АКВАКУЛЬТУРА

УДК 639.3.07:576.8

В.Е. Терехова^{1,2}, Н.Л. Белькова^{3*}¹ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского,
690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17;² Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,
690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4;³ Лимнологический институт СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ДРОЖЖЕВОЙ ФЛОРЫ
ОСЕТРОВЫХ РЫБ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ИХ СОСТОЯНИЯ
В АКВАКУЛЬТУРЕ

В 2008–2009 гг. исследованы сезонные изменения численности и видового состава дрожжевой флоры органов разновозрастной молоди осетровых рыб при тепловодном садковом выращивании на Лучегорской НИС ТИНРО-центра. Установлено, что грибковое сообщество осетровых рыб представлено молочными, пивными и винными типами дрожжей, большинство из которых обладают пробиотическими свойствами. Показано, что такие виды, как *Naganishia albida*, *Papiliotrema laurentii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichomonascus ciferrii*, а также грибы рода *Candida*, обнаруженные в кишечнике и на жабрах молоди калуги и амурского осетра, являются производными микрофлоры воды в садках для содержания рыбы. Грибы видов *Cryptococcus neoformans* и *Ogataea angusta* обнаружены исключительно в воде. Представители рода *Hanseniaspora*, а также виды *Rhodotorula mucilaginosa* и *Cystobasidium minuta* ассоциированы с органами осетровых рыб. Изучение сезонных изменений структуры всего сообщества культивируемых гетеротрофных микроорганизмов исследованных биотопов выявило ингибирующую активность грибковой флоры в отношении плесеней и энтеробактерий. Установлены сезонные изменения интенсивности колонизации слизистых гидробионтов пробиотическими дрожжами, что не может не сказаться на состоянии местного иммунитета молоди осетров. Таким образом, полную элиминацию дрожжей со слизистых осетровых рыб следует рассматривать как предиктор ухудшения их физиологического состояния и квалифицировать как абсолютное показание для проведения внеплановых мероприятий по иммунокоррекции аквакультурантов.

Ключевые слова: осетровые рыбы, дрожжевая флора, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Candida*, мониторинг.

Terekhova V.E., Bel'kova N.L. Prospects of studies on the yeast flora of sturgeons for monitoring of their state in aquaculture // Izv. TINRO. — 2017. — Vol. 189. — P. 171–176.

Seasonal changes in abundance and species composition of the yeast flora from organs of juvenile sturgeons were traced during their growing in the warm-water ponds of Luchegorsk Research Station of the Pacific Fish. Res. Centre (TINRO) in 2008–2009. The fungal community of the sturgeons was represented by whey, brewers, and wine yeasts, mostly with probiotic properties.

* Терехова Валерия Евгеньевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, e-mail: veter186@yandex.ru; Белькова Наталья Леонидовна, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник, e-mail: nlbelkova@gmail.com.

Terekhova Valeria E., Ph.D., senior researcher, e-mail: veter186@yandex.ru; Bel'kova Natalia L., Ph.D., associate professor, senior researcher, e-mail: nlbelkova@gmail.com.

Naganishia albida, *Papiliotrema laurentii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichomonascus ciferrii*, and fungi of the genus *Candida* were found in the intestines and gills of kaluga and siberian sturgeon juveniles, but they came from the water and are usual for microflora of cages for fish cultivation. *Cryptococcus neoformans* and *Ogataea angusta* were found in the water only. *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cystobasidium minuta* and fungi of the genus *Hanseniaspora* were associated with the sturgeon organs. Generally the yeast heterotrophic microbiota in the cages showed inhibitory effect against mould and enterobacteria. Colonization of the sturgeon mucous membranes by yeasts had seasonal dynamics that definitely affected on local immunity of the juveniles. Complete elimination of the yeasts from the sturgeon mucous membranes should be considered as a predictor of worsening of their physiological state and anti-epizootic measures are necessary in this case.

Key words: sturgeon, yeast, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Candida*, monitoring of microbiota.

Введение

Развивающиеся технологии искусственного воспроизводства рыб в значительной степени влияют на среду обитания гидробионтов, контроль состояния которой обеспечивает определение экологически значимой нагрузки, своевременное проведение профилактических и оздоровительных мероприятий и, как следствие, стабильную экономическую выгоду предприятий. Выбор эффективных организмов-биоиндикаторов, наличие, количество или особенности развития которых характеризуют физиологическое состояние аквакультурантов, условия их содержания или антропогенные изменения водной среды (Биологический контроль..., 2007), является актуальной биотехнологической задачей.

Целью работы стало исследование дрожжевой флоры молоди осетровых рыб и оценка перспектив ее использования как индикаторной группы микроорганизмов для мониторинга состояния рыб при тепловодном садковом выращивании.

Материалы и методы

Модельными объектами выбраны молодь калуги *Huso dauricus* (сеголетки, двух-, трехлетки) и амурского осетра *Acipenser schrenckii* (сеголетки, четырехлетки), поскольку исследования структуры сообществ культивируемых гетеротрофных организмов (КГМ), ассоциированных с данными видами осетровых рыб, ранее не выполнялись.

Отбор проб для микробиологических исследований проводили на Лучегорской НИС ТИНРО-центра в 2008 и 2009 гг. ежеквартально с весны по осень, с учетом хода температуры воды в рыбоводных садках.

В процессе работы было исследовано: 23 пробы воды из садков для выращивания рыбы; 42 пробы содержимого кишечника молоди осетровых; 42 смыва с жабр. Всего проанализировано 107 проб.

Вскрытие рыбы, забор биологического материала и микробиологический анализ отобранных образцов проводили по общепринятой методике (Лабораторный практикум..., 1983). Численность представителей семейств *Vibrionaceae* и *Enterobacteriaceae*, грамотрицательных неферментирующих бактерий (гр.- НФБ), грамположительных кокков (гр.+ кокки) и палочек (гр.+ палочки), а также грибов определяли с использованием чашечного метода Коха на среде СММ (Youchimizu, Kimura, 1976), Эндо, желточно-солевым агаре и среде Сабуро (Руководство..., 1983).

Для определения биохимической активности изолятов применяли тесты API 20 E, API 20 NE, API 20 C AUX, API Staph, API 20 Strep, API 50 CH производства bioMérieux (Франция). Идентификацию культур проводили с использованием программы *ariweb* V1.2.1 по совокупности культуральных, тинкториальных и биохимических свойств (Austin, Austin, 2007). Идентификацию плесневых грибов (обозначенных в таблице как «плесени») не проводили, учитывали только их общую численность на среде Сабуро.

Результаты и их обсуждение

В 2008–2009 гг. на Лучегорской НИС наблюдали некоторые тенденции сезонных изменений сообщества КГМ органов осетровых рыб, а также воды в садках для их содержания (см. таблицу).

Структура сообщества культивируемых гетеротрофных микроорганизмов (КГМ)
осетровых рыб при тепловодном садковом выращивании
Structure of the cultivated heterotrophic microorganisms community (CHM)
of sturgeons during warm-water cultivation

Сезон года	Возрастная группа рыб	Доля отдельных групп микроорганизмов от общей численности КГМ в различных биотопах, %					
		Вода из садков		Содержимое кишечника		Смыв с жабр	
Калуга (<i>Huso dauricus</i>)							
Весна, 14–16 °С	Трехлетки	<i>Гр.</i> + кокки	99,0	Дрожжи	71,5	Дрожжи	96,0
		Дрожжи	0,9	<i>Гр.</i> + кокки	21,8	Enterobacteriaceae	2,6
		Прочие	< 1,0	<i>Гр.</i> - НФБ	5,1	Vibrionaceae	1,3
				Enterobacteriaceae	1,3	Прочие	< 1,0
	Двухлетки	<i>Гр.</i> + кокки	98,7	Дрожжи	53,0	Дрожжи	96,0
		Дрожжи	1,0	<i>Гр.</i> + кокки	35,9	Enterobacteriaceae	2,6
		Прочие	< 1,0	<i>Гр.</i> - НФБ	6,7	Vibrionaceae	1,3
				Enterobacteriaceae	3,5	Прочие	< 1,0
	Трехлетки	Дрожжи	97,8	Плесени	57,1	Плесени	75,0
		<i>Гр.</i> + кокки	1,3	<i>Гр.</i> - НФБ	30,9	<i>Гр.</i> - НФБ	12,4
		Прочие	< 1,0	Vibrionaceae	9,5	<i>Гр.</i> + кокки	9,4
				<i>Гр</i> + кокки	1,3	Дрожжи	3,1
	Двухлетки	Дрожжи	63,1	Дрожжи	1,2	Прочие	< 1,0
		Плесени	36,1	<i>Гр.</i> - НФБ	62,5	Плесени	90,0
		Прочие	< 1,0	Плесени	25,0	<i>Гр.</i> + кокки	9,1
				Дрожжи	6,2	Прочие, включая дрожжи	< 1,0
Осень, 14–16 °С	Трехлетки, двухлетки, сеголетки	Плесени	99,1	Плесени	99,1	Плесени	99,1
		Прочие	< 1,0	Прочие	< 1,0	Прочие	< 1,0
Осень, 10–12 °С	Трехлетки	<i>Гр.</i> - НФБ	61,9	Vibrionaceae	62,5	Vibrionaceae	46,2
		Vibrionaceae	19,1	Enterobacteriaceae	21,9	Enterobacteriaceae	44,4
		Enterobacteriaceae	9,5	<i>Гр.</i> - НФБ	15,6	<i>Гр.</i> - НФБ	9,2
		Дрожжи	9,5			Прочие	< 1,0
	Двухлетки	<i>Гр.</i> - НФБ	81,3	Vibrionaceae	87,7	Enterobacteriaceae	80,9
		Enterobacteriaceae	18,7	<i>Гр.</i> - НФБ	12,2	Vibrionaceae	18,7
				Прочие	< 1,0	Прочие, включая дрожжи	< 1,0
	Сеголетки	<i>Гр.</i> - НФБ	62,5	Vibrionaceae	51,2	<i>Гр.</i> - НФБ	81,6
		Vibrionaceae	25,0	<i>Гр.</i> - НФБ	25,6	Vibrionaceae	13,6
	Enterobacteriaceae	12,5	Enterobacteriaceae	21,3	Enterobacteriaceae	4,6	
			Дрожжи	1,7	Прочие	< 1,0	
			Прочие	< 1,0			
Амурский осетр (<i>Acipenser schrenckii</i>)							
Весна, 4–5 °С	Четырех-летки	<i>Гр.</i> - НФБ	73,4	<i>Гр.</i> - НФБ	71,5	Плесени	78,0
		Плесени	12,3	<i>Гр.</i> + кокки	27,7	<i>Гр.</i> - НФБ	11,1
		<i>Гр.</i> + кокки	10,7	Прочие, включая дрожжи	< 1,0	Enterobacteriaceae	6,8
		Vibrionaceae	3,3			<i>Гр.</i> + кокки	3,4
		Прочие, включая дрожжи	< 1,0			Прочие	< 1,0
	Четырех-летки	Плесени	77,7	Плесени	73,9	Плесени	85,9
		<i>Гр.</i> + кокки	18,5	<i>Гр.</i> + кокки	10,4	<i>Гр.</i> - НФБ	13,7
		<i>Гр.</i> + палочки	3,7	<i>Гр.</i> - НФБ	10,4	Прочие, включая дрожжи	< 1,0
		Прочие	< 1,0	Дрожжи	5,2		
	Сеголетки	<i>Гр.</i> + кокки	78,4	<i>Гр.</i> - НФБ	76,7	<i>Гр.</i> - НФБ	83,2
		Дрожжи	15,6	Плесени	23,2	Плесени	16,7
		Плесени	3,9	Прочие, включая дрожжи	< 1,0	Прочие	< 1,0
		<i>Гр.</i> + палочки	1,5				
Осень, 17–18 °С	Четырех-летки	Прочие	< 1,0				
		<i>Гр.</i> - НФБ	60,4	<i>Гр.</i> + кокки	54,5	<i>Гр.</i> - НФБ	99,9
		<i>Гр.</i> + кокки	39,6	Плесени	45,4	Прочие	< 1,0
				Прочие	< 1,0		

В начале апреля температура воды в садках не поднималась выше 5 °С. В этот период в воде и содержимом кишечника рыб доминировали грамотрицательные неферментирующие бактерии, а на слизистых жабр — плесневые грибы. Во всех исследованных микробиоценозах доля доминант превышала 70 %. Дрожжевая флора составила минорную часть популяции (< 1 %) и была представлена одним видом молочных дрожжей *Papiliotrema laurentii* (Kuff.) X.Z. Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout, 2016 (син. *Cryptococcus laurentii*), обнаруженным в воде садков и содержимом кишечника рыб.

В середине мая температура воды в садках колебалась в диапазоне 14–16 °С. В водном сообществе КГМ отчетливо преобладали грамположительные кокки, доля которых превысила 98 %. Дрожжи были второй по численности группой водных микроорганизмов. Они же доминировали в микробиоценозах содержимого кишечника и слизистой жабр осетровых рыб. В это время дрожжевая флора отличалась большим разнообразием. Помимо обнаруженного ранее вида *P. laurentii* во всех исследованных биотопах выявлены представители рода *Candida*, а в воде — пивные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, 1883 и молочные дрожжи *Naganishia albida* (Saito) X.Z. Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout, 2015 (син. *Cryptococcus albidus*).

К июлю температура воды в садках повысилась до 28–30 °С. В этот период в микробном сообществе органов рыб доминирующие позиции заняли плесневые грибы и грамотрицательные неферментирующие бактерии, а в воде садков — дрожжи. Сообщество дрожжей органов рыб и воды было идентичным по составу и включало в себя представителей рода *Candida* и молочные дрожжи *Trichomonascus ciferrii* (M. Th. Smith, van der Walt & E. Johannsen) Kurtzman & Robnett, 2007 (син. *Stephanoascus ciferrii*).

В 2008–2009 гг. годовой максимум температур на Лучегорской НИС был зафиксирован в августе, когда температура воды в садках достигала 30–31 °С. В этот период наблюдалось увеличение численности грамположительной кокковой флоры. Последняя вошла в тройку доминирующих групп микроорганизмов наряду с плесневыми грибами и грамотрицательными неферментирующими бактериями. Дрожжи по-прежнему занимали все исследованные биотопы, представляя, за редким исключением, минорные группы микробиоценозов. В августе сообщество дрожжей отличалось наибольшим видовым разнообразием. В воде садков обнаружены не встречавшиеся ранее виды молочных *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuill. 1901 и винных дрожжей *Ogataea angusta* (Teun., H.H. Hall & Wick.) Suh & Zhou 2010 (син. *Pichia angusta*). Виды *S. cerevisiae* и *N. albida*, в мае изолированные из воды, выделены из содержимого кишечника. Впервые выявленные представители рода *Hanseniaspora* (син. *Kloeckera*) — винные дрожжи — обнаружены в кишечнике и на жабрах молоди осетровых рыб.

В начале сентября температура воды в садках не превышала 18 °С. В этот период грамотрицательные неферментирующие бактерии заняли лидирующие позиции в микробиоценозах воды и слизистых жабр осетров. Грамположительная кокковая флора и плесневые грибы преобладали в сообществе содержимого кишечника рыб. По сравнению с августом тройка доминирующих групп микроорганизмов исследованных биотопов не изменилась, однако из воды и органов рыб полностью исчезли дрожжи.

В конце сентября температура воды в садках колебалась в диапазоне от 14 до 16 °С. В этот период в микробных ассоциациях воды и органов рыб господствовали плесневые грибы, доля которых превышала 99 %. Дрожжевая флора, как и в начале месяца, отсутствовала во всех исследованных биотопах. Возможно, это обусловлено ежегодным сентябрьским повышением pH воды в приводном канале Приморской ГРЭС, где установлены рыбоводные садки. В сентябре 2008 и 2009 гг. pH воды в садках Лучегорской НИС превышала 8,3 при среднегодовом значении показателя около 7,8. Согласно литературным данным (Берри, 1985) дрожжи сохраняют жизнеспособность в диапазоне pH среды 2–8, более высокие значения указанного показателя губительны для большинства видов дрожжей.

В октябре температура воды в садках опустилась до 10–12 °С. Представители семейств *Vibrionaceae* и *Enterobacteriaceae* впервые преобладали в сообществах КГМ органов рыб. Исключение составил микробиоценоз жабр сеголеток калуги, где, как и

в водных сообществах, превалировали граммотрицательные неферментирующие бактерии. Смена доминант сопровождалась элиминацией плесеней из всех исследованных субстратов, а также активизацией дрожжевой флоры. На жабрах рыб присутствовали молочные дрожжи *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jorg.) F.C. Harrison, 1928 и *Cystobasidium minuta* (Saito) A.M. Yurkov, Kachalkin, H.M. Daniel, M. Groenewald, Libkind, V. de Garcia, Zalar, Gouliamova, Boekhout & Begerow (2014) (син. *Rhodotorula minuta*), а в воде и содержимом кишечника — представители рода *Candida*.

Являясь продуцентами молочной кислоты, каратиноидов, биотина и других витаминов группы В, дрожжи играют важную роль в формировании местного иммунитета макроорганизма (Берри, 1985). Это мощные стабилизаторы среды обитания для нормальной микрофлоры слизистых (Квасников, Щелокова, 1991; Irianto, Austin, 2002). Согласно данным литературы (Slavikova, Vadkertiova, 1995; Кулаковская и др., 2007) большинство представителей родов *Candida* и *Cryptococcus*, в том числе выделенные из рыбоводных прудов, проявляют выраженную фунгицидную активность. По-видимому, это объясняет тот факт, что майское доминирование дрожжей в сообществе КГМ органов рыб Лучегорской НИС сопровождалось исчезновением плесневых грибов. И наоборот, во время сентябрьской элиминации дрожжей доля плесневых грибов в микробных ассоциациях всех исследованных биотопов была максимальной (99 %).

Известно также, что, вырабатывая бактериоцины, дрожжи, как и плесени, сдерживают размножение многих видов энтеробактерий (Пирузан, Михайловский, 1992). Последние в значимых количествах (> 1 %) присутствовали в исследованных микробных сообществах Лучегорской НИС не летом, как следовало ожидать, а весной (май) и осенью (октябрь). В обоих случаях повышение доли энтеробактерий наблюдалось на фоне исчезновения плесневых грибов. Однако доминирующие позиции энтеробактерии заняли осенью (до 81 %), когда элиминация плесневых грибов протекала на фоне минимальной численности дрожжевой флоры, тогда как в мае — период преобладания в сообществе КГМ дрожжей (53–99 %) — доля энтеробактерий не превышала 4 %.

Антагонистическое действие дрожжей в отношении энтеробактерий и плесневых грибов указывает на пробиотическую активность дрожжевой флоры, циркулирующей в хозяйстве. Интенсивность колонизации слизистых молоди осетровых рыб пробиотическими дрожжами оказывает значительное влияние на формирование неспецифических иммунных реакций у гидробионтов (Бурлаченко и др., 2006), поэтому сентябрьская элиминация дрожжей из воды садков и органов рыб Лучегорской НИС не может не сказаться на состоянии местного иммунитета осетров. Таким образом, исчезновение дрожжей со слизистых осетровых рыб следует рассматривать как предиктор ухудшения их физиологического состояния и квалифицировать как абсолютное показание для проведения внеплановых противоэпизоотических мероприятий. Среди последних целесообразно отдать предпочтение иммунокоррекции, например введению в рацион аквакультурантов пробиотических микроорганизмов, в частности кормовых дрожжей.

Заключение

Согласно полученным данным видовой состав дрожжевой флоры, распространенной в хозяйстве, представлен дикими видами рода *Candida*, молочными, винными и пивными типами дрожжей. Такие виды, как *N. albida*, *P. laurentii*, *S. cerevisiae*, *T. ciferrii*, а также грибы рода *Candida*, обнаруженные в кишечнике и на жабрах молоди калуги и амурского осетра, являются производными микрофлоры воды в садках для содержания рыбы. Сообщество дрожжей, встречающихся только в воде, представлено видами *C. neoformans* и *O. angusta*, а ассоциированных с органами осетровых рыб — *R. mucilaginosa*, *C. minuta* и *Hanseniaspora* sp. (син. *Kloeckera*). Изучение сезонной динамики структуры всего сообщества КГМ исследованных биотопов позволило выявить ингибирующее влияние дрожжей в отношении плесеней и энтеробактерий, циркулирующих на Лучегорской НИС.

Проведенные исследования показали, что состав и структура сообщества дрожжей, многие представители которого проявляют пробиотические свойства, является важным

показателем, характеризующим состояние местного иммунитета аквакультурантов и условия их содержания при тепловодном садковом выращивании. Таким образом, дрожжи можно с успехом использовать как индикаторную группу микроорганизмов для мониторинга физиологического состояния рыб и среды их обитания в условиях аквакультуры.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам Лучегорской НИС ТИНРО-центра за содействие в сборе материала, сотрудникам лаборатории экологии патогенных бактерий НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН за помощь в обработке материала, а также сотрудникам ТИНРО-центра В.Н. Валовой и Е.И. Рачеку за консультативную помощь и ценные замечания в процессе подготовки рукописи.

Список литературы

- Берри Д. Биология дрожжей : моногр. — М. : Мир, 1985. — 96 с.
- Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование : учеб. пособие / под ред. О.П. Мелехова, Е.И. Егорова. — М. : Академия, 2007. — 288 с.
- Бурлаченко И.В., Судакова Н.В., Балакирев Е.И. и др. Перспективные пробиотики для осетровых рыб // Рыб. хоз-во. — 2006. — № 3. — С. 64–65.
- Квасников Е.И., Щелокова И.Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования : моногр. — Киев : Наук. думка, 1991. — 327 с.
- Кулаковская Е.В., Кулаковская Т.В., Голубев В.И. и др. Фунгицидная активность целлюлополипидов из культуральной жидкости дрожжей *Cryptococcus humicola* и *Pseudozyma fusiformata* // Биоорг. химия. — 2007. — Т. 33, № 1. — С. 167–171.
- Лабораторный практикум по болезням рыб : учеб. пособие / под ред. В.А. Мусселиус. — М. : Лег. и пищ. пром-сть, 1983. — 296 с.
- Пирузян Л.А., Михайловский Е.М. Сапрофитная микрофлора в качестве продуцента биологически активных веществ для целей микробной сапротрофной фармакотерапии // Изв. РАН. Сер. биол. — 1992. — № 6. — С. 860–866.
- Руководство к практическим занятиям по микробиологии / под ред. Н.С. Егорова. — М. : МГУ, 1983. — 220 с.
- Austin B., Austin D. Bacterial fish pathogens : disease of farmed and wild fish. — Chichester : Praxis Publishing Ltd, 2007. — 552 p.
- Irianto A., Austin B. Probiotics in aquaculture // J. of Fish Diseases. — 2002. — Vol. 25, Iss. 11. — P. 633–642.
- Slavikova E., Vadkertiova R. Yeasts and yeast-like organisms isolated from fish-pond waters // Acta Microbiol. Pol. — 1995. — Vol. 44, № 2. — P. 181–189.
- Youchimizu M., Kimura T. Study of intestinal microflora of Salmonids // Fish Pathol. — 1976. — Vol. 10, № 2. — P. 243–259.

Поступила в редакцию 3.04.17 г.

Принята в печать 7.04.17 г.