

Список литературы

1. Болоцкий, И.А. Вопросы эпизоотологии и терапии псевдомоноза свиней / И.А. Болоцкий, В.И. Семенцов, С.В. Пруцаков, Н.Н. Кружнов // Актуальные вопросы ветеринарной фармакологии и фармации : сборник материалов Межрегиональной научно-практической конференции. - 2012. - С. 107-110.
2. Гафаров, Х.З. Mono- и смешанные инфекционные диареи новорожденных телят и поросят / Х.З. Гафаров, А.В. Иванов, Е.А. Непоклонов, А.З. Равилов. - Казань, 2002. – 590 с.
3. Заволока, А. Желудочно-кишечные заболевания поросят/ А. Заволока, А. Руденко, В. Смолянинов // Свиноводство, 1999. – № 3. – С. 19-20.
4. Кружнов, Н.Н. Ассоциативные желудочно-кишечные и респираторные заболевания свиней в Краснодарском крае / Н.Н. Кружнов, С.В. Пруцаков, И.А. Болоцкий, В.И.Семенцов, Е.В. Иванасова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. – № 2. – С. 53-54.

[DOI: 10.34617/pd9x-rc40](https://doi.org/10.34617/pd9x-rc40)

УДК 579.6:639.512:619:639.3.09

**ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНАЯ МИКРОФЛОРА КИШЕЧНИКА
КРЕВЕТКИ *NEOCARIDINA HETEROPODA*
GRAM-NEGATIVE INTESTINAL MICROFLORA IN
NEOCARIDINA HETEROPODA SHRIMPS**

Шорохова Анна Павловна¹, канд. биол. наук,

Никулин Никита Алексеевич¹,

Присяжная Наталья Викторовна¹,

Зимин Андрей Антонович¹, канд. биол. наук,

Осепчук Денис Васильевич², д-р с.-х. наук

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.

Скрябина РАН – обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ

«Пушкинский научный центр биологических исследований

РАН», Российская Федерация, г. Пущино,

² Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии,
г. Краснодар, Российская Федерация,

Shorokhova Anna Pavlovna¹, Ph. D. Biol. Sci.,

Nikulin Nikita Alekseevich¹,

Prisyazhnaya Natalya Viktorovna¹,

Zimin Andrey Antonovich¹, Ph. D. Biol. Sci.,

Osepchuk Denis Vasilyevich², Dr. Agr. Sci.

¹G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation,

² Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation.

Аннотация: работа посвящена выделению быстрорастущих бактерий кишечника креветки *N. heteropoda*. Было выделено около 40 штаммов бактерий. Определение бактерий было проведено с помощью масс-спектромерии на приборе MALDI TOF. Было показано с высокой достоверностью среди изолятов наличие грамтрицательных бактерий трех родов: *Pseudomonas*, *Shewanella* и *Aeromonas*.

Ключевые слова: аквакультура; бактерии кишечника; креветки; *Neocaridina heteropoda*.

Abstract: the study is devoted to the selection of fast-growing intestinal bacteria of *N. heteropoda* in the shrimp. About 40 strains of bacteria were isolated. The determination of bacteria was carried out using mass spectrometry on a MALDI TOF instrument. The presence of gram-negative bacteria of three genera: *Pseudomonas*, *Shewanella* and *Aeromonas*, was shown with high confidence among isolates.

Key words: aquaculture; intestinal bacteria; shrimp; *Neocaridina heteropoda*.

Продукты аквакультуры имеют большое значение для человека из-за их питательной ценности и явной пользы для здоровья. Хотя эти продукты питательны, но они часто загрязнены патогенными бактериями, которые естественным образом встречаются в водной среде, что может привести к заболеваемости и смертности людей во всем мире.

Например, аэромонады выделяют из широкого спектра источников, включая продукты аквакультуры. Эти бактериальные

контаминации вызывают существенные экономические потери в аквакультуре во всем мире. Хотя эти бактерии являются патогенными микроорганизмами, одновременно они являются частью нормальной кишечной микрофлоры здоровой рыбы [1]. Многие исследования аквакультуры можно было бы проводить с использованием мелких гидробионтов эволюционно близких объектам производства.

Исследование на такой модели роли микрофлоры кишечника креветки в продуктивности и поддержании здоровья животного существенно для контроля численности бактерий в промышленном производстве с целью получения качественной и здоровой пищи.

Задача работы. Креветка *Neocaridina heteropoda* (Crustacea, Malacostraca) является мелким гидробионтом до 4 см в длину [2]. Она легко размножается в аквариумной культуре с мультипликацией до 50 раз за 6-8 месяцев. То есть, это удобный лабораторный объект исследования различных микробиологических параметров производственных креветок, включая опыты по фаговой терапии.

Неокаридины также используются в токсикологических тестах. Данное исследование было предпринято для микробиологической характеристики российской популяции неокаридин, поиска бактерий-хозяев бактериофагов и штаммов бактерий для получения пробиотиков для профилактики и лечения бактериозов креветок.

Методика. Среды для бактерий. Питательные среды:

- а) триптон-соевая агаризованная среда ИБФМ РАН (5/5);
- б) триптон-соевая агаризованная среда ИБФМ РАН (5/5), разведённая в 10 раз;
- в) агаризованная среда LB;
- г) питательная среда с аквариумной водой (ППСАВ) (г/л): дрожжевой экстракт – 1, пептон – 1, агар – 15.

Операция по извлечению кишечника и выделение бактерий из *N. heteropoda*. Реконструкция пищеварительной системы была проведена ранее методом компьютерной микротомографии [3]. Креветку отмывали в 70 % этиловом спирте. Скальпелем разрезали хитиновый экзоскелет, энтомологической булавкой

извлекали необходимую область кишечника. Шпателем растирали кишку до получения однородной взвеси в 0,1 мл 0,9 % NaCl.

Доводили данный раствор до 1 мл и 0,1 мл суспензии высевали твердые питательные среды. Инкубировали культуры при 25°C 24 часа. Из полученных накопительных культур выделяли отдельные колонии на среде LB.

Результаты исследований и их обсуждение. Численность популяции быстрорастущих бактерий кишечника креветки не превышала концентрации 10^4 КОЕ/мл.

Количество быстрорастущих бактерий из кишечника креветки *N. heteropoda* варьировало не сильно: на LB выросло $9,1 \pm 0,8 \times 10^4$, на 5/5 – $7,7 \pm 0,9 \times 10^4$, на 5/5, разведённой в 10 раз – $8,2 \pm 0,4 \times 10^4$, на ППСAB – $7,8 \pm 0,9 \times 10^4$. Было выделено примерно 40 штаммов бактерий. Все штаммы были очищены микробиологически, путем пересева отдельных колоний.

Таксономическая идентификация изолятов была определена с помощью масс-спектрометрии пептидов длиной 2 – 20 КДа на приборе MALDI TOF Bruker Daltonik (США). Ряд изолятов были достоверно определены согласно базе данных Bruker Daltonik MALDI Biotyper и базе данных Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН.

Достоверным результатом считались значения более 1.7. Штаммы рода *Aeromonas* были определены со следующей достоверностью: *Aeromonas media* – 2.056, *Aeromonas veronii* – 2.384, 2.367, *Aeromonas hydrophila* – 1.986. *Aeromonas hydrophila* – это гетеротрофная грамотрицательная палочковидная бактерия, обитающая в водоемах стран с тёплым климатом. Её можно найти как в пресной, так и в солёной воде. *A. hydrophila* является одним из основных патогенов рыб и амфибий, может вызывать токсические инфекции и у человека (Microbewiki).

Ряд видов рода *Aeromonas*, в первую очередь *A. hydrophila* вызывают инфекции у креветок [6].

Aeromonas media – это бактерия, выделенная из поверхностной хьюстонской черной почвы. Интересно, что штамм *Aeromonas media* WS, используется как биоинсектицид (Microbewiki).

Aeromonas veronii – это грамотрицательная палочковидная бактерия, обнаруживаемая в пресной воде и у различных гидробионтов. Она может вызывать раневые инфекции и диареи у пациентов с ослабленным иммунитетом [4].

Было выделено несколько изолятов бактерии вида *Pseudomonas alcaligenes*. Они имели более высокую достоверность определения 2.129, 2.12, 2.129, 2.12.

С меньшей, но достаточной достоверностью были определены бактерии вида *Shewanella putrefaciens* – 1.91, 2.224, 1.781. *Shewanella putrefaciens* является грамотрицательной плеоморфной бактерией, которая впервые была выделена из морской воды, а также из морского анаэробного песчаника в Нью-Мексико. *S. putrefaciens* также является факультативным анаэробом, способным метаболизировать железо и марганец [5]. Хотя очень редко, но отмечались случаи инфекций с бактериемией у человека.

Выводы: 1. Мажорными грамотрицательными аэробными культивируемыми компонентами бактериального сообщества кишечника креветки *N. heteropoda* являются представители родов: *Pseudomonas*, *Shewanella* и *Aeromonas*.

2. Присутствие данных видов говорит о необходимости предпринимать стандартные меры санитарии при проведении экспериментов с данным гидробионтом.

Список литературы

1. Trust, M.B. et al. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*)// J. Fish. Res. Board. Can. – 1974. – 36:1174–1179.

2. Klotz, W. Gattung Neocaridina Kubo. Süßwassergarnelen aus aller Welt (3rd ed.) / W. Klotz, A. Karge // Daehne Verlag – 2013. – pp. 131-6.

3. Moriarty, D.J.W. The role of microorganisms in aquaculture ponds / D.J.W. Moriarty // Aquaculture. 1997 – 151(1–4): 333-349.

4. Hickman-Brenner, F. W. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea / F. W.

Hickman-Brenner, K. L. MacDonald, A. G. Steigerwalt, G. R. Fanning D. J. et al. // J. Clin. Microb. – 1988. – 25 (5): 900–906.

5. Fredrickson, J.K. et al. Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium / J.K. Fredrickson et al. // Geochim. Cosmochim. Acta. – 1998. – 62 (19–20): 3239–3257. doi:10.1016/S0016-7037(98)00243-9.

6. Hänninen, M.L. Aeromonas species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater / M.L. Hänninen, P. Oivanen, V. Hirvelä-Koski // Int. J. Food. Microbiol. – 1997. – 34(1):17-26.