

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ**

**ФГБОУ ВО «КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**ФГБОУ ВО «САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ им. Н.И. ВАВИЛОВА»**

**IV Национальная  
научно-практическая конференция**

**СОСТОЯНИЕ И ПУТИ РАЗВИТИЯ АКВАКУЛЬТУРЫ  
В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Калининград, 8-10 октября 2019 г.**

УДК 639.3:639.5  
ББК 47.2  
С23

Редакционная коллегия:  
Васильев А.А., Кузнецов М.Ю., Сивохина Л.А., Поддубная И.В.

Состояние и пути развития аквакультуры в Российской Федерации: материалы IV национальной научно-практической конференции, Калининград – 8-10 октября 2019 г./ под ред. А.А. Васильева; Саратовский ГАУ. – Саратов: Амирит, 2019. – 267 с.

ISBN 978-5-00140-341-8

В сборнике материалов IV национальной научно-практической конференции приводятся результаты исследования по актуальным проблемам аквакультуры, в рамках решения вопросов продовольственной безопасности, ресурсосберегающих технологий производства рыбной продукции и импортозамещения. Для научных и практических работников, аспирантов и обучающихся по укрупненной группе специальностей и направлений подготовки 35.00.00 сельское, лесное и рыбное хозяйство.

Статьи даны в авторской редакции в соответствии с представленным оригинал-макетом.

**Сборник подготовлен и издан при финансовой поддержке  
ООО «Научно-производственное объединение «Собский рыбоводный завод»»  
Генеральный директор Д. Ю. Эльтеков**

ISBN 978-5-00140-341-8

© ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ, 2019

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОБИОТИКОВ НА ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ТРЕПАНГА *APOSTICHOPUS JAPONICUS*

Е.А. БОГАТЫРЕНКО<sup>1</sup>, Т.И. ДУНКАЙ<sup>1,2</sup>, С.И. МАСЛЕННИКОВ<sup>2</sup>,  
И.О. ЮНУСОВА<sup>1</sup>, А.В. КИМ<sup>1</sup>

E.A. Bogatyrenko<sup>1</sup>, T.I. Dunkay<sup>1,2</sup>, S.I. Maslennikov<sup>2</sup>, I.O. Yunusova<sup>1</sup>, A.V. Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет

<sup>2</sup>Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского

<sup>1</sup>Far Eastern Federal University

<sup>2</sup>A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology

**Аннотация.** Изучена способность симбионтных бактерий дальневосточного трепанга синтезировать пищеварительные ферменты и ингибировать рост патогенных вибрионов. Наиболее активные бактерии без факторов патогенности были использованы в качестве пищевой добавки для трепанга в серии экспериментов. Использование потенциальных пробиотиков при выращивании *Apostichopus japonicus* продемонстрировало свою эффективность, однако, необходимы дальнейшие исследования.

**Ключевые слова:** пробиотик, дальневосточный трепанг *Apostichopus japonicus*, симбионтные бактерии

**Abstract.** The ability of symbiotic bacteria of the Japanese sea cucumber to synthesize digestive enzymes and inhibit the growth of pathogenic vibrios was studied. The most active bacteria without virulence factors were used as a dietary supplement for sea cucumbers in a series of experiments. The use of potential probiotics in the *Apostichopus japonicus* farming has been shown to be effective, however, further studies are needed.

**Keywords:** probiotic, Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus*, symbiotic bacteria

Среди представителей класса голотурий *Holothuroidea* (тип Иглокожие – *Echinodermata*) немало коммерчески ценных видов животных, которые представляют большой интерес для аквакультуры. Одним из таких объектов является дальневосточный трепанг *Apostichopus japonicus*. По данным литературы, наиболее частыми причинами массовой гибели *Apostichopus japonicus* в условиях его искусственного воспроизводства являются заболевания, вызванные такими микроорганизмами, как *Vibrio splendidus* [4, 5] и *Vibrio alginolyticus* [3]. Для ликвидации вспышек инфекционных заболеваний нередко используют различные антибиотики, что имеет ряд серьезных негативных последствий. Одним из наиболее перспективных способов решения этой

проблема является применение пищевых добавок на основе микроорганизмов-пробиотиков, которые способны избирательно ингибировать рост патогенных микроорганизмов, не нанося при этом вред организму хозяина [6]. На сегодняшний день в литературе имеются ограниченные сведения о положительном влиянии отдельных видов бактерий, дрожжей и бактериофагов, полученных из различных источников, на воспроизводство *Apostichopus japonicus*. В связи с этим поиск пробиотиков для этого вида иглокожих остается по-прежнему актуальным.

Цель работы – поиск микроорганизмов с пробиотическим потенциалом и оценка их влияния на прирост массы дальневосточного трепанга в модельных экспериментах.

**Материалы и методы.** Для работы была использована ранее полученная нами коллекция 134 штаммов культивируемых гетеротрофных бактерий, выделенных из пищеварительной системы дальневосточного трепанга из естественной среды обитания [2]. Изучение антагонистических свойств симбионтной микрофлоры трепанга проводили на патогенных штаммах вибрионов, выделенных из аквакультурных хозяйств. Межмикробные взаимодействия изучали методом перпендикулярных штрихов [1] на универсальной агаризованной среде для морских микроорганизмов СММ [7], подходящей для инкубации всех исследуемых микроорганизмов. Вначале по диаметру чашки Петри со средой штрихом высевали штамм бактерии - потенциального продуцента антимикробных веществ. Инкубацию проводили при температуре 22°C в течение 5 суток. После этого к посеву перпендикулярным штрихом подсеивали тест-культуру патогенной бактерии. Чашки с культурами ставили в термостат и инкубировали при 37°C в течение 2 суток. О наличии антимикробной активности судили по величине зоны подавления роста тест-культур вблизи посева бактерий-симбионтов, которую выражали в мм. Все опыты повторяли трижды.

Для выявления у симбионтных микроорганизмов способности синтезировать ферменты, участвующие в пищеварении хозяина, все исследуемые штаммы бактерий были высеяны на чашки с агаризованными средами, содержащими один из следующих субстратов: крахмал, хондроитинсульфат, хитин, альгинат натрия, твин 40, твин 80, оливковое масло, казеин и желатин. Культивирование микроорганизмов проводили в термостате при температуре 22°C в течение 3-4 суток (для выявления хитинолитической активности – 9 суток). О наличии энзиматической активности судили по появлению зон гидролиза субстрата вокруг посева бактерий на соответствующих средах. Для выявления зон гидролиза на среде с крахмалом в чашки дополнительно вносили раствор Люголя и отмечали появление светлых колец вокруг посевов, свидетельствующее о наличии амилаз.

Для оценки биологической безопасности потенциальных микроорганизмов-пробиотиков была проведена работа по выявлению у них некоторых факторов патогенности (синтез гиалуронидазы, нейраминидазы, плазмокоагулазы, лецитиназы и гемолизинов).

Биологически безопасные и наиболее активные в отношении синтеза пищеварительных ферментов и подавления роста патогенной микробиоты бактерии были использованы в качестве пищевой добавки для дальневосточного трепанга. Эксперименты на взрослых особях трепанга проводили в течение недели, на молоди - в течение месяца.

**Результаты исследований.** Для определения роли выделенных нами из трепанга бактерий была изучена их способность расщеплять различные органические субстраты. Из всей коллекции бактерий, выделенных нами из кишечника гидробионта, различную степень активности изучаемых ферментов проявили 33% штаммов. Из 134 штаммов бактерий способность разлагать крахмал проявили 12%, твины 40 и 80 - по 16%, казеин и желатин - по 8%, альгинат и хондроитинсульфат - по 7%, хитин - 6% и оливковое масло - 10%.

Из всех исследуемых штаммов бактерий различную степень антимикробной активности в отношении изучаемых тест-культур проявили 17 штаммов (13%). Антимикробную активность в отношении одной тест-культуры проявили 4 штамма бактерий исследуемой коллекции (3%), в отношении двух - 7 штаммов (5%), в отношении трех - 2 штамма (1%), в отношении четырех - 3 штамма (2%), в отношении пяти - 1 штамм (менее 1%). Таким образом, большинство активных штаммов ингибировали две и более тест-культуры, что, вероятно, связано с широким спектром продуцируемых ими антимикробных веществ. Однако, ни один из исследуемых микроорганизмов не подавлял рост всех патогенных культур.

Для оценки биологической безопасности потенциальных микроорганизмов-пробиотиков была проведена работа по выявлению у них некоторых факторов патогенности (синтез гиалуронидазы, нейраминидазы, плазмокоагулазы, лецитиназы и гемолизина). На основе полученных результатов для следующего этапа исследований, направленных на определение микроорганизмов, повышающих скорость роста дальневосточного трепанга, были выбраны 5 штаммов с наибольшим противомикробным потенциалом и 2 штамма с высокой активностью пищеварительных гидролаз.

Поскольку молодь голотурий является более уязвимой и чувствительной к действию факторов внешней среды, то для подтверждения безопасности нашей коллекции штаммов бактерий была проведена предварительная апробация биологически активных добавок на взрослых особях. Добавление исследуемых культур бактерий в корм взрослым трепангам приводило спустя неделю эксперимента к приросту массы животных до 11,6%, в то время как прирост массы трепангов в контрольной группе составлял всего 2,4%.

Кормление молоди трепанга добавками на основе потенциальных пробиотиков в течение месяца испытаний также продемонстрировало значительный положительный эффект по сравнению с контролем. Для получения оптимальных результатов, которые будет целесообразно внедрять в аквакультуру, следует экспериментально подобрать необходимые концентрации отдельных культур или их сочетаний, а также, возможно, скорректировать схему кормления животных.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00693.

### Список литературы:

1. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Учеб. Пособие / под ред. Н.С. Егорова – 3е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во МГУ, 1995. 224 с.
2. Bogatyrenko, E.A. Characterization of the gut bacterial community of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* / E.A. Bogatyrenko, L.S. Buzoleva // *Microbiology*. 2016. V. 85. № 1. P. 116-123.
3. Effect of bacteriophages on *Vibrio alginolyticus* infection in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka) / J. Zhang, Z. Cao, Z. Li, L. Wang, H. Li, F. Wu, L. Jin, X. Li, S. Li, Y. Xu // *J. World Aquac. Soc.* 2015. V. 46. P. 149-158.
4. Effects of dietary live yeast *Hanseniaspora opuntiae* C21 on the immune and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* / Y. Ma, Z. Liu, Z. Yang, M. Li, J. Liu, J. Song // *Fish & Shellfish Immunol.* 2013. V. 34. № 1. P. 66-73.
5. Growth performance, immune response, and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* fed a supplementary diet of the potential probiotic *Paracoccus marcusii* DB11 / F. Yan, X. Tian, S. Dong, Z. Fang, G. Yang // *Aquaculture*. 2014. V. 420. P. 105-111.
6. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture / L. Verschuere, G. Rombaut, P. Sorgeloos, W. Verstraete // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000. V. 64. № 4. P. 655-671.
7. Youchimizu, M. Study of intestinal microflora of Salmonids / M. Youchimizu, T. Kimura // *Fish Pathol.* 1976. V. 10. № 2. P. 243-259.