Н. В. Структурная организация фитопланктонного сообщества водоемов с позиций концепции ассоциативного симбиоза // Вестник ОГУ. 2009. № 12 (106). С. 71–76.
- Austin B. The Bacterial Microflora of Fish // Sci. World J. 2002. № 2. P. 558–572.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York: Springer Science & Business Media, 2001. 1388 p.
- Bordenstein S. R., Theis K. R. Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes // PLoS Biol. 2015. № 13 (8). P. 202–226.
- Izvekova G. I., Izvekov E. I., Plotnikov A. O. Symbiotic Microflora in Fishes of Different Ecological Groups // Biology Bulletin. 2007. Vol. 34, № 6. P. 610–618.
- Hansen G. H., Olafsen J. A. Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish // Microbiol. Ecol. 1999. Vol. 38. P. 1–26.
- Helfman G. S., Collette B. B., Facey D. E., Bowen B. W. The diversity of fishes. Second Edition. Malaysia: Vivar Printing, 2009. P. 217–284.
- Jankauskiene R. Defence Mechanisms in Fish: Lactobacillus Genus Bacteria of Intestinal Wall in Feeding and Hibernating Carps // Ekologija (Vilnius). 2000. № 1. P. 3–6.
- McGrady-Steed J., Harris P. M., Morin P. J. Biodiversity regulates ecosystem predictability // Nature. 1997. Vol. 390. P. 162–165.
- Minich J. J., Petrus S., Michael J. D., Michael T. P., Knight R., Allen E. E. Temporal, Environmental, and Biological Drivers of the Mucosal Microbiome in a Wild Marine Fish // Scomber japonicus. mSphere. 2020a. № 5 (3). P. 123–134.
- Minich J. J., Poore G. D., Jantawongsri K., Johnston C., Bowie K., Bowman J., et al. Microbial Ecology of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Hatcheries: Impacts of the Built Environment on Fish Mucosal Microbiota // Appl. Environ. Microbiol. 2020b. № 86 (12). P. 207–211.
- Riiser E. S., Haverkamp T. H. A., Varadharajan S., Borgan O., Jakobsen K. S., Jentoft S., et al. Metagenomic Shotgun Analyses Reveal Complex Patterns of Intra- and Interspecific Variation in the Intestinal Microbiomes of Codfishes // Appl. Environ. Microbiol. 2020. № 86 (6). P. 106–113.
- Ringo E., Birkbeck T. H. Intestinal microflora of fish and fry: A review // Aquac Res. 1999. № 30 (2). P. 73–93.
- Ringø E., Olsen R.E., Mayhew T. M., Myklebust R. Electron Microscopy of the Intestinal Microflora of Fish // Aquaculture. 2003. Vol. 227. P. 395–415.
- Sanger F., Nidclen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-remmanng inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sc. USA. 1977. № 84. P. 5463–5467.
- Sugita H., Shen K. Z., North R. A. 5-Hydroxytryptamine is a fast excitatory transmitter at 5-HT₁ receptors in rat amygdala // Fish. Sci. 1992. № 8. P. 199–203.
- Sugita H., Shibuya K., Hanada H., Deguchi Y. Anti-bacterial Abilities of Intestinal Microflora of River Fish // Fish. Sci. 1997. Vol. 63, № 3. P. 378–383.
- Woodhams D. C., Bletz M. C., Becker C. G., Bender H. A., Buitrago-Rosas D., Diebboll H., et al. Host-associated microbiomes are predicted by immune system complexity and climate // Genome Biol. 2020. № 21 (1). P. 23.

Благодарности

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 322-23 (Соглашение № 23-16-20026), проводимого совместно с Республикой Карелия с финансированием из Фонда венчурных инвестиций Республики Карелия (ФВИ РК).

FEATURES OF ASSOCIATIVE SYMBIOSIS ON THE EXAMPLE OF INTESTINAL BACTERIOFLORA OF RAINBOW TROUT (*PARASALMO MYKISS* WALBAUM)

SIDOROVA
Natalia Anatolyevna

PhD, Petrozavodsk State University (33, Lenin Ave., Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russia, 185910), fagafon@yandex.ru

KUCHKO
Alexander Alexeyevich

Petrozavodsk State University (33, Lenin Ave., Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russia, 185910), ufer1996@yandex.ru

Keywords:

associative symbiosis
dominants
subdominants
intestinal bacterioflora
minor microsymbionts
rainbow trout

Summary: The features of associative symbiosis were studied on the example of intestinal bacterioflora of three age groups of rainbow trout grown in conditions of cage culture in the waters of Lake Ladoga. Methods of microbiological analysis and Sanger genome-wide sequencing were used to describe the structure of associative symbiosis of trout intestine. To identify the significance of various bacterial taxa in associative symbiosis, a series of experiments on co-culture and evaluation of the viability of associates were performed. As a result of microbiological analysis and genotyping, 310 bacterial species belonging to 37 genera were described. Due to a comparative study of the composition of the intestinal microflora, it was found that firmicutes bacteria dominated in the age group 1+, and proteobacteria dominated in the age groups 2+ and 3+. Representatives of 11 genera were classified as constant taxa, for which a sequential change of dominant, subdominant and minor microsymbionts was described, depending on the age group of trout. For the age group 1+ the priority of taxon changes consisted of the sequence of Eubacterium >

Received on: 13 November 2023

Published on: 11 January 2024

References

- Austin B. The Bacterial Microflora of Fish, *Sci. World J.* 2002. No. 2. R. 558–572.
- Bakanov A. I. Quantitative assessment of dominance in ecological communities, *Kolichestvennye metody ekologii i gidrobiologii. Tol'yatti: SamNC, 2005.* P. 37–67.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York: Springer Science & Business Media, 2001. 1388 r.
- Bordenstein S. R., Theis K. R. Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes, *PLoS Biol.* 2015. No. 13 (8). R. 202–226.
- Buharin O. V. Lobakova E. S. Nemceva N. V. Cherkasov S. V. Associative symbiosis. Ekaterinburg: UrO RAN, 2007. 264 p.
- Features of gastric digestion in ruminants, *Nauchnoe obozrenie. Biologicheskie nauki.* 2017. No. 2. P. 153–156.
- Guidelines for veterinary and sanitary control of breeding fish farms: scientific and practical publishing house. M.: Izd-vo FGBNU «Rosinformagroteh», 2018. 52 p.
- Hansen G. H., Olafsen J. A. Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish, *Microbiol. Ecol.* 1999. Vol. 38. P. 1–26.
- Helfman G. S., Collette B. B., Facey D. E., Bowen B. W. The diversity of fishes. Second Edition. Malaysia: Vivar Printing, 2009. R. 217–284.
- Izvekova G. I., Izvekova E. I., Plotnikov A. O. Symbiotic Microflora in Fishes of Different Ecological Groups, *Biology Bulletin.* 2007. Vol. 34, No. 6. R. 610–618.
- Jankauskiene R. Defence Mechanisms in Fish: Lactobacillus Genus Bacteria of Intestinal Wall in Feeding and Hibernating Carps, *Ekologija (Vilnius).* 2000. No. 1. R. 3–6.
- Lobakova E. S. Associative symbiology on the example of plant symbioses, *Vestnik Moskovskogo universiteta. Ser. 16. Biologiya.* 2006. No. 4. P. 9–16.
- Lusta K. A. Fihte B. A. Methods for determining the viability of microorganisms. Puschino: ONTI NCBI, 1990. 186 p.
- McGrady-Steed J., Harris P. M., Morin P. J. Biodiversity regulates ecosystem predictability, *Nature.* 1997. Vol. 390. R. 162–165.

- Methodological guidelines for the laboratory diagnosis of pseudomonoses of fish. M.: Ministerstvo sel'skogo hozyaystva i prodovol'stviya RF, 1998. 16 p.
- Methods of general bacteriology, Pod. red. F. Gerharda. T. 1. M.: Mir, 1983. 340 p.
- Minich J. J., Petrus S., Michael J. D., Michael T. P., Knight R., Allen E. E. Temporal, Environmental, and Biological Drivers of the Mucosal Microbiome in a Wild Marine Fish, *Scomber japonicus*. mSphere. 2020a. No. 5 (3). R. 123–134.
- Minich J. J., Poore G. D., Jantawongsri K., Johnston C., Bowie K., Bowman J., et al. Microbial Ecology of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Hatcheries: Impacts of the Built Environment on Fish Mucosal Microbiota, *Appl. Environ. Microbiol.* 2020b. No. 86 (12). R. 207–211.
- Nemceva N. V. Symbiotic interactions of hydrobionts and their use to assess the ecological state of reservoirs in the monitoring system, *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2015. No. 10 (185). P. 229–231.
- Provorov N. A. The genetic and evolutionary foundations of the doctrine of symbiosis, *Zhurnal obschey biologii*. 2001. T. 62. P. 472–495.
- Riiser E. S., Haverkamp T. H. A., Varadharajan S., Borgan O., Jakobsen K. S., Jentoft S., et al. Metagenomic Shotgun Analyses Reveal Complex Patterns of Intra- and Interspecific Variation in the Intestinal Microbiomes of Codfishes, *Appl. Environ. Microbiol.* 2020. No. 86 (6). R. 106–113.
- Ringø E., Olsen R.E., Mayhew T. M., Myklebust R. Electron Microscopy of the Intestinal Microflora of Fish, *Aquaculture*. 2003. Vol. 227. P. 395–415.
- Ringo E., Birkbeck T. H. Intestinal microflora of fish and fry: A review, *Aquac Res.* 1999. No. 30 (2). R. 73–93.
- Sanger F., Nidclen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-remmanng inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*. 1977. No. 84. R. 5463–5467.
- Stepanova T. N. Nemceva N. V. Structural organization of the phytoplankton community of reservoirs from the standpoint of the concept of associative symbiosis, *Vestnik OGU*. 2009. No. 12 (106). P. 71–76.
- Sugita H., Shen K. Z., North R. A. 5-Hydroxytryptamine is a fast excitatory transmitter at 5-HT₁ receptors in rat amygdala, *Fish. Sci.* 1992. No. 8. R. 199–203.
- Sugita H., Shibuya K., Hanada H., Deguchi Y. Anti-bacterial Abilities of Intestinal Microflora of River Fish, *Fish. Sci.* 1997. Vol. 63, No. 3. R. 378–383.
- Woodhams D. C., Bletz M. C., Becker C. G., Bender H. A., Buitrago-Rosas D., Diebboll H., et al. Host-associated microbiomes are predicted by immune system complexity and climate, *Genome Biol.* 2020. No. 21 (1). R. 23.