

На правах рукописи  
УДК 639.371.2:639.3/6:639.3.043.2

**БУРЛАЧЕНКО**  
**Ирина Виленовна**

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ  
ПОВЫШЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОСЕТРОВЫХ РЫБ  
В АКВАКУЛЬТУРЕ**

Специальность 03.00.10 – ихтиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва – 2007 г.



Работа выполнена в отделе воспроизводства и марикультуры ФГУП "Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии" (ФГУП "ВНИРО")

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
**Гамыгин Евгений Алексеевич**,  
Московский государственный университет  
технологий и управления (МГУТУ),  
г. Москва

доктор биологических наук, профессор  
**Кузьмина Виктория Вадимовна**,  
Институт биологии внутренних вод  
им. И.Д. Папанина РАН,  
п. Борок, Ярославская обл.

доктор биологических наук  
**Кляшторин Леонид Борисович**,  
Всероссийский научно-исследовательский  
институт рыбного хозяйства и океанографии  
(ВНИРО), г. Москва

Ведущая организация: Государственный научно-исследовательский  
институт озерного и речного рыбного хозяй-  
ства (ГосНИОРХ), г. Санкт-Петербург

Защита состоится 25 мая 2007 г. в 11 часов на заседании диссертационно-  
го совета Д 307.004.01 при Всероссийском научно-исследовательском институ-  
те рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО) по адресу: 107140, Москва, ул.  
Верхняя Красносельская, д. 17.

Факс 8-499- 264-91-87, электронный адрес [sedova@vniro.ru](mailto:sedova@vniro.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИРО.

Автореферат разослан « 20 » апреля 2007 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

М.А. Седова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Анализ современных тенденций и прогноз развития произ-  
водства продукции водных биологических ресурсов свидетельствуют, что статус и место  
любой страны в этой области во многом зависят от состояния аквакультуры. Сегодня на ее  
долю приходится около половины мировой продукции гидробионтов (FAO Fisheries Circular,  
1988-1997; 2003). Актуальные задачи науки в этой области значительно меньше, чем ранее,  
связаны с созданием технологий культивирования, которые, в основном, имеются. На пер-  
вый план выходит выявление узких мест, изучение механизмов, сдерживающих реализацию  
продуктивного потенциала объектов и разработка биологически оправданных предложений  
по решению имеющихся проблем (Карпевич, 1985, 1998; Душкина, 1998).

Для нашей страны в этом аспекте актуален вопрос об аквакультуре осетровых рыб.  
Уникальный опыт заводского воспроизводства этих ценных видов, обязанный во многом во-  
площению результатов эколого-физиологических исследований Н.Л. Гербильского (1949,  
1953, 1962, 1966), В.В. Мильштейна (1940, 1962), Г.С. Карзинкина (1942, 1952), И.Ф. Вель-  
тишевой (1951, 1955), Б.Н. Казанского (1957, 1963), Ю.Ю. Марти (1972, 1979) и других уче-  
ных явился, в свое время, основой сохранения промысла осетровых рыб. Это происходило в  
условиях мощного антропогенного воздействия, практически полностью исключившего ес-  
тественный путь пополнения популяций. Нынешняя, не менее сложная ситуация, диктует  
необходимость интенсификации осетроводства. На современном этапе культивирование  
осетровых рыб в управляемых условиях становится основной возможностью получения мо-  
лоди, предназначенной для выпуска в естественные водоемы и производства востребованной  
пищевой продукции (Строганов, 1968; Николюкин, Бурцев, 1969; Бурцев, Николаев, 2004).

Одной из важнейших основ интенсификации производства продукции при культиви-  
ровании любых видов животных является рациональное кормление, основанное на применении  
высокоэффективных комбикормов (Бергнер, Кетц, 1973; Остроумова, 2001; Щербина, Гамы-  
гин, 2006). Для осетровых рыб, на основе изучения их пищевых потребностей в основных  
питательных веществах, аминокислотах и жирных кислотах, витаминах, разработаны старто-  
вые и производственные комбикорма (Абросимова и др. 1984; Абросимова, 1997; Бондаренко,  
1984; Пономарев и др., 1997; Судакова, 1998). В то же время реальная практика осетроводст-  
ва свидетельствует, что проблема кормления осетровых рыб решена далеко не полностью.

Современные тенденции рационального и эффективного кормления требуют весьма  
значимого смещения акцентов в сторону надежного обеспечения безопасности кормов, ис-  
пользуемых для выращивания животных и рыб, в аспекте накопления в пищевых цепях нега-  
тивных для человека факторов (Codex alimentarius, 1963). Известно, что большинство компо-  
нентов комбикормов нередко содержат контаминанты - комплекс чужеродных веществ, спо-  
собных оказывать отрицательное влияние на общее состояние здоровья и продуктивность  
объектов выращивания (Тутельян, 1985). Поэтому в животноводстве присутствие конта-  
минантов в кормах регламентируется показателями безопасности, которые устанавливаются в  
соответствии с особенностями влияния этих веществ на организм. В связи со сравнительно  
недавней историей индустриального культивирования рыб, многие показатели безопасности  
комбикормов, в силу своей недостаточной изученности, приняты по аналогии с теплокров-  
ными животными, без учета биологических особенностей рыб и специфики их выращивания  
(ГОСТ Р 51899-2002). В то же время активность естественного иммунитета рыб, в частности  
осетровых, намного ниже, чем у теплокровных животных (Лукияненко, 1971, 1989; Конд-  
ратьева, Киташова, 2002).

Серьезную опасность представляют контаминанты, присутствие которых в комбикор-  
мах для рыб обусловлено особенностями их пищевых потребностей - высоким содержанием  
белка и липидов. К ним относятся продукты перекисного окисления жиров и жизнедеятель-  
ности микроорганизмов - грибов и бактерий. Вопросы воздействия на рыб продуктов окис-  
ления липидов и продуцируемых грибами микотоксинов изучались достаточно подробно



(Абрамова и др., 1981; Шабалина и др., 1974, 1986; Галаш, 1988, 1990; Остроумова, 2001; Головина, 2003). В то же время бактериальное заражение кормов для рыб остается в ряду наименее изученных. При этом имеются сведения, что микробная контаминация кормов вызывает изменения в их химическом составе, снижает пищевую ценность, приводит к накоплению токсичных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов и нарушает нормальную микрофлору пищеварительного тракта (Чернышов, Панин, 2000).

С позиций современной теории питания (Уголев, 1985, 1991; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005) нормальная микрофлора пищеварительного тракта, являясь симбионтом, участвует не только в процессах расщепления питательных веществ корма, синтезе жизненно важных соединений, но и выполняет защитную функцию. У человека и теплокровных животных негативные изменения в составе микробиоценоза кишечника приводят к нарушениям переваривания и усвоения пищи и целостности его защитных барьеров. Это способствует снижению резистентности организма и сопровождается проникновением бактерий из пищеварительного тракта во внутренние органы, сокращением их функциональной активности ухудшением деятельности иммунной системы. В литературе приводятся отдельные сведения об аналогичных явлениях, обнаруженных у рыб под действием микроорганизмов кормов (Жезмер и др., 1988, 1991; Войнова, 1991). Однако, особенности комплексного влияния на рыб наиболее значимых групп микроорганизмов, поражающих комбикорма, знание которых необходимо для понимания их специфического воздействия на состояние здоровья и реализацию продуктивного потенциала рыб, не были изучены.

Контаминация комбикормов является одним из негативных факторов, постоянно действующих в условиях интенсивного культивирования. К ним также относятся высокие плотности посадки, повышенное содержание в воде токсичных продуктов метаболизма рыб и органическое загрязнение, сопровождаемые бурным развитием микрофлоры (Ведемейер, 1981). Влияние этих факторов усугубляется весьма значимой зависимостью рыб от качества среды обитания (Патин, 1985). Отрицательное воздействие вынуждает организм рыб направлять часть своих сил на адаптацию к подобным условиям, что приводит к усилению напряженности иммунитета, ухудшению здоровья, снижению темпа роста и выживаемости.

Селекция осетровых рыб в направлении устойчивости к воздействиям условий индустриального культивирования только начинается. Поэтому особую актуальность приобретает поиск способов повышения их резистентности, позволяющих уже на современном этапе добиться более полной реализации продуктивного потенциала и обеспечить выпуск в естественные водоемы жизнеспособной молодежи.

**Цель и задачи исследований.** Цель настоящей работы - определить роль микробной контаминации комбикормов как фактора, лимитирующего реализацию продуктивного потенциала и жизнеспособность осетровых рыб, и разработать способ повышения их резистентности в аквакультуре. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить степень опасности для рыб микроорганизмов, преобладающих в рыбных комбикормах:

- выявить преобладающие формы;
- оценить динамику бактериальной обсемененности комбикормов при хранении;
- оптимизировать способы контроля качественных и количественных характеристик микробной обсемененности комбикормов.

2. Выявить биологические особенности воздействия преобладающих в комбикормах форм микроорганизмов на молодь осетровых рыб, включая:

- рост и жизнеспособность;
- клинико-морфологическое состояние и степень обсемененности внутренних органов, наиболее подверженных поражению микроорганизмами;
- влияние на метаболизм.

Дать предложения к требованиям безопасности комбикормов для осетровых рыб по микробиологическим показателям.

3. Теоретически обосновать целесообразность и применить пробиотические препараты для обеспечения резистентности осетровых рыб в аквакультуре, включая:

- выбор и испытания препаратов;
- исследование особенностей воздействия пробиотиков на нормализацию микробиоценоза кишечника, состояние здоровья и продуктивность осетровых рыб;
- разработку способа применения пробиотиков на ранних этапах жизненного цикла осетровых рыб;
- создание специализированного препарата.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

• Контаминация комбикормов наиболее типичными для них микроорганизмами является одним из негативных факторов индустриальной аквакультуры, который приводит к снижению резистентности, системным и функциональным нарушениям в осуществлении процессов жизнедеятельности молоди осетровых рыб и их пониженной жизнеспособности.

• Существующие нормативы безопасности не соответствуют реальной степени отрицательного воздействия микробной обсемененности комбикормов на состояние здоровья и реализацию ростового потенциала молоди осетровых рыб.

• Сходство влияния симбиотной микрофлоры на эффективность осуществления защитной функции пищеварительного тракта у пойкилотермных и гомойотермных животных позволяет, посредством использования ветеринарных и видоспецифичных пробиотических препаратов, повысить резистентность и продуктивность осетровых рыб в условиях интенсивного культивирования.

**Научная новизна и теоретическая значимость.** Впервые получена комплексная характеристика реакции молоди осетровых рыб на микробное заражение комбикормов на различных функциональных уровнях. Показано, что длительное время (1,5-2 мес) она может иметь скрытую форму. При сохранении выживаемости рыб в пределах технологических нормативов и незначительном торможении их роста происходят, как правило, необратимые структурные и функциональные изменения иммунокомпетентных органов, которые ответственны за детоксикацию и удаление из организма микрофлоры и продуктов ее жизнедеятельности (печень, почки, кишечник). На метаболическом уровне хроническая интоксикация, вызываемая микробным заражением кормов, приводит к разнонаправленным нарушениям водного и липидного обмена, угнетению синтеза белка и повышенному расходу энергии на нейтрализацию токсического действия; а в поддерживающем обмене - к нарушениям соотношения в утилизации белков и липидов, резкому снижению жизнеспособности рыб, особенно в неблагоприятных условиях.

Впервые примененный комплекс клинико-морфологических, микробиологических и физиолого-биохимических исследований при питании рыб и последующем голодании позволил выявить и описать индивидуальный характер воздействия на состояние здоровья, обмен веществ, рост, выживаемость и жизнеспособность молоди осетровых рыб следующих основных микроорганизмов, контаминирующих комбикорма: кишечной палочки (*Escherichia coli*), протей (*Proteus vulgaris*), цитробактера (*Citrobacter sp.*), стафилококка (*Saphylococcus epidermidis*), картофельной палочки (*Bacillus mesentericus*), дрожжеподобных (*Candida albicans*) и плесневых (*Penicillium sp.*) грибов.

Впервые экспериментально обоснованы предельно переносимые молодью осетровых рыб уровни контаминации комбикормов изученными микроорганизмами.

Теоретически обоснована и экспериментально доказана целесообразность использования пробиотических препаратов для повышения резистентности, профилактики и лечения заболеваний осетровых рыб, связанных с микробным заражением комбикормов, а также повышения их продуктивности при индустриальном культивировании; показана перспективность направленного формирования микробиоценоза кишечника на ранних стадиях развития осетровых рыб, наиболее важных для дальнейшей реализации потенциала роста.



Впервые на основе видоспецифичных штаммов лактобактерий создан пробиотический препарат для осетровых рыб «Аквалакт» (совместно с НПЦ «ЦМВЭИ»).

**Практическое значение работы.** Научно обоснована и экспериментально доказана опасность кормления осетровых рыб комбикормами, загрязненными наиболее распространенными микроорганизмами. Показана необходимость пересмотра и ужесточения требований к безопасности комбикормов для осетровых рыб по микробиологическим показателям. Обоснована возможность повышения нормативных показателей выживаемости молоди осетровых, за счет ужесточения требований к безопасности комбикормов по микробиологическим показателям.

Определены предельно-переносимые молодью осетровых уровни контаминации комбикормов следующими микроорганизмами: кишечная палочка (*E. coli*) -  $1 \times 10^5$ ; протей (*Pr. vulgaris*) -  $1 \times 10^4$ , цитробактер (*Citrobacter sp.*) -  $5 \times 10^5$ , стафилококк эпидермальный (*St. epidermidis*) -  $5 \times 10^4$ , картофельная палочка (*Bac. mesentericus*) -  $5 \times 10^5$ , дрожжеподобные грибы (*Candida albicans*) -  $1 \times 10^4$ , плесени (*Penicillium sp.*) -  $1 \times 10^4$ .

Разработаны модификация экспресс-системы Petrifilm 3М и руководство по ее использованию для характеристики микробной обсемененности рыбных комбикормов.

Предложен способ прижизненной первичной рыбоводной оценки клинического состояния осетровых рыб при выращивании в индустриальных условиях.

Научно обоснована и экспериментально доказана эффективность применения пробиотических препаратов для повышения резистентности и оздоровления осетровых рыб в условиях интенсивной аквакультуры.

Подобраны и испытаны новые эффективные ветеринарные пробиотические препараты «Биокорм-Пионер» и «Интестевит». Показана целесообразность их курсового применения с интервалом 10 суток.

Создан специализированный комплексный пробиотический препарат для осетровых рыб «Аквалакт» на основе видоспецифичных штаммов лактобактерий.

Разработан способ направленного формирования микрофлоры личинок осетровых рыб на ранних этапах постэмбрионального развития (до перехода на активное питание).

Материалы диссертации могут быть использованы при чтении курса лекций «Аквакультура», «Кормление рыб», «Болезни рыб» для студентов биологических и рыбохозяйственных факультетов ВУЗов.

**Апробация.** Материалы диссертации представлены на международных конференциях: «World Aquaculture» (Бразилия, 2003; Индонезия 2005; Италия 2006); «Aquaculture Europe» (Испания, 2004; Норвегия 2005); 5<sup>th</sup> International Symposium on Sturgeon (Иран, 2005); научно-практической конференции «Проблемы и перспективы развития аквакультуры в России (Краснодар, 2001); международной научно-практической конференции «Аквакультура начала XXI века (Москва, 2002); международном симпозиуме «Холодноводная аквакультура: старт в XXI век» (Санкт-Петербург, 2003); III и IV международных научно-практических конференциях «Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития» (Астрахань, 2004, 2006); конференции "Развитие рыбохозяйственного комплекса России" (Санкт-Петербург, 2004); научно-практической конференции "О приоритетных задачах рыбохозяйственной науки в развитии рыбной отрасли до 2020 года" (Москва, 2004); международной научно-практической конференции "Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов Мирового океана" (Москва, 2005).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 38 работ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 319 стр. текста и состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и списка литературы. Включает 52 таблицы, иллюстрирована 37 рисунками. В списке литературы - 418 наименований, в том числе 145 работ на иностранных языках. Схема и основные направления исследований приведены на рис. 1.

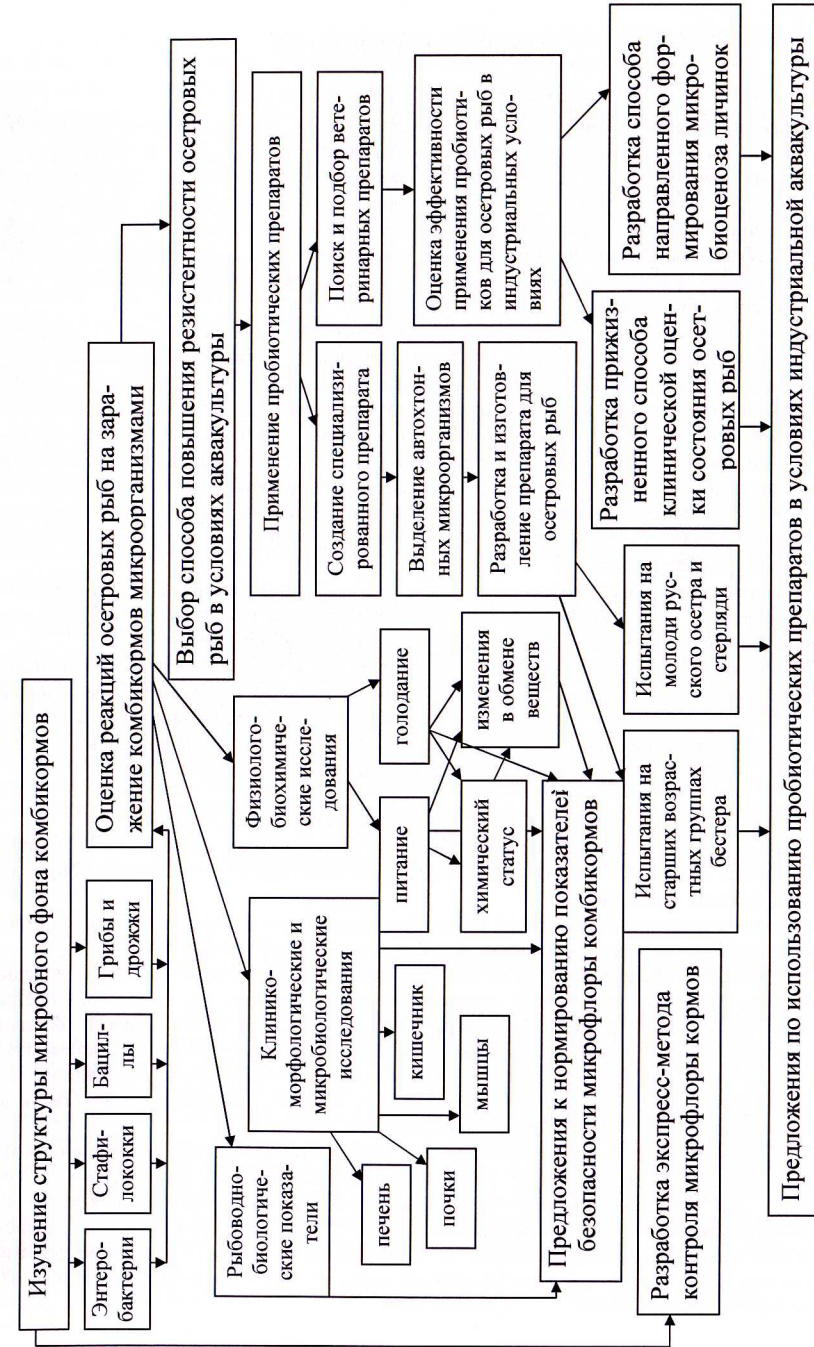


Рис 1. Схема и основные направления исследований



## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

В главе приведены краткие сведения об истории и современном состоянии аквакультуры осетровых рыб, особенностях и проблемах их выращивания и кормления. Дана характеристика современных научных представлений о процессе питания и пищеварения животных, роли пищеварительной системы в защитных функциях организма, а также о физиологическом значении нормальной микрофлоры кишечника, ее пищеварительной, защитной и гормональной функций. Рассматривается влияние условий обитания и культивирования на резистентность рыб, а также значение микрофлоры кормов как источника заболеваний и загрязнения среды обитания рыб.

Дан подробный анализ структурных составляющих комбикормов, способных вызывать токсические эффекты. Описаны состав, свойства и влияние на организм животных, его резистентность и продуктивность техногенных (тяжелые металлы, средства химической защиты растений) и биогенных контаминантов (антипитательные факторы растений, окисленные липиды, микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности). Показано, что микроорганизмы не только разрушают питательные вещества корма, но и способны вызывать заболевания и гибель культивируемых рыб. Подробно проанализированы природа и механизм действия на животных и рыб таких контаминантов, как афла- и охратоксины, группа трихотеченовых микотоксинов. Особое внимание уделено малоизученному пути контаминации комбикормов – бактериальной обсемененности.

Проанализированы публикации об особенностях структуры бактериального фона сырьевых компонентов и комбикормов для сельскохозяйственных животных и рыб. Большое внимание уделено информации о питании рыб подобными комбикормами.

Обзор литературных источников свидетельствует, что к настоящему времени накоплен обширный фактический материал, в то же время многие вопросы, представляющие большой научный интерес и имеющие практическое значение для предупреждения и лечения последствий бактериального заражения комбикормов, для осетровых рыб, культивируемых в индустриальных условиях, изучены недостаточно или не затрагивались совсем.

### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Диссертация является обобщением результатов исследований, выполненных в рамках плановых работ ВНИРО в 1986-2006 гг. (Госконтракты 7-16/1986-2003; 7-10/2003-2006).

#### 2.1. Объекты исследований

Объекты исследований настоящей работы, разделены нами на четыре группы - осетровые рыбы, комбикорма для рыб, микроорганизмы комбикормов и пробиотики.

2.1.1 Основная экспериментальная часть работы проведена на икре, личинках, молоди, ювенильных особях осетровых рыб: стерляди (*Acipenser ruthenus* L.), сибирского осетра (*Acipenser baerii* Brandt), русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt), бестера (*Acipenser nkoljukini*). Рыбоводные эксперименты выполняли в инкубационных установках, аквариумах и бассейнах аквариальной и экспериментального комплекса по ускоренному выращиванию осетровых ВНИРО (Москва и Московская область), в научно-производственном центре по осетроводству "БИОС" (Астраханская обл.).

2.1.2. Вторая группа - комбикорма для рыб различного назначения, изготовленные на комбикормовых предприятиях нашей страны, в том числе ЗАО «Ассортимент-Агро», г. Сергиев-Посад, ДФГУП «Гипрорыбфлот-Экос», г. Иван-город, НПЦ «БИОС» и др., а также ведущими мировыми производителями (датские фирмы «Биомар» и «Аллер Аква», «Коппенс» (Норвегия), «Рейху-Райсио» (Финляндия). В комбикормах определяли общую микробную обсемененность с последующей идентификацией основных групп микроорганизмов и их изменения в различных условиях.

2.1.3. Третья группа - микроорганизмы, с которыми работы велись в двух направлениях. В первом – исследовали особенности воздействия на молодь осетровых рыб отдельных групп микроорганизмов наиболее типичных для комбикормов. Для этого проводили экспериментальное заражение комбикормов. В качестве заражающих агентов использовали культуры, выделенные непосредственно из комбикормов (*Bac. mesentericus*, *E. coli*, *Citrobacter* sp.), а также эталонные штаммы микроорганизмов родов *Proteus*, *Staphylococcus*, *Penicillium*, полученные из ГНИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.Н. Тарасевича. Предполагаемую степень заражения выбирали, исходя из данных об уровнях обсемененности кормов (более  $10^5$  КОЕ/г), вызывавших заболевания рыб и указанных в исследованиях В.Ю. Жезмер и соавторов (1988, 1991), Н.В. Войновой (1991), Л.И. Бычковой с соавторами (1995), "Рекомендациях по борьбе с алиментарными болезнями рыб" (1999), а также собственных данных (Бурлаченко и др., 2002). Максимальная концентрация микроорганизмов составляла -  $10^9$  КОЕ/г, сверхвысокие концентрации не применяли. Заражение проводили в лаборатории ихтиопатологии ВНИИПРХа и Ростовском центре по сертификации НП РЦС «Донтест».

Во втором случае, с целью создания специализированного пробиотического препарата, изучали микроорганизмы кишечника молоди и производителей осетровых рыб, содержащихся как в условиях аквакультуры, так и отловленных в естественных водоемах.

2.1.4. Четвертая группа – пробиотические препараты различных механизмов действия, разработанные для теплокровных животных (многокомпонентные - «Интестевит», комплекс лактобактерий, однокомпонентный – «Биокорм-Пионер») и препарат для осетровых рыб «Аквалакт».

Создание первого специализированного пробиотического препарата проводили поэтапно: прижизненное выделение изолята лактобактерий кишечника осетровых рыб из естественных условий; целенаправленная селекция и отбор штаммов, перспективных для использования в качестве компонента пробиотического препарата; определение таксономической принадлежности штамма; проверка биологических свойств, включая биохимические и молекулярно-генетические, антагонистические к тест-культурам энтеропатогенных бактерий; проверка ростовых свойств и стабильности штамма при культивировании, проверка выживаемости при лиофилизации и длительном хранении; испытание препарата на осетровых рыбах. Исследования по разработке и применению пробиотических препаратов были выполнены совместно с вед. науч. сотр. ВГНКИ, канд. вет. наук Е.В. Маликом. Препараты были изготовлены в Центре медико-ветеринарных экспериментальных исследований (НПЦ «ЦМВЭИ»).

#### 2.2. Методы исследований

2.2.1. Рыбоводно-биологические, клинко-морфологические и физиолого-биохимические методы

В ходе рыбоводно-биологических экспериментов изучали воздействие на рыб комбикормов различного качества, обусловленного присутствием в них микроорганизмов, а также действие лечебных и профилактических препаратов. О степени воздействия факторов судили по комплексу показателей, получаемых в ходе экспериментов по питанию и голоданию, проведенных на осетровых рыбах, которые находились на различных этапах жизненного цикла. Этот методический подход позволяет установить наличие или отсутствие пролонгированного влияния изучаемого фактора на обмен веществ рыб, а также получить характеристику физиологической полноценности накопленных при питании пластических веществ и энергии. В качестве основных рыбоводных показателей были также приняты выживаемость, среднесуточная скорость роста (CW, %), эффективность кормления (затраты корма на прирост массы рыб) и продукция.

Темп роста рассчитывали по формуле:  $CW = [2 \cdot (M_t - M_0) / (M_t + M_0) \cdot t] \cdot 100\%$ ,



где, CW – среднесуточный прирост, % средней массы рыб;  $M_0$ ,  $M_1$  – масса рыб в начале и конце периода; t – длительность периода.

На основании выживаемости молоди в процессе кормления и последующего голодания (аналогичного по продолжительности в градусо-днях зимнему в естественных условиях), определяли ее общую жизнеспособность.

О степени воздействия токсических факторов на рыб судили по результатам клинико-морфологического анализа состояния и обсемененности микроорганизмами печени, почек, кишечника - органов, выполняющих барьерную функцию по отношению к чужеродным агентам, а также осуществляющих детоксикацию и удаление ядов и являющихся важнейшими структурными элементами иммунной системы. Оценку вели на основании визуально выявляемых изменений цвета, размеров и консистенции органов, характеризующих норму или степень развития патологического процесса. При этом использовали критерии нормы и патологии органов при различных заболеваниях, приводимых в работах по ихтиопатологии (А. Щербина, 1973; Мусселиус, 1983; Головина, 2003).

При работе со старшими возрастными группами и производителями осетровых рыб, выращиваемых в индустриальных условиях, использовали оригинальный способ прижизненной оценки их состояния. Применение способа позволяет получить количественную характеристику клинического состояния рыб в динамике, ускорить диагностику заболеваний, а также оценить эффективность профилактических и лечебных мероприятий (Бурлаченко, Бычкова, 2005).

Химический статус рыб определяли по содержанию в организме воды и пластических веществ. Содержание воды - путем высушивания образцов до абсолютно сухого веса при 105°C. Определение общего азота - колориметрическим методом Несслера с некоторыми модификациями (Барашков, Вахрашина 1965). Сырой протеин (общее количество азотистых соединений) рассчитывали по содержанию общего азота, путем умножения его на коэффициент 6,25. Содержание липидов оценивали гравиметрическим способом по их общему количеству в эфирных вытяжках, после экстракции в аппаратах Сокслета. Минеральные вещества определяли методом сухого озоления в муфельной печи при температуре около 500°C. Углеводы рассчитывали по разности. Валовую энергию устанавливали расчетным способом, используя коэффициенты Рубнера. Определения проводились по прописям, изложенным в методическом руководстве М.А. Щербины (1983).

Оценку воздействия различных факторов на обмен веществ рыб проводили по способу М.А. Щербины (1983) на основании учета изменений массы и химического состава их тела. Для чего рассчитывали показатель накопления или утилизации при голодании и остаточных количествах веществ и энергии в различные периоды экспериментов по следующей формуле:

$$N = [(M_1 x P_1) - (M_0 x P_0)] / M_0,$$

где: N – накопление или потери веществ и энергии после голодания в г или ккал на 100 г первоначальной массы рыб;  $M_0$ ,  $M_1$  и  $P_0$ ,  $P_1$  – масса и содержание веществ и энергии в теле рыб в начале и по окончании периода питания или голодания, г, % и ккал/100 г.

Эти показатели являются интегральным отражением накопления или потерь массы и изменений в обмене веществ у рыб за период опытов. Химические анализы были выполнены на базе лаборатории физиологии питания рыб ВНИИПРХ.

### 2.2.2. Методы микробиологических анализов

Микробиологические анализы комбикормов выполняли по ГОСТ Р 51426-96, применяемому, главным образом, к кормам для теплокровных животных: определяли общую бактериальную обсемененность, количество бактерий кишечной группы, дрожжи и плесени.

Идентификацию микроорганизмов проводили после выявления культуральных свойств на селективных и дифференциально-диагностических средах по стандартным методикам и определителю Берджи (1997). Бактериальную обсемененность выражали в количестве колонии образующих единиц (КОЕ) на 1 г комбикорма. Анализы комбикормов и органов рыб

были выполнены во ВНИИПРХе Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычковой, а также в НП РЦС «Дон-тест» (г. Ростов-на-Дону).

Отбор проб для бактериологических анализов микробиоценоза кишечника осетровых проводили от вскрытых рыб (личинки и молодь) в соответствии с рекомендациями В.А. Мусселиус (1983). От рыб старшего возраста - только прижизненно, с использованием зондов и питательных сред фирмы HiMedia Laboratories (Индия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

Всего проведено 38 серий экспериментов на икре, личинках, молоди и старших возрастных группах осетровых рыб, выполнено 600 ихтиопатологических анализов молоди и рыб старшего возраста, 1100 микробиологических анализов внутренних органов и тканей рыб, 200 - комбикормов, 300 анализов содержимого кишечника осетровых, 700 биохимических анализов тела рыб и комбикормов, 500 клинических осмотров рыб. Испытано 4 пробиотических препарата. В опытах было использовано 10 тыс. шт. икры, 5 тыс. личинок, 2000 экз. молоди, 1300 рыб старших возрастных групп и производителей осетровых; проведено экспериментальное заражение 21 партии кормов.

## ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБНОГО ФОНА КОМБИКОРМОВ ДЛЯ РЫБ И ЭКСПРЕСС-МЕТОД ЕГО КОНТРОЛЯ

Анализ немногочисленных сведений о микрофлоре рыбных комбикормов показал, что для них характерно присутствие высокоактивных форм микроорганизмов - участников гнилостных процессов и возбудителей неинфекционных заболеваний (Жезмер и др., 1991; Ларцева, Рогаткина, 1996; Мирзоева 2002). Размножение микроорганизмов при нарушениях технологии изготовления или хранения кормов вызывает не только снижение их вкусовых качеств, под действием продуктов жизнедеятельности микрофлоры, но и накопление токсинов. Образование этих токсических продуктов, в большинстве своем, идет по типу цепной реакции, при взаимном усилении токсинообразующего эффекта, который нарастает и далее в процессе хранения кормов.

Как показали собственные экспериментальные и литературные данные, приведенные в аналитическом обзоре, питание рыб комбикормами с высокой степенью обсемененности микроорганизмами (более  $10^6$  КОЕ/г) может сопровождаться интоксикацией организма рыб, поражениями внутренних органов, нарушениями в обмене веществ, а также бактериальными заболеваниями и гибелью (Жезмер и др., 1991; Войнова, 1991; Бурлаченко и др., 2001, 2002).

В то же время сведения о структуре микробного фона рыбных комбикормов, их общей микробной обсемененности, ее изменениях при различных условиях крайне ограничены.

В связи с изложенным, цель исследований настоящей главы заключалась в изучении микробного фона комбикормов, с точки зрения его потенциальной опасности для культивируемых рыб, его изменений в процессе хранения и оптимизации способа его контроля.

### 3.1. Структура микробного фона комбикормов для рыб и характеристика доминирующих групп

На основании анализа микрофлоры комбикормов для рыб установлено, что фоновый уровень их бактериальной обсемененности колеблется в диапазоне  $2,9 \times 10^3$  -  $2,0 \times 10^9$  КОЕ/г. При этом большая часть кормов характеризовалась обсемененностью выше, чем  $10^5$ - $10^6$  КОЕ/г, что превышает нормативный показатель безопасности -  $5 \times 10^5$  КОЕ/г (Комбикорма для осетровых и лососевых рыб; ТУ, 2003). Структура бактериального фона комбикормов, как правило, представлена ассоциацией, включающей 2 - 6 (в большинстве случаев 3-4) групп микроорганизмов.

Следует отметить, что в отличие от комбикормов для теплокровных животных (Соколов, 2002), несмотря на одинаковый набор компонентов, корма для рыб имеют более высокий уровень обсемененности. Это связано с высоким содержанием в рыбных кормах продук-



тов животного происхождения (в частности, рыбной и мясокостной муки), для которых изначально характерен более значимый уровень бактериального заражения (Чернышов, Панин, 2000; Соколов, 2002).

Основные группы микроорганизмов, выделенные из образцов кормов, и частота их встречаемости схематически обобщены на рис. 2. Можно видеть, что в комбикормах для рыб доминируют бактерии родов *Bacillus* и *Staphylococcus*, плесени (*Penicillium*, *Mucor*), дрожжеподобные грибы (*Candida*), бактерии кишечной группы (в основном *Escherichia coli*). Особенности их биологии представляют интерес в интерпретации наших результатов.

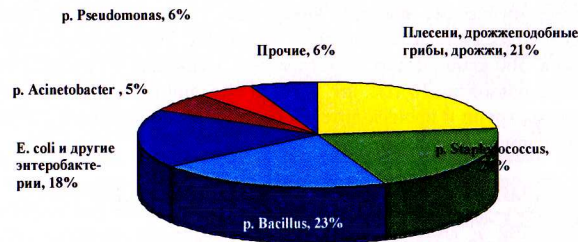


Рис. 2. Основные группы фоновых микроорганизмов и частота их встречаемости в рыбных комбикормах

Бактерии рода *Bacillus* широко распространены в почвах, воде, поселяются на растениях, покровах и в пищеварительном тракте животных. Они относятся к сапрофитам и являются основными участниками разложения белковых субстратов. Бациллы характеризуются высокой протеолитической активностью, часто являются антагонистами по отношению к другим микроорганизмам. Образование спор позволяет им сохранять жизнеспособность при неблагоприятных условиях внешней среды (в частности, при влаготепловой обработке сырья и кормов в процессе гранулирования). Некоторые виды р. *Bacillus* относятся к возбудителям заболеваний человека, позвоночных животных (в частности, сибирской язвы, ботулизма, пищевых отравлений, и т.д.), а также насекомых и растений.

Следующая, не менее многочисленная группа – это стафилококки (р. *Staphylococcus*). В большей степени – *St. epidermidis* и *St. saprophyticus*, в меньшей – *St. aureus*. Их присутствие обусловлено высоким содержанием этих микроорганизмов в исходном сырье как животного, так и растительного происхождения (Соколов, 2002; Чернышов, Панин, 2000). Стафилококки относятся к условно-патогенным микроорганизмам. Они широко распространены в воздухе, на объектах окружающей среды, на кожных покровах человека и животных, обладают мощными защитными механизмами, противостоят высушиванию и замораживанию. Стафилококки вырабатывают достаточно устойчивые экзотоксины, в том числе гемолитины, приводящие к разрушению эритроцитов, и энтеротоксины, вызывающие пищевые отравления. Эти микроорганизмы являются основной причиной гнойных и других заболеваний, энтероколитов, могут поражать любые органы и ткани. Для стафилококковых инфекций характерно наличие повторных рецидивов. Кроме развития инфекций, стафилококки активно гидролизуют белки и жиры (А.Щербина, 1960; Черкес и др., 1987; Чернышов, Панин, 2000).

Бактерии кишечной группы (энтеробактерии), представители сем. *Enterobacteriaceae*. К преобладающим в ней организмам относят кишечную палочку (*E. coli*) с различными ферментативными свойствами. Они заслуживают пристального внимания, так как являются возбудителями ряда бактериальных заболеваний рыб, связанных с питанием комбикормами (Жезмер, 1988, 1991; Бычкова, 1995; Ларцева, 2003). Энтеробактерии одинаково успешно существуют во внутренней среде живых организмов и в окружающей среде, приспосабливаясь к которым проявляют многообразие своих свойств. Они могут являться симбионтами

желудочно-кишечного тракта, активно участвовать в процессе переваривания его содержимого, а также в формировании неспецифического иммунитета. Ферментативная активность бактерий этой группы наиболее выражена у сапрофитов и уменьшается по мере усиления патогенности. Это объясняется тем, что микроорганизмы, приспосабливаясь к паразитическому образу жизни, утрачивают ставшие ненужными ферменты. При изменении условий существования (например, ослабление организма хозяина), они трансформируются в возбудителей заболеваний (Черкес и др., 1987).

Энтеробактерии, являясь представителями транзитной микрофлоры, очень часто обнаруживаются на жабрах и в паренхиматозных органах живых рыб, не имеющих признаков патологий. В рыбной продукции, особенно в случаях недостаточной степени обработки сырья, их количество многократно возрастает, что может явиться причиной пищевых токсикоинфекций (Ларцева, 2003).

Следующая крупная группа – это грибы - дрожжеподобные и плесени. Они широко распространены на всех естественных субстратах: почвах, растительных и животных остатках, продуктах питания и т.д. Среди них имеются сапрофитные и паразитические формы. Эту группу относят к потенциальным источникам опасности, так как грибы способны к токсинообразованию при нарушении нормальных условий хранения кормов (повышении влажности и температуры), а также могут вызывать различные заболевания, в частности микозы, кандидозы и прочее, у теплокровных животных и рыб (Головина, 2003).

Так представители рр. *Fusarium* и *Candida* – являются причиной заболеваний и гибели различных видов рыб (Галаш, 1988, 1990; Войнова, 1991; Исаева, Козиненко, 1991); грибы рода *Candida*, и плесени рода *Penicillium* – вызывают снижение выживаемости, изменения в обмене веществ, дисбактериоз, накапливаются во внутренних органах осетровых (Бурлаченко, 2004).

По нашим данным, микроорганизмы других групп присутствуют в комбикормах в ограниченных количествах (Бурлаченко и др., 2002). Однако они также представляют интерес, в частности бактерии р. *Pseudomonas* и р. *Acinetobacter*, в связи с наличием большого количества условно-патогенных и патогенных форм, и как возбудители инфекционных заболеваний.

Таким образом, микробный фон комбикормов для рыб характеризуется ограниченным числом групп микроорганизмов. Все они имеют широкое распространение, высокую ферментативную активность, позволяющую расщеплять органические субстраты; большинство способно к токсинообразованию и обладает факторами патогенности - гемолитической и протеолитической активностью, а также имеет сапрофитные и паразитические формы. Многие из них, с одной стороны, являются представителями нормальной микрофлоры рыб, с другой - будучи достаточно активными, при наступлении определенных условий (ослабление рыб, стрессе, органическом загрязнении среды и т.д.), могут проявлять патогенные свойства.

Эти свойства, на фоне способности микроорганизмов длительное время сохраняться во внутренних органах и на поверхности тела рыб (Ларцева, 2003), представляют весьма существенную угрозу и для потребителей рыбной продукции.

### 3.2. Изменения бактериальной обсемененности комбикормов при различных условиях хранения

В таких компонентах комбикормов как рыбная мука в процессе хранения уровень бактериальной обсемененности претерпевает значительные изменения (Сафронова, Шендерюк, 2001). В растительных компонентах его динамика выражена значительно меньше (Чернышов, Панин, 2000).

В связи с вышесказанным, представлялось целесообразным оценить особенности динамики бактериальной обсемененности комбикормов в стабильных условиях хранения и при повышении влажности, что, как правило, имеет место в рыбоводных хозяйствах. Для полу-



чения более полного представления о динамике микробной обсемененности комбикормов для рыб были также проведены наблюдения за ее изменениями в кормах одного состава, но имеющих различный уровень заражения микроорганизмами.

В исследованиях использовали стартовый комбикорм для осетровых (влажность – 8,3%, сырой протеин – 42%, жир – 7,8%, энергия 3560 ккал/кг). Его общая бактериальная обсемененность составила  $2,1 \times 10^4$  КОЕ/г, при этом значительная доля (более 76%) приходилась на бактерии р. *Staphylococcus* (по биохимическим свойствам – *St. saprophyticus*). При моделировании изменений условий хранения часть корма была подвергнута кратковременному увлажнению (повышение влажности корма на 10% в течение 12 часов). Для наблюдений за динамикой различных уровней бактериальной обсемененности провели экспериментальное заражение исследуемого корма в трех концентрациях. В качестве заражающего агента был использован эталонный штамм *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990.

В ходе трехмесячных наблюдений за бактериальным фоном корма, принятого за контроль, было отмечено некоторое снижение уровня общей обсемененности. Следует отметить, что корм хранился в стабильных условиях температуры и влажности (количество влаги в нем не превышало 8,3%).

В то же время, даже незначительное увлажнение отдельной партии корма (до 9,6%) привело к резкому и быстрому (в течение 48 часов) возрастанию общей бактериальной обсемененности более чем в 6 раз (рис. 3), которая сменилась стабилизацией при снижении содержания влаги до первоначального уровня.

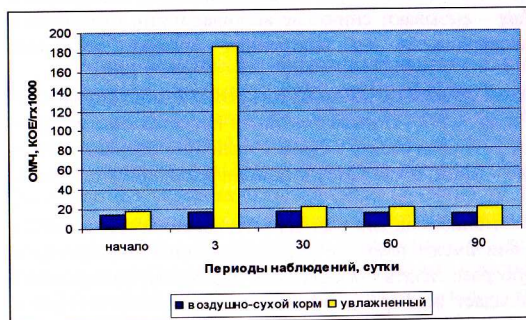


Рис. 3. Динамика бактериальной обсемененности комбикорма при стабильных условиях хранения и кратковременном увлажнении.

Полученные данные являются убедительной иллюстрацией необходимости соблюдения условий хранения кормов, в частности, их защиты от увлажнения.

При длительном хранении (в пределах трех месяцев), независимо от величины начальной обсемененности корма, в течение первого месяца, как правило, происходило ее снижение (табл. 1). Аналогичные изменения отмечены и в процессе хранения рыбной муки (Сафронова, Шендерюк, 2001)

Таблица 1. Динамика микробной обсемененности кормов с различным уровнем заражения

Уровень заражения, КОЕ/г	Периоды опыта, сутки				
	1	3	30	60	90
$10^4$	$3 \times 10^4$	$2,7 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
$10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$2,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$
$10^8$	$1,2 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$2,7 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$

Это связано с активным накоплением в корме экзотоксинов, вырабатываемых бактериями, и токсичных продуктов деградации белков и липидов. Токсины, аккумулируясь, по-

давливают рост и самих микроорганизмов. Подтверждением этого факта является отмеченный в ходе наблюдений переход бактерий *St. epidermidis* из активной S-формы (в начале эксперимента) в ослабленную R-форму (в конце эксперимента), что свидетельствует об отрицательном влиянии накопления токсичных веществ.

Следует отметить, что при традиционном бактериологическом контроле кормов, проводимые определения характеризуют состояние обсемененности в конкретный момент времени. Поэтому, особенно если речь идет о кормах, хранившихся более месяца, получаемые показатели, не превышающие нормативных значений, не могут служить гарантией отсутствия в корме токсичных веществ, которые могли образоваться ранее в результате жизнедеятельности бактерий.

### 3.3. Тест-система для микробиологической характеристики рыбных комбикормов

Процедура микробиологического анализа достаточно сложна, продолжительна по времени и трудоемка. Поэтому в практике работы рыбоводных предприятий и комбикормовых заводов исследование бактериальной обсемененности кормов в большинстве случаев затруднено. Подготовка и проведение анализов возможны лишь в специализированных бактериологических лабораториях и должны осуществляться квалифицированным персоналом. Кроме того, детальная идентификация основных групп микроорганизмов, необходимая в случае возникновения экстренных ситуаций, для точной диагностики и назначения комплекса мероприятий достаточно длительна.

Между тем, потеря времени в условиях рыбоводных хозяйств, при значительном поражении комбикормов патогенными или условно-патогенными формами, может привести к гибели выращиваемых рыб. В целях упрощения и ускорения процедуры микробиологического анализа комбикормов и обеспечения возможности его проведения непосредственно в хозяйствах или на комбикормовых заводах, не имеющих соответствующих лабораторий, была создана модификация современной тест-системы Petrifilm 3М. Эта экспресс-система была разработана в США Бобом Нельсоном (Nelson) в 1984 г. и постоянно совершенствуется. В Европе система появилась в конце 80-х годов. На сегодняшний день она применяется более чем на 3000 европейских предприятий пищевой и сельскохозяйственной промышленности.

В основе метода лежит использование для микробиологических анализов тест-пластин Petrifilm 3М с готовыми питательными средами. Находящиеся на пластинах специфичные среды, предназначены для идентификации и количественного учета различных групп микроорганизмов путем подсчета всех выросших видимых колоний.

На основании полученных данных о преобладающих группах микроорганизмов в комбикормах и сырье, из предлагаемого фирмой 3М набора тест-пластин, нами были выбраны тесты для определения общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), энтеробактерий, колиформных бактерий, дрожжей и плесеней и стафилококков.

С целью подтверждения возможности использования пластин 3М Petrifilm при бактериологических анализах комбикормов были проведены сравнительные посевы 18 образцов комбикормов на тест-пластинах и на стандартных средах: эритрит-агаре (для определения общего количества микроорганизмов), среде Эндо (для энтеробактерий) и среде Сабуро (для грибов и дрожжей). Подготовка проб, посевы и их инкубация велись в соответствии с традиционными методиками и рекомендациями фирмы 3М для тестов Petrifilm. Полученные результаты продемонстрировали возможность определения как общего количества, так и отдельных групп микроорганизмов, и, в основном, более высокую чувствительность пластин Petrifilm 3М, по сравнению с обычными питательными средами.

Проведение анализов на пластинах, в отличие от традиционных, выполняемых в микробиологических лабораториях, не требует специальной подготовки и высокой квалификации персонала. Согласно информации фирмы-изготовителя, применение пластин при тех же затратах времени и средств позволяет увеличить количество анализов на 60%.



Предлагаемая нами модификация метода предусматривает его использование применительно к микрофлоре, обычно населяющей сырье и комбикорма для рыб. Модификация подробно описана в «Руководстве по применению микробиологических тестов Petrifilm 3М для характеристики рыбных кормов» (Бурлаченко, 2007).

3.3.1. *Компьютерная программа: «Image analyzer for microbiological tests system (IAMTS)»*

Компьютерная программа предназначена для подсчета количества колоний микроорганизмов на 4-х типах тест-пластин с учетом особенностей идентификации их различных групп по цветовым, размерным и культуральным характеристикам. Программа может быть использована для ускорения и упрощения подсчета результатов, а также для хранения и обработки получаемой информации в цифровом формате (свидетельство № 2006612044, Бурлаченко, Яхонтов, 2006).

Подводя итог результатам, изложенным в главе, и принимая во внимание литературные данные о влиянии микробного заражения комбикормов на животных различных систематических групп, следует отметить, что более высокая, чем в кормах для сельскохозяйственных животных, микробная обсемененность кормов для рыб представляет для них реальную опасность (Жезмер и др., 1991; Ларцева, Рогаткина, 1996; Чернышов, Панин, 2000; Соколов, 2002). Это связано с преобладанием в рыбных кормах микроорганизмов, имеющих мощные факторы патогенности, склонность к паразитизму, быстрому наращиванию численности при кратковременных изменениях условий хранения, что сопровождается накоплением высокотоксичных продуктов жизнедеятельности. Все это, на фоне менее совершенной, по сравнению с высшими позвоночными, иммунной системы рыб (Лукьяненко, 1971, 1989; Кондратьева, Киташова, 2002) и их большей зависимости от качества среды выращивания, позволяет предполагать высокую чувствительность организма рыб при интенсивном культивировании к повреждающему действию микробного заражения комбикормов.

#### ГЛАВА 4. ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРЕОБЛАДАЮЩИХ ФОРМ МИКРООРГАНИЗМОВ КОМБИКОРМОВ НА МОЛОДЬ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Известно, что микробный пейзаж рыб на 50% определяется микрофлорой кормов (Войнова, 1991 и др.; Вовк, 1994; Бормотова и др., 1995). Доминирующая в кормах микрофлора, попадая в рыб непосредственно с кормом или водой, колонизирует кишечник, изменяя его нормальный биоценоз, а затем при развитии патологических процессов проникает и во внутренние органы. При этом присутствующие в кормах условно-патогенные бактерии, способные к токсинообразованию, приводят к возникновению генерализованных энтеросептицемий. Последние могут усиливаться действием постоянно присутствующих в воде бактерий рода *Aeromonas*, также обладающих энтеротоксигенной активностью (Жезмер и др. 1988, 1991; Бычкова и др. 1995). В наиболее тяжелых случаях наблюдается массовая гибель рыб. В то же время столь выраженная отрицательная реакция организма рыб на воздействие микрофлоры комбикормов не является абсолютным правилом. Тем более, что присутствие микроорганизмов в кормах как в естественных условиях, так и в условиях культивирования, является очевидным фактом, играющим определенную роль в формировании микробиоценоза их кишечника, который принимает участие как в процессах переваривания пищи, так и в осуществлении защитных функций организма.

С этих позиций представлялось важным выяснить, каков безопасный порог присутствия в комбикормах наиболее типичных микроорганизмов, и какие изменения на различных функциональных уровнях у рыб вызывает превышение этого порога.

В связи с тем, что поражение корма микроорганизмами приводит к накоплению бактериальных клеток, продуктов их метаболизма, в частности токсинов, изменяет химический состав и питательность корма, суммарный эффект этого комплексного воздействия (из-за сложности определения каждого элемента в отдельности) мы характеризовали как общую микробную обсемененность, выраженную в «колонии образующих единицах на 1 г корма»

(КОЕ/г) по ГОСТ Р 51426-99. В связи с тем, что единственным переменным фактором в условиях экспериментов была обсемененность комбикормов микроорганизмами, в целях исключения влияния токсичных продуктов окисления липидов, проводился регулярный контроль кислотного числа кормов. За период экспериментов его значения составили в среднем 25 мг КОН (максимально до 45 в конце экспериментов), что находилось в пределах нормы, или немного превышало, нормативные показатели (Комбикорма для осетровых рыб. ТУ, 2003).

Для моделирования реальных условий рыбоводных хозяйств в опытах использовали свежие отечественные комбикорма, полученные непосредственно от завода-изготовителя. Какого-либо дополнительного обеззараживания кормов не проводили. В исследованиях была использована молодь стерляди и сибирского осетра, объектов искусственного воспроизводства и товарного выращивания. Рыб приобретали на Конаковском заводе товарного осетроводства (КЗТО). Начальная масса подопытной молоди составляла от 7 до 30 г. Выбор этой возрастной группы был обусловлен высокой чувствительностью быстро растущего организма к повреждающим агентам вследствие незаконченного формирования защитных функций (Патин, 1985). Кроме того, учитывалась возможность более быстрого, по сравнению со взрослыми рыбами, получения результатов. Молодь осетровых содержали в проточных аквариумах, емкостью 300 л, при скорости водообмена 1 л/мин. Концентрация растворенного в воде кислорода колебалась в пределах 80-85% насыщения. Важным фактором проведения экспериментов являлось полное исключение естественной пищи, а также рыбного фарша, что соответствует условиям индустриального выращивания.

Эксперименты с молодь, питавшейся зараженными комбикормами, проводили по единой схеме «питание-голодание» в аквариальной ВНИРО в период 1999-2004 гг. Все эксперименты были выполнены совместно с К.Б. Аветисовым.

При оценке результатов экспериментов был использован комплекс рыбоводно-биологических, клинко-морфологических и физиолого-биохимических показателей. Проводили определения выживаемости рыб, их среднесуточной скорости роста, оценку состояния и обсемененности внутренних органов, а также изменения в химическом составе тела рыб. Особенности течения метаболических процессов характеризовали на основании интегральных показателей накопления и утилизации пластических веществ и энергии в процессе роста и голодания.

#### 4.1. Влияние заражения комбикормов энтеробактериями (сем. *Enterobacteriaceae*) на рост, физиологическое состояние и обмен веществ молоди осетровых

Основанием для многостороннего изучения влияния на молодь осетровых, наиболее типичных представителей этого семейства – кишечной палочки (*E. coli*), протей (*Pr. vulgaris*) и цитробактера (*Citrobacter sp.*) – явилось наличие у них признаков, присущих представителям транзитной и симбионтной микрофлоры рыб, и в то же время патогенных свойств, вызывающих заболевания, а также способности к контаминации ими рыбной продукции.

##### 4.1.1. Влияние заражения комбикормов кишечной палочкой (*E. coli*) на молодь стерляди и сибирского осетра

Кишечная палочка является типичным представителем микрофлоры кишечника животных различных систематических групп – млекопитающих, птиц, пресмыкающихся, рыб, насекомых. Она обладает широкими адаптационными, в том числе и патогенными свойствами, проявляющимися в зависимости от условий обитания. Вырабатываемые ею в процессе жизнедеятельности ферменты активно расщепляют пищевые субстраты, участвуя тем самым в пищеварении макроорганизма. Кишечная палочка синтезирует некоторые витамины (в частности ряд витаминов группы В и витамин К), а также проявляет антагонистические свойства в отношении патогенных микроорганизмов. Однако при снижении резистентности макроорганизма, нарушениях его пищевого режима, инфекционных заболеваниях кишечные эшерии



хии могут проникать в другие органы и ткани, где активизируется проявление их патогенных свойств и вызывают при этом заболевания (Коляков, 1957; Черес и др., 1987).

В опытах использовали стартовый корм для осетровых рыб рецепта ОСТ-5 (влага - 9,8%, сырой протеин - 51%, сырой жир - 11,0%, энергия 3560 ккал/кг), изготовленный на заводе рыбных комбикормов в Московской области. Партии корма подвергали экспериментальному заражению различными концентрациями ассоциации бактерий группы кишечной палочки, выделенной из этого корма. После экспериментального заражения фактический уровень обсемененности комбикормов бактериями группы кишечной палочки составил  $1,9 \times 10^7$ ,  $3,8 \times 10^8$ ,  $6,5 \times 10^9$  КОЕ/г. Следует подчеркнуть, что фоновый уровень обсемененности свежего корма, принятый за контроль, составлял  $2 \times 10^6$  КОЕ/г, что на порядок выше допустимых значений присутствия микроорганизмов.

Опыты проводили на молоди стерляди и сибирского осетра начальной массой 6,5-7,5 г, которую содержали совместно. Температура воды составила в среднем 23,7°C, продолжительность периода кормления - 60 суток, периода голодания - 50 суток (средняя температура 19,2° С). В связи с тем, что реакция обоих видов рыб на заражение комбикорма *E. coli* сходна, но более выражена у молоди стерляди, в автореферате приводятся только результаты экспериментов со стерлядью.

По окончании периода питания кормами, зараженными кишечной палочкой, средняя масса рыб составила от 20 до 24 г (за исключением варианта  $6,5 \times 10^9$  КОЕ/г, где она составила в среднем 15,9 г). Различия не превышали статистической погрешности. Выживаемость молоди находилась в пределах нормативной для исследуемой весовой группы (80 %). В то же время, начиная с уровня обсемененности корма кишечной палочкой  $2 \times 10^6$  КОЕ/г, появились признаки ее отрицательного воздействия на молодь стерляди. При этой обсемененности корма, являвшейся фоновой в условиях наших опытов, более чем у половины рыб отмечены патологические изменения печени, почек и кишечника. В печени и почках они проявились в изменениях их цвета и структуры, что является отражением различных этапов течения воспалительных процессов. Известно, что на начальных этапах для воспаления характерно усиление циркуляции крови, повреждение стенок сосудов, отеки. Затем, вследствие недостаточного кровоснабжения, наблюдается развитие некротических процессов, идет замещение части собственных тканей органов соединительной или жировой тканью. Наряду с поражением микроорганизмами, это сопровождается снижением эффективности их работы, в том числе и угнетением защитных функций (Коляков, 1952; Журавель 1968; Schäperclaus, 1979; Евдокимова, 2003).

Рост степени заражения корма до  $6,5 \times 10^9$  привел к снижению темпа роста (до 23%), выживаемости и дальнейшему увеличению количества рыб с патологиями. При максимальном уровне заражения внутренние органы у 80-100% молоди были поражены кишечной палочкой и другими микроорганизмами. Это явилось свидетельством нарушения целостности слизистой оболочки кишечника и снижения эффективности выполняемой ею защитной функции (Уголев, 1991; Кузьмина, 1995 и др.). В микрофлоре кишечника молоди, под влиянием зараженных кормов, произошло обеднение видового состава нормофлоры и замена сапрофитных форм паразитическими, вступающими в конкурентные отношения с макроорганизмом. Согласно А.М. Уголеву (1991), истончение и повреждение стенок кишечника приводит к сокращению поверхности слизистой и, как следствие, к ухудшению процессов переваривания и усвоения пищи. Кроме того, повреждения слизистой увеличивают ее проницаемость для микрофлоры кишечника обсеменяющей внутренние органы.

Начиная с уровня заражения  $1,9 \times 10^7$  КОЕ/г, изменения в химическом составе тела молоди стерляди имели достаточно выраженный характер с тенденцией усиления по мере возрастания обсемененности корма. У рыб наблюдалось сильное обводнение и снижение содержания в организме белка и липидов. На метаболическом уровне значимые изменения отмечены при заражении корма от  $1,9 \times 10^7$  до  $6,5 \times 10^9$  КОЕ/г (табл. 2). При питании они выразились в снижении накопления массы на 30-40%, обезвоживании организма на 10-37%, угнете-

нии синтеза белка на 20-42%, липидов - на 59-75%, а также в существенном (до 41-54%) сокращении обеспеченности организма энергией, в связи с ее преимущественным использованием для нейтрализации действия токсинов.

При голодании рыб, по мере увеличения заражения корма, в 2-3,5 раза возросли потери массы, в 4 раза - воды. Роль белка в поддерживающем обмене усилилась в 3,8 раз, липидов - в 1,3 раза; более чем в 2 раза возросли потери энергии, которые обеспечивались в основном за счет энергии белка (до 76%).

Регистрируемые при голодании накопление или минимальные траты углеводов, несмотря на их активное участие в обменных процессах, обусловлены их постоянным образованием из белков и липидов посредством глюконеогенеза. Этот естественный процесс, свойственен всем голодающим или зимующим животным (Хочачка, Сомеро, 1988). Наличие подобного пути снабжения голодающих рыб глюкозой описано М.А. Щербиной и З.А. Мукошеевой (1978) у зимующих карпов и нами у молоди кефалей (Бурлаченко, 1990; 1991). Таким же естественным процессом для голодающих рыб является и накопление зольных элементов. Это происходит в связи с преимущественным расходом в поддерживающем обмене органических веществ, в результате чего относительный вес минералов, в частности костной ткани, возрастает (Щербина и др., 1974). Кроме того, они могут поступать в голодающий организм осмотическим путем (Карзинкин, 1952).

Таблица 2. Накопление массы, веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными *кишечной палочкой*, их утилизация при голодании; выживаемость рыб

Варианты заражения, КОЕ/г	Масса	Вода	Сухое вещество	Сырой протеин	Сырой жир	Углеводы	Минеральные в-ва	Энергия,		Выживаемость, %
								ккал 100 г	белка, % общей	
<i>НАКОПЛЕНИЕ, % 100 г массы до питания</i>										
$2,0 \times 10^6$ (контроль)*	240,4	180,2	60,2	37,5	13,0	2,9	6,8	349	61	93
$1,9 \times 10^7$	207,5	162,3	45,2	30,0	3,2	0,9	11,1	205	83	93
$3,8 \times 10^8$	167,2	128,6	38,6	24,3	5,3	2,5	6,5	199	70	93
$6,5 \times 10^9$	144,6	113,2	31,4	21,8	3,8	0,1	4,7	161	77	87
<i>УТИЛИЗАЦИЯ, % 100 г массы до голодания</i>										
$2,0 \times 10^6$ (контроль)*	8,3	5,0	3,3	1,8	2,6	+0,1**	+1,0	35	29	75
$1,9 \times 10^7$	10,8	5,5	5,3	3,7	0,9	+0,5	1,2	28	76	80
$3,8 \times 10^8$	21,5	14,0	7,5	4,2	1,9	0,6	0,8	45	54	80
$6,5 \times 10^9$	25,8	18,4	7,4	5,6	1,5	+0,5	0,8	43	74	60

\* Вариант с естественным фоном обсеменения *E. coli*;

\*\* Знак + означает превышение содержания вещества в теле рыб по сравнению с его количеством до голодания.

На рис. 4 приведены абсолютные значения количества пластических веществ и энергии, оставшихся после голодания от накопленных стерлядью при питании.

Таким образом, последовательное снижение интенсивности синтеза пластических веществ и энергии, их возрастающие траты при голодании, отмеченные у рыб по мере повышения уровня обсемененности корма, на фоне торможения роста, даже при нормативном уровне выживаемости, являются отражением резко отрицательного влияния на молодь стерляди присутствия в кормах кишечной палочки и ее метаболитов.



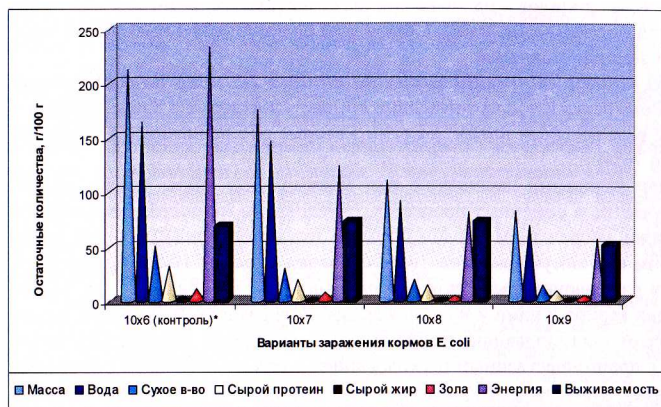


Рис.4. Остаточные количества веществ и энергии, сохранившихся после голодания от накопленных в теле молоди стерляди при питании комбикормами, зараженными кишечной палочкой (г/100 г начальной массы)

В связи со значительными сдвигами в обмене веществ и развитием патологий внутренних органов уже при степени заражения корма кишечной палочкой, составляющей  $2 \times 10^6$  КОЕ/г, следует признать необходимость нормирования ее присутствия в кормах на уровне, не превышающем  $5 \times 10^5$  КОЕ/г.

#### 4.1.2. Заражение комбикормов протеом (*Pr. vulgaris*) и его влияние на рост, физиологическое состояние и обмен веществ у молоди стерляди

Род *Proteus* включает многообразную группу бактерий, обладающих значительными адаптационными возможностями, которые позволяют им легко приспосабливаться к многообразию условий внешней среды. Они часто контаминируют комбикорма и продукты питания человека. Протеи устойчивы к действию низкой температуры, высушиванию, способны долгое время сохраняться в различных субстратах. К биохимическим характеристикам протеов относятся их гемолитическая, протеолитическая и лецитиназная активность, что является свидетельством наличия у них патогенных свойств. Кроме того, они обладают способностью продуцировать сильнодействующий эндотоксин, вызывающий гемолиз эритроцитов. Протеи характеризуются ярко выраженными антагонистическими свойствами по отношению к различным представителям микрофлоры кишечника, а также способностью к активному прикреплению к слизи, при этом устойчивы к большинству антибиотиков (Черкес и др. 1987; Миرونюк и др., 2000; Urbanova et al., 2000; Ларцева, 2003). У рыб, также как у высших позвоночных животных, протеи являются возбудителями инфекционных заболеваний, независимо от среды обитания как в естественных условиях, так и при культивировании.

Эксперименты по питанию рыб комбикормами, зараженными протеом, были проведены на молоди стерляди, масса которой колебалась около 7 г. Продолжительность периода кормления составила 55 суток при средней температуре  $21,7^\circ\text{C}$ , периода голодания – 35 суток, при  $19,5^\circ\text{C}$ .

В опытах использовали стартовый комбикорм для осетровых, изготовленный в экспериментальном цехе «Гипрорыбфлот-Экос». Комбикорм имел следующий состав (%): вода – 6,3, сырой протеин – 51,2, сырой жир – 10,0, энергия – 3560 ккал/кг. Начальная фоновая обсемененность корма составляла  $7,4 \times 10^4$  КОЕ/г корма. Реальная обсемененность после заражения эталонным штаммом *Pr. vulgaris* составила  $6,0 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $1,0 \times 10^8$  КОЕ/г. Контролем служил тот же комбикорм, не содержащий заражающего агента.

Темп роста рыб во всех вариантах, включая контрольный, был невысоким, что при нормальных условиях содержания, которые поддерживались на протяжении всего периода экспериментов, могло свидетельствовать, с одной стороны, о неполном соответствии исполь-

зуемого корма пищевым потребностям рыб, с другой – о неудовлетворительном состоянии их здоровья или же о низком качестве подопытной молоди. Масса рыб в конце опыта составляла от 11,8 до 14,4 г, без статистически значимых различий между вариантами. Выживаемость, за исключением варианта с максимальной степенью заражения, находилась в пределах нормативных показателей.

Визуальные симптомы негативного воздействия проявились у молоди стерляди уже в варианте с минимальным обсеменением корма –  $6 \times 10^4$  КОЕ/г, и имели максимальное проявление, выраженное в снижении темпа роста на 25%, и выживаемости до 39% в варианте с наивысшим заражением  $10^8$  КОЕ/г. Причем возможность случайной гибели молоди по техническим причинам полностью исключалась. Клинико-морфологическое состояние внутренних органов рыб в начале опыта было удовлетворительным. Количество рыб с нарушениями цвета, структуры и контаминацией почек и печени микроорганизмами было относительно невысоким.

По окончании периода кормления доля рыб с изменениями цвета и нарушениями структуры печени в контрольном варианте возросла в полтора раза. В вариантах с заражением кормов протеом количество патологий увеличилось в два раза. Состояние почек ухудшилось, у половины рыб была отмечена анемия. Наблюдались патологические изменения и в кишечнике (истончение слизистой оболочки и нарушение отделения слизи), при отсутствии существенных изменений в видовом составе микробиоценоза кишечника.

После голодания во всех вариантах (за исключением контрольного) возросло количество пораженных рыб, усилились патологии и степень обсемененности внутренних органов. Это свидетельствовало о крайне неблагоприятном физиологическом состоянии молоди, ее ослаблении и отсутствии оздоравливающего и регенерирующего эффектов, которые, как правило, сопровождают голодание. О существенном ослаблении организма рыб свидетельствовал факт появления микроорганизмов в мышцах. Худшее, по сравнению с молодой контрольного варианта, состояние почек, частично кишечника и печени, дало основание полагать, что именно присутствие протея привело к развитию у рыб необратимых изменений, усилившихся во внутренних органах в стрессовой ситуации голодания.

Таблица 3. Накопление массы, веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными протеом, их утилизация при голодании;

Варианты заражения, КОЕ/г	Масса	Вода	Сухое в-во	Сырой протеин	Сырой жир	Углеводы	Минеральные в-ва	Энергия,		Выживаемость, %
								ккал/100 г	белка, % об-щей	
<b>НАКОПЛЕНИЕ, г/100 г массы до питания</b>										
Контроль	92,0	74,1	17,9	11,2	1,6	2,0	3,1	87	73	83
$6,0 \times 10^4$	59,5	46,5	13,0	7,8	0,8	2,0	2,4	61	74	93
$8,3 \times 10^6$	77,1	61,5	15,6	9,6	1,5	1,8	2,7	77	71	91
$1,0 \times 10^8$	81,7	64,3	17,4	10,4	3,4	1,3	2,3	97	61	39
<b>УТИЛИЗАЦИЯ, г/100 г массы до голодания</b>										
Контроль	27,8	19,7	8,1	5,2	1,6	1,7	+0,4*	52	57	80
$6,0 \times 10^4$	20,4	12,6	7,8	5,0	1,5	0,8	0,5	46	62	40
$8,3 \times 10^6$	33,6	24,4	9,2	5,7	1,7	0,6	0,9	51	64	73
$1,0 \times 10^8$	20,9	13,2	7,7	4,9	2,8	0,2	+0,2	55	51	40

\* - знак + означает превышение содержания вещества в теле рыб по сравнению с его количеством до голодания



Снижение темпа роста рыб, критическое состояние их внутренних органов и мышц теснейшим образом были связаны с изменениями в химическом статусе организма и обмене веществ (табл. 3 и рис. 5). При минимальной степени заражения корма протеом отмечено наибольшее обезвоживание прироста, торможение синтеза белка и липидов на 30 и 49%, соответственно. По мере увеличения обсемененности корма, ожидаемая тенденция еще большего угнетения синтеза белка и липидов не проявилась, напротив, анаболические процессы даже активизировались. Например, в варианте с максимальным уровнем заражения корма, наблюдалось усиление синтеза липидов более чем в два раза. Однако, это относилось лишь к небольшой части (39%) выживших в этом варианте рыб.

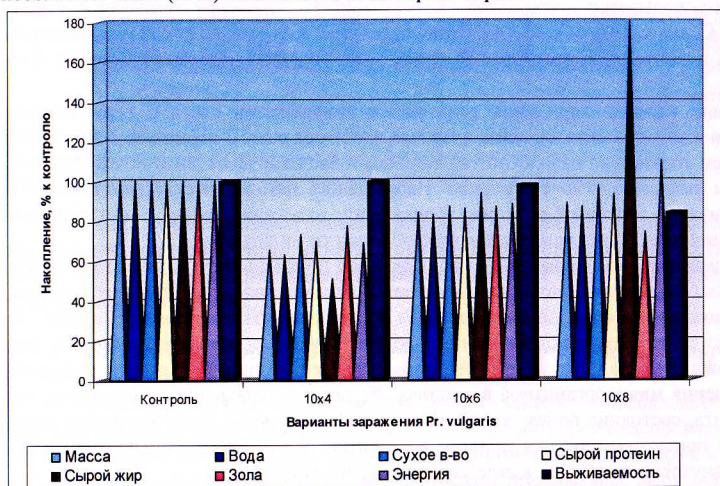


Рис. 5. Накопление веществ и энергии у молоди стерляди, при питании комбикормами, зараженными протеом, % к контролю

В поддерживающем обмене при голодании, максимальные, по сравнению с контролем, траты белка и липидов были отмечены в варианте заражения корма протеом  $8,3 \times 10^6$  КОЕ/г.

Особое внимание привлекла способность небольшой части рыб (16% выживших), из варианта с максимальным заражением корма протеом, сохранить достаточно высокий темп роста, уровень накопления белка и особенно липидов (более, чем в два раза). При голодании эти рыбы характеризовались меньшими потерями массы, влаги и равной, с молодью контрольного варианта, степенью утилизации сухого вещества и белка. Подобная устойчивость рыб к действию протея наблюдается и в естественных условиях обитания, где он часто обнаруживается в кишечнике, других органах и тканях, различных видов рыб, не имеющих признаков патологий (Горегляд, 1940; Погорелова и др., 1992; Ларцева, 1997).

Подводя итог изучению воздействия на молодь стерляди комбикормов, зараженных протеом, можно сделать заключение, что показатель выживаемости отражает отрицательное действие заражения корма протеом на молодь стерляди в случае, если степень обсемененности им составляет не менее  $10^8$  КОЕ/г корма. При меньшей степени заражения питание рыб этим кормом даже в течение двух месяцев негативно не отражается на их росте и выживаемости. Однако при отсутствии видимых признаков неблагоприятного влияния во внутренних органах молоди, наблюдались патологические изменения их структуры и увеличение бактериальной обсемененности. Эти изменения еще более усилились при голодании, что позволило предположить необратимый характер патологий, возникших в результате интоксикации. Одновременно достаточно четко проявились резкие изменения в обмене веществ, которые выразились в угнетении синтеза белков и липидов.

На основании данных о высокой смертности рыб при питании (степень заражения корма  $10^8$  КОЕ/г) и голодании (при всех степенях заражения), а также негативных изменений в состоянии внутренних органов и в обмене веществ, вызываемых у молоди стерляди, а также с учетом высоких адаптивных свойств и санитарной значимости протея, его присутствие в кормах следует ограничить уровнем  $1 \times 10^4$  КОЕ/г.

#### 4.1.3. Влияние различной степени заражения комбикормов цитробактером (*Citrobacter sp.*) на молодь стерляди

*Citrobacter* относится к роду *Escherichia* и имеет сходные с кишечной палочкой свойства (Фробишер, 1965). Он является типичным представителем энтеробактерий и одинаково хорошо развивается во внешней среде и в кишечнике. Эти бактерии обладают выраженными гемолитическими и протеолитическими свойствами, характеризующими их патогенность.

У рыб, пораженных цитробактером, наблюдается энтерит, множественные воспаления внутренних органов, язвы на коже и признаки других патологий (Афанасьев и др., 1997; Сайко, 1999; Ожередова, 2006а, 2006б). В ассоциации с другими бактериями кишечной группы цитробактеры усиливают их патогенные свойства и тяжесть заболевания (Жезмер и др., 1991).

Широкое распространение цитробактера в водной среде, его способность инфицировать комбикорма и рыб, вызывая их заболевания, или же просто сохраняться в живых рыбах и рыбной продукции, являясь при этом возможным источником пищевой токсикоинфекций человека, послужили основанием для более подробного изучения воздействия заражения комбикормов бактериями рода *Citrobacter* на молодь стерляди.

Для экспериментального заражения был взят стартовый комбикорм для осетровых рыб рецепта ОСТ-5 (влага - 8,7%, сырой протеин - 55%, жир - 11,2%, энергия 1,36 МДж). Фактическая обсемененность кормов цитробактером после заражения оказалась ниже расчетной, составив  $6,6 \times 10^6$ ,  $8,5 \times 10^6$ ,  $1,3 \times 10^7$  КОЕ/г, что было обусловлено действием неучтенных нами факторов, в частности, присутствием в исходном корме спорных форм картофельной палочки и других микроорганизмов. Масса молоди стерляди в начале опыта была равна 7-8 г. Продолжительность периода кормления составила 45 суток при средней температуре  $24,8^\circ\text{C}$ , голодания - 40 суток, при температуре  $19,8^\circ\text{C}$ .

Питание молоди стерляди комбикормами с различной степенью заражения цитробактером не оказало влияния на выживаемость (отход отсутствовал) и массу рыб, которая составила в среднем 23-25 г при отсутствии статистически значимых различий между вариантами. Однако, усиление степени заражения корма (от  $6,6 \times 10^6$  до  $1,3 \times 10^7$ ) привело к последовательному сокращению скорости роста молоди (до 17%).

Помимо угнетения роста, наблюдаемого у рыб, получавших зараженные цитробактером корма, на разных этапах опыта были отмечены существенные изменения состояния внутренних органов. Установлено, что высокая обсемененность кормов, вызвала изменения цвета и нарушение структуры печени и почек у 70-100% рыб. Кроме того, было обнаружено развитие анемии, а у половины всех рыб варианте с максимальным заражением корма - воспаление заднего отдела кишечника. Все это свидетельствовало о развитии патологических процессов (Баженов, 1964; Журавель и др., 1968; Евдокимова, 2003). Сходные, с отмеченными нами, изменения в печени, почках, кишечнике на фоне более тяжелого, острого течения заболевания, были описаны Н.А. Ожередовой (2006 а) у двухлеток карповых рыб.

Подтверждением алиментарной природы изменений внутренних органов стала регенерация и нормализация их состояния, зарегистрированная после голодания. Кроме того, следует отметить, что, несмотря на наличие патологических изменений во внутренних органах, присутствия в них цитробактера не обнаружено. Его количество в кишечнике, по сравнению с обсемененностью корма, было незначительным. Все это свидетельствовало о существовании у молоди стерляди достаточно эффективных защитных механизмов пищеварительного тракта, которые препятствовали проникновению в организм чужеродных бактерий, и яви-



лось подтверждением сведений различных авторов о защитной роли слизистой кишечника рыб в отношении чужеродных бактерий (Guelein, 1962, 1963; Кузьмина, 1995 и др.).

Анализ данных о накоплении массы, веществ и энергии у рыб, питавшихся кормами, зараженными цитробактером (табл.4), позволили установить, что по сравнению с контролем прирост массы, более значимый у молоди из опытных вариантов, обеспечивался, в основном, за счет накопления воды. Максимальная обводненность прироста (на 29% выше, чем в контроле) отмечена в варианте с наименьшим обсеменением, причем количество накоплений пластических веществ, практически, не отличалось от контроля. Далее, по мере увеличения степени заражения корма, обводнение прироста затормозилось (~ на 10%). Количество синтезируемого белка сократилось на 16-20%, липидов – на 11-36%. Одновременно с нарушениями биосинтетических процессов произошло значительное снижение выживаемости рыб (до 50%) в условиях голодания.

Таблица 4. Накопление массы, веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными *цитробактером*, их утилизация при голодании; выживаемость рыб

Варианты заражения, КОЕ/г	Масса	Вода	Сухое вещество	Сырой протеин	Сырой жир	Углеводы	Минеральные в-ва	Энергия		Выживаемость, %
								ккал/100 г	белка, % общей	
<b>НАКОПЛЕНИЕ, г/100 г массы до питания</b>										
Контроль	208,2	151,7	56,5	31,9	12,8	4,3	7,5	323	56	100
6,6x10 <sup>6</sup>	251,4	195,2	56,2	32,2	12,1	3,9	8,0	315	58	100
8,5x10 <sup>6</sup>	224,4	173,4	51,0	26,8	11,4	5,8	7,0	285	54	100
1,3x10 <sup>7</sup>	219,8	174,3	45,5	25,6	8,2	4,7	7,0	244	60	100
<b>УТИЛИЗАЦИЯ, г/100 г массы до голодания</b>										
Контроль	10,9	5,5	5,4	2,8	2,9	0,3	+0,6	45	36	100
6,6x10 <sup>6</sup>	16,4	9,6	6,8	3,6	3,2	+0,2*	+0,5	50	41	50
8,5x10 <sup>6</sup>	6,0	1,5	4,5	1,9	3,1	0,1	+0,6	41	27	98
1,3x10 <sup>7</sup>	4,8	2,8	2,0	0,5	2,2	+0,2	+0,5	23	13	87

\* Знак + означает превышение содержания вещества по сравнению с его количеством до голодания

Менее значимое накопление пластических веществ сопровождалось их более экономной утилизацией (за исключением варианта 6,6x10<sup>6</sup>) при голодании, что можно связать с восстановительными процессами регенерации, отмеченными во внутренних органах.

На основании выявленных негативных изменений в состоянии внутренних органов и патологических сдвигов в обмене веществ, присутствие в кормах цитробактера следует ограничить уровнем 5x10<sup>5</sup> КОЕ/г.

Резюмируя представленные данные о воздействии на молодь осетровых рыб бактерий семейства Enterobacteriaceae следует отметить, что в благоприятных экологических условиях они могут являться представителями нормальной или транзитной микрофлоры. Поэтому у рыб, как и у теплокровных животных, выработаны механизмы, позволяющие не только сдерживать проявление патогенных свойств этих микроорганизмов, но и использовать их в качестве симбионтов при выполнении пищеварительной функции (Коляков, 1952; Черкес и др., 1985; Ларцева, 2003 и др.). В то же время, при неблагоприятных условиях культивирования, которыми в рассматриваемых случаях является высокая бактериальная обсемененность комбикормов, организм осетровых рыб, даже при отсутствии значимых внешних проявлений, достаточно остро реагирует на воздействие энтеробактерий изменениями в обмене веществ. Сочетание действия всех вышеперечисленных факторов находит свое отражение в снижении скорости роста и выживаемости рыб. По силе отрицательного воздействия на молодь осетровых рыб исследованных представителей энтеробактерий можно расположить в следующем возрастающем порядке: *Citrobacter* → *Proteus* → *Escherichia coli*

#### 4.2. Поражение комбикормов стафилококками (*St. epidermidis*) и его влияние на молодь стерляди

Из группы стафилококков для исследований был избран эпидермальный (или белый) стафилококк (*St. epidermidis*). По своей способности к токсинообразованию и вирулентности он сходен с золотистым стафилококком, но эти свойства у него выражены значительно слабее, т.е., в основном, менее агрессивен (Фробишер, 1965). Устойчив к антибиотикам. Термическая обработка продуктов вызывает гибель стафилококков при условии достаточной интенсивности и продолжительности (при температуре 75-80°C они погибают через 20-30 мин).

Весьма существенна для рыбоводства способность стафилококков восстанавливать нитраты до более ядовитых нитритов, что может оказаться дополнительным отрицательным фактором при выращивании рыб в системах с замкнутым циклом водообеспечения.

Для экспериментального заражения комбикормов бактериями использовали эталонный штамм *St. epidermidis*. Стартовый комбикорм для осетровых имел состав (%): влага - 8,3 сырой протеин - 51, жир - 11,0, энергия 3560 ккал/кг. Фактический уровень обсемененности экспериментальных партий комбикорма стафилококком составил 2x10<sup>4</sup>, 1,3x10<sup>6</sup>, 1,2x10<sup>8</sup> КОЕ/г. Контролем служил комбикорм, не содержащий заражающего агента.

Начальная масса молоди стерляди, использованной в опытах, составляла 27-29 г. Продолжительность периода кормления - 55 суток, при средней температуре 23°C, периода голодания - 40 суток, при средней температуре 19,8 °C.

По окончании кормления видимой разницы в скорости роста рыб, питавшихся контрольным и зараженными кормами, не обнаружено. Средняя масса молоди составляла 47-49 г, без каких либо значимых различий между вариантами. Выживаемость молоди была близка к нормативной.

Следует особо отметить, что перед началом экспериментов состояние внутренних органов у подопытных рыб было оценено как благополучное - видимые признаки патологий отсутствовали. Однако после окончания кормления, даже у молоди из контрольного варианта, были обнаружены отрицательные изменения в паренхиматозных органах и кишечнике.

После окончания питания обнаруженные изменения в печени и почках у половины рыб, в кишечниках у всех - наблюдались уже при минимальном уровне заражения корма (2x10<sup>4</sup> КОЕ/г.). Обращает особое внимание истончение стенок кишечника, нарушения отделения кишечной слизи и увеличение в микробиоценозе доли паразитических форм у всей молоди из варианта максимального заражения корма (рис. 7).

Варианты	Количество рыб с патологиями внутренних органов, %					
	печень		почки		слизистая кишечника	
	цвет	структура	цвет	структура	истончение	нарушен. секреции
<b>До начала опыта</b>						
	0	0	0	0	0	0
<b>После питания</b>						
контроль	42	0	15	15	43	30
10 <sup>4</sup>	42	43	15	15	48	48
10 <sup>6</sup>	42	71	80	57	43	85
10 <sup>8</sup>	85	100	100	57	100	100

Количество рыб с заражением внутренних органов микроорганизмами, %					
печень		почки		мышцы	
%	КОЕ	%	КОЕ	%	КОЕ
<b>До начала опыта</b>					
20	<10	20	<10	0	<10
<b>После питания</b>					
20	<10	20	<10	20	<10
20	<10	15	<10	40	<10
20	<300	40	<300	70	<10
30	>300	30	<300	40	<300

Рис. 7. Количество рыб (%) с патологиями и заражением внутренних органов и их обсемененность (КОЕ) у молоди стерляди после питания кормами, зараженными стафилококком



Следствием изменений явилось ухудшение процессов переваривания и усвоения пищи, что привело к низкому темпу роста рыб (CW=0,9%). Наряду с этим, высокая степень обсеменения паренхиматозных органов микроорганизмами свидетельствовала о нарушении целостности слизистой кишечника, и, как следствие, снижении ее защитных свойств и уровня обшей резистентности молоди.

На метаболическом уровне (табл. 5 и рис. 8) воздействие на молодь стерляди заражения корма стафилококками, выразилось в обводнении прироста (в пределах 16-33%), которое при отсутствии различий в массе рыб, маскировало неблагоприятное действие зараженного корма. Кроме того наблюдалось очень резкое сокращение синтеза липидов (до 63%), усиление синтеза углеводов на 26-47% и незначительное снижение синтеза белка (на 4-6%), повышенные затраты энергии на нейтрализацию негативного действия бактериального заражения на 2-23%, и усиление накопления минеральных элементов (на 26-47%).

Таблица 5. Накопление массы, веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными эпидермальным стафилококком, их утилизация при голодании; выживаемость рыб

Варианты заражения, КОЕ/г	Масса	Вода	Сухое вещество	Сырой протеин	Сырой жир	Углеводы	Минер. в-ва	Энергия,		Выживаемость, %
								ккал/100 г	белка, % об-щей	
<b>НАКОПЛЕНИЕ, г/100 г массы до питания</b>										
Контроль	60,8	45,3	15,5	9,3	2,7	1,6	1,9	85	62	94
2,0x10 <sup>4</sup>	76,5	60,1	16,4	9,2	1,8	2,9	2,5	87	60	89
1,3x10 <sup>6</sup>	66,8	53,0	13,8	8,6	1,0	1,8	2,4	66	74	88
1,2x10 <sup>8</sup>	68,5	52,8	15,7	8,9	1,1	2,9	2,8	73	69	90
<b>УТИЛИЗАЦИЯ, г/100 г массы до голодания</b>										
Контроль	0,2	+5	5,2	3,2	2,1	0,5	+0,6*	40	46	94
2,0x10 <sup>4</sup>	12,5	6,8	5,7	3,4	1,6	0,9	+0,2	38	51	81
1,3x10 <sup>6</sup>	11,2	5,9	5,3	3,6	1,6	1,3	+1,2	41	50	89
1,2x10 <sup>8</sup>	10,8	4,9	5,9	3,1	0,9	1,5	0,4	32	55	76

Знак + означает превышение вещества в теле рыб по сравнению с его количеством до голодания

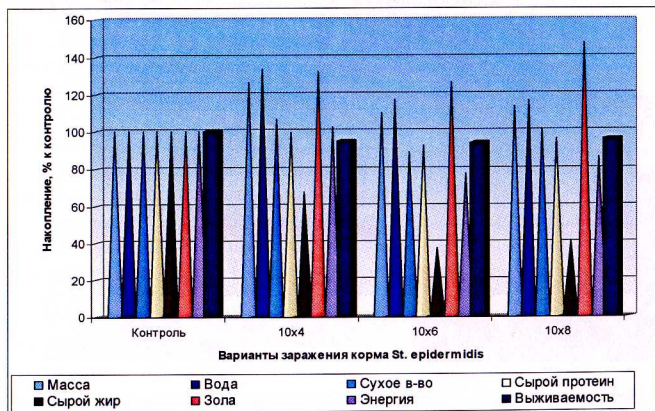


Рис. 8. Накопление веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными эпидермальным стафилококком, % к контролю

В поддерживающем обмене при голодании специфика действия стафилококков выразилась в резком увеличении потерь массы в основном за счет воды, ограничении утилизации липидов на фоне большего участия белка (на 10-20%) в энерготратах. Все эти изменения от-

разились на последовательном, по мере увеличения степени заражения корма, снижении выживаемости рыб за более чем трехмесячный период наблюдений – от 88% в контроле, до 68% при максимальном заражении корма.

Резюмируя представленные данные, можно сделать вывод, что интоксикация молоди стерляди кормом, зараженным *St. epidermidis* до 10<sup>8</sup> КОЕ/г, имеет скрытую форму, не отражающуюся на темпе роста рыб и выживаемости в процессе питания. Однако недостаточный уровень накопления липидов приводит к более интенсивному использованию в поддерживающем обмене белка, значительным потерям массы и обезвоживанию организма рыб, что на фоне высокой обсемененности внутренних органов патогенными микроорганизмами сопровождается увеличением смертности, превышающей нормативные значения отхода для исследуемой весовой группы рыб.

Совокупность изменений, вызываемых у молоди стерляди кормами, зараженными стафилококками, свидетельствует, что их присутствие в комбикормах не должно превышать 1x10<sup>4</sup> КОЕ/г.

#### 4.3. Влияние на молодь стерляди заражения комбикормов бактериями рода *Bacillus*

В качестве представителя бактерий рода *Bacillus* была избрана картофельная палочка (*Bacillus mesentericus*). Эти бактерии широко распространены в природе, встречаются как в аэробных, так и в анаэробных условиях, часто обнаруживаются в комбикормах для рыб. Они обладают высокой ферментативной, в том числе протеолитической активностью, что рассматривается как один из факторов патогенности. Кроме того, они являются антагонистами по отношению к другим микроорганизмам, что дало основание предположить агрессивность картофельной палочки и ее возможное отрицательное действие на качество корма и организм рыб. Несмотря на широкое распространение, каких-либо данных о действии этих бактерий на организм и физиологическое состояние рыб в доступных отечественных и зарубежных публикациях обнаружить не удалось.

Эксперименты проводили на молоди стерляди начальной массой 7-8 г параллельно с исследованиями воздействия на осетровых рыб заражения комбикормов цитробактером (см. 4.1.3). Фоновый уровень обсемененности корма картофельной палочкой составлял 2,2x10<sup>5</sup> КОЕ/г. Ее культура, выделенная из этого корма, была использована для заражения опытных партий, обсемененность которых равнялась 4,0x10<sup>5</sup>, 6,0x10<sup>6</sup>, 2,8x10<sup>7</sup> КОЕ/г.

Влияние на молодь стерляди заражения комбикормов картофельной палочкой, также как стафилококком и цитробактером, имело скрытый характер при полной сохранности рыб во всех вариантах. По окончании опытов средняя масса молоди колебалась от 24,5 до 27 г, при отсутствии значимых различий между вариантами. Изменения темпа роста практически не улавливались. Однако клинико-морфологическое обследование рыб позволило обнаружить существенные изменения во внутренних органах молоди. В печени у половины, а в почках – у всех рыб, они появились уже при минимальном из исследованных, фоновом уровне заражения кормов картофельной палочкой – 2,2x10<sup>5</sup> КОЕ/г.

Из патологий кишечника, состояние слизистой оболочки которого не изменялось у всех рыб, у половины молоди в варианте с максимальной степенью заражения корма наблюдалось нарушение отделения слизи. В паренхиматозные органы картофельная палочка при исследованных уровнях заражения не проникла. Не оказала она также и существенного влияния на микробиоценоз кишечника. После голодания у молоди, получавшей зараженные корма, наблюдалась нормализация состояния внутренних органов, что свидетельствовало об обратимом характере нарушений, вызываемых присутствием в корме этих микроорганизмов.

Анализ направленности биосинтетических процессов (табл. 6) также позволил обнаружить у рыб появление признаков интоксикации. Они выражались в обводнении организма (в пределах 19-25%), снижении интенсивности синтеза белка и липидов в различных вариантах опыта на 5-12% и сопровождалась меньшим накоплением запасов энергии. Более заметно



признаки интоксикации проявились при голодании. Наиболее значимыми были потери массы и воды. Обезвоживание организма молодежи из вариантов с высокой степенью заражения корма превышало потери воды у молодежи из контрольной группы в 2-3 раза. Различия в обеспечении энерготрат между рыбами подопытных и контрольного вариантов состояли в более интенсивном использовании белка (на 6-26%) и меньших тратах липидов (на 7-13%). Выявленные изменения биосинтетических процессов у молодежи стерляди, вызванные заражением кормов *Bac. mesentericus*, сопровождались снижением общей резистентности и гибелью при голодании.

Таблица 6. Накопление массы, веществ и энергии в теле молодежи стерляди после питания комбикормами, зараженными *картофельной палочкой*, их утилизация при голодании; выживаемость рыб

Варианты заражения, КОЕ/г	Масса	Вода	Сухое вещество	Сырой протеин	Сырой жир	Углеводы	Минеральн. в-ва	Энергия,		Выживаемость, %
								ккал 100 г	белка, % об-щей	
<i>НАКОПЛЕНИЕ, г/ 100 г массы до питания</i>										
Контроль* 2,2x10 <sup>5</sup>	213,4	156,7	56,7	31,7	13,0	4,3	7,6	323	56	100
4,8x10 <sup>6</sup>	201,3	150,0	51,3	28,1	11,0	2,6	9,6	275	58	100
6,0x10 <sup>6</sup>	257,2	197,1	60,1	32,1	12,5	6,9	8,6	331	55	100
2,8x10 <sup>7</sup>	244,2	187,8	56,8	30,2	11,0	7,3	7,9	308	56	100
<i>УТИЛИЗАЦИЯ, г/ 100 г массы до голодания</i>										
Контроль* 2,2x10 <sup>5</sup>	10,9	5,5	5,4	2,8	2,9	0,3	+0,6**	45	36	100
4,8x10 <sup>6</sup>	13,0	6,8	6,2	3,1	2,7	+0,5	0,9	41	43	63
6,0x10 <sup>6</sup>	25,2	16,9	8,3	3,6	2,9	1,4	0,4	54	38	90
2,8x10 <sup>7</sup>	17,7	11,8	5,9	3,0	2,5	0,3	0,1	39	44	80

\* Вариант с естественным фоном обсеменения картофельной палочкой

\*\* Знак + означает превышение вещества в теле рыб по сравнению с его количеством до голодания

Принимая во внимание нарушения во внутренних органах и обмене веществ у молодежи стерляди, вызываемые картофельной палочкой, а также способность бактерий этого вида к спорообразованию, т.е. сохранению жизнеспособности в широчайшем диапазоне неблагоприятных условий, ее уровень в комбикормах должен быть не выше исследованных нами минимальных значений – 1x10<sup>5</sup> КОЕ/г.

#### 4.4. Характеристика воздействия комбикормов, зараженных дрожжеподобными и плесневыми грибами, на молодь стерляди

На долю представителей этой группы, приходится около четверти микроорганизмов наиболее часто регистрируемых в кормах, причем в равной степени дрожжеподобных грибов и плесеней.

##### 4.4.1. Дрожжеподобные грибы (*Candida albicans*)

У рыб в естественных условиях обитания дрожжи присутствуют на поверхности кожи, жабрах, реже в содержимом пищеварительного тракта. Дрожжевая флора рыб тесно связана с их присутствием в водоеме и зависит от его типа, проточности, трофности и других свойств. При этом зависимости между составом дрожжей и видовой принадлежностью рыб не наблюдается (Солнцева и др., 1983, 1987). В условиях аквакультуры видовой состав дрожжей у рыб тесно коррелирует с их составом в воде и корме, при этом в содержимом кишечника дрожжи более многочисленны, чем в воде (Квасников и др., 1981).

Имеются сведения и о негативном воздействии дрожжей на рыб в условиях аквакультуры. В частности, при их высоком содержании в кормах, у карпов наблюдались сбои в работе ферментных систем и увеличение содержания в мышцах и крови рыб нуклеиновых и мочевой кислот в количествах, опасных для употребления такой рыбы в пищу (Турецкий и др., 1989). В своих исследованиях Л.С. Тихонова с соавторами (1987), а также Н.В. Войнова (1991) приводят сведения о патогенности дрожжей для карпов различного возраста.

Эти и ряд других данных на фоне высокой частоты встречаемости дрожжей в комбикормах, в частности *Candida albicans*, явились основанием для подробного изучения влияния этих микроорганизмов, присутствующих в корме, на молодь осетровых рыб.

Работы были проведены параллельно с опытами по изучению влияния на молодь стерляди заражения комбикормов протеем (см. 4.1.2). Фактическая обсемененность партий корма после их заражения музейным штаммом *Candida albicans* составила 3,1x10<sup>4</sup>; 1,8x10<sup>6</sup> и 4,3x10<sup>8</sup> КОЕ/г.

Результаты почти 2-х месячного питания молодежи стерляди комбикормами с различной степенью заражения этими микроорганизмами не позволили выявить статистически значимых различий в конечной массе рыб. По окончании периода кормления она колебалась в пределах 12,5-14,5 г. Высокая выживаемость – более 90%, и незначительное снижение темпа роста свидетельствовали об отсутствии видимого эффекта. В то же время клинико-морфологический анализ внутренних органов позволил выявить различные нарушения в структуре печени, изменения в почках, слизистой оболочке кишечника, увеличение в полтора-два раза количества рыб с высокой степенью бактериального заражения внутренних органов и появлению в них дрожжей *Candida albicans*. Все перечисленное свидетельствовало о наличии скрытой формы отрицательного эффекта заражения кормов этим видом дрожжей. Обнаруженные изменения были усугублены также низким качеством использованного комбикорма, подтверждением чего явились сходные, но менее выраженные нарушения, отмеченные у молодежи контрольного варианта.

Воздействие зараженных комбикормов нашло свое отражение в обменных процессах у рыб. Расчеты накопления и утилизации массы, пластических веществ и энергии в процессе роста и последующего голодания (табл. 7) позволили установить, что заражение кормов дрожжами привело к снижению накопления массы, ее обезвоживанию (в пределах 13-42%) и угнетению синтеза белка на 16-43%.

Таблица 7. Накопление массы, веществ и энергии в теле молодежи стерляди после питания комбикормами, зараженными *дрожжеподобными грибами*, их утилизация при голодании; выживаемость рыб

Варианты заражения, КОЕ/г	Масса	Вода	Сухое вещество	Сырой протеин	Сырой жир	Углеводы	Минеральн. в-ва	Энергия,		Выживаемость, %
								ккал 100 г	белка, % об-щей	
<i>НАКОПЛЕНИЕ, г/ 100 г массы до питания</i>										
Контроль	92,0	74,1	17,9	11,4	0,9	2,5	3,1	91	73	83
3,1x10 <sup>4</sup>	54,4	43,1	11,3	6,4	0,9	1,9	2,1	65	69	93
1,8x10 <sup>6</sup>	72,3	55,7	16,6	8,7	3,1	1,9	2,9	102	57	92
4,3x10 <sup>8</sup>	82,0	64,1	17,9	9,4	2,6	3,2	2,7	103	59	96
<i>УТИЛИЗАЦИЯ, г/ 100 г массы до голодания</i>										
Контроль	27,8	19,7	8,1	5,7	1,6	0,9	+0,1*	52	57	80
3,1x10 <sup>4</sup>	35,2	25,0	10,2	6,4	1,7	1,1	1,0	57	64	33
1,8x10 <sup>6</sup>	38,1	26,8	11,3	6,4	2,8	1,0	1,1	67	54	53
4,3x10 <sup>8</sup>	33,2	23,0	10,2	5,9	2,5	1,1	0,7	69	54	40

\* Знак + означает превышение вещества в теле рыб по сравнению с его количеством до голодания



Причем степень дегидратации и торможения синтеза белка находилась в обратной зависимости от уровня заражения корма. В липидном обмене (за исключением варианта  $8,3 \times 10^6$ ) наблюдалось резкое усиление накопления жира – почти в 1,5 – 2 раза. Накопление минеральных элементов в значительной степени (от 10 до 32%) угнеталось.

Негативная направленность этих изменений четко проявилась при голодании (рис. 9). Отмечены более значимые (на 19-35%), чем в контрольном варианте, потери массы, дальнейшее обезвоживание организма рыб (до 40% против контроля) и большее участие в поддерживающем обмене белка (вариант с минимальным заражением) при значительно меньших потерях углеводов. Жир, в избытке накопленный молодь при питании, не смог полностью обеспечить потребность в энергии на поддерживающий обмен, что подтвердилось существенной гибелью рыб и свидетельствовало о недостаточной полноценности этих накоплений. За весь период опытов описанные патологические изменения сопровождались значительными (до 37%) потерями массы и высокой (до 60%) гибелью голодавших рыб.

Учитывая, что наиболее ярко выраженные отрицательные показатели в обмене веществ, росте и выживаемости рыб, которые происходили на фоне негативных изменений во внутренних органах, отмечены в вариантах заражения кормов  $1,8 \times 10^6$  и  $4,3 \times 10^8$ , а также принимая во внимание потенциал возможного роста микроорганизмов, можно сделать вывод, что для обеспечения безопасности кормов степень присутствия в них дрожжеподобных грибов *Candida albicans* не должна превышать  $1 \times 10^4$  КОЕ/г, что ниже, чем приведено в действующих ТУ (Комбикорма для осетровых рыб, ТУ, 2003)

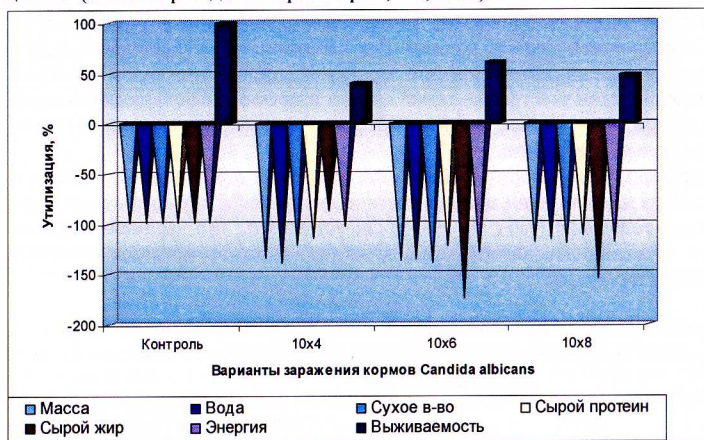


Рис. 9. Потери при голодании веществ и энергии у молоди стерляди, питавшейся комбикормами, зараженными грибами (% к контролю)

В этой серии экспериментов, как и ранее (за исключением серии с кишечной палочкой), обращает особое внимание проявление наивысшего эффекта отрицательного воздействия на метаболизм и выживаемость рыб не максимальных концентраций микроорганизмов в кормах, а, наоборот, наименьших или промежуточных. Подобное явление может быть обусловлено повышенной активностью микроорганизмов, которая при невысоком обсеменении кормов в меньшей степени сдерживается присутствием в комбикормах бактериальных метаболитов. С другой стороны, этот эффект связан с синергизмом ассоциации различных видов микроорганизмов, присутствующих в комбикормах, кумулятивное действие которых является более мощно, чем влияние каждого из них в отдельности (Фробишер, 1965; Черкес и др., 1987).

#### 4.4.2. Плесневые грибы (*Penicillium sp.*)

Плесени часто контаминируют комбикорма и их компоненты (Тутельян, 1985; Чернышов, Панин, 2000). Однако в ряду таких опасных контаминантов комбикормов, как афла-, трихотеченовые и другие микотоксины, образуемые различными видами микроскопических грибов, метаболитам пенициллула (за исключением патулина) уделяется намного меньше внимания (Тутельян, 1985). В то же время, питание кормами, зараженными этими микроорганизмами в высокой степени, вызывает гибель рыб, которой предшествует повышенная возбудимость, кровоизлияния, ерошение чешуи, опухоли (Головина, 2003). Все эти факты явились основой для более детального исследования воздействия комбикормов, зараженных плесенью на молодь осетровых рыб.

Работы были проведены параллельно с опытами по изучению влияния на молодь стерляди протей и дрожжеподобных грибов (см. 4.1.2). Фактическая обсемененность партий корма после их заражения музейным штаммом *Penicillium sp.* составила  $1,2 \times 10^4$ ,  $7,8 \times 10^6$  и  $4,3 \times 10^8$  КОЕ/г корма. Масса молоди стерляди после окончания кормления комбикормами, как и в предыдущих сериях опытов, была достаточно близкой в различных вариантах 12,2 - 14,4 г. Выживаемость молоди находилась в пределах нормативной для рыб этой весовой группы, за исключением варианта с заражением корма  $7,8 \times 10^6$ , где она составила 58%.

Влияние на внутренние органы молоди стерляди заражения комбикормов плесенью проявилось уже при минимальном обсеменении ( $1,2 \times 10^4$  КОЕ/г). Необратимые изменения в печени и почках, независимо от степени заражения корма, наблюдались более чем у 80% рыб. У 30-50% молоди паренхиматозные органы были поражены различными микроорганизмами, в том числе и плесенью. Повреждения кишечника наблюдались у 17% молоди. Однако во всех вариантах, наряду с другими микроорганизмами, в кишечниках были обнаружены и плесени. Особое внимание в опытных вариантах обращает на себя высокая степень контаминации мышц аэромонадами и плесенью, что является свидетельством крайнего ослабления организма рыб. Одновременно патологические изменения внутренних органов наблюдались у половины рыб из контрольного варианта.

Изменения в метаболизме рыб были выявлены при минимальном заражении кормов (табл. 8). Направленность этих изменений имела сходство с экспериментами по заражению кормов дрожжеподобными грибами, но была более выражена. Снижение прироста массы рыб, по сравнению с контрольным вариантом, составило от 12 до 47%, обезвоживание организма – 14-37%, угнетение синтеза белка – до 39%. В то же время, в отличие от опытов с дрожжами, липиды накапливались в меньших количествах, чем в контрольном варианте.

Таблица 8. Накопление массы, веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными плесенью, их утилизация при голодании; выживаемость рыб

Варианты заражения, КОЕ/г	Масса	Вода	Сухое вещество	Сырой протеин	Сырой жир	Угле-воды	Минеральн. в-ва	Энергия,		Выжи-ваемость, %
								ккал 100 г	белка, % общей	
<i>НАКОПЛЕНИЕ, г/100 г массы до питания</i>										
Контроль	92,0	74,1	17,9	11,4	0,9	2,5	3,1	91	73	83
$1,2 \times 10^4$	58,4	46,9	11,5	6,8	0,8	2,1	1,8	55	70	90
$7,8 \times 10^6$	68,6	56,0	12,6	7,6	1,2	2,1	1,7	64	68	58
$4,3 \times 10^8$	81,1	63,5	17,6	11,0	2,0	1,3	3,3	87	72	90
<i>УТИЛИЗАЦИЯ, г/100 г массы до голодания</i>										
Контроль	27,8	19,7	8,1	5,7	1,6	0,9	+0,1*	52	57	80
$7,8 \times 10^6$	29,7	21,4	8,3	5,7	1,6	0,8	0,1	51	64	40
$4,3 \times 10^8$	27,6	19,0	8,6	5,8	1,8	0,1	0,9	51	65	40

\* Знак + означает превышение вещества в теле рыб по сравнению с его количеством до голодания



Траты пластических веществ и энергии на поддерживающий обмен при голодании, в отличие от опыта с дрожжами, были менее интенсивными, а различия с контрольным вариантом не превышали 10%. Более полную картину влияния на молодь стерляди кормов, зараженных плесенью, позволили получить расчеты остаточных количеств веществ и энергии, сохранившихся у молоди после голодания (рис.10). На рисунке четко видно, что к окончанию периода голодания тело рыб состояло в основном из воды. Крайнее истощение запасов пластических веществ и использование молодью тех резервов, которые у нее имелись до начала питания зараженными кормами, сказались на ее выживаемости, которая была намного ниже, чем в контроле. В то же время уровень запасов, сохранившихся у молоди из контрольного варианта, так же был невысок и составлял лишь 6,7 % от массы тела. Это свидетельствовало о неудовлетворительном состоянии молоди и в контрольном варианте, что усугублялось патологическими изменениями во внутренних органах рыб.

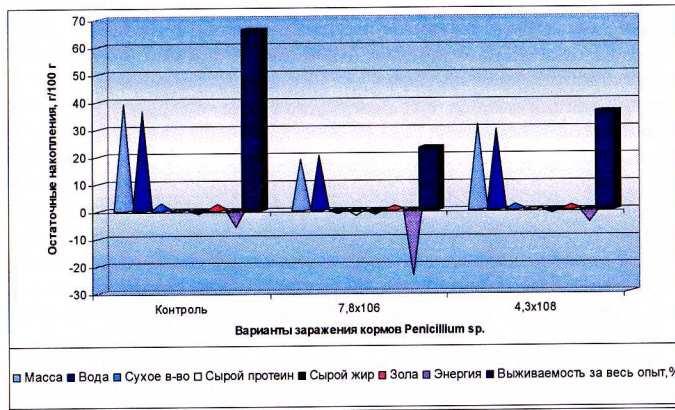


Рис. 10. Остаточные количества веществ и энергии, сохранившиеся после голодания, от накопленных в теле молоди стерляди при питании комбикормами, зараженными плесенью (г/100 г начальной массы)

Следует отметить, что аналогичные негативные изменения во внутренних органах были обнаружены у рыб контрольных вариантов и в других сериях опытов с кишечной и картофельной палочками, стафилококками, дрожжами. В отсутствие повышенного содержания в кормах продуктов перекисного окисления липидов, о чем свидетельствовали регулярные химические анализы, это явление может быть объяснено естественной динамикой микрофлоры корма и накоплением в нем токсических продуктов ее метаболизма в течение периода проведения экспериментов. Их присутствие в кормах, несомненно, отрицательно влияло на обмен веществ и жизнеспособность и было подтверждено смертностью рыб из контрольных вариантов при питании и последующем голодании.

Подводя итог комплексу проведенных исследований по изучению воздействия ряда преобладающих в комбикормах микроорганизмов и их метаболитов на состояние внутренних органов, метаболические процессы, темп роста и жизнеспособность молоди стерляди, их присутствие в кормах для осетровых рыб целесообразно нормировать на уровне, не превышающем следующие значения (КОЕ/г): кишечная палочка (*E. coli*) -  $1 \times 10^5$ , протей (*Pr. vulgaris*) -  $1 \times 10^4$ , цитробактер (*Citrobacter sp.*) -  $5 \times 10^5$ , стафилококк эпидермальный (*St. epidermidis*) -  $5 \times 10^4$ , картофельная палочка (*Bac. mesentericus*) -  $5 \times 10^5$ , дрожжеподобные грибы (*Candida albicans*) -  $1 \times 10^4$ , плесени (*Penicillium sp.*) -  $1 \times 10^4$ .

## ГЛАВА 5. ПРИМЕНЕНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ КАК БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ЛЕЧЕНИЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ В ИНДУСТРИАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Рассмотренные в предыдущей главе особенности хронического токсикоза, связанные с воздействием микробного заражения комбикормов на здоровье и жизнеспособность молоди осетровых рыб, являются далеко не единственным проявлением, характеризующим условия их интенсивного культивирования. Наряду с оптимизацией абиотических факторов содержания и достаточным кормлением, условия индустриального выращивания осетровых рыб имеют и ряд неизбежных, но весьма существенных издержек. Речь идет о высокой концентрации крупных рыб на небольшой площади и связанным с этим ограничением движения, применении несвойственных рыбам кормов и навязываемого им режима питания, органическом загрязнении воды, перепадах концентрации кислорода, а также различных технологических операциях - сортировках, взвешиваниях, лечебных обработках и т.д. (Остроумова, 1976; Ведемейер и др., 1981). Все это является постоянно действующими факторами стресса. Их влияние приводит к снижению общей резистентности организма рыб, что на практике выражается в ослаблении темпа роста, высокой подверженности рыб различным заболеваниям, повышенной смертности. При этом, в отличие от условий экстенсивного заводского выращивания молоди или товарных рыб в прудах, как правило, не используется естественная пища и отсутствует самоочищение воды, являющиеся сильнейшими факторами повышения резистентности рыб.

В то же время, несмотря на различную природу повреждающего действия на животных условий культивирования, общая реакция их организма достаточно сходна (Hoar, 1957; Hill, Henderson, 1968; Рудиков, Грищенко, 1985). Она выражается сначала в мобилизации защитных сил и проявлении экологической пластичности его функций в экстремальных условиях. Затем, в случае адаптации, в изменениях обмена веществ, снижении темпа роста, повышенной напряженности иммунитета. Это происходит в связи со снижением функциональной активности систем органов, в том числе и иммунокомпетентных, за счет их патологических изменений и поражения микрофлорой, проникающей из кишечника вследствие дегенеративно-дистрофических изменений его слизистой оболочки (Панин и др., 2002).

Отсутствие видимой человеческому глазу ранней реакции рыб на повреждающее действие условий культивирования приводит к тому, что лечение начинается только тогда, когда заметно снижается аппетит рыб и патологии усугубляются сопутствующими неинфекционными бактериозами и паразитарными инвазиями. Тогда для лечения применяют антибиотики, положительный эффект использования которых, вследствие невысокой пищевой активности и общего ослабления организма рыб, не всегда является бесспорным (Смит, 1986). Речь, в частности, идет об узкой направленности действия антибиотиков, накоплении их в среде культивирования, подавлении естественной симбионтной микрофлоры, образовании антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов, и т.д. В этой связи возникла необходимость пересмотра сложившихся методологических подходов к оздоровлению выращиваемых объектов (Панин, 2002; Юхименко и др. 2003).

С позиций современной теории питания большое значение в поддержании общей резистентности организма принадлежит его симбионтной микрофлоре. Ее деятельность способствует улучшению перевариваемости пищи, она участвует в регуляции активности ферментов, синтезе гормонов, коррекции минерального, солевого и витаминного обмена. Симбионтная микрофлора играет значимую роль в морфологическом и функциональном восстановлении клеток и стимуляции иммунитета слизистой оболочки кишечника (Уголев, 1984, 1985, 1991; Кузьмина, 1995, Кузьмина, 2005 и др.). Все перечисленные функции играют весьма существенную роль в обеспечении естественной резистентности организма, что особенно актуально для условий интенсивного культивирования.

Состав кишечной микрофлоры находится в состоянии динамического равновесия, подверженного действию различных факторов. В условиях интенсивного культивирования эти



факторы, как в частности было показано в предыдущей главе, приводят к нарушениям микробиоценоза кишечника и, соответственно, к ослаблению организма рыб. Поэтому наиболее целесообразным нам представлялось использование экологического метода повышения резистентности рыб за счет нормализации состава микробиоценоза кишечника.

Таким биологически оправданным методом, получившим признание и широкое применение в медицине и ветеринарной практике, стало использование пробиотиков. Они представляют собой новое поколение экологически безопасных препаратов, действие которых предполагает коррекцию микробиоценоза кишечника животных. В основе этого подхода лежит заместительная терапия, направленная на его восстановление путем регулярного введения живых бактерий – пробионтов, представителей нормальной кишечной микрофлоры (Малик, Панин, 2001).

В отличие от антибиотиков, бактерии-пробионты, являясь антагонистами патогенных бактерий, не «убивают» их, а препятствуя развитию патогенных свойств, вытесняют их из состава кишечного биоценоза. Кроме того, пробиотики, оказывая положительное влияние на иммунный статус, не вызывают привыкания со стороны условно-патогенной микрофлоры (Шендеров, 2001; Санин и др., 2002). С этих позиций пробиотики можно охарактеризовать как иммунологические препараты, безопасные для здоровья человека и животных, которые обладают широким спектром протективных свойств (Зинченко, Панин, 2000; Панин, Малик, 2005).

В настоящее время в сельском хозяйстве применение пробиотиков является составной частью технологий выращивания сельскохозяйственных животных и птиц. В рыбоводстве, особенно в нашей стране, применение пробиотиков пока еще не нашло столь широкого распространения. В то же время наблюдающийся сегодня переход рыбоводства к внедрению интенсивных технологий, уже приводит к появлению проблем бактериальных заболеваний различной этиологии, с которыми уже давно столкнулись в животноводстве и птицеводстве.

За рубежом использование пробиотиков в рыбоводстве было начато в 80-х годах прошлого столетия, когда предпринимались попытки применения препаратов, разработанных для наземных животных (Kozasa, 1986; Gatesoupe, 1989; Gatesoupe et al., 1989; Strom, Olafsen, 1990; Nedoluha, Westhoff, 1995; Мирзоева, 2001). В нашей стране на сегодняшний день используются только ветеринарные препараты (Юхименко и др., 2000; 2002; Трифонова и др., 2003, 2004; Гаврилин, 2004; Филиппова и др., 2004.). Специализированных препаратов для рыб, к моменту начала наших исследований разработано не было.

Цель исследований настоящей главы – оценить эффективность применения пробиотических препаратов, нормализующих микрофлору кишечника для улучшения состояния здоровья, повышения резистентности и продуктивных свойств осетровых рыб различного вида и возраста в условиях индустриального культивирования.

### **5.1. Использование пробиотиков в качестве способа повышения резистентности и лечения бестера старших возрастных групп при выращивании в установках с замкнутым циклом водообеспечения**

Выращивание рыб в замкнутых системах, являющееся технически и технологически самым сложным направлением индустриального рыбоводства, нередко сопровождается сбоями в работе механической и биологической очистки воды. Это приводит к резким изменениям гидрохимического режима, загрязнению воды органическими веществами и последующему массовому развитию микроорганизмов. В этом случае весьма значимы микроорганизмы комбикормов. При неполной поедаемости кормов, они служат источником органического и бактериального загрязнения. Согласно литературным данным (Жезмер и др., 1988; 1991), наибольшую опасность представляет заражение воды бактериями кишечной группы – протеем, цитробактером, энтерококком и др. Повышенная концентрация микрофлоры в воде способствует непосредственному проникновению бактерий через жаберный аппарат в кровь рыб с последующим инфицированием внутренних органов и возможным развитием бактери-

альных заболеваний. Отрицательное воздействие органического загрязнения в условиях рециркуляционных систем усугубляется быстрым снижением общей резистентности, возникновением и нарастанием патологий у рыб. В короткие сроки, исчисляемые сутками, это может привести к существенному отходу у рыб.

В то же время в замкнутой системе, в отличие от выращивания осетровых рыб на протоке, в связи с высокой напряженностью их иммунитета, внешние проявления реакции организма на подобные воздействия достаточно характерны даже на начальной стадии, когда внутренние патологии еще обратимы. Своевременное лечение или проведение комплекса соответствующих мероприятий позволяют предотвратить гибель большого числа рыб.

В связи с этим представлялось важным оценить эффективность действия пробиотических препаратов в качестве лечебного средства, повышающего резистентность осетровых рыб при расстройствах пищеварения, повреждении поверхностных частей тела и покровов, бестера, вызываемых бактериальным загрязнением воды и кормов.

Для испытаний были избраны два препарата. Первый – «Интестевит», который содержит комплекс культур бифидобактерий *Bifidobacterium globosum*, стрептококков *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis*. Второй пробиотик «Аквалакт» – новый специализированный препарат на основе лактобактерий кишечника осетров из естественной среды обитания.

Исследования выполнялись на старших возрастных группах бестера бурцевской породы. Рыбы имели массу от 1,5 до 6,0 кг. Выращивание велось в бассейнах опытно-промышленного модуля ВНИРО с замкнутым циклом водообеспечения при нагрузке биомассы рыб 40-60 кг/м<sup>3</sup> и крайне неблагоприятном микробиологическом фоне кормов и воды. Обсемененность корма составляла  $1 \times 10^6$  КОЕ/г (преимущественно стафилококк). Уровень обсемененности воды –  $2,7 \times 10^4$  КОЕ/мл (из них более половины микроорганизмов было представлено бактериями кишечной группы), что повлекло заражение ими печени и почек, а также гибель части рыб. Все рыбы имели внешние признаки заболевания: слабую подвижность, потерю аппетита, множественные поражения кожи и внешних скелетных образований (жучек), рострума, плавников. Почти у всех рыб была воспалена область анального отверстия, что являлось признаком энтерита.

Корма, обогащенные пробиотиками из расчета  $10^7$  КОЕ/г корма, применяли в течение 10 дней. Оценка состояния рыб проводили прижизненно путем учета изменений комплекса морфологических признаков по оригинальной методике, разработанной нами (Бурлаченко, Бычкова, 2005), а также по результатам микробиологических анализов содержимого кишечника. Учитывали степень повреждения спинных и брюшных жучек, воспалительное покраснение области анального отверстия, поражения каймы плавников и рострума.

Питание рыб комбикормом с пробиотиком «Интестевит» в течение 10 дней вызвало существенное улучшение их состояния по внешним признакам. Число особей с нормальными спинными и брюшными жучками возросло более чем в 2 раза, при уменьшении их количества с максимальным поражением на 10-17%. Количество рыб без повреждений рострума возросло в 1,5 раза, однако, число особей с максимальным поражением осталось почти на прежнем уровне. Более чем в 2 раза снизилась интенсивность воспалительных поражений анауса, причем в той же степени сократилось количество рыб с его максимальным поражением. На состояние плавников пробиотик не оказал подобного действия. Количество рыб с максимальным поражением осталось без изменений, с небольшим – сократилось. Включение в комбикорма препарата «Аквалакт» оказало сходный эффект по всем признакам (рис. 11). Кроме того, «Аквалакт» лучше воздействовал на состояние плавников и ростума. Существенная нормализация окраски тканей вокруг анауса при применении обоих препаратов свидетельствовала о снижении интенсивности воспалительных процессов в кишечнике. Гибель рыб прекратилась.

При микробиологическом исследовании проб химуса, взятых после 10-дневного курса применения пробиотиков, было установлено, что частота выделения условно-патогенных бактерий, присутствовавших в кишечниках, снизилась в 2-3 раза по сравнению с аналогич-



ными данными до начала применения пробиотиков. Количество положительных находок микроорганизмов-пробионтов (лактобацилл, бифидобактерий и спорообразующих бактерий *Bac. subtilis*) в образцах химуса обеих групп исследованных рыб составило от 60 до 100% случаев.

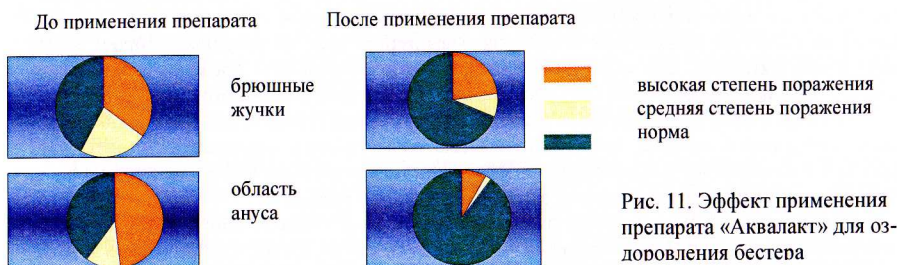


Рис. 11. Эффект применения препарата «АкваЛакт» для оздоровления бестера

Результаты микробиологических анализов показали, что у бестера продолжительность положительного влияния пробиотических препаратов на состав микроорганизмов кишечной популяции сохранялась еще в течение 6-7 суток. После прекращения питания рыб кормами с пробиотиками в содержимом их кишечника происходило постепенное увеличение накопления условно-патогенных микроорганизмов. Продолжительность действия пробиотиков у рыб оказалась такой же, как и у теплокровных животных – около 10 суток. Именно поэтому в ветеринарии пробиотики применяются десятидневными курсами, с интервалом не более 10 дней (Малик, 2002; Сканичев, Сканичева, 2006).

Таким образом, анализ совокупности результатов морфологических и микробиологических исследований позволил заключить, что введение пробиотических препаратов в корм и питание ими рыб в течение 10 суток вызывает изменения в микрофлоре кишечника, которые сопровождаются прекращением отхода и появлением внешних признаков оздоровления рыб. Сравнение действия обоих пробиотических препаратов дает основание говорить о некотором преимуществе перед ветеринарным препаратом «Интестевит» нового видоспецифичного пробиотика «АкваЛакт».

## 5.2. Оценка воздействия пробиотических препаратов на микробиоценоз кишечника и продуктивность молоди осетровых рыб

Как указывалось выше, одним из значимых элементов неспецифической защиты живого организма от неблагоприятных воздействий окружающей среды, является его пищеварительная система и, в частности симбионтная микрофлора, населяющая кишечник (Кузьмина, 1995). В условиях индустриального культивирования возможность формирования и поддержания симбионтной микрофлоры, специфичной для объектов выращивания, весьма ограничена (Шивокене, 1989; Малик Н., Панин, Малик Е., 2000). Именно поэтому одним из важных условий повышения резистентности и, как следствие, продуктивности живых организмов в условиях культивирования, может служить нормализация микробного биоценоза в кишечнике путем введения в корм пробиотических препаратов.

В этой связи целью раздела явилось изучение воздействия на микробиоценоз кишечника молоди осетровых пробиотических препаратов, как фактора повышения общей резистентности рыб к условиям индустриального культивирования и увеличения продуктивности рыб.

В этом аспекте изучали влияние пробиотиков на продуктивные показатели (продукцию и затраты корма), а также на ускорение нормализации общего состояния молоди осетровых рыб после голодания. Работа выполнялась совместно с Н.В. Судаковой, Е.И. Балакиревым, Д.А. Мордовцевым. Для экспериментов были избраны ветеринарные пробиотические препараты «Биокорм-Пионер» и «Интестевит».

В первой серии опытов объектом исследований служила молодь русского осетра начальной массой 8-10 г, которую выращивали в бассейновом цехе НПЦ «БИОС», при плотности посадки 80 экз./м<sup>2</sup>. Температура воды колебалась от 23,3 до 24,8°С, концентрация кислорода находилась на уровне 70-80% насыщения. Опыты продолжались 30 суток.

В экспериментах использовали корм для осетровых рыб рецепта ОТ-6Сг, производимый комбикормовым заводом НПЦ «БИОС». Препараты вводили в корм путем орошения сухих гранул водным раствором пробиотиков. Расчетные значения содержания препаратов в корме составляли  $1 \times 10^5$  и  $1 \times 10^7$  микробных клеток (КОЕ) на 1 г корма. Было проведено два курса кормления с пробиотиками по 10 суток каждый, с десятидневным перерывом между ними.

Согласно рис. 12 в микробиоценозе кишечника молоди осетра под действием препарата «Биокорм-Пионер» (доза  $1 \times 10^5$ ) произошли качественные и количественные изменения.

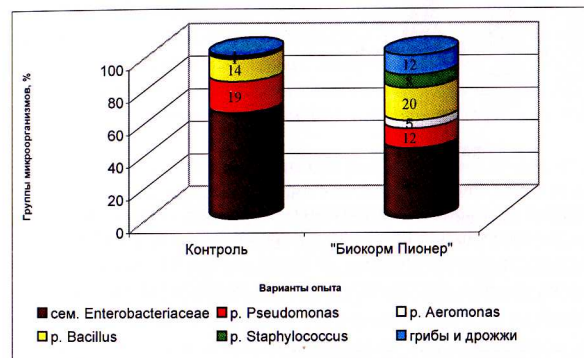


Рис. 12. Влияние пробиотика «Биокорм-Пионер» на микробиоценоз кишечника молоди русского осетра

У рыб, получавших препарат, на фоне значительного сокращения общего количества энтеробактерий, произошло расширение спектра видов микрофлоры кишечника за счет пробионтов (*Bacillus subtilis*) и микроорганизмов воды, в частности, *Aeromonas sp.* и дрожжей. Эти микроорганизмы в подобном сочетании, играя весьма существенную роль в усилении неспецифических иммунных реакций, значительно снизили пресс отрицательного воздействия энтеробактерий и их токсинов и расширили функциональную активность микрофлоры кишечника.

Изменения в микробиоценозе кишечника молоди осетра оказали непосредственное влияние на продуктивные показатели. Применение пробиотиков привело к некоторому ускорению темпа роста и увеличению выживаемости молоди (в пределах 3-6%). При использовании «Интестевита», затраты корма в вариантах с дозами  $1 \times 10^5$  и  $1 \times 10^7$  были, соответственно, на 4 и 9% ниже, чем в контрольном варианте, при обеих дозировках препарата «Биокорм-Пионер» – ниже на 18%.

Величина интегрального показателя продукции, учитывающего изменения массы и выживаемость рыб, у молоди, получавшей пробиотика, была существенно выше. Увеличение концентрации препаратов сопровождалось, практически, адекватным увеличением продукции. Для «Биокорма-Пионер» они соответственно составили 11 и 26% для препарата «Интестевит» – 45 и 93% (рис. 13). Полученные результаты могут служить наглядным подтверждением взаимной связи между положительной динамикой изменения состава микроорганизмов кишечной флоры под влиянием пробиотиков и продукционными характеристиками молоди русского осетра.



Положительное влияние на величину продукции и затраты кормов, а также на состояние молоди русского осетра, было подтверждено результатами специальной серии экспериментов, целью которых была оценка влияния пробиотиков на преодоление негативных последствий голодания у молоди стерляди.

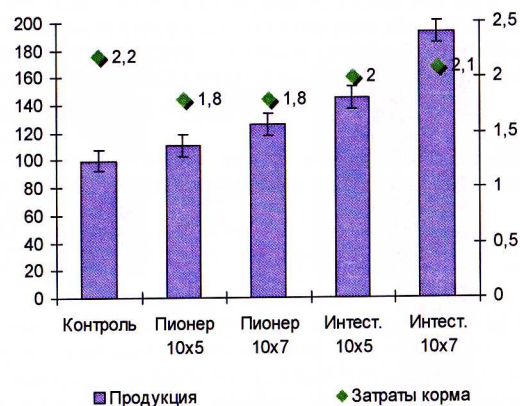


Рис. 13. Продукция и эффективность использования комбикормов молодь русского осетра после применения пробиотиков, %

Использовали две концентрации препарата «Интестивит» -  $10^7$  и  $10^9$  КОЕ препарата/г корма. Контролем служили рыбы, не получавшие препарат. Продолжительность применения препарата - 10 суток, продолжительность эксперимента - 30 суток. Начальная масса молоди стерляди - 43 г, масса в конце опыта - 61-68 г. Результаты действия пробиотика на метаболические процессы отражены на рис. 14.

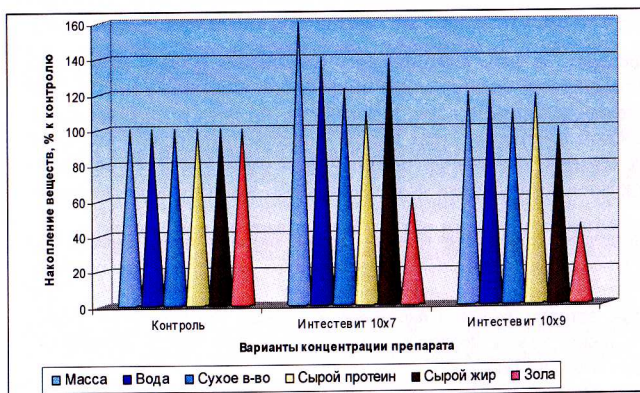


Рис. 14. Влияние препарата «Интестивит» на интенсивность накопления пластических веществ в теле молоди стерляди после голодания, % к контролю

Применение препарата способствовало значительному улучшению состояния ослабленной в ходе голодания молоди и стимулировало синтез органических веществ. Накопление массы, по сравнению с контролем, возросло на 26-65%, белка - на 11-24%, липидов на 4-39%. Причем более высокая концентрация препарата стимулировала более интенсивный синтез белка, меньшая - липидов. Все это свидетельствовало о резком улучшении состояния молоди, активизации ее жизненных сил под действием пробиотических препаратов.

Резюмируя результаты выполненных исследований, можно сделать заключение, что полученный эффект улучшения физиологического состояния и усиления биосинтеза пластических веществ у молоди осетровых является следствием влияния пробиотиков. В результате произошло повышение резистентности организма осетровых рыб к условиям культивирования и переориентация их обмена веществ от противодействия негативным факторам среды выращивания к реализации ростового и продуктивного потенциала.

### 5.3. Применение пробиотических препаратов для формирования микробиоценоза кишечника личинок сибирского осетра и повышения их резистентности

Основа микробиоценоза кишечника всех видов животных формируется в первые моменты их жизни - из микроорганизмов матери у теплокровных и микроорганизмов среды - у рыб. Как указывалось выше, условия интенсивного культивирования способствуют развитию и накоплению в среде выращивания условно-патогенной микрофлоры и принудительному формированию в ней неблагоприятного микробного фона. Этот фон значительно отличается от состава микрофлоры воды в естественной, природной, среде обитания рыб. Поэтому личинки рыб, выращиваемые в интенсивных условиях, лишены возможности заселения кишечника нормальной водной микрофлорой. В этой связи, при разведении осетровых рыб развитие в воде условно-патогенных микроорганизмов при слабо сформированных пищеварительной и иммунной системах, является одной из причин массовой гибели личинок (до 50% и более) при переходе на внешнее питание и после окончания рассасывания желточного мешка.

Вместе с тем известно, что при инкубации между икрой и водной средой идет постоянный обмен. Этот обмен наиболее интенсивен сразу после оплодотворения, когда в процессе набухания икры происходит активное поглощение воды и солей. Именно в этот период оболочка икринки наиболее легко проницаема (Зотин, 1961). Есть данные, что бактерии, колонизирующие оболочку в первые часы после оплодотворения, оказывают непосредственное воздействие на формирование микрофлоры икры (Hansen, Olafsen, 1999). Поэтому, по нашему мнению, именно икра могла бы служить наиболее подходящим объектом для максимально-раннего направленного формирования микробиоценоза личинок осетровых рыб путем заселения их кишечника пробиотической микрофлорой.

Главная цель исследований этого раздела состояла в изучении возможности применения пробиотиков для направленного формирования микробиоценоза личинок осетровых рыб на ранних стадиях развития и разработке способа введения препаратов.

Были исследованы три пробиотических препарата: «Интестивит», «Биокорм-Пионер», а также специально подобранный комплекс лактобактерий, применяемых в ветеринарии.

В качестве способа введения пробиотиков в организм рыб на ранних стадиях постэмбрионального развития была опробована двукратная обработка оплодотворенной икры водным раствором пробиотических препаратов. Концентрация микроорганизмов в водных растворах составляла  $10^7$ - $10^9$  КОЕ микробных клеток на 1 мл. Опыты были проведены в течение двух лет на 6 партиях икры сибирского осетра, стерляди и бестера. В связи со сходством результатов ниже приведены данные, полученные на сибирском осетре.

В каждом из вариантов использовали по 200 икринок. После вылупления личинок помещали в отдельные аквариумы. Кормление было начато на 10-е сутки. В качестве стартового корма применяли науплии артемии. Через трое суток личинкам начали добавлять комбикорм, который в течение недели постепенно заменил живой корм.

На рис. 15 четко видны незначительные различия в выживаемости личинок между опытными и контрольными вариантами в момент вылупления (1-4%). Однако, в дальнейшем, при переходе на экзогенное питание выживаемость личинок, обработанных препаратами «Интестивит» и «Биокорм - Пионер», по сравнению с контрольной группой, достоверно возросла на 12-14%. В конце периода наблюдений личинки, икра которых была обработана «Интестивитом» и «Биокормом-Пионер», достоверно имели большую массу (на 28 и 7%, со-



ответственно) по сравнению с контролем. А в их кишечниках присутствовали микроорганизмы, гомологичные организм-пробионтам препаратов.

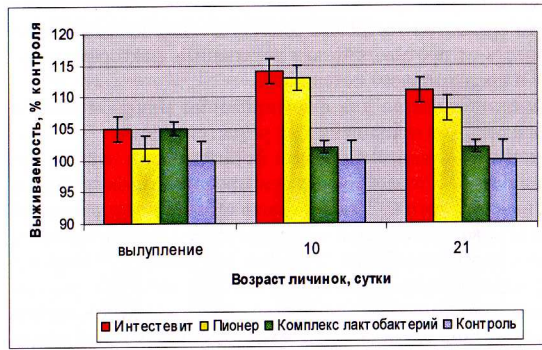


Рис. 15. Влияние пробиотических препаратов на выживаемость личинок и мальков сибирского осетра в течение трех недель выращивания, % к контролю

В то же время после обработки икры «комплексом лактобактерий» темп роста, так же как и микрофлора личинок, были сходными с контрольным вариантом. Обнаруженный факт связан с большими размерами клеток лактобактерий, что явилось препятствием для их проникновения через оболочку икринки.

Представленные результаты двухлетних исследований дают основание считать, что именно обработка икры пробиотиками оказала положительное влияние на выживаемость и темп роста личинок. Резюмируя описанные экспериментальные материалы, можно говорить о реальной возможности направленного формирования микробиоценоза личинок сибирского осетра на ранних стадиях эмбрионального и постэмбрионального развития с использованием разработанного способа введения пробиотических препаратов.

Анализ литературных и собственных экспериментальных данных позволил свести все многообразие воздействия микрофлоры кормов на организм рыб и среду их обитания к схеме, которая представлена на рис. 16. Из этого комплекса вопросов нами была исследована часть, касающаяся влияния заражения комбикормов на организм рыб, а также обоснована и экспериментально доказана возможность коррекции неблагоприятного воздействия среды культивирования на осетровых рыб с использованием пробиотических препаратов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование в индустриальной аквакультуре комбикормов как пищи, несвойственной осетровым рыбам в природных условиях, ограничивает спектр их питания и приводит к риску превышения естественной резистентности, что связано с неизбежной аккумуляцией различных загрязнителей.

Результаты выполненных исследований позволили получить качественную и количественную характеристику микробной обсемененности комбикормов для рыб, производимых отечественными и зарубежными промышленными предприятиями, а также выявить основные группы микроорганизмов. Установлено, что средний фоновый уровень их бактериальной обсемененности ( $10^3$ - $10^6$  КОЕ/г) на порядок выше, по сравнению с комбикормами для сельскохозяйственных животных и птиц и нормативных показателей для рыб ( $5 \times 10^5$  КОЕ/г по ГОСТ Р 51899-2002). Этот факт связан с высоким содержанием в рыбных комбикормах компонентов животного происхождения, степень заражения микроорганизмами которых значительно выше, чем зерновых и других растительных кормов, являющихся основой питания сельскохозяйственных животных (Чернышов, Панин, 2000; Дацун, 2001; Соколов, 2002). Кроме того, он свидетельствует о недостаточном контроле микробиологических показателей безопасности комбикормов для рыб со стороны предприятий - изготовителей.

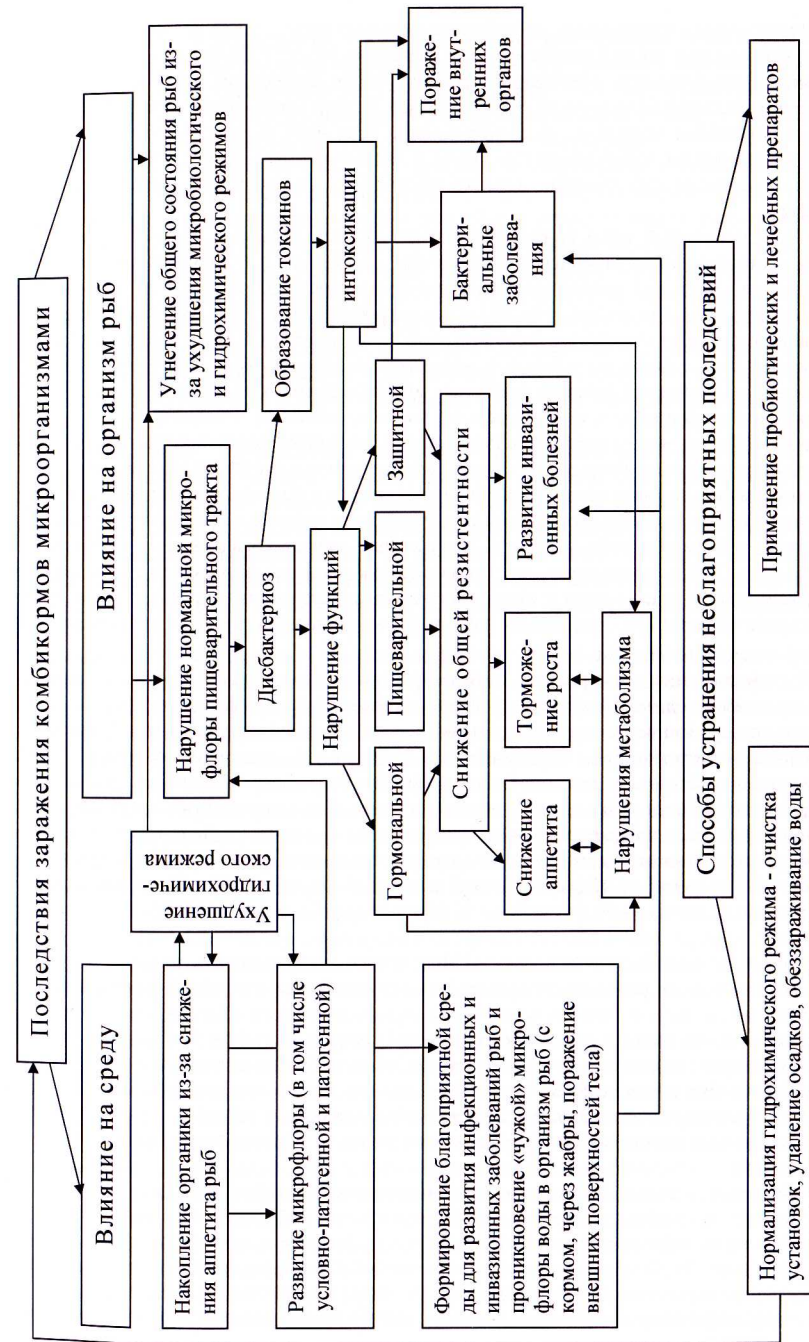


Рис. 16. Последствия заражения комбикормов микроорганизмами и пути их нейтрализации



Установлено отрицательное воздействие фонового уровня микробной обсемененности ряда промышленных партий комбикормов (в диапазоне  $10^4$ - $10^6$  КОЕ/г) на состояние пищеварительной, выделительной и иммунной систем, а также метаболизм, темп роста, выживаемость и жизнеспособность молоди осетровых рыб. В этой связи имеется существенный резерв для повышения норматива их выживаемости. Речь идет об ужесточении требований к микробиологическим характеристикам сырья и комбикормов, а также применению современных технологий изготовления, предусматривающих стерилизацию корма, упаковки и хранения.

Использованный нами комплексный методический подход к изучению влияния на молодь осетровых рыб повреждающих факторов, связанных с микробной контаминацией комбикормов, имеет ряд существенных преимуществ перед принятыми в ветеринарии косвенными методами для живых, или патолого-анатомическими - для погибших животных. Сочетание результатов ростовых экспериментов с клиническим и микробиологическим исследованием рыб, а также изучение их химического состава, позволило получить комплексную оценку особенностей влияния отдельных микроорганизмов на физиологическое состояние органов и систем молоди осетровых, а так же на процессы их метаболизма. Было показано, что воздействие может иметь скрытую форму и пролонгированный характер. При отсутствии замедления темпа роста и гибели рыб, оно проявлялось в сдвигах процессов анаболизма и катаболизма, которые сопровождалось изменениями в химическом составе тела молоди осетровых рыб, возникновением патологий во внутренних органах и снижением их жизнеспособности в неблагоприятных условиях. Полученные данные согласуются с мнением В.А. Шатерникова (1985), считающего, что таким образом организм адаптируется к неблагоприятным условиям существования и вместо остановки процессов обмена веществ, т.е. смерти, существенно изменяя его, продолжает жить и функционировать в крайне затрудненном состоянии - состоянии болезни.

Изучение специфики отрицательного воздействия на метаболизм белка у молоди стерляди (торможение синтеза в процессе роста и усиление трат при голодании) позволили расположить исследованные микроорганизмы в следующем возрастающем порядке: картофельная палочка → цитробактер → эпидермальный стафилококк → кишечная палочка → протей → плесневые грибы → дрожжеподобные грибы. При этом было обнаружено, что значения суммарной смертности (%) молоди стерляди, питавшейся зараженными комбикормами, в большинстве случаев находятся в прямой зависимости от степени отрицательного воздействия микроорганизмов на метаболизм белка и располагаются в аналогичном возрастающем порядке: 17 (контроль) → 22 (картофельная палочка и цитробактер) → 26 (стафилококк) → 34 (кишечная палочка) → 40 (протей) → 61 (дрожжеподобные грибы) → 70 (плесневые грибы).

Результаты комплексных исследований позволили проследить реакцию осетровых рыб на действие бактериальных токсинов. Под влиянием всех изученных микроорганизмов она выразилась в тех или иных нарушениях водного и липидного обменов, торможении синтеза белка и использовании его значительных количеств на борьбу с интоксикацией. Обнаруженные явления аналогичны проявлениям воздействия бактериальных токсинов на теплокровных животных и человека (Вертисев, 1996). Это связано с универсальностью бактериальных токсинов, которые эволюционно, по строению и механизму действия, сходны с ферментами и гормонами животных и способны использовать соответствующие субстраты в организме хозяина.

На примере заражения кормов кишечной палочкой, стафилококками, дрожжеподобными грибами и плесенью получено подтверждение, что наблюдаемые у молоди стерляди морфологические и функциональные изменения в кишечнике и его микробиоценозе приводят к снижению общей резистентности организма рыб. Они проявляются в высоком микробном заражении паренхиматозных органов, структурных нарушениях, сокращении эффективности их работы и сопровождаются сдвигами в метаболизме, снижением темпа роста и жиз-

неспособности рыб. Регистрируемые у молоди осетровых рыб проявления воспалительных процессов в ответ на действие микроорганизмов, во многом сходны с их течением у высших позвоночных животных (Журавель и др. 1968; Шатерников, 1985; Чернышов, Панин, 2000), что свидетельствует об общих закономерностях в реакциях пойкилотермных и гомойотермных животных на повреждающее действие бактериального заражения.

Необходимо отметить, что наряду с выявленным сходством в течении воспалительных процессов в ответ на микробное заражение, степень бактериального поражения внутренних органов и мышц, аналогичная наблюдавшейся в условиях наших экспериментов у молоди осетровых рыб, является смертельной для теплокровных животных (Коляков, 1957; Журавель, 1968). Однако в подобной ситуации рыбы продолжают жить и расти, хотя и плохо. При этом они служат резервантами патогенной микрофлоры, накопление которой резко возрастает после их отлова для реализации (Шульгина и др., 1985), что представляет реальную опасность для потребителей рыбной продукции. Подтверждением данного факта может служить статистическая информация о более высокой, чем для мяса и птицы, частоте микробных заболеваний человека, вызываемых рыбами и другими водными организмами (Lis-top, 1990).

С позиций новых теоретических концепций о роли пищеварительной системы и ее микрофлоры в защитных функциях (Уголев, 1984; 1991; Кузьмина, 2005), был избран биологически оправданный способ повышения резистентности рыб с использованием пробиотических препаратов. В его основе лежит не уничтожение всей микрофлоры макроорганизма, как это обычно происходит при применении антибиотиков и других препаратов со всеми следующими за этим негативными последствиями, а подавление активности чуждой организму микрофлоры с участием ее естественных антагонистов – представителей нормофлоры кишечника.

Использование ветеринарных пробиотических препаратов позволило получить убедительные доказательства возможности коррекции нарушений нормофлоры кишечника и, как следствие, повысить продуктивность осетровых рыб. В серии описанных в работе экспериментов помимо нормализации состава микрофлоры, нам удалось показать эффективность ее участия в осуществлении защитных функций и повышении резистентности при лечении старших возрастных групп осетровых рыб (бестера) в условиях замкнутой системы водоснабжения. Положительная динамика в состоянии здоровья и продукционных показателях осетровых рыб под влиянием пробиотиков была аналогичной реакции на них теплокровных животных, так же как и продолжительность циркуляции микроорганизмов - пробионтов в кишечнике (Малик, 2002; Сканичев, Сканичева, 2006). Помимо испытаний эффективности действия на осетровых рыб ветеринарных пробиотиков, было положено начало успешному применению специализированного препарата «АкваЛакт». Он был создан в результате наших исследований совместно с вед. науч. сотр. ВГНКИ Е. В. Маликом на основе видоспецифичных штаммов лактобактерий, выделенных от осетровых рыб из естественных условий обитания.

Особое значение применение пробиотиков приобретает в аспекте обеспечения резистентности рыб на наиболее ответственных начальных стадиях развития, которые являются определяющим моментом для реализации потенциала роста организма. Разработанный нами способ направленного формирования микробиоценоза личинок осетровых рыб до их перехода на активное питание, может послужить существенным резервом повышения их выживаемости на ранних этапах выращивания и обеспечить дальнейшую жизнеспособность как в условиях индустриального культивирования, так и при выпуске в естественные водоемы.

Подводя итог, хотелось бы подчеркнуть, что в аквакультуре, где объектам навязывается очень много противоестественного, рыбы остаются рыбами и только более сильно, чем в естественных условиях, реагируют на вмешательство в их природу. В этой работе показан один из серьезных аспектов такого вмешательства – отрицательное влияние микробной контаминации комбикормов, обоснованы пути и доказана возможность повышения резистент-



ности рыб к подобным воздействиям. Понимание их механизмов лежит в основе гармонизации отношений между человеком и объектами культивирования, целью которой является создание для рыб управляемых условий, способных обеспечить наиболее полную реализацию их продуктивного потенциала вне зависимости от влияния внешних, в том числе и неподвластных человеку, факторов.

## ВЫВОДЫ

1. Теоретический поиск и результаты выполненных исследований дают основание утверждать, что микробная контаминация комбикормов является одним из негативных факторов индустриальной аквакультуры, действие которого приводит к риску превышения естественной резистентности, системным и функциональным нарушениям в осуществлении процессов жизнедеятельности осетровых рыб. Зависимость эффективности осуществления защитной функции пищеварительной системы от качественных и количественных характеристик ее симбионтной микрофлоры позволяет повысить резистентность осетровых рыб посредством использования пробиотических препаратов и переориентировать их жизненные силы от нейтрализации повреждающих факторов условий культивирования к повышению жизнеспособности и реализации ростового потенциала.

2. Структура бактериального фона комбикормов для рыб обычно представлена ассоциацией микроорганизмов, включающей в среднем 3-5 групп; представители всех групп потенциально опасны, т.к. при определенных условиях могут приобретать патогенные и паразитические свойства; к доминирующим относятся (%): бактерии р. *Bacillus* -23, р. *Staphylococcus* - 21, плесени и дрожжеподобные грибы - 21, сем. *Enterobacteriaceae*, 18, сем. *Acinetobacter* - 6, сем. *Pseudomonadaceae* -5, прочие - 6. Кратковременное нарушение условий хранения комбикормов (повышение влажности) приводит к резкому увеличению количества микроорганизмов (более чем в шесть раз), затем к снижению и стабилизации численности под влиянием токсичных продуктов их жизнедеятельности, а также к приобретению сапрофитными формами паразитических свойств.

3. Разработанная модификация тест-системы Petrifilm 3M позволяет при отсутствии специализированных лабораторий быстро получать качественную и количественную характеристику общего уровня микробной обсемененности кормов с идентификацией бактерий кишечной группы, стафилококков, плесеней и дрожжеподобных грибов.

4. Влияние на молодь осетровых рыб различной степени заражения комбикормов кишечной палочкой (*E. coli*), протеем (*Pr. vulgaris*), цитробактером (*Citrobacter sp.*), стафилококком (*St. epidermidis*), картофельной палочкой (*Bac. mesentericus*), дрожжеподобными (*Candida albicans*) и плесневыми (*Penicillium sp.*) грибами в большинстве случаев имеет скрытый характер, не отражаясь на нормативных показателях выживаемости; максимальный отрицательный эффект проявляется в снижении жизнеспособности молоди в неблагоприятных условиях.

5. Токсическое действие микроорганизмов и их метаболитов проявляется, как правило, при минимальной из исследованных степеней заражения кормов и вызывает замедление роста и снижение резистентности молоди стерляди; оно выражается в структурных и функциональных (как правило, необратимых) нарушениях в органах, осуществляющих детоксикацию и удаление чужеродных веществ, а также являющихся важнейшими элементами иммунной системы (печень, почки, кишечник). Реакция организма осетровых рыб на действие повреждающих факторов, связанных с микробным заражением комбикормов, во многом сходна с проявлениями защитных свойств и течением воспалительных процессов, вызываемых различными токсинами, у теплокровных животных.

6. В процессах метаболизма молоди осетровых рыб наиболее выраженному влиянию со стороны микроорганизмов комбикормов подвергаются водный, белковый и липидный обме-

ны, значительно снижается обеспеченность энергией за счет ее использования для нейтрализации токсического действия различных микроорганизмов и их метаболитов:

- кишечная палочка, протей, дрожжеподобные и плесневые грибы вызывают обезвоживание организма молоди в пределах 13-42%, стафилококк, цитробактер и картофельная палочка - обводнение на 14-29%, в сходном, для различных уровней заражения, диапазоне;

- все исследованные микроорганизмы вызывают угнетение синтеза белка и его повышенное использование в поддерживающем обмене при голодании; наименее выражено влияние на обмен белка картофельной палочки и стафилококка - 1-12% при различных уровнях заражения корма, наиболее - протей и грибов (15-49%);

- под влиянием бактерий у молоди стерляди замедляется синтез липидов и снижается их участие в поддерживающем обмене - в минимальной степени под действием картофельной палочки (4-16% при различных уровнях заражения), в максимальной - стафилококка и протей (до 75%); дрожжеподобные и плесневые грибы в 1,5-2 раза усиливают накопление неполноценных липидов, использование которых в поддерживающем обмене затруднено;

- жизнеспособность молоди стерляди, питавшейся комбикормами, зараженными различными микроорганизмами, находится в выраженной обратной зависимости от степени их специфического отрицательного влияния на метаболизм белка;

-снижение защитных функций и нарушения метаболизма у молоди стерляди проявляются при меньшей микробной обсемененности корма ( $10^4$  КОЕ/г), чем предусмотрено действующими нормативами безопасности  $5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$  КОЕ/г (ГОСТ Р 51899-2002).

7. На основании количественных характеристик отрицательного действия микроорганизмов, заражающих комбикорма, на состояние внутренних органов, метаболические процессы, темп роста и жизнеспособность молоди стерляди их присутствие в кормах для осетровых рыб целесообразно нормировать на уровне, не превышающем следующие значения (КОЕ/г): кишечная палочка (*E. coli*) -  $1 \times 10^5$ ; протей (*Pr. vulgaris*) -  $1 \times 10^4$ ; цитробактер (*Citrobacter sp.*) -  $5 \times 10^5$ ; стафилококк эпидермальный (*St. epidermidis*) -  $5 \times 10^4$ ; картофельная палочка (*Bac. mesentericus*) -  $5 \times 10^5$ ; дрожжеподобные грибы (*Candida albicans*) -  $1 \times 10^4$ ; плесени (*Penicillium sp.*) -  $1 \times 10^4$ .

8. Коррекция состава микрофлоры кишечника культивируемых осетровых рыб с использованием представителей нормофлоры, входящих в состав пробиотических препаратов, «Интестевит» и «Биокорм-Пионер», а также специализированного препарата «Аквалакт», позволила повысить резистентность осетровых рыб при их культивировании. Подтверждением явились нормализация состояния кишечной микрофлоры, оздоровление внешних покровов, увеличение темпа роста, повышение продукции и выживаемости рыб на различных этапах жизненного цикла (личинки, молодь, взрослые рыбы). Аналогичные внешние проявления лечебного эффекта, продолжительность циркуляции микроорганизмов-пробионтов в кишечнике осетровых рыб и теплокровных животных свидетельствуют об общих закономерностях действия пробиотиков у пойкилотермных и гомеотермных животных.

9. На основе видоспецифичных лактобактерий, выделенных из кишечника осетров из естественных условий, проведена селекция штаммов, перспективных по биохимическим и пробиотическим свойствам, создан специализированный комплексный пробиотик для осетровых рыб - «Аквалакт», обладающий более выраженным эффектом действия, по сравнению с ветеринарными препаратами.

10. Разработанный способ направленного формирования микробиоценоза позволяет повысить выживаемость и темп роста личинок (соответственно на 14 и 20%) на ранних стадиях развития, наиболее важных для дальнейшей реализации ростового потенциала при товарном выращивании или искусственном воспроизводстве осетровых рыб.



### Основные публикации по теме диссертации

1. Бурлаченко И.В. Опыт применения искусственных кормов для ранней молодежи кефалей // Вопросы физиологии и биохимии питания рыб. М.: ВНИИПРХ, 1987. – С. 66-75.
2. Логвиненко И.А., Бурлаченко И.В., Маслова О.Н. Активность пищеварительных ферментов у двух видов черноморских кефалей, выращиваемых на искусственных кормах // Тезисы докл. Ш Всес. конф. по морской биологии. Севастополь. – 1988. – С. 253.
3. Бурлаченко И.В. Интенсивность накопления и утилизации веществ и энергии у молодежи остроноса при выращивании на различных кормах и последующем голодании // Тез. Докл. VII Всесоюзной конференции «Физиология и биохимия рыб». Ярославль. – 1989. – С.64-65.
4. Бурлаченко И.В., Вайтман Г.А. Аминокислотный состав тела молодежи кефали при питании зоопланктоном, искусственными кормами и голодании // Тез. Докл. Всесоюзной конференции «Физиология морских животных». Апатиты. – 1989. – 118-119.
5. Бурлаченко И.В., Логвиненко И.А. Изменения химического состава и обмен веществ у молодежи кефалей в зимний период // Тез. Докл. II Симпозиума по экологической биохимии рыб. – Ярославль. – 1990. С. 23.
6. Бурлаченко И.В. Пищевые потребности молодежи кефали как основа для создания искусственных кормов // Автореф. дисс. канд. биол. наук - М.: 1991. - ВНИРО. - 27 с.
7. Маслова О.Н., Бурлаченко И.В. Способ искусственного воспроизводства кефалей. Патент РФ 2000695 А01К61/00. - БИ. 1993.10.15
8. Маслова О.Н., Бурлаченко И.В. Способ искусственного разведения черноморской камбалы-калкана. - Патент РФ 2073432 А01К61/00. - БИ. 1997.5.
9. Маслова О.Н., Разумеев Ю.В., Бурлаченко И.В. – 2000 г. Инструкция по опытно-промышленному разведению и товарному выращиванию посадочного материала камбалы-калкана // М.; ВНИРО
10. Бурлаченко И.В., Аветисов К.Б., Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И. – 2001 г. Бактериальная обсемененность комбикормов // Рыбоводство и рыболовство - № 2 –с. 16-18
11. Бурлаченко И.В., Аветисов К.Б., Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И. Влияние бактериального заражения кормов на рост и химический статус молодежи стерляди // Материалы научно-практической конференции «Проблемы и перспективы развития аквакультуры в России. – Краснодар, 2001 г. – с. 151-152.
12. Бурлаченко И.В., К.Б. Аветисов К.Б., Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И. Бактериальная обсемененность комбикормов и ее влияние на молодежь стерляди – Тр. ВНИРО. Т. 141. – М.; ВНИРО. 2002 с.194-208.
13. Бурлаченко И.В., Аветисов К.Б., Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И. Влияние бактериальной обсемененности кормов на физиологическое состояние молодежи рыб // Материалы международной научно-практической конференции «Аквакультура начала XXI века – Москва, изд. ВНИРО, 2002 – с. 245-253.
14. Бурлаченко И.В. Зависимость качества рыбных кормов от степени их загрязнения *Escherichia coli* // Материалы Международного симпозиума «Холодноводная аквакультура: старт в XXI век – Санкт-Петербург 8-13 сентября 2003 г. – с. 75-76.
15. Бурлаченко И.В. - Обсемененность рыбных комбикормов микроорганизмами и ее изменения при хранении и экспериментальном заражении кормов - Материалы III Международной научно-практической конференции «Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития» - Астрахань 2004 г. – с. 235- 238.
16. Судакова Н.В., Мордовцев Д.А., Бурлаченко И.В. – Результаты выращивания разных пород бестера при использовании комбикормов с ферментализатором - Материалы III Международной научно-практической конференции «Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития» - Астрахань 2004 г. – с. 257-261.
17. Дергалева Ж.Т., Бурлаченко И.В., Цвильев О.П. - Проблемы безопасности комбикормов для рыб и методы ее оценки, как основа повышения эффективности искусственного воспроизводства// Материалы конференции "Развитие рыбохозяйственного комплекса России" 2004. С.-Пб.: С. 60-61.
18. Бурлаченко И.В. - Безопасность комбикормов для рыб и тест системы контроля их бактериальной зараженности - // Тез. докл. научно-практич. конф. "О приоритетных задачах рыбохозяйственной науки в развитии рыбной отрасли до 2020 года". 24-25 ноября 2004 г. М.: Изд. ВНИРО С. 131-133.
19. Судакова Н.В., Балакирев Е.И., Мордовцев Д.А., Бурлаченко И.В. - Повышение рыбопродуктивности биологической эффективности выращивания осетровых рыб путем применения пробиотиков // Материалы междунардн. науч-практич. конф. "Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов Мирового океана" 2005. М.: ВНИРО. С. 130-131.
20. Котенев Б.Н., Дергалева Ж.Т., Бурлаченко И.В., Яхонтова И.В. - Основные тенденции развития аквакультуры в мире и России //Материалы междунардн. науч-практич. конф. "Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов Мирового океана" 2005. М.: Изд. ВНИРО. С. 125-126.
21. Бурлаченко И.В., Бычкова Л.И. - Способ клинической оценки состояния осетровых рыб при их культивировании в установках с замкнутым циклом водообеспечения // 2005. Рыбное хозяйство № 6. С. 70-72.
22. Николаев А.И., Бурлаченко И.В., Судакова Н.В., Бондаренко Л.Г. - Состояние и перспективы научно-исследовательских работ в осетроводстве // Материалы III Международной научно-практической конференции «Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития» - Астрахань 2006 г. М.: Изд. ВНИРО. С. 10-12.
23. Бурлаченко И.В. - Влияние заражения комбикормов стафилококками (*Staphylococcus epidermidis*) на рост, состояние внутренних органов и биохимический статус молодежи осетровых // Материалы IV Международной научно-практической конференции «Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития» - Астрахань 2006 г. М.: Изд. ВНИРО. С. 227-231.
24. Бурлаченко И.В., Аветисов К.Б., Банщикова И.В., Малик Е.В. - Использование пробиотиков на ранних стадиях развития рыб и их влияние на микрофлору, рост и выживаемость личинок сибирского осетра (*Acipenser baerii*) // Материалы IV Международной научно-практической конференции «Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития» - Астрахань 2006 г. М.: Изд. ВНИРО. С. 231-233.
25. Бурлаченко И.В., Судакова Н.В., Балакирев Е.И. и др. Перспективные пробиотики для осетровых рыб //2006. Рыбное хозяйство. № 3.С.64-65.
26. Бурлаченко И.В., Яхонтов Д.Е. Программа для ЭВМ «Image analyzer for microbiological test system (IAMTS)». Свидетельство об официальной регистрации № 2006612044. Оффич. биол. программ для ЭВМ, базы данных, топологии интегральных микросхем. – RU ОБПБТ № 3 (56). – С. 209.
27. Бурлаченко И.В. Тест-система Petrifilm 3 М для микробиологической характеристики рыбных комбикормов. Комбикорма. 2006. - № 5. - С. 73-74.
28. Котенев Б.Н., Дергалева Ж.Т., Бурлаченко И.В. и др. Состояние и перспективы развития аквакультуры в Российской Федерации // 2006. Рыбное хозяйство. № 5. С. 25-29.
29. Бурлаченко И.В. Руководство по применению микробиологических тестов Petrifilm 3М для характеристики рыбных кормов. - М.: Изд. ВНИРО, 2007. - 36 с.
30. Бурлаченко И.В., Малик Е.В. Использование пробиотиков на ранних стадиях развития рыб и их влияние на выживаемость, рост и микробиоценоз личинок сибирского осетра (*Acipenser baerii*) // Ветеринария. 2007. - № 3. - С. 47-51.
31. Bournlatchenko I. – Contamination of combination feeds with E.coli, and its impact on the growth and metabolism in juvenile starlet sturgeon (*Acipenser ruthenus L.*) / World Aquaculture 2003 Salvador, Brazil. Book of abstracts, volume 1 – p. 117.



32. *Bourlatchenko I., Malik E.* Use probiotics for getting through the stress consequences for young sterlet (*Acipenser ruthenus L.*) – Aquaculture Europe 2004 "Biotechnologie for quality", Barcelona, Spain, October 20-23. European aquaculture society, special publication N 34 pp. 182-183.
33. *Bourlatchenko I.* - Microorganisms in fish feeds and its influence on the growth, physiological and metabolic characteristics of Young sturgeons //World Aquaculture 2005. Bali - Indonesia. P. 93.
34. *Bourlatchenko I.* Effect of probiotics on the growth and biochemical status of young sterlets (*Acipenser ruthenus L.*) after starvation // World Aquaculture 2005. Indonesia. P. 94.
35. *Bourlatchenko I., Soudakova N., Mordovtsev D.* - The effect of use of plants and animals sources proteins in feeds for sturgeons// Aquaculture Europe 2005. Trondheim, Norway, August 5-9, 2005. European aquaculture society, N 35, pp. 151-152.
36. *Bourlatchenko I., Malik E.*- Use probiotics for normalization of physiological condition of young sterlet (*Acipenser ruthenus L.*) after starvation // 5<sup>th</sup> International Symposium on Sturgeon. May 2005 Ramsar - Iran. pp. 25-26.
37. *Bourlatchenko I., Avetisov K., Banchikova I. and Malik E.* Influence of curing of eggs by probiotics on microflora, surviving and growth of sturgeons' larvae// World Aquaculture 2006. May 9-13, Florence, Italy. P. 109.
38. *Kotenev B., Bourlatchenko I., Dergaleva J., Yakhontova I.* Strategy of aquaculture development in Russia // World Aquaculture 2006 May 9-13, Florence, Italy. P. 480.

**Благодарности.** Выражаю свою искреннюю признательность и благодарность всем, чьи знания, умение, опыт, ценные советы и поддержка оказали огромную помощь в выполнении этой работы: директору ВНИРО к.г.н. Б.Н. Котеневу, зав. сектором Ж.Т. Дергалевой, д.б.н., профессору М.А. Щербине, к.б.н. А.И. Николаеву, д.б.н., профессору Е.В. Микодиной, с.н.с. К.Б. Аветисову, к.вет.н. Е.В. Малику, к.б.н. Л.Н. Юхименко, к.б.н. Л.И. Бычковой, к.б.н. Н.В. Войновой, зав. сект. И.В. Яхонтовой, к.б.н. Н.В. Судаковой, вед. инженеру К.В. Дудину, редактору В.В. Донской, вед. инж. А.А. Васильевой, сотрудникам лаборатории сохранения биоразнообразия ценных гидробионтов ВНИРО.

