

Влияние бактериальных сообществ кишечника на развитие тимпаний у молоди осетровых рыб (Acipenseridae) при переходе на искусственные комбикорма

Бедрицких К.С.^{1,2}, Бец В.Д.¹, Макушева Ю.С.¹, Грибченко И.Б.¹, Соловьев М.М.³, Севастеев С.В.⁴, Худышев Д.А.⁴, Литвинова Е.А.¹

¹Новосибирский государственный технический университет, г. Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

³Институт систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск, Россия

⁴ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ, г. Новосибирск, Россия

Аннотация

В ходе исследования была проведена комплексная оценка этиологии и патогенеза тимпаний у молоди осетровых в период перехода на комбикорма, с особым вниманием к взаимосвязи микробиома кишечника, гидрохимических показателей водной среды и клинического статуса рыб. Экспериментальная модель включала три группы мальков — здоровых, демонстрирующих клинические признаки тимпаний и прошедших терапевтический курс, — для которых осуществлялся мониторинг зоотехнических параметров, а также выполнялся молекулярно-генетический анализ бактериальных сообществ в различных отделах желудочно-кишечного тракта рыб (желудок и спиральный клапан). Результаты исследования выявили выраженные различия в структуре кишечной микробиоты между группами. У особей с тимпанией зафиксирован дисбиоз, характеризующийся изменением локализации и относительного содержания ключевых бактериальных таксонов (в том числе родов *Lactobacillus* и *Bacteroides*). Сравнительный анализ аминокислотного состава кормов исключил нутритивный дефицит как непосредственную причину заболевания, указав на опосредованную роль комбикорма через изменение микробного баланса. Применение живого корма (мотыля) привело к клиническому выздоровлению рыб и частичной нормализации микробиоты, демонстрируя её ключевое значение в поддержании гомеостаза ЖКТ. Результаты подчёркивают необходимость поддержания эубиоза кишечника для успешной адаптации к искусственным кормам и служат основой для разработки практических мер, таких как пробиотики и оптимизация кормления, для снижения отходов в осетроводстве.

Ключевые слова: Осетровые, молодь, тимпания, микробиом кишечника, дисбиоз, ПЦР, комбикорм, аквакультура, *Acipenser*, *Aeromonas*.

Введение

Осетровые рыбы (семейство *Acipenseridae*), известные своими древними корнями и значимостью для водных экосистем, играют критическую роль в поддержании биоразнообразия и устойчивости экосистем [1]. В последние десятилетия, из-за чрезмерного вылова, браконьерства, загрязнения водоемов и трансформации речного стока, многие виды осетровых оказались под угрозой исчезновения, что подчеркивает необходимость разработки эффективных стратегий их сохранения и восстановления популяций [2]. В этих условиях аквакультура осетровых не только обеспечивает устойчивое производство ценных продуктов, таких как икра и мясо, снижая давление на дикие популяции, но и служит инструментом для восстановления и поддержания численности этих видов в природе [3,4].

Для поступательного развития аквакультуры необходимо освоение инновационных технологических решений, нацеленных на повышение производительности, минимизацию экологического воздействия и создание оптимальных условий содержания выращиваемых особей [5].

Важнейшим технологическим этапом в аквакультуре осетровых рыб является перевод молоди с живых кормов (например, артемии или зоопланктона) на стартовые комбикорма. Успешность этого этапа напрямую определяет дальнейшую продуктивность хозяйства, поскольку своевременное обеспечение молоди адекватным живым кормом критически важно для достижения максимальной выживаемости и темпов роста [6]. При этом необходимо учитывать, что нормы питания существенно варьируют в зависимости от вида живого корма, его физиологического состояния и сезона заготовки [7].

В последние годы активно разрабатываются искусственные корма, призванные удовлетворить нутритивные потребности рыб при одновременном снижении издержек производства. Такие корма обладают рядом технологических преимуществ: более низкой себестоимостью, стандартизованностью состава и удобством хранения [8]. Экспериментальные данные свидетельствуют, что применение искусственных рационов на ранних стадиях развития отдельных видов осетровых перспективно для интенсификации коммерческого выращивания [9]. Однако внедрение искусственных

кормов сопряжено с рисками нарушения микробного баланса желудочно-кишечного тракта. У части личинок осетровых при переходе на комбикорма наблюдается дисбиоз, сопровождающийся: потерей аппетита; нарушением координации движений; отказом от корма; изменением поведенческих реакций.

Современные исследования подтверждают, что диетические факторы способны значительно модифицировать структуру кишечной микробиоты [10]. Это обуславливает необходимость детального изучения механизмов взаимодействия между типом кормления, составом микробных сообществ и физиологическим статусом молоди осетровых.

Исследования показывают, что слишком ранний или резкий переход на сухие корма приводит к снижению выживаемости и замедлению роста, тогда как постепенное введение стартовых кормов параллельно с живыми кормами обеспечивает лучшие показатели роста и сохранности молоди [11].

Одной из частых проблем при переводе на комбикорма является тимпания (вздутие кишечника) - патологическое состояние, обусловленное дисбиозом желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и избыточным газообразованием. Болезнь развивается достаточно быстро, и при отсутствии своевременного вмешательства молодь может погибать [12].

На долю тимпании, развивающейся на фоне дисбактериоза, приходится до 50% и более потерь от общего объема выращиваемой молоди, что влечет за собой прямые убытки из-за снижения численности рыбы и увеличения затрат на лечение и профилактику [13].

Разработка эффективных схем лечебного и профилактического кормления с использованием пробиотиков и корректировкой состава комбикорма позволяет существенно снизить эти потери и улучшить физиологическое состояние рыб, увеличивая их выживаемость и продуктивность. Но при этом возрастает экономический ущерб, включающий затраты на специализированные корма, лечение, а также вынужденные сокращения объема продаж рыбы [14].

Ранее было показано, что дисбиоз у личинок осетров вызванный голоданием способствует увеличению разнообразия микробиома с преобладанием однотипного сообщества бактерий из типа *Proteobacteria* (в частности, роды *Aeromonas* и *Pseudomonas*), которые часто являются условно-патогенными. У здоровых рыб, продолжавших питаться живым кормом, в микробиоме доминировали бактерии типа *Firmicutes*, что ассоциируется с нормальным состоянием [15].

Современные исследования подтверждают, что диетические факторы способны значительно модифицировать структуру кишечной микробиоты [10]. Это обуславливает необходимость детального изучения механизмов взаимодействия между типом кормления, составом микробных сообществ и физиологическим статусом молоди осетровых.

Исследования показывают, что слишком ранний или резкий переход на сухие корма приводит к снижению выживаемости и замедлению роста, тогда как постепенное введение стартовых кормов параллельно с живыми кормами обеспечивает лучшие показатели роста и сохранности молоди [11].

Одной из частых проблем при переводе на комбикорма является тимпания (вздутие кишечника) - патологическое состояние, обусловленное дисбиозом желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и избыточным газообразованием. Болезнь развивается достаточно быстро, и при отсутствии своевременного вмешательства молодь может погибать [12].

На долю тимпании, развивающейся на фоне дисбактериоза, приходится до 50% и более потерь от общего объема выращиваемой молоди, что влечет за собой прямые убытки из-за снижения численности рыбы и увеличения затрат на лечение и профилактику [13].

Разработка эффективных схем лечебного и профилактического кормления с использованием пробиотиков и корректировкой состава комбикорма позволяет существенно снизить эти потери и улучшить физиологическое состояние рыб, увеличивая их выживаемость и продуктивность. Но при этом возрастает экономический ущерб, включающий затраты на специализированные корма, лечение, а также вынужденные сокращения объема продаж рыбы [14].

Ранее было показано, что дисбиоз у личинок осетров вызванный голоданием способствует увеличению разнообразия микробиома с преобладанием однотипного сообщества бактерий из типа *Proteobacteria* (в частности, роды *Aeromonas* и *Pseudomonas*), которые часто являются условно-патогенными. У здоровых рыб, продолжавших питаться живым кормом, в микробиоме доминировали бактерии типа *Firmicutes*, что ассоциируется с нормальным состоянием [15].

Предполагается, что развитие тимпании может быть связано не с самим комбикормом, а с вызванными им изменениями в микробном сообществе (дисбиозом) желудочно-кишечного тракта, что приводит к газообразованию и нарушению пищеварения.

Поэтому нами было проведено комплексное изучение взаимосвязи между клиническим статусом молоди осетровых, выживаемостью, ростом и составом бактериальных сообществ в кишечнике.

Материалы и методы

Объект исследования.

В эксперименте использовали молодь стерляди и осетра в возрасте 21 дня. Выращивание молоди стерляди проводилось в установке замкнутого водоснабжения (УЗВ). Гидрохимические режимы поддерживались в оптимальных для вида диапазонах: температура воды — 20–22 °С, концентрация растворенного кислорода — не менее 7,0 мг/л, уровень pH — 7,2–7,6. Содержание токсичных соединений азота не превышало: аммиак (NH_3) — 0,05 мг/л, нитриты (NO_2^-) — 0,1 мг/л. Кратность водообмена в бассейнах составляла 1–2 объема в час.

Плотность посадки молоди находилась в пределах 1,5–2,0 кг/м³. Освещение — рассеянное, с фотопериодом 14 часов светлого времени в сутки. Кормление осуществлялось специализированными стартовыми комбикормами для осетровых рыб с частотой 6–8 раз в сутки в соответствии с массой тела.

Схема эксперимента

Для проведения эксперимента молодь стерляди была разделена на три группы по 30 шт: здоровые, больные тимпанией и выздоровевшие при получении живого корма, в виде мотыля. Все группы содержались отдельно. Для исследования отбирали образцы воды, фекалий и содержимое кишечника. Образцы исследовали методами ПЦР и микробиологии, с целью определить состав микрофлоры. Схема приведена на рисунке 1.

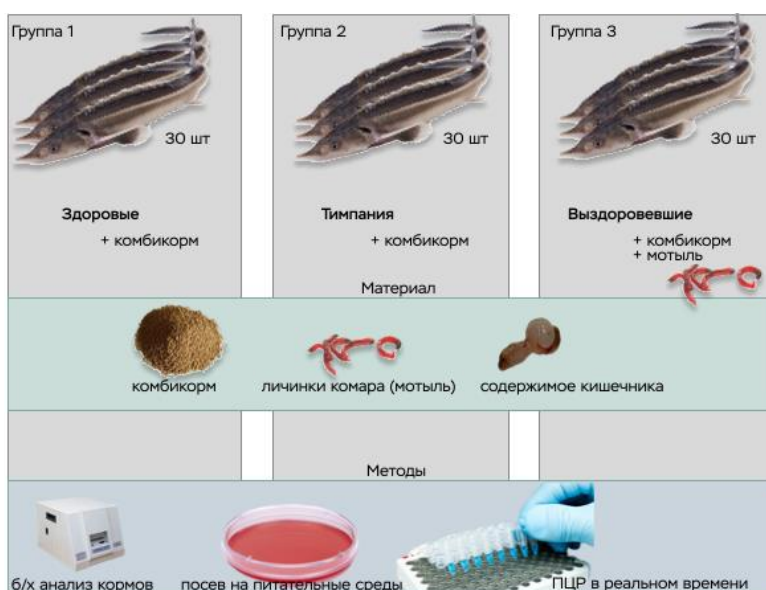


Рисунок 1. Схема эксперимента

Методика определения процентного содержания аминокислот в комбикорме и живом корме

Анализ свободных аминокислот проводили методом капиллярного электрофореза на системе «Капель-205» с УФ-детекцией при 200 нм. Использовали кварцевый капилляр (50 мкм × 60 см) с фоновым электролитом на основе 100 мМ фосфорной кислоты и цетилтриметиламмония бромидом (рН 2.0). Пробу вводили гидродинамически (5 сек, 0.5 бар), разделение проводили при напряжении +30 кВ и температуре 25°C.

Перед анализом образцы готовили путем осаждения белков ацетонитрилом с последующей фильтрацией через мембраны 0.45 мкм. Калибровку выполняли по стандартным растворам аминокислот в диапазоне концентраций 10-200 мкг/мл. Идентификацию пиков проводили по времени миграции, количественное определение – по площадям пиков методом калибровочного графика.

Межсуточная воспроизводимость метода (n=5) составляла $\leq 3.5\%$ по времени миграции и $\leq 5.2\%$ по площадям пиков. Пределы обнаружения находились в диапазоне 1.5-3.0 мкг/мл для различных аминокислот. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Statistica 10.0.

Отбор проб от мальков осетра

В ходе эксперимента был осуществлен забор кишечного содержимого и фекалий, а также пробы воды. Рыбы индивидуально взвешивались до и после эксперимента перед забоем.

Для отбора проб из кишечника использовались стерильные чашки Петри (Перинт, Россия), на которые помещали ЖКТ осетров. Далее в боксе микробиологической безопасности (BSL II) содержимое извлекали и переносили в стерильные 1,5 мл пробирки (Biofil, Китай). Образцы фекалий и воды собирались в стерильные пробирки (15 мл, Biofil, Китай, кат. №: CTF010150). Образцы фекалий хранились - для микробиологических работ в 20% глицерине (CAS 56-81-5, CDH, Индия) на -80°C, а для выделения ДНК в 1^х PBS на -20°C. Взвешивание осуществлялось на лабораторных весах (Сартогосм SE224 +, Россия) с точность 0,001 г.

Выделение ДНК из содержимого кишечника и фекалий на колонках

Выделение ДНК содержимого кишечника и фекалий для последующего секвенирования, осуществляли с помощью набора от BioLabmix (Россия, кат. №: DU-10) по стандартному протоколу. Концентрацию полученной ДНК измеряли на приборе EzDrop1000C (Blue-Ray Biotech, Китай).

Методика посева содержимого кишечника и фекалий от осетров

Образцы объёмом 1 мл титровали с однократным фосфатным буфером (DPBS, StemCell Technologies). Далее высевали 100 мкл соответствующего десятикратного разведения на плотную питательную среду Starch agar plate для получения единичных колоний микроорганизмов. Чашки инкубировали в аэробных и анаэробных условиях в термостате при 37 °С в течение 24-48 часов, после чего производили качественную оценку разнообразия выросших колоний.

Для дальнейшего изучения видового разнообразия анаэробных микроорганизмов и их свойств производили пересев колоний на кровяной агар в анаэробных условиях с дальнейшей инкубацией в анаэроостате при 37 °С в течение 3-5 суток.

Молекулярно-генетический анализ

Для определения наличия бактерий в образцах фекалий и кишечнике был проведен анализ образцов методом ПЦР в реальном времени со специфичными праймерами. Праймеры подбирали в программе NCBI Primer Blast и синтезировали в компании Биоссет, Новосибирск. Праймеры использованные в данном исследовании представлены в таблице 1. Реакционная смесь (20 мкл) содержала смесь BioMaster HS qPCR SYBR Blue 1^x (Биолабмикс, Россия), соответствующие праймеры (300 нм) и 50 нг бактериальной ДНК. ПЦР проводили в системе детекции в реальном времени на приборе DTlite 4, ДНК-Технология. ДНК денатурировали в течение 3 мин при 95 °С; затем проводили 40 циклов: денатурация - 95 °С, 10 с; отжиг праймера - 60 °С, 20 с; элонгация - 72 °С, 20 с.

Количественное определение относительного содержания целевых таксонов в составе бактериального сообщества проводили методом количественной ПЦР в реальном времени (qPCR). Специфичные олигонуклеотидные праймеры, нацеленные на консервативные участки гена 16S рРНК, использовали для оценки общей бактериальной биомассы, в то время как таксон-специфичные праймеры применяли для детекции целевых филогенетических групп. Ключевым измеряемым параметром выступал пороговый цикл амплификации (Ct). Расчет относительного содержания проводили с использованием математической модели $\Delta\Delta C_t$, которая учитывает эффективность амплификации для каждого праймерного набора и позволяет получать результат в виде отношения количества ДНК целевого таксона к общей бактериальной ДНК, что и представляет собой искомую относительную долю в составе сообщества.

Таблица 1. Используемые праймеры

Название	Последовательность 5'-3'
16S F	TCCTACGGGAGGCAGCAG

16S R	ATTACCGCGGCTGCTGG
Fusobacterium_R	CGAATTTACCTCTACACTTGT
Fusobacterium_F	GATCCAGCAATTCTGTGTGC
Clostridium_R	TTCTTCCTAATCTCTACGCA
Clostridium_F	AAAGAAGATTAATACCGCATA
Bacteroides_F	CTGAACCAGCCAAGTAGCGT
Bacteroides_R	CGCAATCGGAGTTCTTCGTG
Lactobacillus_F	ATCTTCCACAATGG(G/A)CGC
Lactobacillus_R	GGCTGCTGGCACGTAGTTAG
Bifidobacterium_F	CCCCACATCCAGCATCCA
Bifidobacterium_R	CGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG

Статистический анализ.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения *SPSS Statistica, Past*. Для оценки достоверности различий между контрольной и опытными группами применяли непараметрический критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U test) в случае отклонения распределения от нормального или t-критерий Стьюдента (Student's t-test) для независимых выборок при выполнении условий нормальности и гомоскедастичности. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk test). Уровень значимости ($p < 0.05$).

Результаты и их обсуждение

Анализ состава аминокислотной последовательности комбикорма и живого корма

С целью подтверждения гипотезы о том, что развитие тимпаний у исследуемых организмов не обусловлено дефицитом аминокислот, был проведен сравнительный анализ аминокислотного профиля двух типов кормовых субстратов: промышленного комбикорма и живого корма (мотыля). В рамках эксперимента осуществлено

количественное определение содержания незаменимых и заменимых аминокислот в обоих видах питания с применением стандартизированных биохимических методик. Результаты представлены в таблице 2 и на рисунке 2. Полученные экспериментальные данные демонстрируют, что процентное содержание аминокислот в комбикорме в среднем на порядок (в 10 раз) превышает аналогичные показатели для мотыля. Эти результаты объективно свидетельствуют о том, что этиология тимпании не может быть сведена к аминокислотному голоданию, поскольку даже при значительном дефиците аминокислот в рационе (на примере питания мотылем) патологическое состояние не пропорционально уровню аминокислотной недостаточности. Таким образом, полученные эмпирические данные позволяют исключить аминокислотный дефицит из числа первопричин развития тимпании и ориентируют на поиск иных патогенетических механизмов данного состояния.

Таблица 2. Процентное содержание аминокислот в комбикорме и в живом корме.

Наименование аминокислоты	Содержание аминокислоты в комбикорме, %	Содержание аминокислоты в мотыле, %
аргинин	6.395	0.58
лизин	4.605	0.405
тирозин	1.625	0.135
фенилаланин	2.3	0.29
гистидин	1.285	0.155
лейцин+изолейцин	6.7	0.625
метионин	1.35	0.055
валин	2.315	0.265
пролин	2.985	0.42
треонин	2.115	0.235
серин	2.3	0.255
аланин	3.52	0.41

ГЛИЦИН	3.06	0.24
--------	------	------

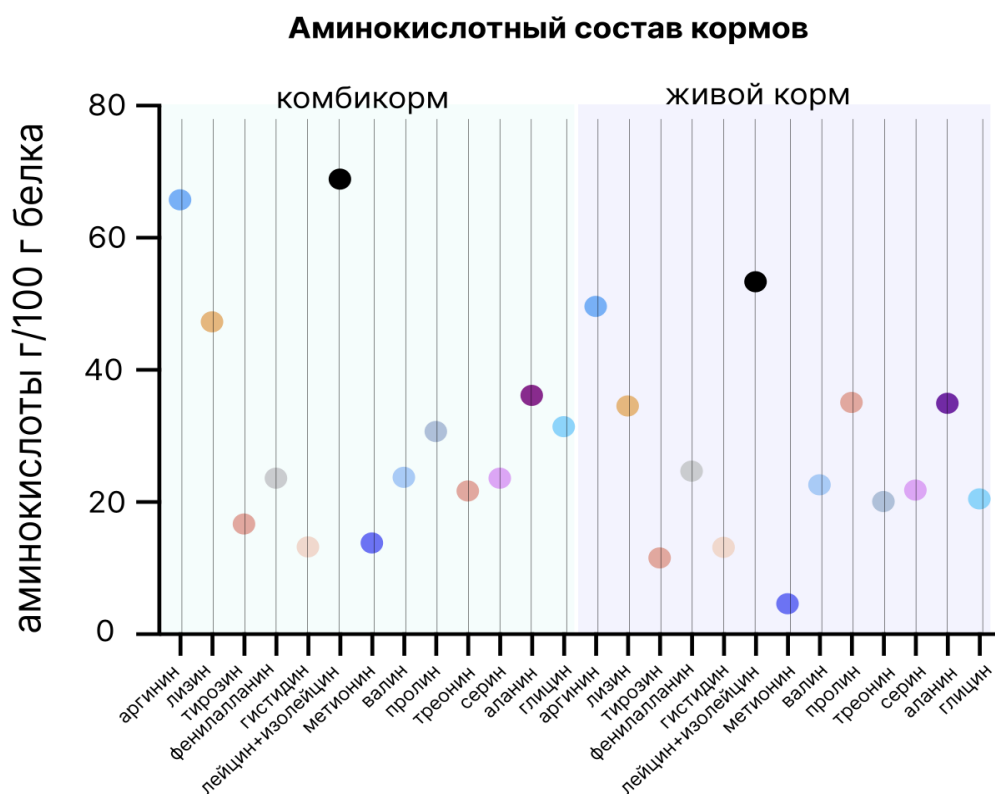


Рисунок 2. Аминокислотный состав кормов для кормления осетровых рыб.

Масса мальков осетров в эксперименте

На рисунке 3 представлена диаграмма с данными по средней массе мальков трёх экспериментальных групп: клинически здоровые особи (группа «Здоровые»), особи, перенёвшие заболевание и восстановившиеся (группа «Выздоровевшие»), и особи с клиническими признаками тимпании (группа «Тимпания»). Статистический анализ выявил достоверные межгрупповые различия. Группа здоровых мальков характеризовалась статистически значимо наибольшими значениями массы тела. Особи с тимпанией продемонстрировали наименьшую среднюю массу, что является следствием дисбиотических нарушений и дисфункции желудочно-кишечного тракта, ведущих к снижению усвоения питательных веществ. Промежуточные значения массы в группе «Выздоровевшие» указывают на частичное восстановление ростовых показателей после перенесенного заболевания.

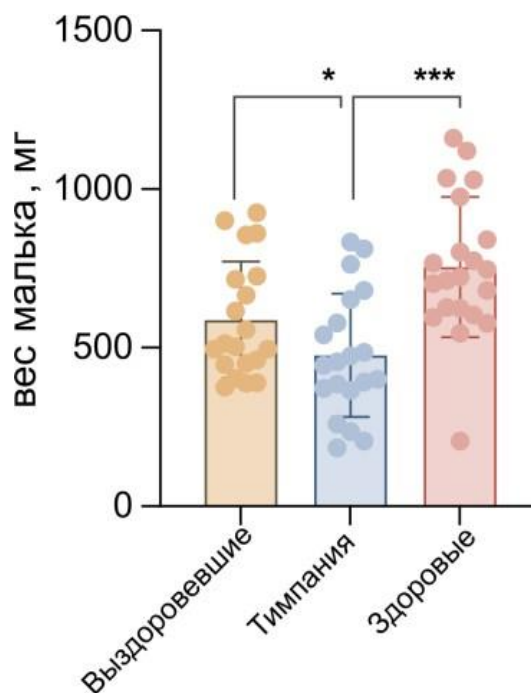


Рисунок 3. Масса мальков в эксперименте. Столбцы диаграммы отображают средние значения, вертикальные линии — стандартную ошибку среднего (SEM), * — $p < 0,05$, *** — $p < 0,001$.

Анатомо-морфологическая картина желудочно-кишечного тракта при вскрытии мальков осетров

Вскрытие мальков первой линии эксперимента проводили в возрасте 25-и дней. При вскрытии оценивали анатомо-топографическое положение желудка и кишечника в группах здоровых и больных осетров. В группе больных рыб обнаружено сильное острое расширение желудка и сильное вздутие кишечника (Рис 4А). В группе здоровых осетров патологических изменений не обнаруживали (Рис 4Б), а в группе рыб, вылеченных мотылем, желудок и кишечник выглядели здоровыми и были наполнены мотылем (Рис 4В).

А



Б



В



Рисунок 4. Фотографии желудка и кишечника осетров разных групп. А - мальков осетров с признаками тимпании, Б - здоровых мальков осетров, В - осетров, вылеченных мотылем.

Определение состава кишечной микробиоты методом ПЦР в реальном времени

Известно, что спиральный клапан – это специализированный отдел средней кишки (у костистых рыб она редуцирована, у осетровых – развита). Представляет собой спиралевидную складку слизистой оболочки, закрученную в просвете кишечника наподобие пружины или штопора. Эта складка многократно увеличивает площадь всасывающей поверхности и основная ее функция всасывание питательных веществ, замедление пассажа и формирование локализации основных симбионтных консорциумов для ферментации пищеварительного комка. Методом ПЦР в реальном времени были проанализированы образцы ДНК, выделенных из трёх групп рыб — здоровых, с тимпанией и выздоровевших, — из двух отделов ЖКТ: желудка и спирального клапана. Определялось относительное содержание бактерий различных родов в микробиоте с использованием математической модели $\Delta\Delta C_t$.

Бактерии типов *Bacteroidetes* и *Firmicutes* могут оказывать благоприятное воздействие на метаболизм и желудочно-кишечный тракт в целом, поскольку участвуют в производстве бутирата и других короткоцепочечных жирных кислот. Последние необходимы для питания и энергообмена эпителиальных клеток кишечника. *Firmicutes*, к которым в том, числе относятся полезные бактерии: *Faecalibacterium* (Фекалобактерии), *Ruminococcus* (Руминококки), *Eubacterium* (Эубактерии), *Blautia* (Блаутия), *Roseburia* (Розебурия), *Coprococcus* (Копрококки), *Lactobacillus* (Лактобациллы), осуществляют подавление патогенной микрофлоры, участвуют в защитных механизмах стенок кишечника, и синтезируют гамма-аминомасляную кислоту, которая отвечает за внимание и двигательный контроль. Многие из этих бактерий осуществляют разложение сахаров, контроле воспаления, с помощью взаимодействия с иммунными клетками посредством бактериальных белковых молекул [16]. Ученые полагают, что бактерии типа *Firmicutes* связаны с такими заболеваниями как ожирение и диабет. Так, одно из исследований показало: в микробиоте пациентов с ожирением было больше бактерий типа *Firmicutes*, а в кишечнике здоровых участников наблюдалось большее количество бактерий типа *Bacteroidetes* [17]. Помимо полезных семейств к фирмикутам относятся патогенные представители, среди которых: золотистый стафилококк, столбнячная палочка или известная многим бактерия *Clostridium difficile*.

Нами с помощью праймеров на *Clostridium*, были выявлены представители типа *Firmicutes* (Рис.5). Выявлено наличие *Clostridium* во всех трех группах, но статистических различий между группами сравнения не наблюдалось.

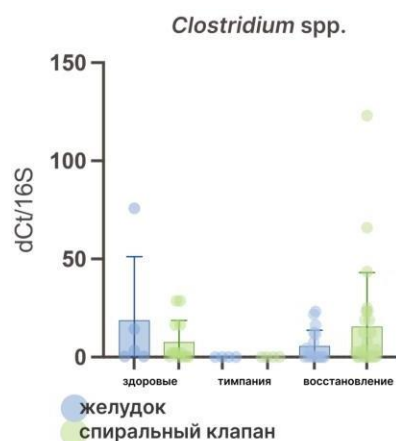


Рисунок 5. Диаграмма относительного содержания бактерий рода *Clostridium*.

Также был проведен анализ на наличие рода *Lactobacillus* типа *Firmicutes* (Рис.6). При анализе ПЦР в реальном времени выявили достоверные отличия по отделам кишечника у здоровых и больных $p < 0,05$, а у выздоровевших $p < 0,001$. В спиральном клапане отличаются достоверно $p < 0,01$ группы здоровые-тимпания и здоровые-выздоровевшие, но в отношении выздоровевшие и больные достоверных отличий не выявлено. В желудке между всеми группами есть достоверное отличие здоровые-тимпания $p < 0,05$, а два других отношения оцениваются $p < 0,001$. Наличие патологии (тимпании) оказывает достоверное влияние ($p < 0,001$) на распределение бактерий рода *Lactobacillus* в отделах ЖКТ.

Такие данные позволяют сказать, что бактерии рода *Lactobacillus* у здоровых рыб локализованы больше в спиральном клапане, а у больных тимпанией – в желудке. У здоровых рыб бактерии рода *Lactobacillus* в большей степени локализованы в спиральном клапане, что, вероятно, отражает их нормальную экологическую нишу, связанную с процессами ферментации в задних отделах кишечника. При тимпании наблюдается значимое перераспределение в сторону желудка. Это может быть следствием некоторых изменений, например, изменения моторики и pH в ЖКТ, создающих условия для колонизации желудка, компенсаторного роста данных бактерий как ответа на дисбиоз и воспаление или смещения общей микробной массы из-за нарушения пищеварения.

А также выявлено, что относительное количество данного рода в желудке меньше всего у выздоровевших рыб, чем у здоровых и больных, что так же может быть следствием некоторых предполагаемых факторов, таких как, нормализация микробиоты после восстановления

У выздоровевших рыб выявлено наименьшее относительное количество *Lactobacillus* в желудке по сравнению со здоровыми и больными особями. Это может быть обусловлено рядом факторов: нормализацией микробиоты после устранения патологии (снижение доминирования *Lactobacillus*, характерного для острой фазы болезни), длительной иммунной регуляцией (селективное подавление бактериальной популяции во время воспаления), долгосрочными изменениями среды (трансформация условий слизистой или секреторной функции желудка) либо усилением конкуренции со стороны других восстановившихся таксонов микрофлоры, вытесняющих *Lactobacillus* из желудочной ниши. Таким образом, динамика данного рода служит чувствительным индикатором как патологического состояния, так и этапа постинфекционного восстановления экосистемы желудочно-кишечного тракта.

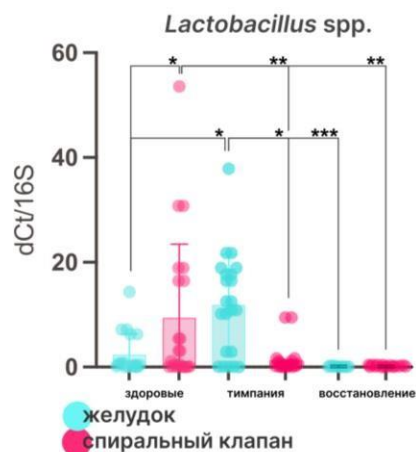


Рисунок 6. Диаграмма относительного содержания бактерий рода *Lactobacillus*. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$.

Помимо этого, нами были обнаружены представители рода *Fusobacteria* (Рис.7). Но статистическая обработка результатов показала, что достоверных различий между группами сравнения не наблюдается.

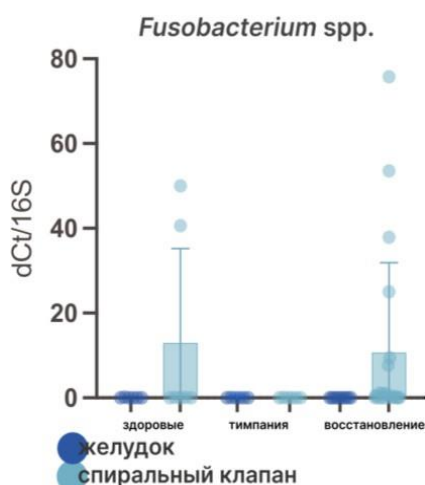


Рисунок 7. Диаграмма относительного содержания бактерий рода *Fusobacteria*.

Одним из значимых для понимания механизма развития тимпании у мальков осетров, разводимых в неволе, является обнаружение бактерий класса *Bacteroides*. Анализ бактерий рода *Bacteroides* показал статистическое различие ($p < 0,001$) количества бактерий в желудке и спиральном клапане в группах здоровые и тимпания (Рис.8). При этом есть достоверное отличие по отделам ЖКТ $p < 0,01$.

Данные результаты позволяют сделать заключение, что относительное содержание этих бактерий больше в желудке, чем в спиральном клапане.

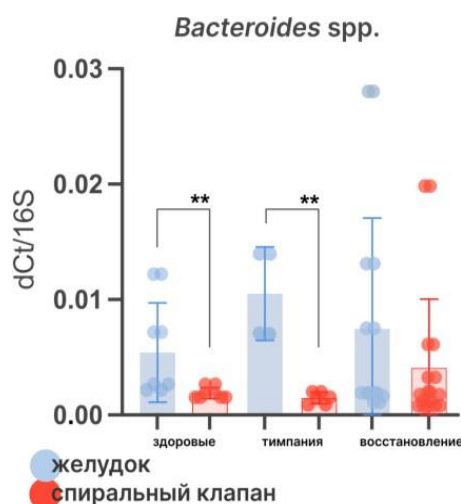


Рисунок 8. Диаграмма относительного содержания бактерий рода *Bacteroides*. ** — $p < 0,01$

Также во всех группах были обнаружены бактерии рода *Bifidobacterium*. При анализе было показано статистическое различие ($p < 0,05$) по отделам ЖКТ только в группе рыб с тимпанией, которое показывает преимущественное расположение данных бактерий в желудке относительно спирального клапана у рыб больных тимпанией.

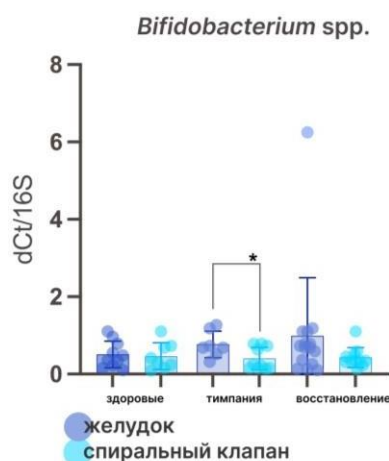


Рисунок 9. Диаграмма относительного содержания бактерий рода *Bifidobacterium*. * — $p < 0,05$

Определение состава микробиоты мотыля методом ПЦР в реальном времени

Также нами были определены методом ПЦР в реальном времени относительное содержание некоторых из бактерий в живом корме. Статистическая обработка данных показала, что в мотыле относительное содержание *Fusobacterium* и *Clostridium* больше, чем *Bacteroides* (Рис.10). Интересно, что в живом корме преобладают бактерии родов склонных вызывать проблемы с ЖКТ, чем рода *Bacteroides*. Но несмотря на такое распределение, мотыль, который был анализирован методом ПЦР положительно влиял на улучшение состояния больных тимпанией рыб.

Этот результат позволяет предположить наличие у живого корма сложных компенсаторных механизмов или иных благоприятных свойств, которые компенсируют потенциальные риски, связанные с его специфическим микробиомом, и открывает перспективы для дальнейшего изучения взаимодействия между диетой, микробиотой хозяина и его физиологией.

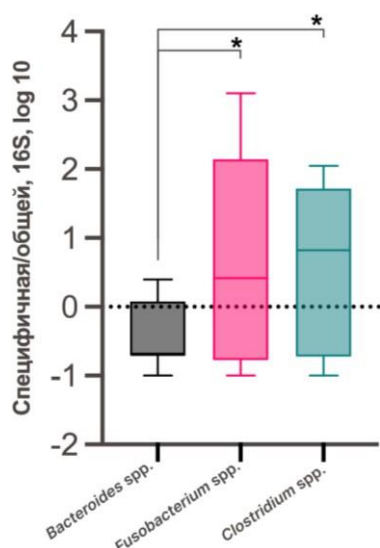


Рисунок 10. Диаграмма относительного содержания бактерий родов *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium* в живом корме (мотыле). * — $p < 0,05$.

Микробиологические исследования

По результатам микробиологических исследований, на кровяном агаре были обнаружены мелкие (1-3 мм) выпуклые пигментированные колонии бактериодов (Рис.11). С чашек собиралась суспензия бактерий и загружалась в гель для дальнейшего эксперимента.



Рисунок 11. Чашки с кровяным агаром. Мелкие белые, круглые колонии бактерий относящихся к *Bacteroides*.

Заключение

Проведённое исследование позволило выявить ключевые механизмы, лежащие в основе развития тимпаний у молоди осетровых рыб в критический период перехода на искусственные комбикорма. Полученные результаты убедительно свидетельствуют о том, что возникновение этого патологического состояния напрямую связано не с нутритивным дефицитом корма, а с вызванными им глубокими дисбиотическими нарушениями в желудочно-кишечном тракте. У больных особей наблюдается перераспределение бактериальных сообществ между отделами кишечника и изменение их таксономического профиля, что сопровождается функциональными расстройствами пищеварения, снижением темпов роста и увеличением смертности.

Экспериментально подтверждён терапевтический эффект живого корма (мотыля), применение которого не только приостанавливало клинические проявления тимпаний, но и способствовало частичному восстановлению микробного баланса. Этот факт указывает на наличие в естественной диете специфических модулирующих факторов, благотворно влияющих на микробиоту хозяина.

Таким образом, поддержание стабильного эубиоза кишечника выступает определяющим условием успешной адаптации молоди осетровых к технологическим рационам. Результаты работы формируют научную базу для разработки новых практических решений в аквакультуре, таких как создание целевых пробиотических комплексов и оптимизированных схем кормления, направленных на профилактику дисбиоза и связанных с ним заболеваний. Внедрение этих подходов будет способствовать повышению выживаемости, сохранению здоровья и увеличению продуктивности ценных видов рыб на рыбоводных предприятиях.

Финансирование

Данная работа была выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 25-26-00150.

Список литературы

1. Chandra G., Fopp-Bayat D. Trends in aquaculture and conservation of sturgeons: a review of molecular and cytogenetic tools // Rev. Aquac. 2021. Т. 13, № 1. С. 119–137.

2. Johnson P. и др. Conservation aquaculture of wild-origin offspring preserves genetic diversity in an endangered population of white sturgeon // *Conserv. Genet.* 2025. Т. 26, № 2. С. 335–346.
3. Nie P. More and diverse contributions from aquaculture // *Rev. Aquac.* 2023. Т. 15, № 1. С. 2–2.
4. Vasilyeva L.M. и др. History, current status and prospects of sturgeon aquaculture in Russia // *Aquac. Res.* 2019. Т. 50, № 4. С. 979–993.
5. Sustainable aquaculture development: a review on the roles of cloud computing, internet of things and artificial intelligence (CIA) - Mustapha - 2021 - *Reviews in Aquaculture* - Wiley Online Library [Электронный ресурс]. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/raq.12559> (дата обращения: 01.11.2025).
6. Das P. и др. IMPORTANT LIVE FOOD ORGANISMS AND THEIR ROLE IN AQUACULTURE. 2012. С. 69–86.
7. Improvement of nutritional quality of live feed for aquaculture: An overview - Kandathil Radhakrishnan - 2020 - *Aquaculture Research* - Wiley Online Library [Электронный ресурс]. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/are.14357> (дата обращения: 01.11.2025).
8. Ivanovna S.V. и др. NUTRITIONAL VALUE OF STARTERFEED FOR VALUABLE TYPES OF FISH GROWN IN COMMERCIAL CONDITIONS // *Vestn. Astrakhan State Tech. Univ. Ser. Fish. Ind.* 2019. № 3. С. 97–106.
9. Абросимова К.С. Оптимизация кормов и кормления молоди осетровых рыб для профилактики и лечения тимпаний в интенсивной аквакультуре. 2015. С. 22.
10. Hao Q. и др. Influence of diet shift from bloodworm to formulated feed on growth performance, gut microbiota structure and function in early juvenile stages of hybrid sturgeon (*Acipenser baerii* × *Acipenser schrenckii*) // *Aquaculture*. 2021. Т. 533. С. 736165.
11. Lee S. и др. Feeding Strategies for Adapting Lake Sturgeon (*Acipenser fulvescens*) Larvae to Formulated Diets at Early Life Stages // *Animals. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2022. Т. 12, № 22. С. 3128.
12. Mutuyemungu E. и др. Intestinal gas production by the gut microbiota: A review // *J. Funct. Foods*. 2023. Т. 100. С. 105367.
13. Абросимова К.С., Абросимова Н.А., Васильева (Неклёсова) Л.М. Проблемы Выращивания Личинок И Мальков Осетровых Рыб В Интенсивной Аквакультуре И Пути Их Решения // *Фундаментальные Исследования*. 2015. № 2–9. С. 1882–1886.

14. Rohani M.F. и др. Probiotics, prebiotics and synbiotics improved the functionality of aquafeed: Upgrading growth, reproduction, immunity and disease resistance in fish // *Fish Shellfish Immunol.* 2022. Т. 120. С. 569–589.
15. Abdul Razak S. и др. Compositional Dynamics of Gastrointestinal Tract Microbiomes Associated with Dietary Transition and Feeding Cessation in Lake Sturgeon Larvae // *Microorganisms.* 2022. Т. 10, № 9. С. 1872.
16. Lactobacilli at the Front Line of Defense Against Vaginally Acquired Infections: Future Microbiology: Vol 6, No 5 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2217/fmb.11.36> (дата обращения: 27.10.2025).
17. Human gut microbes associated with obesity | Nature [Электронный ресурс]. URL: <https://www.nature.com/articles/4441022a> (дата обращения: 01.11.2025).