

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«ПЕТРОЗАВОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ПетрГУ)
Институт биологии, экологии и агротехнологий
Кафедра зоологии и экологии

**Кучко
Александр Алексеевич**

Направление
05.04.06 - Экология и природопользование
Магистерская программа
«Общая экология»

**ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ СИМБИОТИЧЕСКИХ
ОТНОШЕНИЙ АУТОФЛОРЫ
PARASALMO MYKISS WALBAUM (ФОРЕЛЬ РАДУЖНАЯ)**

Выпускная квалификационная работа магистранта

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент
Ольга Владимировна Мамонтова
Научный консультант:
кандидат биологических наук,
доцент
Наталья Анатольевна Сидорова

Петрозаводск
2020

Содержание

| | |
|---|----|
| Содержание | 2 |
| Введение..... | 4 |
| Глава 1. Обзор литературы | 8 |
| 1.1. Классификация симбиотических взаимодействий..... | 9 |
| 1.2. Функции симбиоза | 10 |
| 1.3. Особенности освоения микроорганизмами экологической ниши..... | 11 |
| Глава 2. Характеристика объектов исследования..... | 15 |
| 2.1. Характеристика <i>Parasalmo mykiss Walbaum</i> (форель радужная)..... | 15 |
| 2.1.1. Особенности породы «Рофор» | 18 |
| 2.2. Характеристика водоема исследования..... | 19 |
| 2.3. Описание исследуемого корма для форели..... | 21 |
| 2.4. Описание доминантных типов аутофлоры <i>Parasalmo mykiss Walbaum</i> (форель радужная) | 22 |
| 2.4.1. Характеристика бактерий типа <i>Actinobacteria</i> | 22 |
| 2.4.2. Характеристика бактерий типа <i>Bacteroidetes</i> | 23 |
| 2.4.3. Характеристика бактерий типа <i>Firmicutes</i> | 23 |
| 2.4.4. Характеристика бактерий типа <i>Fusobacteria</i> | 24 |
| 2.4.5. Характеристика бактерий типа <i>Proteobacteria</i> | 24 |
| Глава 3. Материалы и методы исследования..... | 25 |
| 3.1. Методы выделения и изучения индигенной микрофлоры <i>Parasalmo mykiss Walbaum</i> (форель радужная)..... | 25 |
| 3.2. Микрофлора воды | 27 |
| 3.3. Микрофлора корма..... | 28 |
| 3.4. Методы определения биохимической активности микроорганизмов..... | 28 |
| 3.4.1. Методы изучения интенсивности аммонификации | 30 |
| 3.4.2. Методы изучения сахаролитических свойств микроорганизмов | 30 |
| 3.4.3. Методы изучения отношения микроорганизмов к O ₂ | 31 |
| 3.4.4. Методы изучения ферментов агрессии (лецитиназы) и ферментов токсинов (гемолизинов)..... | 32 |
| 3.5. Методы вариационной статистики | 33 |
| Глава 4. Результаты исследования | 36 |
| 4.1. Результаты исследования доминантной аутофлоры кишечника <i>Parasalmo mykiss Walbaum</i> | 37 |
| 4.1.1. Результаты исследования доминантной аутофлоры кишечника <i>Parasalmo mykiss Walbaum</i> (зона А) | 37 |
| 4.1.2. Результаты исследования доминантной аутофлоры кишечника <i>Parasalmo mykiss Walbaum</i> (зона В)..... | 37 |
| 4.1.3. Результаты исследования доминантной аутофлоры кишечника <i>Parasalmo mykiss Walbaum</i> (зона С)..... | 38 |

| | |
|---|----|
| 4.2. Результаты сравнительного анализа микрофлоры воды Янисъярви с доминантной аутофлорой кишечника <i>Parasalmo mykiss Walbaum</i> | 38 |
| 4.3. Результаты микробиологического исследования корма для форели | 39 |
| Заключение..... | 41 |
| Выводы..... | 42 |
| Список литературы: | 43 |
| Приложение..... | 49 |

Введение

Любое взаимоотношение между многоклеточным организмом и населяющими его микробными ассоциациями или микробиомом носит облигатный или факультативный симбиотический характер, который лежит в основе экологического успеха и является взаимовыгодным для обоих партнеров. В симбиотических отношениях участвуют самые разнообразные группы микроорганизмов, включая бактерии, археи, простейшие, а также вирусы, которые способны интегрировать свой геном в геном клетки-хозяина, приводя к развитию длительной интеграции в форме вирусной инфекции. Подобные микробные симбиозы по своему функциональному назначению могут выполнять исключительно метаболическую (McCutcheon, Moran, 2012) или защитную роль в организме хозяина (Oliver et al., 2014). При этом, микроорганизмы остаются свободноживущими или переходят в состояние полной клеточной и геномной интеграции, которая, как предполагают, возникла в период эндосимбиотического происхождения митохондрий и хлоропластов эукариотических клеток (Roger et al., 2017). Благодаря открытиям прошлых лет и достижениям современной биологии, в настоящее время, симбиоз рассматривается, как некая эволюционная стратегия, которая лежит в основе наиболее важных переходов в развитии живых организмов. С использованием методов молекулярной биологии, охватывающих омиксные технологии, исследования в биологии, связанные с изучением закономерностей развития симбиотических отношений переживают настоящую революцию. Именно благодаря развитию молекулярной биологии, геномики, биоинформатики и других отраслей современной биологии стал возможным подробный анализ генетического потенциала и метаболических возможностей симбиотических партнеров, который ранее считался невозможным из-за трудностей, связанных с особенностями выделения в чистую культуру, культивирования и накопления биомассы облигатных симбионтов, включая эндосимбионтов. Применение метагеномных и геномных подходов к изучению симбиоза позволяет обойти некоторые из этих проблем и реконструировать геномы симбионтов в их естественной среде обитания (Siegl et al., 2011). Методы современной биологии значительно расширили возможность исследовать существующее симбиотическое разнообразие в природе и изменили представление о взаимодействии между многоклеточными организмами и микробами в окружающей среде. База данных о симбиотических отношениях в мире микроорганизмов существенно дополнена протеомикой (Mao and Franke, 2015), развитием технологий трансфекции и трансформации, с помощью которых стало возможным осуществлять генетические манипуляции с широким спектром симбиотических организмов.

Особую роль в развитии симбиотических отношений между макро- и микроорганизмом играет интерстициальная микрофлора или микрофлора пищеварительного тракта. В формировании микрофлоры пищеварительного тракта рыб важную роль играют микроорганизмы окружающей среды. По сравнению с водой, желудочно-кишечный тракт является экосистемой, гораздо более богатой питательными веществами и, следовательно, более благоприятной для роста большинства бактерий. Бактерии, попадающие в организм рыбы, с кормом адаптируются, активно колонизируют ткани рыбы и вступают в сложные симбиотические отношения, благодаря которым организм хозяина получает преимущество в получении большого спектра метаболитов и в борьбе с условно-патогенными и патогенными возбудителями инфекционных заболеваний. При этом, пищеварительный тракт морских и пресноводных видов рыб является самым обильным по биоразнообразию бактерий, которые могут быть условно разделены на автохтонные (доминантная микрофлора) и аллохтонные(субдоминантная микрофлора) виды бактерий (Ringo и Birkbeck, 1999). Несмотря на видовое обилие интерстициальной микрофлоры рыб, пищеварительный тракт гидробионтов намного беднее качественного состава бактериофлоры гомойотермных животных (Sakata, 1990).

Микрофлора желудочно-кишечного тракта рыб играет важную роль в обеспечении устойчивости к инфекционным заболеваниям путем производства антибактериальных материалов, предотвращающих попадание патогенных бактерий в организм (Sugita et al., 1988). Желудочно-кишечные бактерии принимают участие в разложении питательных веществ и обеспечивают хозяина физиологически активными веществами, такими как ферменты, аминокислоты и витамины (Sugita et al. 1997). Целью данного обзора было изучение полезного действия бактерий кишечника на обеспечение активных питательных веществ.

В естественных условиях обитания кишечная микробиота делит свою среду обитания с аналогичными микроорганизмами, принадлежащими к автохтонной микрофлоре, многие из которых также имеют очень широкое распространение. Как аутохтонная, так и аллохтонная микрофлора могут резко изменить физический и иммунный статус организма хозяина, создавая широкие возможности для взаимодействия как между собой, так и между организмом хозяина. Например, патогенная микрофлора может повлиять на то, как хозяин взаимодействует с аутохтонной микрофлорой, составляющей эубиоза, либо управляя, либо защищая от дисбиоза и воспалительных процессов. И наоборот, аутофлора может изменить степень колонизации, размножения и вирулентность патогенного микроорганизма. Механизмы и последствия симбиотических отношений желудочно-кишечного тракта и других биотопов позвоночных животных только начинают

изучаться; развиваются транс-дисциплинарные области на границе экологии, ихтиологии, гидробиологии, микробиологии и других биологических дисциплин. Многие ученые по нашим данным, занимаются исследованиями сложных симбиотических отношений (Березина, 2009; Озерский, 2013; Умаров, 1986; Чёрная, 2017; Шивокене, 1989). Тем не менее, существует неоднородность проведения экспериментов в данной области, что связано с отсутствием единой методической базы, связанной с подходами к изучению симбиоза. Такое состояние исследований очень затрудняет получение объективной научной информации, связанной с взаимоотношениями на уровне «микроорганизм-макроорганизм».

В представленной работе раскрываются закономерности влияния нормофлоры позвоночных на состояние макроорганизма в зависимости от привнесенного бактериального фона со стороны окружающей среды (воды и корма). Полученные знания о биоразнообразии микрофлоры кишечника радужной форели и взаимодействии микрофлоры с представителями фонового бактериального сообщества, должны помочь в понимании сложных форм взаимоотношений биологических объектов друг с другом, что важно, как для практических, так и для фундаментальных исследований в данной области.

Исходя из вышесказанного, **целью работы является: анализ экологического потенциала симбиотических отношений аутофлоры форели радужной на примере интестинальной микрофлоры.**

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Изучить закономерности становления и развития симбиотических связей между *ParasalmomykissWalbaum* входящей в её состав микрофлорой;
- 2) Оценить биоразнообразие интестинальной микрофлоры *ParasalmomykissWalbaum*, обитающей в водоемах с разным сроком эксплуатации;
- 3) Проанализировать распространение доминантной, субдоминантной и остаточной микрофлоры в кишечнике *ParasalmomykissWalbaum*, выловленной в водоемах с разными сроками эксплуатации;
- 4) Изучить состав доминантной микрофлоры воды и корма как потенциальных источников колонизации желудочно-кишечного тракта *Parasalmo mykiss Walbaum*;
- 5) Описать состав доминантной микрофлоры желудочно-кишечного тракта *Parasalmo mykiss Walbaum* по степени доминирования обнаруженных типов, семейств и родов выделенных бактерий;

Выражаю глубокую благодарность Сидоровой Наталье Анатольевне и Мамонтовой Ольге Владимировне за поддержку и научную консультацию при написании диссертации.

Также хочется поблагодарить Кучко Тамару Юрьевну за предоставление материала для исследования.

Глава 1. Обзор литературы

В классическом понятии симбиоз – это совместное существование разноименных организмов (Сельскохозяйственная биология, 2014). Термин впервые появился в 1879 году в работах немецкого микробиолога и ботаника Генриха Антона Де Бари и использовался для описания взаимодействия водоросли и гриба в лишайнике. В современном представлении, симбиоз является ключевой стратегией адаптивной эволюции, которая обеспечивает становление высших форм жизни и сложноорганизованных биологических систем. Развитие эукариотической клетки, по мнению ученых, шло за счет симбиоза бактериальных клеток и продолжается до сих пор, создавая новые уровни организации. Основные компоненты клетки - органеллы и их функции были «разработаны» бактериями задолго до появления ядерных клеток. Так, например, пластиды произошли от живших анаэробных фотосинтезирующих бактерий, а способность к кислородному дыханию митохондрии приобрели еще тогда, когда они были свободноживущими бактериями (Маргелис, 1983; Проворов, 2001).

На данный момент, существует множество различных моделей взаимодействия микроорганизмов с животными и растительными клетками. Примером симбиоза бактерий с животным может послужить микробиоценоз рубца жвачных животных. Пищеварительная система парнокопытных имеет постоянную температуру в 37-39°C, pH 5,8-7,3, непрерывное поступление минеральных веществ, периодическое поступление питательных веществ и механическое перемешивание, что является идеальными условиями для развития микрофлоры в рубце. Основным источником углеводов для жвачных служат солома, сено и трава, которые, в основном, состоят из целлюлозы. Такие бактерии как: *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Clostridium locheadii* и *Lachnospira multiparus* расщепляют целлюлозу и гемицеллюлозу до простых соединений в виде жирных кислот и спиртов. Помимо этого, бактерии других видов в пищеварительном тракте разлагают до простых соединений крахмал, сахара, лактат и сукцинат (Чёрная, 2017).

Модели микробно-растительного взаимодействия отличаются своим разнообразием в функциональном значении. Например, бактерии рода *Rhizobium*, присутствующие в клубеньках корнях сои, переводят атмосферный азот в доступную для растений форму аммония, взамен получая комплекс питательных веществ и необходимые условия для жизнедеятельности (Умаров, 1986). Также, примером симбиоза между растениями и микроорганизмами, может послужить бактериализация семян пшеницы псевдомонадами. Бактерии рода *Pseudomonas* способны продуцировать широкий спектр вторичных

метаболитов и антибиотиков, тем самым повышая устойчивость растения к фитопатогенам за счет увеличения активности оксидаз(Минаева и др., 2015).

1.1. Классификация симбиотических взаимодействий

Основой для возникновения симбиотических отношений могут быть трофические, пространственные и другие типы взаимодействий. Один или оба партнеров биологической системы приобретают возможность выигрыша в борьбе за существование. Симбиозы бывают:

- факультативные, когда каждый из организмов может жить самостоятельно при отсутствии партнера;
- облигатные, когда один или оба организма оказываются в зависимости друг от друга и самостоятельное существование невозможно.

По расположению симбиозы разделяют на:

- эктосимбиоз – локализация вне хозяина;
- эндосимбиоз – локализация внутри хозяина.

По характеру взаимодействий между партнерами выделяют следующие типы симбиоза:

- мутуализм;
- комменсализм;
- паразитизм.

При мутуализме отношения между партнерами характеризуются взаимовыгодностью и ни один из них не может существовать без другого. При эндосимбиозе возникает самая тесная форма мутуализма. Примером могут послужить взаимоотношения между термитами и обитающими в их кишечнике многожгутиковыми простейшими.

Комменсализм (сотрапезничество) – это форма симбиоза при которой один из партнеров (комменсал) возлагает на другого (хозяин) регуляцию своих связей с внешней средой, но не вступает с ним в тесные отношения. Основой для комменсальных отношений обычно является общее пространство, субстрат или пища. При этом присутствие комменсала для хозяина остается обычно безразличным. Например, аэробный микроорганизм, расходуя кислород, создает условия для развития анаэроба. Также многие черты комменсализма свойственны процессу нитрификации. Бактерии из рода *Nitrosomonas*, обеспечивают энергетический субстрат для нитробактера, за счет окисления аммиака до нитритов.

Паразитизм – это форма антагонистических взаимодействий двух различных организмов, при которой один из них (паразит) использует другого (хозяина) в качестве среды обитания (среда 1-го порядка) или источника пищи, возлагая на него регуляцию своих связей с внешней средой (среда 2-го порядка). Существует различные уровни специализации паразитов (приуроченность к различным органам и тканям) и специфичность паразитов (приуроченность определенного вида паразита к определенным видам хозяина). Паразиты участвуют в регуляции численности популяций хозяев, а в некоторых случаях даже определяют направленность микроэволюционных процессов. Паразиты подразделяются на облигатные (обязательные) и факультативные (необязательные). Паразитические микроорганизмы обладают некоторыми факторами патогенности, которые по функциям подразделяются на следующие группы:

- токсические (экзо- и эндотоксины), которые проявляются в деструктивном действии на ткани хозяина в месте локализации паразита;
- инвазивные, то есть способствующие внедрению в ткани макроорганизма (ворсинки бактерий, способствующие проявлению адгезии бактерий к эпителиальным клеткам слизистых оболочек, и ферменты - гиалуронидаза, нейраминидазы, муциназы и др.);
- повышающие устойчивость к защитным факторам организма (капсульные полисахариды и полипептиды; липополисахариды и протеиды клеточной стенки и др.)(Озерский, 2013).

1.2. Функции симбиоза

На основе анализа механизмов взаимодействия организмов в симбиологии были выработаны три функции симбиоза — метаболическая, экологическая и регуляторная. Теперь они широко используются и для характеристики мутуалистических отношений.

Метаболическая функция основывается на представлении о том, что партнеры тесно связаны друг с другом за счет интенсивного переноса источников энергии и питания. При этом стоит отметить, что во многих случаях тесные трофические связи сводятся к передаче неспецифических метаболитов, а эндосимбионты могут самостоятельно синтезировать вещества, получаемые от хозяина. В других случаях один из партнеров адаптируется и приобретает новую функцию, которую он не может выполнять самостоятельно. Такие взаимоотношения очень характерны для симбиоза эукариот с прокариотами. Имеющие более высокоорганизованную систему эукариоты обеднены биохимическими функциями, которые восполняются за счет симбионтов. Кроме того, между организмами не просто

передаются полезные вещества, а формируются цельные скоординированные биохимические пути.

Экологическая функция находит свое отражение при проявлении мутуалистического симбиоза. Так, например, морские беспозвоночные семейства *Siboglinidae* благодаря вступлению в симбиоз с прокариотами-хемосинтетиками рода *Thiomicrospira*, смогли освоить новое жизненное пространство на больших глубинах Мирового океана (Березина, 2009). Важнейшие адаптации находятся под контролем генов, которые входят в геном микроорганизмов, а не организма хозяина (Douglas, 1994). Примером может послужить микробный ген *rscS*, который был найден первоначально у бактерий вида *Vibriofischeri* населяющих организм *Euprymna scolopes*. Впоследствии данный микроорганизм переселился к малькам *Monocentris japonica*, образовав на нижней челюсти своеобразные «фары» помогающие рыбе охотиться в темноте.

Регуляторная функция позволяет рассматривать симбиоз как результат взаимовыгодного контроля партнерами численности популяции, репродуктивной активности и интенсивности метаболизма. Наиболее важным является контроль активности эндосимбионта, потенциальная скорость размножения которого обычно выше, чем у хозяина. Эта функция оформилась из патофизиологии паразитизма, где основная роль отводится защитным системам хозяина, ограничивающим патогены, и факторам вирулентности, позволяющим паразиту проходить через эту защиту (Березина, 2009). Стоит отметить, что в последнее время все более активно изучается контроль размножения эндосимбионтов в мутуалистических системах. Данные механизмы разнообразны: регуляция активности генов симбионта, ограничение его питания, частичный лизис и выброс в среду (Douglas, 1994). К примеру, семейство бобовые контролирует численность клубеньковых бактерий и на уровне общего числа клубеньков, и на уровне числа бактерий в клубеньке. В первом случае контроль осуществляется на системном уровне (с участием веществ, выделенных в надземных органах), а во втором — на локальном (с участием тканей клубенька) (Березина, 2009).

1.3. Особенности освоения микроорганизмами экологической ниши

Данный процесс рассмотрен на примере симбиоза микроорганизмов с организмом радужной форели *Parasalmotykiss Walbaum*. Состав микрофлоры рыбы очень разнообразен и зависит от многих факторов: микробного населения воды, донного ила и от условий ее обитания. В основном, судя по данным литературных источников, интенсивное развитие бактериофлоры наблюдается на таких биотопах как: кожа, жабры, глаза, желудок, селезенка и печень (табл. 1).

Состав симбиотической микрофлоры *ParasalmomykissWalbaum*

| Биотоп | Таксономическая группа | Источник |
|-----------|--|----------------|
| Кожа | <i>Acinetobacter, Enterobacter, Escherichia, Flavobacterium, Flexibacter, Moraxella, Neisseria, Pseudomonas</i> | Ларцева, 2004 |
| Жабры | <i>Acinetobacter, Acinetobacter, Micrococcus, Mycota, Coryneforms, Enterobacter, Pseudomonas</i> | Сидорова, 2013 |
| Глаза | <i>Bacteroides, Neisseria, Pseudomonas</i> | Обухова, 2013 |
| Желудок | <i>Aeromonas, Alcaligenes, Enterobacter, Bacillus, Listeria, Propionibacterium, Staphylococcus, Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Proteus, Serratia, Aeromonas, Clostridium, Moraxella, Micrococcus, Pseudomonas</i> | Ускова, 2019 |
| Селезенка | <i>Alcaligenes, Bacteroides, Bacillus, Citrobacter, Enterobacter, Escherichia</i> | Паршуков, 2012 |
| Печень | <i>Aeromonas, Pseudomonas, Enterobacteriaceae</i> | Авдеева, 2019 |

Большинство симбионтов форели являются постоянными, обитают внутри организма хозяина без выхода в окружающую среду. При этом наблюдаются следующие стадии симбиоза:

1) Узнавание партнерами друг друга – это способность неродственных организмов узнавать партнеров по симбиозу. Означает переход микроорганизма и организма-хозяина от свободноживущего состояния в качественно иное – интегрированное. Идентификация происходит за счет сигнальных взаимодействий, опосредованных молекулярно-генетическими механизмами. Обнаружено, что бактериальные гены взаимодействия обладают особенностями в виде общих промоторных последовательностей (Symbiosis: Mechanisms and Model Systems, 2002). Сигнальными соединениями могут быть вторичные метаболиты позвоночных, способные активировать Sym-гены бактерий, которые не экспрессируются вне симбиоза;

2) Проникновение внутрь организма-хозяина (бактерий внутрь форели) – регуляция проникновения осуществляется за счет серии генов, белки которых отличаются наличием лейцин-богатых повторов;

3) Трансформация микросимбионта в симбиотическую форму;

4) Метаболическая интеграция партнеров (гетеротрофные бактерии участвуют в конструктивном и энергетическом метаболизме форели).

Желудочно-кишечный тракт рыбы представляет собой одну из сложных микробиологических сред. В момент рождения пищеварительный тракт мальков некоторое время свободен от бактерий. Большая часть микроорганизмов поступает в организм рыб с водой и пищей в самый начальный период экзогенного питания. В зависимости от потребности в кислороде микробиота кишечника *Parasalmo mykiss Walbaum* делится на аэробную, факультативно анаэробную и анаэробную (Шивокене, 1989).

Исходя из данных литературных источников, основными облигатными представителями бактериофлоры форели радужной являются микроорганизмы типа: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Micrococccaceae* и *Proteobacteria*. Данные виды ответственны за бактериальный антагонизм и колонизационную устойчивость, так как эти бактерии тесно связаны с кишечным эпителием и формируют первичный барьер, служащий защитой, препятствующей прямому прикреплению или взаимодействию патогенных бактерий с мукозой. Помимо иммунной функции, кишечная микрофлора *Parasalmo mykiss Walbaum* участвует в синтезе ферментов и витаминов, а также утилизирует пищевые субстраты и продуцирует незаменимые аминокислоты (Кузьмина, 2018).

Экологический потенциал – это доступная для организма совокупность ресурсов среды и условий, способная без ущерба для себя (т. е. для механизмов своего функционирования и самовосстановления) и других отдавать необходимые организму жизненные ресурсы или производить полезную для него деятельность, обеспечивающую комфортную жизнедеятельность среды в которой он обитает. По результатам обзора литературы можно сделать выводы о фундаментальном и практическом применении знаний об экологическом потенциале симбиотических отношений между аутофлорой и организмом *Parasalmo mykiss Walbaum*:

1) Знание об экологическом потенциале симбиотических отношений между аутофлорой и позвоночными животными (в т.ч. рыбами) имеет большое значение в развитии фундаментальных представлений о надорганизменных генетических системах, которые образуются в результате взаимодействия неродственных организмов про- и эукариот, а также обеспечивают формирование новых признаков, расширяющих экологические возможности симбионтов;

2) Знание особенностей формирования аутофлоры необходимо для проведения селекционных работ среди объектов аквакультуры для выведения линий с высокой степенью резистентности к стрессам, неблагоприятным факторам среды, способных поддерживать продуктивность на стабильном уровне. В результате взаимодействия специалистов разного профиля (микробиологов, генетиков, ихтиологов, рыбоводов)

становится возможность реализации программ селекции, направленных на минимизацию затрат организма рыбы на фиксацию и усвоение нутриентов в составе кормов различного состава и происхождения;

3) Знание о функционально активной аутофлоре *Parasalmo mykiss Walbaum*, способной обеспечивать защиту от патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, позволит в будущем разрабатывать и организовывать принципы регуляции рыборазведения с минимальным экологическим риском без применения ксенобиотиков в виде дезинфектантов и антибиотиков; создавать микробные препараты (про-, пре-,эу-, лантибиотики) на основе аутофлоры форели для коррекции дисбиоза и профилактики соматических и инфекционных заболеваний объектов аквакультуры.

Глава 2. Характеристика объектов исследования

Поскольку симбиотическая микрофлора *Parasalmo mykiss Walbaum* представляет из себя сложную поликомпонентную систему, состоящую из специализированных групп микроорганизмов, колонизирующих различные биотопы хозяина, целесообразно подробно описать источники поступления потенциальных симбионтов. Такими источниками являются: вода (микрофлора воды), корм (микрофлора корма), а также микроорганизмы, обитающие в тканях аборигенных (диких) видов рыб.

2.1. Характеристика *Parasalmo mykiss Walbaum* (форель радужная)

Объектом исследования послужила *Parasalmo mykiss Walbaum* (форель радужная) породы Рофор. Радужная форель – это первый объект семейства лососевых (*Salmonidae*), относящийся к роду тихоокеанских форелей (*Parasalmo*), который стал активно использоваться рыбоводами для разведения в искусственных условиях. Данному семейству присуще большое количество видов - 206, вызывающее много разногласий в систематической принадлежности лососёвых рыб. Лишь для популяций радужной форели из Северной Америки было предложено более 20 видовых названий, использовавшихся для таксономизации отдельных форм. Одной из современных классификаций представлена В.С. Артамоновой и А.А. Махровым (2005).

Тип позвоночные (*Vertebrata*)

Ряд – рыбы (*Pisus*)

Класс – костные рыбы (*Osteichthyes*)

Подкласс – лучеперые (*Actinopterygii*)

Отряд – лососеобразные (*Salmoniformes*)

Подотряд – лососевидные (*Salmonoidei*)

Семейство – лососёвые (*Salmonidae*)

Род – тихоокеанские благородные лососи (*Parasalmo*)

Вид – радужная форель (*Parasalmomykiss*)

Основными признаками рода *Parasalmo* являются: мелкие черные пятна на хвостовом плавнике; отсутствие на межчелюстной кости выемки, восходящий к верху тросток; имеющая боковые выступы рукоятка сошника; отсутствие сужения язычной кости в каудальном направлении; длинная орбитальная часть парасфеноида. Основное отличие тихоокеанской (дальневосточной) форели (*Parasalmo*) от обитающей симпатрично в бассейне Тихого океана тихоокеанского лосося (*Oncorhynchus*) в том, что благородный лосось полициклический и нерестится несколько раз в жизни (Дорофеева, 2003).

Parasalmo mykiss Walbaum является широко распространенным видом, имеющим амфипацифический характер природного ареала.

В районе Северной Америки её основными местообитаниями являются реки и озера Прибрежной части Тихоокеанского побережья США (Аляска, Вашингтон, Айдахо, Калифорния, Орегон), а также провинция британская Колумбия (Канада). На севере границей распространения в этой части ареала является бассейн р. Кускоквим (64° с.ш.), на юге – полуостров Калифорния. В одно время отдельные особи встречаются в Тихом океане вплоть до границ мексиканского побережья (46° с.ш.) (Neednam, Gard, 1959; MacCrimmon 1971).

В водах Азии вид встречается в основном у Камчатских берегов и в реках. Малым количеством заходит в лиман Амуре и реки материкового побережья Охотского моря. В районе острова Большой Шантар обитает реликтовая форма микижи (Макеева, 2011; Павлов, 2001).

В Европе впервые радужная форель появилась в 1879 году, когда на промышленную выставку во Франции была завезена икра. К концу 19 века с территории США икру стали развозить по различным странам мира (Промысловые рыбы СССР, 1949; MacCrimmon, 1971). По итогу микижа была завезена почти во все континенты и стала одним из более популярных видов полноциклического разведения. На данный момент радужная форель, как промысловый вид, обитает в 86 странах мира (Новоженин, 2001).

В Россию радужная форель была завезена в 1890 году из Германии, но во время Великой Отечественной войны рыборазведение сохранить не удалось, поэтому в 1948 икра была привезена из той же страны (Боровик, 1969).

Основной причиной широкого распространения *Parasalmo mykiss Walbaum* является её широкий диапазон экологической валентности. Среди лососевых, радужная форель – это наиболее эвритермный вид, имеющий наибольшее широтное распределение (Кузищин, 2010).

Как биологический вид, радужная форель имеет несколько форм жизненных стратегий: типично проходной, речной, эстуарной и некоторыми промежуточными вариантами (т. е. это проходная со стадией полуфунтовика и речная эстуарная). Вместе с тем соотношение и распространение этих форм по численности отличаются в разных частях ареала, а также могут меняться в разные годы находясь при этом в одном водоеме (Павлов, 1999).

Учеными доказано, что определяющими факторами соотношения форм с проходной и резидентной жизненными стратегиями, считаются условия нереста (расположение и площадь нерестилищ), продуктивность водоема, наличие в водотоке ям для зимовки, а

также наличие достаточной площади для нагула молоди и взрослых рыб (Павлов, 2008). В связи с этим, преобладающей жизненной стратегией в небольших пресных системах, является проходная, так как в них невозможна реализация полного жизненного цикла крупных особей, а вся кормовая база идет только на обеспечение питания молоди. Стратегия резидентной формы характерна для более сложных и крупных водоемов, имеющих достаточное количество кормовых ресурсов для обеспечения полового созревания рыб в пресной экосистеме (Титарев, 1980).

Половая зрелость у радужной форели наступает в возрасте 2-5 лет. Обычно нерест идет весной (апрель - май) при температуре воды от 4 до 11°C. Продолжительность эмбрионального развития зависит от температуры воды и колеблется от 18 до 86 дней. При температуре воды 7,5 - 8,9°C продолжительность эмбриогенеза составляет 45 - 50 суток, выклев личинок в нормальных условиях продолжается не более 5 - 6 суток. Выклюнувшиеся личинки малоактивны и большую часть времени проводят на дне бассейнов. Вес их при выклеве колеблется в пределах 38 - 60 мг (с желточным мешком), общая длина 12,2 - 16,1 мм. Желточный мешок составляет около 76 % от общего веса личинки. Однако у различных разновидностей радужной форели нерест может быть растянут, а при регулировании условий размножения экологическим методом потомство можно получать круглогодично. В северном регионе икру от радужной форели чаще всего получают в начале весны, что к вегетационному периоду позволяет иметь полноценный посадочный материал. Величина икринок и плодовитость радужной форели сильно варьируют в зависимости от возраста и размеров самок. Чаще всего диаметр икринок колеблется от 3,0 до 5,3 мм, плодовитость - от 1300 до 4200 икринок. На каждый килограмм живого веса обычно приходится 1300 - 2000 икринок (Рыжков, 2000).

Общеизвестно, что радужная форель – оксифильная и реофильная рыба. При содержании кислорода в воде менее 3,5 мг/л эмбрионы погибают (Остроумова, 1969). При нормальном ходе обменных процессов у молоди и взрослых особей концентрация кислорода не должна быть ниже 80% насыщения (в зависимости от температуры 7-12 мг/л). При значении кислорода в 1,2-1,3 мг/л рыбы погибают (Привольнев, 1976)

Терморезистентность радужной форели варьируется от 0 до 30°C, но её физиологический оптимум – 10-12°C. Наиболее быстрый рост наблюдается при температуре 15-20°C. Снижение роста происходит при температуре воды 22-23°C, а резкий спад при 24-26°C (Garside, 1958; Mantelman, 1958).

В местах обитания благородного лосося активная реакция среды (pH) может меняться в пределах 6,5 – 8,5. Считается, что *Parasalmo mykiss Walbaum* не может размножаться при pH менее 5,6, но некоторые её формы способны выдерживать данную

кислотность даже если она достигает 5,0. Данный факт еще раз доказывает резистентность вида по отношению к разным неблагоприятным факторам и возможность адаптации к специфическим условиям среды (Титарев, 1980).

Североамериканская форма радужной форели имеет довольно широкий диапазон. Пищевой рацион зависит от места обитания, размера и возраста особи, сезона, объема кормовой базы, температуры и т.д. Несмотря на то, что микижа - эврифаг, ихтиологи отмечают у неё сильно выраженную селективность питания. В рационе сеголеток основу составляют планктонные организмы, личинки веснянок, хирономид и поденок. Питание взрослых рыб состоит преимущественно из раков, амфибий, а также мелких рыб, в том числе и собственного вида. Редко в рацион форели входит растительная пища (Jahn, 1993)

2.1.1. Особенности породы «Рофор»

Работы по селекции породы радужной форели Рофор начали проводиться с 1948 года, когда из Германии была завезена икра благородного лосося. В 1952 году было собрано исходное маточное стадо форели. В период с 1964 по 1967 была привезена идентичная икра форели из Дании. Сравнительный анализ немецкой и датской групп рыб показало, что датская форель имеет некоторое преимущество по скорости роста, но выживаемость особей была выше в немецкой группе, за счет преимущественных адаптационных возможностей. В начале 70-х годов половой зрелости достигли рыбы из датской группы. В данный период были поставлены эксперименты по воспроизводительному скрещиванию немецкой и датской групп форели. Было образовано помесное стадо, с которым продолжили работу по селекции вида. Массовый отбор являлся основным методом при создании породы. В его основе был положен отбор особей по фенотипическим признакам: массе, длине тела, а также плодовитости.

Основной целью селекции породы Рофор было повышение продуктивных качеств путем отбора среди гибридных потомств. За счет массовых скрещиваний, отбора по весу тела и репродуктивным показателям поддерживали высокую гетерогенность; использовали самцов и самок разного возраста. До начала 80-х годов использовалась исключительно методика двухступенчатого отбора (на сеголетках и годовиках или годовиках и двухлетках), в настоящее время активно используется одноэтапный отбор среди молодежи средним весом 1-3 г и напряженностью 10-15%. Корректирующий отбор проводили среди старших групп. Для целей воспроизводства проводился отбор самок и самцов по размерным и репродуктивным показателям, а также по срокам нереста в сезоне. В условиях холодноводных хозяйств средний вес тела 4-годовалых самок составляет 1,8 кг.

В результате чего была выведена порода радужной форели Рофор, предназначенная для разведения в хозяйствах с разными условиями среды. Ее выращивание успешно осуществляется в разных уголках страны, при различных условиях и с применением разнообразных технологий: от выращивания в прудовых хозяйствах до разведения в тепловодных рыбхозах (Маслобойщикова, 2016).

По генетическим показателям форель Рофор отличается от других пород специфическим сочетанием и распределением частот аллелей белковых локусов. Для составляющих эту породу рыб характерны высокие показатели среднего уровня гетерозиготности и доли полиморфных локусов (Артамонова, 2016).

2.2. Характеристика водоема исследования

Материал для исследования (*Parasalmo mykiss Walbaum*) и образцы воды предоставлены форелевыми хозяйствами, расположенными на озере Янисъярви.

Озеро Янисъярви находится в Сортавальском районе Карелии и состоит из 2 изолированных частей – большой и малой. Большая часть или «Большое Янисъярви» вытянута с севера на юг, имеет овальную форму и соединяющиеся с западной стороны заливы – Киркколахти и Контиолеппялахти. С южной стороны озеро представлено меньшей частью - это «Малое Янисъярви» имеющее вид узкого длинного водоёма, изогнутого почти под прямым углом и вытянутого в направлении с северо-северо-запада на восток. «Большое Янисъярви» и «Малое Янисъярви» соединены между собой коротким проливом (глубиной не более 2 м) Луопауссалми, расположенным в самой северной части «Большого Янисъярви» (рис. 1).

Максимальная длина «Большого Янисъярви» составляет 18,2 км, ширина – 15 км, средняя глубина – 11,6 м, наибольшая – 57 м. Площадь водной поверхности 174,9 км², на озере насчитывается 43 острова. Береговая линия малоизвилистая, ее длина 98 км, с островами - 123 км. Водосборная площадь – 3640 км². Берега преимущественно каменистые, возвышенные, покрытые лесом. Встречаются скалистые «бараньи лбы». В озеро впадает не менее 20 речек и ручьев (Келококски, Леппяояа, Ульмасенйоки и др.), вытекающие из болот и озер. Из южного конца озера вытекает порожистая река Янисйоки, впадающая в Ладожское озеро.

Рельеф дна состоит из двух впадин, расположенных в северной и южной частях озера и вытянутых с севера-запада на юго-восток. Наиболее глубокая - это южная часть озера. Подводные склоны большей частью пологие, в северо-западной части встречаются многочисленные луды. В прибрежной полосе дно озера каменистое, каменисто-песчаное и

с включениями черной руды. Заиление грунтов начинается на глубине 8-9 метров, иловая зона занимает около 50% площади дна озера.

Площадь водной поверхности «Малого Янисъярви» 29,4 км², общая площадь – 30,3 км². Имеется 15 островов. Береговая линия извилистая, ее длина 56 км, а с островами – 64,5 км. Максимальная длина озера – 19 км, ширина – 2,5 км. Средняя глубина – 7,2 м, наибольшая – 22 м. Водосборная площадь – 2530 км². Берега озера возвышенные, каменистые, каменисто-песчаные, покрытые лесом. В северном конце озера впадает река Янисйокки, берущая начало на территории Финляндии. В восточную часть озера впадают реки Соанйокки и Вельяканйокки. Строение рельефа дна простое. По оси озера проходит впадина, разделенная на середине озера подводным порогом. Дно в прибрежной полосе глубиной до 2 – 4 метров сложено каменистыми, каменисто-песчаными и песчаными грунтами. Около 80% площади дна покрыта серым илом. Объем водной массы Большого и Малого Янисъярви составляет 2251 млн.м³. Воды озера темно-желтого цвета с красноватым оттенком, их прозрачность от 1,5 до 2,5 м, величина цветности – от 34 до 88°, летом хорошо прогреваются (температура поверхностного слоя достигает 23°C). Основная водная масса хорошо насыщена кислородом (80 – 95%), на глубоководных станциях в придонных горизонтах наблюдается снижение растворенного в воде кислорода до 61 гм/л. Концентрация двуокиси кислорода составляет в среднем 0,48 – 1,23 гм/л. Содержание легко окисляемого органического вещества в водоеме невысокое, особенно в его центральной части. В прибрежной зоне и в местах впадения притоков значение перманганатной окисляемости и биохимического потребления кислорода (БПК₅ и БПК₂₀ составляют: 12,4 мг. О₂/л, 1,41 мг. О₂/л и 1,82 мг. О₂/л, соответственно) (Озера Карелии, 1959).



Рис. 1. Оз. Большое Янисъярви
(https://vedlozero.ru/images/fotos/ozera/big_janisjarvi.jpg)

2.3. Описание исследуемого корма для форели

Исследуемую радужную форель на хозяйствах кормили кормом «BioMar» с размером гранулы 4, 6 и 8 мм.

Страна производитель корма – Дания. Биомар – это один из самых популярных плавающих, экструдированных и высокоэнергетический кормов, рекомендуемый для практически любых условий выращивания. В состав корма входит: соевый жмых, рапсовый жмых, рыбий жир, пшеница, кровяная мука, рыбная мука, протеин из гуара, подсолнечный жмых, соевый белковый концентрат, протеин из гороха, рапсовое масло и монокальций. Содержание активн действующих веществ следующее: сырой протеин – 46%, сырой жир –

15,6 %, зола – 6,3%, клетчатка – 4,7%, фосфор – 0,91%, кальций – 0,69%, натрий – 0,14% (Никулин, 2015).

2.4. Описание доминантных типов аутофлоры *Parasalmomykiss Walbaum* (форель радужная)

К доминантным типам аутофлоры относят те виды микроорганизмов, численность которых преобладает в данном микробном сообществе и обычно являются многохозяинными, повсеместно встречающимися жизненными формами. Как правило они обладают большим спектром адаптационных возможностей, специализируются на различных питательных субстратах и являются факультативными хемоорганотрофами приспособленными к обитанию в широком диапазоне температур (от +5 до +50°C). В природных экосистемах доминантные виды обладают антагонистической активностью по отношению к другим членам микробиоценоза благодаря синтезу широкого спектра биологически-активных веществ (колицинов, антибиотикоподобных соединений и факторов, угнетающих рост синтрофной микрофлоры).

Состав аутофлоры форели в основном состоит из санитарно-показательных микроорганизмов типа: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* и *Proteobacteria* (Сидорова, 2013).

2.4.1. Характеристика бактерий типа *Actinobacteria*

Актинобактерии — это тип грамположительных бактерий, содержащих большое количество гуанина и цитозина (более 55%). Включает одноименный класс, состоящий из 6 отрядов. Устаревшее название актинобактерий — актиномицеты (*Actinomycetes*) или лучистые грибки. Классифицируются актинобактерии по РНК или по анализу глутамин синтетазы.

Actinobacteria может обитать как в воде, так и на суше. Она играет важную роль в разложении органических веществ, таких, как целлюлоза и хитин, и таким образом принимает участие в круговороте органических веществ и в углеродном цикле. Это позволяет бактерии пополнять запас питательных веществ в почве, что важно для образования перегноя. Остальные виды актинобактерий обитают на растениях и животных, включая некоторых патогенных, таких, как микобактерии, стрептомицеты. Отдельные виды актинобактерий способствуют образованию специфического запаха, исходящего из почвы после дождя. Такое явление происходит, главным образом, на территориях с теплым климатом.

Некоторые виды актинобактерий образуют ветвящиеся нити, похожие на мицелий. Из-за чего они были первоначально классифицированы как актиномицеты. Большая часть видов — гетеротрофные аэробы, однако, например, *Actinomyces israelii*, может существовать в анаэробных условиях (Ventura, 2007).

2.4.2. Характеристика бактерий типа *Bacteroidetes*

Бактероиды представляют собой тип грамотрицательных неспорообразующих анаэробных или аэробных палочковидных бактерий, которые широко распространены в основном в желудочно-кишечном тракте рыб. Бактерии, входящие в тип, являются оппортунистическими патогенами, поэтому редко вызывают заболевания. *Bacteroidetes* в кишечнике выполняют функцию метаболических преобразований протеинов или сахаров необходимых хозяину.

Желудочно-кишечные бактериоиды в качестве конечных продуктов обмена веществ продуцируют янтарную, уксусную и пропионовую кислоты. Виды, принадлежащие к родам *Alistipes*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotell*, *Paraprevotella*, *Alloprevotella*, *Barnesiella* и *Tannerella* являются сахаролитическими, в то время как виды, принадлежащие к *Odoribacteri* и *Porphyromonas*, являются в основном асахаролитическими. Некоторые виды бактериоидов способны расщеплять такие сложные полисахариды как: крахмал, целлюлоза, ксиланы и пектины. Помимо этого, данные кишечные бактерии играют важную роль в белковом метаболизме за счет высокой протеолитической активности протеаз (Rajilic-Stojanovic, 2007).

2.4.3. Характеристика бактерий типа *Firmicutes*

Фирмикуты – это тип бактерий имеющих, в основном, грамположительную стенку. Однако некоторые из них, такие как *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonasi* и *Zymophilis* имеют пористую псевдонаружную мембрану, которая окрашивается в розовый цвет. *Firmicutes*, в отличие от *Actinobacteria*, имеют пониженное содержание гуанина и цитозина. Форма клеток круглая (кокки) или палочкообразная (бациллы).

Большинство фирмикутов производят эндоспоры, которые обладают устойчивостью к высыханию, что позволяет выживать им в экстремальных условиях. По типу жизнедеятельности делятся на анаэробы (кlostридии) и факультативные или облигатные аэробы (бациллы) (Gibbons, 1978).

2.4.4. Характеристика бактерий типа *Fusobacteria*

Фузобактерии — это тип грамотрицательных, анаэробных неспорообразующих бактерий. Полиморфны, часто имеют форму толстых длинных палочек с заостренными концами размером 0,5-1 на 2-3 мкм, не имеют способности передвигаться (отсутствуют жгутики) и не образуют спор и капсул.

Растут при температуре 37°C на средах где рН не превышает 7,6. Фузобактерии хорошо культивируются на мясных жидких средах, печеночном бульоне, сердечно-мозговом бульоне с глюкозой под вазелиновым маслом. Развитие происходит в строго анаэробных условиях. От колоний фузобактерий исходит гнилостный запах. Основной продукт брожения — масляная кислота. Не способны разжижать желатин и свернутую сыворотку, а также не восстанавливают нитраты в нитриты. В процессе роста выделяют индол и сероводород. Рост в присутствии желчи невозможен.

Главный фактор вирулентности фузобактерий — эндотоксин (ЛПС), у *Fusobacterium necrophorum* обнаружен экзотоксин. Присутствуют ферменты агрессии и инвазии — плазмокоагулаза, фибринолизин, нуклеаза, фосфолипаза А, лейкоцидин. Гибель фузобактерий наступает при 65 °С в течение 15 минут, а при 100°C — моментально (Атлас по медицинской микробиологии, 2003).

2.4.5. Характеристика бактерий типа *Proteobacteria*

Протеобактерии – это основной тип грамотрицательных бактерий. Он включает в себя широкий спектр патогенных родов таких как: *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter*, *Yersinia*, *Legionellales* и другие. Остальные являются свободноживущими непаразитарными видами, ответственными за фиксацию азота.

Proteobacteria является самой многочисленной группой микроорганизмов – 1534 вида (1/3 из общего числа всех известных видов) и является весьма неоднородной. В этот тип включены как симбионты эукариот, так и большое число патогенных и условно-патогенных видов микроорганизмов, а также фото- и хемотрофные виды бактерий, автотрофы и гетеротрофы.

Внешняя мембрана бактериоидов построена из липополисахаридов. Группа включает облигатные, факультативно аэробные и анаэробные бактерии. Подвижность также разная: одни микроорганизмы имеют жгутики, а другие передвигаются «скользящим» типом движения. По морфологическим признакам делятся на: кокки, палочковидные и спиралевидные бактерии (Stackebrandt, 1988).

Глава 3. Материалы и методы исследования

3.1. Методы выделения и изучения индигенной микрофлоры *Parasalmo mykiss*

Walbaum (форель радужная)

В качестве симбиотической микрофлоры форели рассматривали эндогенную микрофлору желудочно-кишечного тракта. Акцент на кишечной микрофлоре форели связан с тем, что она выполняет многочисленные взаимосвязанные функции в организме хозяина. К наиболее важным относят:

1. барьерную, связанную с антагонизмом в отношении посторонней микрофлоры из группы патогенных и условно-патогенных бактерий;
2. метаболическую, связанную с симбионтным пищеварением за счет биосинтеза ферментов, незаменимых аминокислот, биологически активных веществ; биосинтезом эффекторов, кофакторов и сигнальных молекул, контролирующих физиологические функции, метаболизм и поведенческие реакции рыб;
3. иммунобиологическую, направленную на повышение реактивности организма рыб в отношении абиотических и биотических факторов среды, сопряженных с развитием стрессового состояния, соматических отклонений и развитием инфекций и инвазий различной этиологии;
4. регуляторную функцию, связанную с контролем обмена веществ, рециркуляцией биомолекул, регуляцией газового состава различных полостей организма рыб, регуляцией работы сердечно-сосудистой, кроветворной и других жизненно важных систем организма.

Образцы кишечной микрофлоры отобраны у 45 экземпляров радужной форели в возрасте 2+, выращиваемой на 3 форелевых хозяйствах, отличающихся разным сроком эксплуатации. Пробы отбирались согласно определенной нормативно-технической документации, содержащей необходимые требования, нормативы качества и методы исследования: ГОСТ 10444.12-88, ГОСТ 10444.15-94, СанПиН 2.1.4.544-96, СанПиН № 4630-88, МУ №13-4-2/1742.

Аутофлоры рыбы исследовалась по следующим показателям:

1. ОМЧ (общее микробное число кое/мл);
2. Мезофильные аэробные и анаэробные микроорганизмы - показатель естественного самоочищения среды;
3. Споровые виды класса *Clostridia*, относящегося к полифелитической группе бактерий;
4. Подвижные группы – показатель инвазивности;

5. Гликолитические и протеолитические группы – показатель инвазивности, распада органических веществ;
6. Гемотоксичные группы – показатель инвазивности.

Для выделения микроорганизмов и их дальнейшего изучения у живой рыбы в стерильных условиях брали образцы из желудочно-кишечного тракта и помещали в пробирки со стерильным физиологическим раствором. Проверенные на чистоту штаммы бактериальных культур пересеивали на скошенный агар для получения «накопительных» культур. С помощью микроскопических исследований и питательных сред общего (рыбо-пептонный агар, рыбо-пептонный бульон) и специального (среда Эндо, Пешкова) назначения (Приложение 4) изучали морфологические и культуральные свойства бактерий (Методы общей бактериологии, 1983).

Биохимическое тестирование проводили с использованием дисковой тест-системы Горьковского НИИ эпидемиологии и микробиологии, а также путем посева культур на дифференциально-диагностические среды (среды Гисса с углеводами, кровяной агар, среда Кларка, Кесслера, висмут-сульфит агар, Плоскирева, Левина, Сабуро).

При микроскопических исследованиях основных морфологических признаков применяли окраску по Граму, Бурри-Гинсу и Пешкову (см. приложение 1, 2, 3).

Для дифференциации представителей рода *Pseudomonas* от бактерий сходных с ними видов родов (табл. 2, 3) определяли оксидазную активность культуры, способность расщеплять глюкозу и тип дыхания микроорганизмов в среде Хью-Лейфсона (тест окисления-ферментации) (Методические указания, 1986).

Таблица 2

Дифференциация бактерий рода *Pseudomonas* от сходных с ними родов
(Методические указания, 1986)

| Основные признаки | <i>Pseudomonas</i> | <i>Vibrio</i> | <i>Aeromonas</i> | <i>Plesiomonas</i> |
|--|--------------------|---------------|------------------|--------------------|
| оксидаза | + | + | + | + |
| расщепление глюкозы на среде Хью-Лейфсона: | О/- | О/Ф | О/Ф | -/Ф |
| анаэробное (ферментация) | - | к | к/- | к |
| аэробное (окисление) | к | к | к/- | - |
| лизин-декарбоксилаза | - | + | - | + |
| орнитин-декарбоксилаза | - | + | - | + |
| аргинин-дегидролаза | + | - | ± | + |

3.2. Микрофлора воды

Параллельно с микробиологическим исследованием рыбы проводили сравнительный анализ микрофлоры воды вблизи садков с аутофлорой кишечника *ParasalmomykissWalbaum*. Анализ проведен на основе данных о микрофлоре озера Янисъярви прошлых лет. Исследования воды проводятся в соответствии с требованиями государственного стандарта «Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа» (ГОСТ 18963–73, 1981; 2018). Вода отбирается с поверхностного слоя (10 см). За последнее десятилетие проведено несколько таких исследований. Оценка качества воды проводится по санитарно-микробиологическим показателям. Санитарно-бактериологические исследования воды осуществляется титрационным методом в двух параллельных рядах путем посева десятикратных разведений с последующим высевом на плотные селективно-дифференциальные среды. Расчет наиболее вероятного числа (НВЧ) делается по таблицам Хоскинса-Мура (Калинина, 1980). Качество среды обитания форели на рыбных хозяйствах определяется с помощью одного из микробиологических параметров – общего микробного числа. Общее микробное число (ОМЧ) – это количество колоний сапрофитных микроорганизмов, вырастающих при посеве 1 мл неразбавленной воды на обычных питательных средах (МПА) за 24 часа. Результаты оценивались по ГОСТ 155 372-87 (табл. 3).

Биологическое загрязнение водоема определяется путем обнаружения таких групп индикаторных микроорганизмов как: бактерии группы кишечной палочки (БГКП), фекальные кишечные палочки (ФКП), энтерококки, фекальные стрептококки (ФС) (Санитарная микробиология, 1969). В отдельно взятых пробах воды проводится количественное определение аэромонад по методике, разработанной в институте им. Ф. Ф. Эрисмана (Калинина, 1980).

Таблица 3

Общие требования к воде, поступающей в прудовые форелевые хозяйства

| Наименование показателей | Нормативные значения |
|--------------------------|--|
| Температура, С° | Температура поступающей воды не должна иметь перепад более чем 5° относительно воды в прудах. Максимальные значения не должны превышать 20° |
| Запахи, привкусы | Вода не должна иметь посторонних запахов, привкусов и придавать их мясу рыб |
| Цветность, нм (градусы) | До 540 (менее 30) |
| Прозрачность, м | Не менее 1,5 |

| | |
|--|---------------------------------------|
| Взвешенные вещества (г/м ³) | До 10,0 |
| Водородный показатель (рН) | 7,0-8,0 |
| Кислород растворенный, моль/м ³ , (г/м ³) | Не ниже 2,8 x 10 ⁻¹ (9,0) |
| Диоксид углерода растворенный, моль/м ³ , (г/м ³) | 2,3 x 10 ⁻¹ (10) |
| Сероводород растворенный, моль/м ³ , (г/м ³) | Отсутствие |
| Аммиак растворенный, моль/м ³ , (г/м ³) | 2,9 x 10 ⁻³ (0,05) |
| Окисляемость перманганатная, гО/м ³ | До 10,0 |
| Окисляемость бихроматная, гО/м ³ | До 30,0 |
| БПК, гО ₂ /м ³ | До 2,0 |
| Аммоний-ион, моль N/м ³ , (гN/м ³) | 2,8 x 10 ⁻² (0,5) |
| Нитрит-ион, мольN/м ³ , (гN/м ³) | До 4,3 x 10 ⁻⁴ (0,02) |
| Нитрат-ион, мольN/м ³ , (гN/м ³) | До 1,6 x 10 ⁻² (1,0) |
| Фосфат-ион, мольP/м ³ , (гP/м ³) | До 3,2 x 10 ⁻³ (0,3) |
| Железо общее, моль/м ³ , (г/м ³) | До 3,1 x 10 ⁻³ (0,1) |
| Железо закисное, моль/м ³ , (г/м ³) | Не более 1,4 x 10 ⁻³ (0,1) |
| Общая численность микроорганизмов, млн. кл/мл | До 1,0 |
| Численность сапрофитов, тыс. кл/мл | До 3,0 |

3.3. Микрофлора корма

Исследования корма проводились согласно ГОСТам: ГОСТ Р 51448-99, ГОСТ Р 51446-99 и правилам бактериологического исследования кормов от 10.06.75. Полученные результаты нормировались по показателям, указанным в таблице № 4.

Таблица 4

Показатели качества корма

| Показатель | Ед. измерения | Норма | НД на методы исследования |
|----------------------------------|---------------|----------------|---|
| Общее количество микроорганизмов | КОЕ/ 1 г | 500000 | Правила бактериологического исследования кормов от 10.06.75 |
| Бактерии группы кишечной палочки | КОЕ/ 1 г | Не допускаются | - |
| Бактерии анаэробов | КОЕ/ 1 г | Не допускаются | - |
| Бактерии рода «Протеус» | КОЕ/ 1 г | Не допускаются | - |

3.4. Методы определения биохимической активности микроорганизмов

При изучении биохимических признаков микроорганизмов исследовали:

1. Отношение к источникам азота (аммонификация);
2. Отношение к источникам углерода (сахаролитические свойства);
3. Продукты жизнедеятельности, накапливающиеся в среде (кислоты и газы);
4. Отношение к кислороду;

5. Наличие ферментов агрессии и ферментов токсинов (гемолизинов).

При анализе биохимической активности микроорганизмов учитывали, что процессаммонификации связан с превращением органических форм азота в аммиачный азот. При аммонификации микроорганизмы синтезируют протеолитические ферменты, под действием которых эти вещества гидролизуются до аминокислот. Поступление аминокислоты в клетку сопровождается дезаминированием с образованием аммиака, сероводорода, индола и других продуктов. Сахаролитические свойства микроорганизмов связаны с их способностью расщеплять углеводы и высокоатомные спирты. Под действием сахаролитических ферментов бактерий сахара расщепляются на альдегиды и кислоты. Конечными продуктами их расщепления являются газообразные вещества: CO_2 и H_2 . Стоит отметить, что различные виды и даже разновидности микробов относятся по-разному к одним и тем же сахарам. Так, например, одни бактерии, ферментируя лактозу, остаются нейтральными в отношении глюкозы, другие, наоборот, сбраживают глюкозу, а третьи, наиболее активные, вызывают расщепление и глюкозы, и лактозы.

В зависимости от типа дыхания микроорганизмы синтезируют оксидазы, пероксидазы и каталазу, которые относятся к ферментам – металлопротеинам. Каталитическая активность пероксидазы и каталазы зависит от наличия железосодержащей части в порфириновом кольце, а оксидаз – от наличия медьсодержащей части, связанной с характерным для них белком. Пероксидаза является ферментом, который в присутствии перекиси водорода катализирует окисление многих фенолов и ароматических аминов, быстро образуя комплекс с перекисью водорода, в процессе образования которого в присутствии H_2O_2 образуется перекись-I, перекись-II и перекись-III. Считается, что в ходе каталитического процесса железо пероксидазы остается в окисной форме.

Каталаза является ферментом, катализирующим разложение H_2O_2 на воду и молекулярный кислород. Каталаза, помимо расщепления H_2O_2 , может участвовать и в других сопряженных окислениях. В присутствии каталазы и H_2O_2 , которая получается при действии фермента ксантиноксидазы, происходит окисление спиртов в альдегиды. Каталаза распространена очень широко и отсутствует только у облигатных анаэробов и у некоторых микроаэрофильных бактерий. Активной группой каталазы является гематин. Окислительно – восстановительные ферменты (дегидрогеназы, цитохромоксидазы, пероксидаза, каталаза, альдолаза, трансминаза и др.) могут быть использованы как показатели функционального состояния бактериальных клеток.

Вирулентные микроорганизмы имеют ферменты агрессии и ферменты токсины. Некоторые бактерии выделяют гемолизины, вызывающие лизис эритроцитов. На кровяном агаре (КА) их колонии окружают зоны просветления. Образование гемолизинов (и

соответственно – размеры зон гемолиза) может быть переменным. Активность гемолизинов может проявляться в полном или неполном разрушении эритроцитов (Микробиология и вирусология, 2017).

3.4.1. Методы изучения интенсивности аммонификации

Для определения продуктов аммонификации ставят качественные реакции:

1. Проба на NH_3 : выделяющийся NH_3 окрашивает лакмус в синий цвет.
2. Проба на H_2S : H_2S обнаруживают с помощью индикатора в виде ацетата свинца $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$: индикатор чернеет под действием H_2S (рис. 2). Если он покрывается серебристым налетом, значит, вместе с сероводородом образуются и меркаптаны (например, метилмеркаптан CH_3SH).
3. Проба на индол: для выявления индола пользуются реакцией Сальковского: к 10 мл субстрата добавляют 1 мл 0,2% KNO_2 и несколько капель концентрированной H_2SO_4 . При взаимодействии этих веществ с индолом образуется красно-фиолетовое окрашивание. Подобную реакцию вызывает индолилуксусная кислота (Микробиология и вирусология, 2017).



Рис. 2. Протеолитическая активность выделенных аммонификаторов на среде, обогащенной пептоном: хорошо видно изменение цвета индикатора под влиянием выделенного в результате аммонификации H_2S

3.4.2. Методы изучения сахаролитических свойств микроорганизмов

Для обнаружения сахаролитических ферментов исследуемую культуру бактерий засевают в питательные среды Гисса или дифференциально-диагностические среды с субстратом в виде глюкозы, лактозы, маннита, мальтозы или сахарозы. Под действием ферментов микроба углеводы сбраживаются, образуя кислые продукты распада, которые изменяют цвет индикатора и, соответственно, цвет питательной среды. Среды Гисса бывают жидкими и полужидкими (с добавлением 0,2—0,5% агар-агара). В пробирки с жидкими средами Гисса для обнаружения газов, являющихся конечными продуктами

распада сахаров, опускают «поплавок» — трубку диаметром 0,5—0,7 см, запаянную с одного конца. «Поплавок» помещают запаянным концом кверху; при стерилизации он полностью заполняется питательной средой. При образовании в среде газообразных продуктов они вытесняют часть жидкости, находящейся в «поплавке», вследствие чего у запаянного конца его собирается воздушный пузырек.

В полужидких средах Гисса газообразование определяют по наличию мелких пузырьков газа в толще среды и стойкой пены на ее поверхности. Таким образом, при изучении сахаролитических ферментов, выделяемых микробами, учитывается не только явление расщепления тех или иных сахаров по кислотообразованию, но и глубина ферментативного процесса по наличию в питательной среде конечных газообразных продуктов. Пробирки с набором сред Гисса ставят в штатив в один ряд. На каждой пробирке надписывают название сахара, содержащегося в среде. На первой пробирке каждого ряда, кроме названия сахара, указывают номер или вид исследуемой микробной культуры. Культуру берут на кончик петли в очень небольшом количестве и засевают по общепринятой методике (Микробиология и вирусология, 2017).

3.4.3. Методы изучения отношения микроорганизмов к O₂

Об отношении микроорганизмов к O₂ судят по росту культуры при посеве уколом в пробирку с агаризованной питательной средой. Аэробы развиваются в верхней части посева; факультативные анаэробы – равномерно по все толще среды; анаэробы – в нижней части посева (рис. 3).

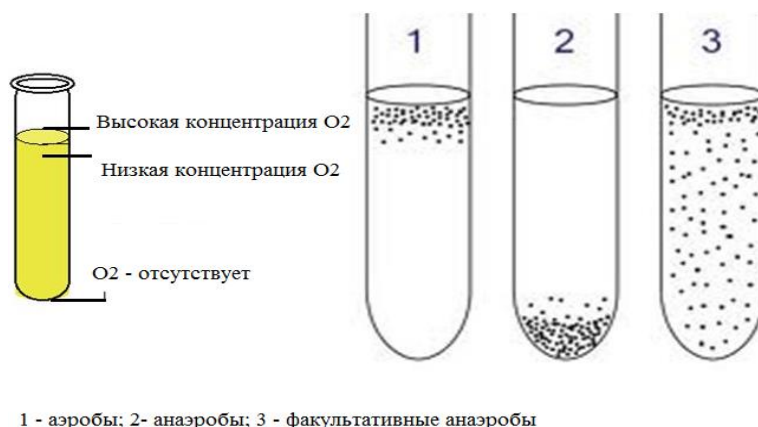


Рис. 3. Схема опыта по изучению типов дыхания микроорганизмов

(https://studfile.net/html/2706/365/html_l2m5p7wPO6.jhCd/img-ZtOrHj.jpg)

Для определения каталазы ставят качественную реакцию.

Проба на каталазу: на поверхность микробной культуры, выращенной на плотной питательной среде в чашке Петри, наносят 1–2 мл 1% раствора H_2O_2 так, чтобы он покрывал поверхность культуры тонким слоем. Появление пузырьков газа в слое нанесенной жидкости свидетельствует об образовании кислорода в результате расщепления перекиси водорода под действием каталазы. Подобный результат в протоколе опыта отмечается знаком + как положительный результат реакции на каталазу (Микробиология и вирусология, 2017).

3.4.4. Методы изучения ферментов агрессии (лецитиназы) и ферментов токсинов (гемолизин)

Тест на лецитиназу: лецитиназа расщепляет гидролизом лецитин. Готовят желточно-солевой агар (ЖСА): пептон — 20 г, гидрофосфат натрия — 2,5 г, натрий — 1 г, 0,5%-й раствор сульфата магния — 0,1 мл, глюкоза—1 г, агар—12,5 г, вода дистиллированная — 500 мл. Устанавливают pH 7,2-7,4, стерилизуют при 121°C 15 мин, охлаждают до 55°C, добавляют один стерильный желток на 500 мл среды, компоненты перемешивают и смесь разливают в чашки Петри. Исследуемую культуру засевают мелко на желточный агар, культивируют при 37-38°C 48 ч (Микробиология и вирусология, 2017). Положительный результат фиксируют по появлению зон помутнения вокруг колоний (рис. 4).

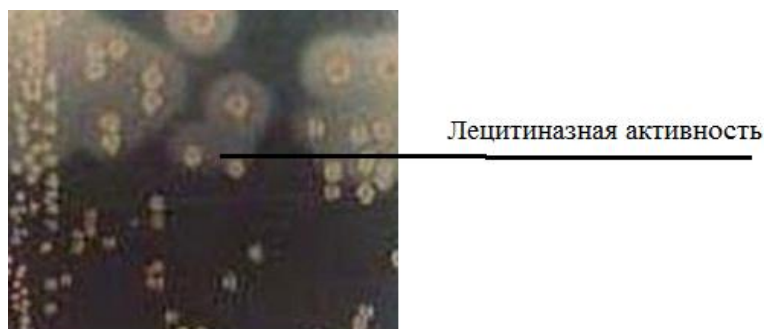


Рис. 4. Лецитиназная активность микроорганизмов на ЖСА

Тест на гемолизин: для обнаружения гемолизин исследуемую культуру бактерий засевают на КА. Под действием ферментов-токсинов микроба происходит гемолиз эритроцитов, который фиксируют по зонам просветления КА вокруг колоний (рис. 5) (Микробиология и вирусология, 2017).

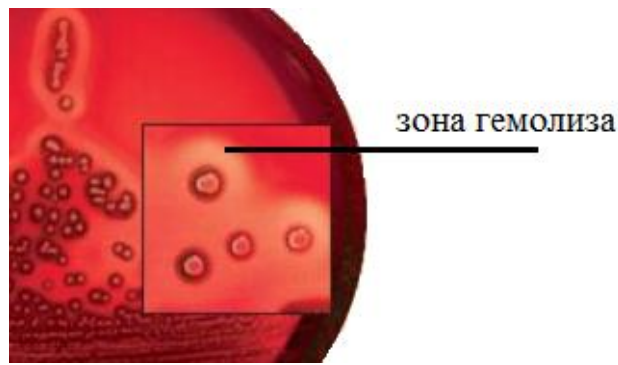


Рис. 5. Гемолитическая активность микроорганизмов на кровяном агаре (http://www.bakteriologieatlas.de/Bilder/Staphylococcus_epidermidis_01-1Tag-Columbia.jpg)

3.5. Методы вариационной статистики

Отдельные ферелевые хозяйства, разводящие более или менее идентичную форель, находящуюся в сравнительно одинаковых условиях, представляют собой совокупности, или множества. Характеристику данных множеств можно дать с помощью вариационных методов статистики.

Первый шаг на пути статистической обработки заключается в группировке собранных данных. Сделать группировку можно с помощью вариационного ряда. Группировку можно проводить в упорядоченный ряд, называемый вариационным рядом.

Первичной величиной, характеризующей определенные совокупности, являются средние величины. В статистике наиболее часто применяется средняя арифметическая. Она выражается теми же единицами измерения, что и характеризуемый ею признак и вычисляется по формуле:

$$x = \Sigma x_i / n$$

Если в общем количестве наблюдений отдельные варианты повторяются p раз, то средняя называется взвешенной средней и уже вычисляется с учетом повторяемости вариант по форме:

$$x = \Sigma x_i p_i / p_i, \text{ где } x - \text{значение вариант; } p - \text{их частота или «веса»}.$$

Для меры варьирования наиболее подходящим является показатель дисперсии:

$$\sigma^2 = \Sigma (x_i - x)^2 / n - 1$$

При извлечении квадратного корня из дисперсии, получается другой показатель – среднее квадратичное отклонение:

$$\sigma = \sqrt{\Sigma (x_i - x)^2 / n - 1}$$

Среднее квадратичное отклонение величина именованная, это не позволяет использовать её в качестве меры сравнения вариабельности признаков. Поэтому её выражают в процентах от средней арифметической. Полученный показатель

именуется коэффициентом вариации и обозначается символом CV :

$$CV = \sigma / x \cdot 100 \%$$

Для получения исчерпывающей информации о состоянии статистической совокупности, нужно учесть весь ее состав без исключения. Тем не менее не всегда можно или нужно прибегать к сплошному обследованию. В связи с чем делают выборку, исследуя её на интересующий нас признак. Совокупность, из которой отбираются варианты, называется генеральной, ее объем обозначают N , а объем выборки - n . Характеристики генеральной совокупности – средняя величина (M), дисперсия (σ^2) и среднее квадратичное отклонение (σ) – являются величинами постоянными. По отношению к ним соответствующие выборочные характеристики, считаются величинами случайными. Выборочные средние варьируют в \sqrt{n} раз меньше, чем отдельные варианты одной и той же генеральной совокупности. Таким образом, среднее квадратичное отклонение, характеризующее варьирование выборочных средних вокруг их генеральных параметра, равняется:

$$\sigma_x = \sigma / \sqrt{n} = \sqrt{\sigma^2 / n}$$

Данный показатель называется выборочной ошибкой средних и обозначается буквой m , которая сопровождается символом того показателя, к которому относится ошибка. При выборках малого объема ($n < 30$) выборочная ошибка вычитается с учетом степеней свободы:

$$m_x = \sigma / \sqrt{n - 1} = \sqrt{\sum (x_i - x)^2 / n (n - 1)}$$

Для получения определенного представления о точности, с какой определен тот или иной средний результат, используется показатель точности (Cs), определяющий по формуле:

$$Cs = m_x / x \cdot 100 \% = CV / \sqrt{n}$$

Чтобы получить точное выражение зависимости между переменными величинами X и Y в математике применяется понятие функции. Оно применяется в тех случаях, когда определенному значению, которое может принять переменная величина Y , называемая аргументом, соответствует только одно значение переменной X , называемой функцией. В общем виде это записывается так: $Y = f(X)$. Однозначная зависимость данного вида между переменными величинами называется функциональной. Обычно, для биологических объектов зависимости не однозначные, т.е. числовому значению одного признака сходно не одно и то же определенное значение, а целая гамма варьирующих значений другого, связанного с ним признака. Данного вида зависимости между переменными случайными величинами X и Y , при которой каждому значению одной из них соответствует не какое-то конкретное значение, а определенная групповая величина,

называется корреляцией. Для измерения степени связи между признаками X и Y , необходимо сопоставить соответствующим образом их значения друг с другом. Это происходит с помощью коэффициента корреляции по формуле:

$$r = \Sigma (x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y}) / n\sigma_x\sigma_y$$

Коэффициент корреляции может принимать значения от -1 до $+1$. Когда $r = 0$, это означает отсутствие корреляции, а $r = 1$ свидетельствует о наличии функциональной связи между признаками. При $r < 0,3$ – слабая связь, при $0,3 \leq r \leq 0,5$ – связь признается умеренной, при $0,5 \leq r \leq 0,7$ – корреляция считается значительной, при $0,7 \leq r \leq 0,9$ – сильная, при $r > 0,9$ очень сильная, приближенная к функциональной (Ашмарин, Воробьев, 1962).

Глава 4. Результаты исследования

Экологический потенциал симбиотических отношений аутофлоры *Parasalmo mykiss Walbaum* связан с дифференциацией видов относительно заселяемых биотопов организма хозяина. Наиболее разнообразные формы взаимоотношений встречаются на уровне микрофлоры желудочно-кишечного тракта, который отличается большим уровнем качественного и количественного соотношения видов, принадлежащих к аутохтонной (доминантной), субдоминантной и остаточной микрофлоре.

Дифференциацию видов аутофлоры кишечника *Parasalmo mykiss Walbaum* выполняли по следующему алгоритму:

1) Оценка морфометрических показателей - доказывает факт присутствия микроорганизмов в образце и позволяет оценить доминирование тех или иных морфологических групп;

2) Оценка тинкториальных показателей – определяется по способности микроорганизмов усваивать тот или иной краситель и используется для диагностических целей. В препарате по Граму оценивается тип клеточной стенки, в препарате по Бурри-Гинсу – наличие капсулы, в препарате по Нейссеру – наличие метакроматических гранул, в препарате по Пешкову – наличие спор, их расположение и полиморфизм при активном спорогенезе;

3) Оценка физиологических показателей – происходит за счет подбора специальных селективных сред, позволяющих выделить определённые физиологические группы прокариот, отличающиеся по типу дыхания, питания и особенностям движения;

4) Оценка биохимических показателей – определяется с помощью подбора специальных дифференциально-диагностических сред, позволяющих выделить биохимические свойства, опосредованные ферментативной активностью определенного рода, вида или варианта микроорганизма.

По вышеуказанным показателям в составе микрофлоры желудочно-кишечного тракта 45 особей радужной форели обнаружено и идентифицировано 120 таксонов, принадлежащих к разным систематическим группам. Полученные результаты представлены в приложениях № 5-7. Дополнительно проведен сравнительный анализ микрофлоры воды озера Янисъярви с аутофлорой желудочно-кишечного тракта *Parasalmo mykiss Walbaum* и микрофлоры корма, используемого для выращивания форели в садковых хозяйствах, расположенных на исследуемых акваториях.

4.1. Результаты исследования доминантной аутофлоры кишечника *Parasalmo mykiss Walbaum*

4.1.1. Результаты исследования доминантной аутофлоры кишечника *Parasalmo mykiss Walbaum* (зона А)

Микробиоценоз кишечника *Parasalmo mykiss Walbaum* предоставленной форелевым хозяйством с зоны А (эксплуатация водоема менее 1 года) состоит из 38 родов, относящимся к 26 семействам и 6 типам (см. приложение 5).

Доминирующая доля присутствия приходится на виды *Bacteroidetes spp.* (13,1 %), *Eubacterium spp.* (11,56 %) и *Staphylococcus spp.* (9,24 %). Бактероиды являются представителями доминантной микрофлоры кишечника рыб. Они участвуют в процессах сбраживания углеводов, биотрансформации желчных кислот и утилизации белков. Но, стоит отметить, что при объединении в единый патоконкомплекс с бактериями рода *Prevotella* (3,42 %) и *Porphyromonas* (2,08 %), *Bacteroidetes* способны вызывать анаэробные инфекции. Бактерии рода *Eubacterium* также являются представителями доминантной микрофлоры желудочно-кишечного тракта и обладают жесткой клеточной стенкой. Им свойственна способность массового заселения биоценоза (до 80%), а также они обладают иммунной функцией, препятствующей колонизации слизистой оболочки кишечника патогенными микроорганизмами, попавшими извне. Также зубактерии являются индикаторным родом, способным реагировать на негативные факторы интенсивным размножением, ведущим к дисбиозу кишечника. Бактерии рода *Staphylococcus* – это типичные представители автохтонной микрофлоры организма рыбы. Данный вид считается условно-патогенным и становится опасным только при определенных условиях.

4.1.2. Результаты исследования доминантной аутофлоры кишечника *Parasalmo mykiss Walbaum* (зона В)

В результате изучения доминантной аутофлоры кишечника радужной форели предоставленной форелевым хозяйством с зоны В (эксплуатация водоема 5 лет), дифференцировано 44 рода, принадлежащих к 30 семействам и 5 типам (см. приложение 6).

На данном участке озера доминирование родов из зоны А выражено в 2-3 раза меньше, по сравнению с зоной В. Доля *Bacteroidetes* составила 6,08 %, а *Eubacterium* – 6,22 %. Наиболее распространенными таксонами в зоне В являются бактерии рода *Bacillus* (9,54 %), *Flavimonas* (9,3 %) и *Propionibacterium* (8,57 %). Бациллы обладают высокой резистентностью к неблагоприятным факторам среды: способны выдерживать высокие температуры, высушивание и ионизирующее излучение. В организме рыбы являются

прямыми антагонистами в отношении таких микроорганизмов как: сальмонеллы, протеи, псевдомонады, аэромонады, стрептококки и кишечная палочка. Помимо этого, *Bacillus* способен синтезировать витамины, аминокислоты и иммуноактивные факторы. Флавимонады напротив, являются очень агрессивным родом, способным вызывать острые заболевания кишечника рыб. Бактерии рода *Propionibacterium* не патогенны и входят в состав резидентной микрофлоры кишечника рыб. Пропионы обладают уникальной функцией выработки пропионовой кислоты, что позволяет относить данный род к группе пробиотических бактерий. Также они способны выдерживать низкую кислотность и ингибируют активность -глюкуронидазы, азаредуктазы и нитроредуктазы.

4.1.3. Результаты исследования доминантной аутофлоры кишечника *Parasalmo mykiss Walbaum* (зона С)

С помощью идентификации видов доминантной аутофлоры кишечника радужной форели, выловленной из акватории зоны С (эксплуатация водоема более 5 лет), стало возможным выделение 38 родов бактерий, относящихся к 26 семействам и 5 типам (см. приложение 7).

В результате исследования доминантной аутофлоры кишечника форели радужной из данной зоны вновь выявлено расселение бактерий рода *Bacillus* (8,42 %). Остальные таксоны идентифицированы в более равной доле доминирования. Увеличение численности бактерий рода *Proteus* (6,33 %), свидетельствует о тенденции к развитию инфекционного заболевания на уровне кишечника рыб. Также отмечено размножение рода *Pseudomonas* (5,35 %). Данный род известен тем, что обладает высокой резистентностью к антибиотикам, в связи с чем, по распространению псевдомонад, можно спрогнозировать изменение соматического и инфекционного статуса организма радужной форели. Стоит отметить, что доля доминантов из зоны А (*Bacteroidetes spp.*, *Eubacterium spp.*, *Staphylococcus spp.*) стала меньше в 2,5-4 раза по сравнению с аутофлорой зоны С, что является показателем снижения численности аборигенных видов и расселению аллохтонных бактерий в кишечнике рыб.

4.2. Результаты сравнительного анализа микрофлоры воды Янисьярви с доминантной аутофлорой кишечника *Parasalmo mykiss Walbaum*

Бактериальный состав микрофлоры Янисьярви составлен на основе данных полученных из литературных источников (Обухова, 2013; Паршуков, 2012; Сидорова, 2013).

Анализ проведен на основе сравнения филумов микрофлоры озера Янисьярви и доминантной аутофлоры кишечника *Parasalmo mykiss Walbaum*(рис. 6, 7).



Рис. 6. Биоразнообразие микрофлоры озера Янисъярви

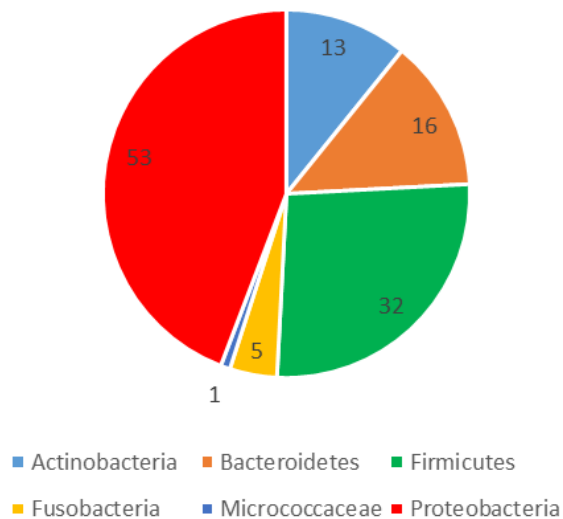


Рис. 7. Биоразнообразие доминантной аутофлоры кишечника *Parasalmo mykiss* Walbaum

По результатам сравнительного анализа установлено, что вода не является основным источником микроорганизмов, способным заселить кишечник рыб. Доминирование на обеих диаграммах присуще филуму *Proteobacteria*. Также стоит отметить, что тип *Bacteroidetes* не замечен в микрофлоре озера Янисъярви, но является третьим по степени распространения филумом в кишечнике, что свидетельствует о ином пути попадания в организм рыбы.

4.3. Результаты микробиологического исследования корма для форели

Для исследования отобран корм «BioMar» (Дания) размером 4-8 мм. По результатам лабораторного анализа получена микологическая и бактериологическая характеристика

корма (табл. 5).

Метод «глубинного посева» навесной кормовой суспензии в МПА оказался более чувствительным, чем метод аппликации гранул на МПА. Согласно полученным данным, микробиологическая характеристика корма зависит от размера гранулы. Минимальная величина ОМЧ (247 КОЕ/мл) характерна для гранул 4 мм, а максимальная (2080 КОЕ/мл) – для гранул 8 мм. Стоит отметить, что обширная обсемененность микологической флорой и энтеробактериями свойственна гранулам с размером 4 мм. Корм 8 мм оказался поражен грибами рода кладоспориум, энтеробактериями и анаэробными споровыми бактериями.

С учетом того, что в составе доминантной аутофлоры кишечника форели радужной обнаружены представители семейств *Bacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae* и представители типа *Proteobacteria* можно заключить, что они колонизируют желудочно-кишечный тракт рыбы исключительно благодаря пищевому рациону.

Таблица 5

Микробиологическая характеристика корма «BioMar»

| Тип корма | ОМЧ, КОЕ/мл | КОЕ с 1 гранулы | Грибы, КОЕ/мл | Энтеробактерии, КОЕ/мл | Анаэробы, КОЕ |
|----------------------------|-----------------------|------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------|
| Вариант посева и тип среды | МПА «глубинный посев» | МПА «аппликация» | Среда Сабуро «аппликация» | Среда Эндо «глубинный посев» | Среда Китт-Тароцци |
| 4 мм | 247 | 1 | Asc, Bas, Clad | + | - |
| 6 мм | 1200 | 1 | - | + | - |
| 8 мм | 2080 | 1 | Clad | + | - |

Примечание: аскоспоры (Ask) и базидиоспоры (Bas) *Cladosporium* (Clad) Альтернария (Alt). Из энтеробактерий выделены: *Proteus*, *Aeromonas* - условно-патогенные (genus).

Заключение

Общепризнано, что микрофлора желудочно-кишечного тракта рыб играет важную роль в питании и иммунитете (Кузьмина, 2018; Ларцева, 2004; Ускова, 2019). Знание структуры и симбиотических взаимоотношений между нормальной микрофлорой рыб и организмом хозяина может дать представление как о норме, так и о патологии вызванной соматическими и инфекционными заболеваниями. Для этого необходимо всестороннее и детально изучать не только таксономический состав микрофлоры рыб, но и выявлять закономерности формирования сложных симбиотических отношений.

Для этого наряду с анализом микробного сообщества рыбы целесообразно изучать доминантных представителей микрофлоры воды и корма. Полученная информация объективно свидетельствует о действии экосистемы на функциональное микробное биоразнообразие интестинальной микрофлоры и конкретно на разнообразие аутохтонных бактерий – истинных симбиотических партнеров организма рыб. Информация о присутствии аутохтонных бактерий может найти применение в системе эпизоотического мониторинга на водоемах рыбохозяйственного значения и для разработки оценочных шкал экотоксичности среды обитания.

Выводы

- 1) Экспериментально доказано, что основные таксоны в составе симбиотической микрофлоры поступают в организм рыбы с водой и кормом;
- 2) На примере доминантной, субдоминантной и остаточной микрофлоры кишечника доказано, что биоразнообразие выделенных таксонов зависит от условия обитания радужной форели;
- 3) Оценено биоразнообразие интестинальной микрофлоры радужной форели. Всего идентифицировано 120 родов, 82 семейства и 16 типов;
- 4) При анализе симбиотической микрофлоры на уровне семейства и рода обнаружены сходные таксоны у всех исследованных особей форели. К ним относятся: бактериоиды, эубактерии, бациллы и клостридии. На их долю у отдельно взятых особей приходилось от 7 до 23 % от общего числа идентифицированных таксонов.
- 5) Среди исследованных групп форели независимо от местообитания установлена зависимость между некоторыми таксонами бактерий в составе микрофлоры кишечника: увеличение численности бактериоидов приводит к увеличению численности таксонов полифилитических классов, что провоцирует развитие инфекций.
- 6) В зависимости от местообитания форели наблюдается таксономический сдвиг в микрофлоре кишечника. На смену фермикутным бактериям и бактериоидам приходят протеобактерии и фузобактерии, которые несвойственны здоровому организму и могут провоцировать соматические и инфекционные отклонения.

Список литературы:

1. Авдеева Е.В., Казимирченко О.В. Предотвращение заражения бактериальными болезнями разводимой форели в форелевом рыбноводном хозяйстве «Прибрежное» Калининградской области // *Фундаментальные исследования*. – 2006. – № 9. – С. 42-42;
2. Артамонова В.С., Янковская В.А., Голод В.М., Махров А.А. Генетическая дифференциация пород радужной форели (*Parasalmo mykiss*), разводимых в Российской Федерации // *Труды ИБВВ РАН*. 2016. №73 (76). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/geneticheskaya-differentsiatsiya-porod-raduzhnoy-foreli-parasalmo-mykiss-razvodimyh-v-rossiyskoj-federatsii> (дата обращения: 31.05.2020).
3. Атлас по медицинской микробиологии / Под ред. А. А. Воробьева, А. С. Быкова. М.: Медицинское информационное агентство, 2003. - С. 62-63.
4. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. - Л.: Государственное издательство медицинской литературы, 1962. - 182 с.
5. Березина Н.А. Экология растений: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Н. А.Березина, Н.Б. Афанасьева. — М.: Издательский центр «Академия», 2009. — 400 с.
6. Боровик, Е.А. Радужная форель / Е.А. Боровик. - Минск: Наука и техника, 1969. - 156 с.
7. Дорофеева, Е. А. (2003) *Parasalmonykiss* (Walbaum, 1792) — микижа. В кн.: Ю. С. Решетников (ред.). Атлас пресноводных рыб России. В 2 т. Т. 1. М.: Наука, с. 92–95.
8. Калинина Г. П., Графова Т. И. Методы исследования объектов окружающей среды и патологического материала на аэромонады: Метод. рекомендации / Мин -во здравоохранения РСФСР, 1980. 11 с.
9. Кузицин, К. В. Формирование и адаптивное значение внутривидового экологического разнообразия лососевых рыб (семейство Salmonidae): дис. в форме науч. доклада ... доктора биол. наук: 03.02.06 / К.В. Кузицин. - М., 2010. - 49 с.
10. Кузьмина В. В. Процессы пищеварения у рыб. Новые факты и гипотезы. Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН. – Ярославль: Филигрань, 2018. – 300 с.
11. Ларцева Л.В. Микрофлора промысловых рыб и рыбной продукции в Волго-Каспийском регионе / Л.В. Ларцева, Я.М. Болдырева // *Рыбное хозяйство*. 2004. - №3. - С. 48-49.

12. Макеева, А.П. Атлас молоди пресноводных рыб России / А.П. Макеева, Д.С. Павлов, Д.А. Павлов. - М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011.- 383 с.
13. Маргелис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. М.: Мир, 1983. – 352 с.
14. Маслобойщикова, В. В. Продуктивные качества производителей двух форм форели и их потомства, выращенных на теплых сбросных водах АЭС: автореферат дис. ... кандидата сельскохозяйственных наук: 06.04.01 / Маслобойщикова Вера Валерьевна; [Место защиты: Рос. гос. аграр. ун-т]. - Москва, 2016. - 21 с.
15. Методические указания по лабораторной диагностике псевдомонозов рыб: утвержденные ГУВ Госагропрома СССР 12.06.1986.
16. Методы общей бактериологии / Под. ред. Ф. Герхарда. Т.1. М.: Мир, 1983. 340с.
17. Микробиология и вирусология: учебно-методическое пособие / сост. Н. В. Шеховцова; Яросл. гос. ун-т им. П. Г. Демидова. — Ярославль: ЯрГУ, 2017. — 64 с.
18. Минаева О. М., Апенышева М. В., Акимова Е. Е., Блинова П. А., Куровский А. В. Влияние бактеризации семян пшеницы на активность оксидаз в растениях при фитопатогенной нагрузке // *Достижения науки и техники АПК*. 2015. Т.29. № 6. С. 53-56.
19. Никулин Р. Ю., Шумейко Д. В., Баштовенко И. В. Результаты подращивания молоди радужной форели на кормах разных рецептов на ФГУП «Племенной форелеводческий завод «Адлер» // JSRP. 2015. №4 (24). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rezultaty-podraschivaniya-molodi-raduzhnoy-foreli-na-kormah-raznyh-retseptur-na-fgup-plemennoy-forelevodcheskiy-zavod-adler> (дата обращения: 01.06.2020).
20. Новоженин, Н.П. Радужная форель как объект поликультуры в прудовом рыбоводстве / Н.П. Новоженин // Рыбохозяйственное использование водоемов комплексного назначения. Часть 2. - М.: ВНИИР, 2001. - С. 173-179.
21. Обухова Е. С. Экологические особенности псевдомоноад в составе аутофлоры радужной форели в условиях Карелии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08; 03.02.06/ Обухова Елена Сергеевна. - Петрозаводск, 2013. 22 с.
22. Озерский П. В. Многообразие симбиотических отношений и возможный подход к их классификации // *Общество. Среда. Развитие (TerraHumana)*. 2013. №4 (29). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mnogoobrazie-simbioticheskikh-otnosheniy-i-vozmozhnyu-podhod-k-ih-klassifikatsii> (дата обращения: 26.05.2020).
23. Озёра Карелии / Александров Б. М., Зыцарь Н. А., Новиков П. И., Покровский В. В., Правдин И. Ф. — Петрозаводск: Госиздат Карельской АССР, 1959. — С. 86—135. — 618 с.

24. Определитель бактерий Берджи: в 2-х т. Пер. с англ. / Под. ред. Дж. Хоулта, Н. Крита. П. Смита, Дж. Стейли, С. Уильямса. М: Мир, 1997. Т. 1., 432 с.
25. Остроумова, И.Н. Рост и развитие эмбрионов радужной форели при разной концентрации кислорода в воде / И.Н. Остроумова // Изв. ГосНИОРХ.- 1969. - Т. 68. - С. 202-216.
26. Охрана природы, гидросфера, вода для рыбоводных хозяйств, общие требования и нормы. ОСТ 155 372-87.
27. Павлов, Д.С. К проблеме формирования эпигенетических вариаций жизненной стратегии у вида Красной книги - камчатской микижи *Parasalmo mykiss* (*Salmonidae*, *Salmoniformes*) / Д.С. Павлов, К.А. Савваитова, К.В. Кузицин // Доклады РАН. - 1999. - Т. 367, № 5. - С. 709-713.
28. Павлов Д. С. Тихоокеанские благородные лососи форели Азии // - М.: Научный мир, 2001. - 200 с.
29. Павлов Д. С. Разнообразие жизненных стратегий и структура популяций камчатской микижи *Parasalmo mykiss* в экосистемах малых лососёвых рек разного типа // Вопросы ихтиологии. - 2008. - Т. 48, № 1. - С. 42-49.
30. Паршуков А.Н. Микробиоценоз радужной форели в садковых хозяйствах северной Карелии/ А. Н. Паршуков, Н. А. Сидорова// Ученые записки Петрозаводского Государственного Университета. - 2014. - Т.1. - No 8. - с. 29-33. //Cyberleninka/ ООО "Итеос". - электрон. дан. - [Россия], сор. 2012. - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobiotsenoz-radu...> - Аналог печатн. изд.
31. Привольнев, Т.И. Увеличение навески товарной радужной форели / Т.И. Привольнев // Биологические основы форелеводства. - 1976. - С.14-18.
32. Проворов Н. А. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе // Журнал общей биологии, 2001. – Т. 62, № 6. – С. 472-495.
33. Промысловые рыбы СССР / Ред. Л.С. Берг [и др.]. М.: Пищепромиздат, 1949. - 787 с.
34. Рыжков Л. П., Кучко Т. Ю., Кучко Я. А. Выращивание форели в садках: методические рекомендации / под ред. Соколовой Л. П.- Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2000. - 68 с., ил.
35. Санитарная микробиология / Под ред. Г.П. Калины, Г.Н. Чистовича. –М. Медицина, 1969. –384 с.
36. Сельскохозяйственная биология, 2014, № 3, с. 113-126.
37. Сидорова Н. А. Санитарно-микробиологические исследования в рыбоводстве: учеб. пособие для студентов эколого-биологического и агротехнического факультетов /

- Н.А. Сидорова, Л. П. Рыжков, Е.С. Обухова. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2013. 56 с.
38. Титарев Е.Ф. Форелеводство / Е.Ф. Титарев. - М.: Пищевая пром-сть, 1980. - 168 с.
 39. Óìàððíà Ì. Ì. Àññíðèàððèáíàÿ Àçíòðèèññàððèÿ. - Ì.: Èçä-âî ÌÃÓ, 1986. - 205 ñ.
 40. Ускова И. В., Потешкина В. А., Калинин К. А., Комплексный мониторинг бактериопланктона рыбоводного хозяйства реки Тулома и энтеральной микрофлоры кишечника, культивируемой в садках форели И. В. Ускова*, В. А. Потешкина, К. А. Калинин // Вестник МГТУ. 2019. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kompleksnyy-monitoring-bakterioplanktona-rybovodnogo-hozyaystva-reki-tuloma-i-enteralnoy-mikrobioty-kishechnika-kultiviruemoj-v> (дата обращения: 27.05.2020).
 41. Чёрная Л. В. Особенности желудочного пищеварения у жвачных животных // Научное обозрение. Биологические науки. – 2017. – № 2. – С. 153-156.
 42. Шивокене Я. С. Симбионтное пищеварение у гидробионтов и насекомых. Вильнюс: Мокслас, 1989. 223 с.
 43. Douglas A. E. Symbiotic Interactions // Oxford; NY; Toronto: Oxford. Univ. Press, 1994 – 148 p.
 44. Elsevier, Amsterdam, pp 217–223
 45. Garside, E. T. Preferred temperature of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) and its unusual relationship to acclimation temperature / E. T. Garside, J. S. Tait // Canadian Journal of Zoology. - 1958. - Vol. 36. - P. 563-567.
 46. Gibbons N.E., Murray R.G.E. Proposals concerning the higher taxa of bacteria. Int. J. Syst. Bacterid., 1978, v. 28, N 1, p. 1-6.
 47. Jahn, L. A. Food Habits of Rainbow Trout Stocked in Argyle Lake, Illinois / L.A. Jahn, D.J. Lendman // Transactions of the Illinois State Academy of Science.- 1993. - Vol. 86. - P. 71-77.
 48. MacCrimmon, H.R. World distribution of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). /H.R. MacCrimmon // Journal of the Fisheries Research Board of Canada. - 1971. - Vol. 28. - P. 663-704.
 49. Mantelman, I.I. Temperature criteria for freshwater fish: and procedures / I.I. Mantelman // U.S. Environment Protection Agency. - Minnesota, 1958. - 130 p.
 50. McCutcheon J. B., Moran N. A. Extreme genome reduction in symbiotic bacteria // Nat. Rev. Microbiol. -2012. - № 10 -P. 13-20.

51. Needham, P.R. Rainbow trout in Mexico and California with notes on the cutthroat series / P.R. Needham, R. Gard // University of California Publications in Zoology. - 1959. - Vol. 67 (1). - P. 1-124.
52. Oliver K. M., Smith A. H., Russell J. A. Defensive symbiosis in the real world-advancing ecological studies of heritable, production bacteria in aphids and beyond // *Funct. Ecol.* – 2014. - № 28. - P. 341-355.
53. Rajilic-Stojanovic M, Smidt H & de Vos WM (2007) Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol.* - 2007. - № 9. -P. 2125-2136.
54. Ringo E., Birkbeck T. H. Intestinal microflora of fish and fry: a review // *Aquac Res.* - 1999. - № 30(2). - P. 73-93.
55. Roger A. J., Munos-Gomes S. A., Kamikava R. The origin and devirgification of mitochondria // *Curr. Biol.*, 2017. - № 27. - P. 1177-1192.
56. Sakata T (1990) Microflora in the digestive tract of fish and
57. Sakata T. Microflora in the digestive tract of fish and shellfish // Lesel R (ed) *Microbiology of Poekilotherms*. Elsevier, Amsterdam, 1990. -P. 217-223.
58. shellfish. In: Lesel R (ed) *Microbiology of Poekilotherms* .
59. Siegl A., Kamke J., Hachmuth T., Piel J. et al. Single-cell genomics reveals the lifestyle of Poribacteria, a candidate phylum symbiotically associated with marine sponges // *ISMEJ.* - 2011. - № 5. –P. 61-65.
60. Stackebrandt, E.; Murray, R. G. E.; Truper, H. G. (1988). "Proteobacteria classis nov., a Name for the Phylogenetic Taxon That Includes the "Purple Bacteria and Their Relatives"". *International Journal of Systematic Bacteriology*. **38** (3): 321–325. doi:10.1099/00207713-38-3-321
61. *Symbiosis: Mechanisms and Model Systems*. – Ed. J. Seckbach. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Boston, London, 2002. – 796 p.
62. *Symbiosis: Mechanisms and Model Systems*. – Ed. J. Seckbach. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Boston, London, 2002. – 796 p.
63. Ventura M., Canchaya C., Tauch A. et al. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* - 2007a. - Vol. 71, № 3. - P. 495–548. DOI: 10.1128/MMBR.00005-07.

Приложение

Приложение 1

Метод выявления биохимических свойств клеточной стенки бактерий по Граму

Для выявления биохимических свойств клеточной стенки бактерий по Граму использовали набор реагентов «Микро-ГРАМ-НИЦФ»: генцианвиолет (основной краситель), основной фуксин (дополнительный краситель), люголь (фиксатор) и 96° спирт (дифференцирующее вещество). Последовательность приготовления препарата включала:

1. Приготовление фиксированного мазка с исследуемой микробной культурой;
2. Окрашивание генцианвиолетом в течение 2 минут;
3. Фиксация раствором Люголя в течение 1 минуты;
4. Обработка спиртом – 30 секунд;
5. Удаление избытка генцианвиолета дистиллированной водой;
6. Окрашивание клеток фуксином – 1 -2 минуты;
7. Удаление избытка фуксина дистиллированной водой;
8. Высушивание препарата фильтровальной бумагой.

Феномен: под микроскопом Гр (+) бактерии приобретают сине-фиолетовый цвет, а Гр (-) - красный.

Метод выявления макрокапсул бактерий по Бурри-Гинсу

Для выявления экзополисахаридных макрокапсул бактерий, обладающих свойством гидрофобности, использовалась техника негативного контрастирования при окрашивании бактерий. Для этого использовали красители из набора Микро-ГИНС-НИЦФ для окраски капсул по Гинсу: карболовый фуксин Циля (дополнительный краситель), черная тушь (основной краситель для окрашивания фона вокруг капсулы бактерий). Последовательность приготовления препарата включала:

1. Приготовление негативного препарата с исследуемой микробной культурой;
2. Окрашивание фуксином Циля в течение 5 минут;
3. Удаление избытка фуксина дистиллированной водой;
4. Высушивание препарата фильтровальной бумагой.

Феномен: цитоплазма капсулообразующих бактерий окрашивается в красный цвет, капсула обнаруживается в виде неокрашенной каймы вокруг микроба на темном фоне. Приготовить препарат по Бурри из культуры клеток, зафиксировать на пламени. На препарат налить фуксин Циля на 3-5 минут или сафранин на 2 минуты, краску слить, промыть водой (5-10 секунд), высушить фильтровальной бумагой. Препарат промикроскопировать иммерсионным методом. Цитоплазма бактерий окрашивается в красный цвет, неокрашенные капсулы выделяются на темном фоне препарата.

Метод выявления спор бактерий по Пешкову

Для выявления спорогенных культур используют технику протравы спор за счет физической или химической обработки фиксированных клеток микроорганизмов. Выявление спор выполняли с использованием набора Микро-НИЦФ для окраски спор, куда входили: синька Леффлера, нейтральный красный.

Последовательность приготовления препарата включала:

1. Приготовление фиксированного препарата с исследуемой микробной культурой;
2. Окрашивание синькой Леффлера с одновременным протравливанием спор в пламени спиртовки в течение 15-20 секунд;
3. Далее необходимо остудить препарат и промыть дистиллированной водой;
3. Окрашивание раствором нейтрального красного – 2-3 минуты;
4. Удаление избытка красителя нейтрального красного дистиллированной водой;
5. Высушивание препарата фильтровальной бумагой.

На фиксированный препарат налить метиленовую синьку Леффлера. Препарат Феномен: споры окрашиваются в голубовато-синий цвет, вегетативные тела – в розовый.

Список использованных питательных сред

1. Мясо-пептонный агар

| № | Вещество | Количество, г |
|---|-------------|---------------|
| 1 | Пептон | 10,0 |
| 2 | NaCl | 5,0 |
| 3 | Агар | 20,0 |
| 4 | Вода мясная | 1000, 0 мл |

pH – 7,2 Стерилизация 120 °С, 30 мин

2. Мясо-пептонный бульон

| № | Вещество | Количество, г |
|---|-------------|---------------|
| 1 | Пептон | 10,0 |
| 2 | NaCl | 5,0 |
| 3 | Вода мясная | 1000, 0 мл |

pH – 7,2-7,4 Стерилизация 120 °С, 30 мин

3. Среды Гисса с углеводами

| № | Вещество | Количество, г |
|---|-----------------------|---------------|
| 1 | Пептон | 1,0 |
| 2 | NaCl | 0,5 |
| 3 | Вода дистиллированная | 100, 0 мл |
| 4 | Углевод | 1,0 |
| 5 | Индикатор Андрее | 1 мл |

pH – 7,0-7,4 Стерилизация 112 °С, 20 мин

4. Питательная желатина

| № | Вещество | Количество, г |
|---|-------------|---------------|
| 1 | Пептон | 10,0 |
| 2 | NaCl | 5,0 |
| 3 | Вода мясная | 1000, 0 мл |
| 4 | Желатина | 15/100 мл |

pH – 7,0 Стерилизация дробно 110 °С, 20 мин – 3 дня

5. Кровяной агар

| № | Вещество | Количество, % |
|---|-------------------------|---------------|
| 1 | Стерильный МПА | 2 |
| 2 | Дефибринированная кровь | 5-10 |

6. Среда для выделения спорообразующих аммонификаторов

| № | Вещество | Количество, мл |
|---|---------------|----------------|
| 1 | МПА | 500 |
| 2 | Сусловый агар | 500 |

pH – 7,1-7,2 Стерилизация дробно 120 °С, 30 мин

7. Среда для накопления анаэробных аммонификаторов (по Вильсен-Блеру)

| № | Вещество | Количество, г |
|---|---------------------------------|---------------|
| 1 | Мясной экстракт | 3,0 |
| 2 | Пептон | 5,0 |
| 3 | Глюкоза | 10,0 |
| 4 | Агар | 30,0 |
| 5 | Вода | 1000 мл |
| 6 | Na ₂ SO ₃ | 10 мл 20% |
| 7 | FeCl ₂ | 1 мл 8% |
| 8 | NaOH | 0,6 мл 10% |

8. Среда для накопления аэробных аммонификаторов

| № | Вещество | Количество, г |
|---|----------|---------------|
| 1 | Пептон | 0,5 |
| 2 | NaCl | 0,5 |
| 3 | Вода | 100 мл |

pH – 7,0 Стерилизация дробно 110 °С, 20 мин

Результаты исследования аутофлоры *Parasalmo mykiss Walbaum* (зона А)

| № | Вид | Доля | Семейство | Тип | Тип клеточной стенки (по Граму) | Физиология | Форма | Патогенность |
|----|-----------------------------|------|---------------------------|-----------------------|---------------------------------|-------------------------|----------------|--------------|
| 1 | <i>Aeromonas spp</i> | 0,16 | <i>Alcaligenaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | + |
| 2 | <i>Alcaligenes spp.</i> | 0,05 | <i>Actinobacteria</i> | <i>Micrococcaceae</i> | - | аэробы | Палочковидные | - |
| 3 | <i>Arthrobacter spp.</i> | 0,09 | <i>Micrococcaceae</i> | <i>Actinobacteria</i> | + | Облигатные аэробы | Палочки, кокки | - |
| 4 | <i>Bacillus spp.</i> | 6,04 | <i>Burkholderiaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Аэробы | Палочковидные | +/- |
| 5 | <i>Bacteroidetes spp.</i> | 13,1 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Анаэробы | Палочковидные | - |
| 6 | <i>Carnobacterium spp.</i> | 0,09 | <i>Fusobacteriaceae</i> | <i>Fusobacteria</i> | - | Облигатные анаэробы | Палочковидные | +/- |
| 7 | <i>Cetobacterium spp.</i> | 2,49 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Анаэробы | Палочковидные | - |
| 8 | <i>Cytophaga spp.</i> | 0,11 | <i>Bacteroidaceae</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | Аэробы | Палочковидные | + |
| 9 | <i>Exiguobacterium spp.</i> | 0,07 | <i>Bacillaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | - | Палочковидные | + |
| 10 | <i>Flavobacterium spp.</i> | 1,12 | <i>Flavobacteriaceae</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | Аэробы | Палочковидные | + |

| | | | | | | | | |
|----|---------------------------|-------|---------------------------|-----------------------|---|---------------------------------|---------------|-----|
| 11 | <i>Fusobacterium spp.</i> | 5,12 | <i>Fusobacteriaceae</i> | <i>Fusobacteria</i> | - | Анаэробы | Палочковидные | - |
| 12 | <i>Hafnia spp.</i> | 0,29 | <i>Hafniaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 13 | <i>Lactobacillus spp.</i> | 4,84 | <i>Lactobacillaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 14 | <i>Eubacterium spp.</i> | 11,56 | <i>Eubacteriaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Анаэробы | Палочковидные | - |
| 15 | <i>Enterococcus spp.</i> | 1,17 | <i>Enterococcaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | - | Кокки | +/- |
| 16 | <i>Erwinia spp.</i> | 2,12 | <i>Erwiniaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 17 | <i>Escherichia coli</i> | 0,02 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | +/- |
| 18 | <i>Klebsiella spp.</i> | 0,03 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 19 | <i>Kokuria spp.</i> | 2,12 | <i>Micrococcaceae</i> | <i>Actinobacteria</i> | + | Аэробы, факультативные анаэробы | Кокки | - |
| 20 | <i>Lactococcus spp.</i> | 3,87 | <i>Streptococcaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | - | Кокки | - |
| 21 | <i>Leuconostoc</i> | 4,2 | <i>Leuconostocaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |

| | | | | | | | | |
|----|-------------------------------|------|-----------------------------|-----------------------|---|-------------------------|---------------|-----|
| 22 | <i>Listeria spp.</i> | 0,73 | <i>Listeriaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 23 | <i>Microbacterium spp.</i> | 3,21 | <i>Microbacteriaceae</i> | <i>Actinobacteria</i> | + | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 24 | <i>Micrococcus spp.</i> | 2,11 | <i>Micrococcaceae</i> | <i>Actinobacteria</i> | + | Факультативные анаэробы | Кокки | - |
| 25 | <i>Plesiomonas spp.</i> | 2,16 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | +/- |
| 26 | <i>Pantoea spp.</i> | 0,24 | <i>Erwiniaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 27 | <i>Pediococcus spp.</i> | 1,97 | <i>Lactobacillaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 28 | <i>Porphyromonas spp.</i> | 2,08 | <i>Porphyromonadaceae</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | Облигатные анаэробы | Палочковидные | - |
| 29 | <i>Prevotella spp.</i> | 3,42 | <i>Prevotellaceae</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | Анаэробы | Палочковидные | +/- |
| 30 | <i>Propionibacterium spp.</i> | 7,11 | <i>Propionibacteriaceae</i> | <i>Actinobacteria</i> | + | Анаэробы | Палочковидные | - |
| 31 | <i>Proteus spp.</i> | 0,03 | <i>Morganellaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | + |
| 32 | <i>Pseudomonas spp.</i> | 1,17 | <i>Pseudomonadaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Облигатные анаэробы | Палочковидные | +/- |
| 33 | <i>Rahnella spp.</i> | 1,58 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | + |

| | | | | | | | | |
|----|----------------------------|------|--------------------------|-----------------------|---|-------------------------|---------------|---|
| 34 | <i>Rhodococcus spp.</i> | 3,12 | <i>Nocardiaceae</i> | <i>Actinobacteria</i> | + | Аэробы | Палочковидные | - |
| 35 | <i>Serratia spp.</i> | 1,6 | <i>Yersiniaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 36 | <i>Sporocytophaga spp.</i> | 0,23 | <i>Sporocytophaga</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | Облигатные анаэробы | Палочковидные | - |
| 37 | <i>Staphylococcus spp.</i> | 9,24 | <i>Staphylococcaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Кокки | - |
| 38 | <i>Streptococcus spp.</i> | 0,89 | <i>Streptococcaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Кокки | + |

Приложение 6

Результаты исследования аутофлоры *Parasalmo mykiss Walbaum*(зона В)

| № | Вид | Доля | Семейство | Тип | Тип клеточн | Физиология | Форма | Патогенность |
|---|-----|------|-----------|-----|-------------|------------|-------|--------------|
|---|-----|------|-----------|-----|-------------|------------|-------|--------------|

| | | | | | ой стенки (по Граму) | | | |
|----|-----------------------------|------|---------------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------|-----|
| 1 | <i>Acinetobacter spp.</i> | 0,12 | <i>Aeromonadaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | - | Палочковидные | + |
| 2 | <i>Aeromonas spp</i> | 0,38 | <i>Alcaligenaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Аэробы | Палочковидные | - |
| 3 | <i>Arthrobacter spp.</i> | 1,12 | <i>Micrococcaceae</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | Облигатные аэробы | Палочковидные, кокки | - |
| 4 | <i>Bacillus spp.</i> | 9,54 | <i>Burkholderiaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Аэробы | Палочковидные | +/- |
| 5 | <i>Bacteroidetes spp.</i> | 6,08 | <i>Fusobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Анаэробы | Палочковидные | - |
| 6 | <i>Carnobacterium spp.</i> | 0,18 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Fusobacteria</i> | - | Облигатные анаэробы | Палочковидные | +/- |
| 7 | <i>Cetobacterium spp.</i> | 3,21 | <i>Clostridiaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | - | Палочковидные | - |
| 8 | <i>Citrobacter spp.</i> | | <i>Bacillaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Облигатные анаэробы | Палочковидные | - |
| 9 | <i>Clostridium spp.</i> | 1,23 | <i>Bacteroidaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | - | Палочковидные | - |
| 10 | <i>Cytophaga spp.</i> | 0,04 | <i>Bacillaceae</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | Аэробы | Палочковидные | + |
| 11 | <i>Exiguobacterium spp.</i> | 0,07 | <i>Flavobacteriaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | - | Палочковидные | - |
| 12 | <i>Flavobacterium spp.</i> | 1,12 | <i>Pseudomonadaceae</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | Аэробы | Палочковидные | + |
| 13 | <i>Flavimonas spp</i> | 9,3 | <i>Hafniaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Аэробы | Палочковидные | +/- |

| | | | | | | | | |
|----|---------------------------|------|---------------------------|-----------------------|---|-------------------------|---------------|-----|
| 14 | <i>Flexibacter spp.</i> | 0,16 | <i>Fusobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 15 | <i>Fusobacterium spp.</i> | 5,12 | <i>Hafniaceae</i> | <i>Fusobacteria</i> | - | Анаэробы | Палочковидные | - |
| 16 | <i>Hafnia spp.</i> | 0,29 | <i>Lactobacillaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 17 | <i>Lactobacillus spp.</i> | 4,84 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 18 | <i>Edwardsiella spp.</i> | 2,11 | <i>Eubacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 19 | <i>Eubacterium spp.</i> | 6,22 | <i>Eubacteriaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Анаэробы | Палочковидные | - |
| 20 | <i>Enterobacter spp.</i> | 1,35 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 21 | <i>Erwinia spp.</i> | 2,12 | <i>Erwiniaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 22 | <i>Escherichia coli</i> | 0,09 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | +/- |
| 23 | <i>Klebsiella spp.</i> | 1,26 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 24 | <i>Lactococcus spp.</i> | 0,92 | <i>Streptococcaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | - | Кокки | - |

| | | | | | | | | |
|----|-------------------------------|------|-----------------------------|-----------------------|---|-------------------------|---------------|-----|
| 25 | <i>Leuconostoc</i> | 4,2 | <i>Leuconostocaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 26 | <i>Listeria spp.</i> | 1,02 | <i>Listeriaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 27 | <i>Microbacterium spp.</i> | 0,91 | <i>Microbacteriaceae</i> | <i>Actinobacteria</i> | + | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 28 | <i>Micrococcus spp.</i> | 0,46 | <i>Micrococcaceae</i> | <i>Actinobacteria</i> | + | Факультативные анаэробы | Кокки | - |
| 29 | <i>Moraxella spp.</i> | 0,15 | <i>Moraxellaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 30 | <i>Pantoea spp.</i> | 0,12 | <i>Erwiniaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 31 | <i>Pediococcus spp.</i> | 0,69 | <i>Lactobacillaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 32 | <i>Porphyromonas spp.</i> | 2,08 | <i>Porphyromonadaceae</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | Облигатные анаэробы | Палочковидные | - |
| 33 | <i>Prevotella spp.</i> | 5,54 | <i>Prevotellaceae</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | Анаэробы | Палочковидные | +/- |
| 34 | <i>Propionibacterium spp.</i> | 8,57 | <i>Propionibacteriaceae</i> | <i>Actinobacteria</i> | + | Анаэробы | Палочковидные | +/- |
| 35 | <i>Proteus spp</i> | 0,09 | <i>Morganellaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | + |
| 36 | <i>Pseudomonas spp.</i> | 3,23 | <i>Pseudomonadaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Облигатные аэробы | Палочковидные | - |

| | | | | | | | | |
|----|----------------------------|------|---------------------------|-----------------------|---|-------------------------|---------------|---|
| 37 | <i>Rahnella spp.</i> | 1,28 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | + |
| 38 | <i>Ralstonia spp.</i> | 0,02 | <i>Burkholderiaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Облигатные аэробы | Палочковидные | - |
| 39 | <i>Rhodococcus spp.</i> | 1,26 | <i>Nocardiaceae</i> | <i>Actinobacteria</i> | + | Аэробы | Палочковидные | - |
| 40 | <i>Serratia spp.</i> | 1,12 | <i>Yersiniaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 41 | <i>Sporocytophaga spp.</i> | 0,14 | <i>Sporocytophaga</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | Облигатные аэробы | Палочковидные | - |
| 42 | <i>Staphylococcus spp.</i> | 1,24 | <i>Staphylococcaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Кокки | - |
| 43 | <i>Streptococcus spp.</i> | 0,89 | <i>Streptococcaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Кокки | + |
| 44 | <i>Veillonella spp.</i> | 0,02 | <i>Veillonellaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | - | Анаэробы | Кокки | - |

Приложение 7

Результаты исследования аутофлоры *Parasalmo mykiss Walbaum*(зона С)

| № | Вид | Доля | Семейство | Тип | Тип клеточной стенки | Физиология | Форма | Патогенность |
|---|-----|------|-----------|-----|----------------------|------------|-------|--------------|
|---|-----|------|-----------|-----|----------------------|------------|-------|--------------|

| | | | | | (по Граму) | | | |
|----|-----------------------------|------|----------------------------|-----------------------|---------------|----------------------------|-------------------------|-----|
| 1 | <i>Aeromonas spp</i> | 1,28 | <i>Aeromonadaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Аэробы | Палочковидные | + |
| 2 | <i>Alcaligenes spp.</i> | 1,12 | <i>Alcaligenaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Аэробы | Палочковидные | - |
| 3 | <i>Arthrobacter spp.</i> | 2,11 | <i>Micrococcaceae</i> | <i>Actinobacteria</i> | + | Облигатные аэробы | Палочковидные, кокки | - |
| 4 | <i>Bacillus spp.</i> | 8,42 | <i>Bacillaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 5 | <i>Bacteroidetes spp.</i> | 3,08 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | Анаэробы | Палочковидные | - |
| 6 | <i>Burkholderia spp</i> | 4,1 | <i>Burkholderiaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Аэробы | Палочковидные | +/- |
| 7 | <i>Buttiauxella spp.</i> | 0,04 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | - | Палочковидные | - |
| 8 | <i>Campylobacter spp.</i> | 2,17 | <i>Campylobacteraceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | - | Извитые | +/- |
| 9 | <i>Carnobacterium spp.</i> | 3,13 | <i>Carnobacteriaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Анаэробы | Палочковидные | + |
| 10 | <i>Cetobacterium spp.</i> | 1,12 | <i>Fusobacteriaceae</i> | <i>Fusobacteria</i> | - | Облигатные анаэробы | Палочковидные | +/- |
| 11 | <i>Citrobacter spp.</i> | 2,93 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | + | Облигатные анаэробы | Палочковидные | - |
| 12 | <i>Clostridium spp.</i> | 3,19 | <i>Clostridiaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | - | Палочковидные | - |
| 13 | <i>Exiguobacterium spp.</i> | 1,56 | <i>Bacillaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | - | Палочковидные | - |
| 14 | <i>Erysipelothrix spp.</i> | 2,11 | <i>Erysipelotrichaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | - | Палочковидные | - |

| | | | | | | | | |
|----|----------------------------|------|---------------------------------------|-----------------------|---|----------------------------|---------------|-----|
| 15 | <i>Flavimonas spp</i> | 9,3 | <i>Pseudomonadaceae</i> <i>e</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Аэробы | Палочковидные | +/- |
| 16 | <i>Flexibacter spp.</i> | 4,27 | <i>Flexibacteraceae</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | - | Палочковидные | - |
| 17 | <i>Hafnia spp.</i> | 1,14 | <i>Hafniaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 18 | <i>Edwardsiella spp.</i> | 2,11 | <i>Enterobacteriaceae</i> <i>e</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 19 | <i>Eubacterium spp.</i> | 4,11 | <i>Eubacteriaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | - | Палочковидные | - |
| 20 | <i>Enterobacter spp.</i> | 2,45 | <i>Enterobacteriaceae</i> <i>e</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 21 | <i>Escherichia coli</i> | 3,09 | <i>Enterobacteriaceae</i> <i>e</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | +/- |
| 22 | <i>Klebsiella spp.</i> | 5,15 | <i>Enterobacteriaceae</i> <i>e</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 23 | <i>Listeria spp.</i> | 1,21 | <i>Listeriaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 24 | <i>Microbacterium spp.</i> | 2,04 | <i>Microbacteriaceae</i> | <i>Actinobacteria</i> | + | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 25 | <i>Micrococcus spp.</i> | 1,25 | <i>Micrococcaceae</i> | <i>Actinobacteria</i> | + | Факультативные анаэробы | Кокки | - |

| | | | | | | | | |
|----|----------------------------|------|---------------------------|-----------------------|---|-------------------------|---------------|-----|
| 26 | <i>Moraxella spp.</i> | 0,98 | <i>Moraxellaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 27 | <i>Plesiomonas spp.</i> | 1,23 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | +/- |
| 28 | <i>Porphyromonas spp.</i> | 2,08 | <i>Porphyromonadaceae</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | Облигатные анаэробы | Палочковидные | - |
| 29 | <i>Prevotella spp.</i> | 3,42 | <i>Prevotellaceae</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | Анаэробы | Палочковидные | +/- |
| 30 | <i>Proteus spp</i> | 6,33 | <i>Morganellaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | + |
| 31 | <i>Pseudomonas spp.</i> | 5,35 | <i>Pseudomonadaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Облигатные аэробы | Палочковидные | - |
| 32 | <i>Rahnella spp.</i> | 1,28 | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | + |
| 33 | <i>Ralstonia spp.</i> | 0,02 | <i>Burkholderiaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Облигатные аэробы | Палочковидные | - |
| 34 | <i>Serratia spp.</i> | 1,12 | <i>Yersiniaceae</i> | <i>Proteobacteria</i> | - | Факультативные анаэробы | Палочковидные | - |
| 35 | <i>Sporocytophaga spp.</i> | 0,14 | <i>Sporocytophaga</i> | <i>Bacteroidetes</i> | - | Облигатные аэробы | Палочковидные | - |
| 36 | <i>Staphylococcus spp.</i> | 4,11 | <i>Staphylococcaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Кокки | - |
| 37 | <i>Streptococcus spp.</i> | 1,44 | <i>Streptococcaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | + | Факультативные анаэробы | Кокки | + |
| 38 | <i>Veillonella spp.</i> | 0,02 | <i>Veillonellaceae</i> | <i>Firmicutes</i> | - | Анаэробы | Кокки | - |

