

Микробиоценоз кишечника радужной форели в условиях садкового хозяйства

Ю. В. Зайцева^{1✉}, Д. А. Доколин¹, И. В. Злобин¹

¹ Ярославский государственный университет имени П. Г. Демидова, Ярославль, Россия

✉ E-mail: zjv9@mail.ru

Аннотация. Быстрый рост индустрии аквакультуры с использованием современных интенсивных методов выращивания привел к возникновению ряда проблем, связанных с распространением инфекционных болезней рыб и качеством воды. Кишечная физиологическая микробиота рыб и окружающая водная среда составляют экосистему, баланс которой является ключевым фактором для поддержания здоровья аквакультуры. Тем не менее оптимизация микробиоты по-прежнему является сложной задачей из-за недостатка знаний о доминирующих микроорганизмах и о влиянии факторов окружающей среды. **Цель** – исследование структуры и таксономического состава культивируемого бактериального сообщества кишечника радужной форели *Oncorhynchus mykiss* в условиях садкового фермерского хозяйства «Ярославская форель». **Методы.** Для идентификации выделенных изолятов и характеристики состава общих бактериальных сообществ использовались фенотипические и биохимические характеристики, а также амплификация и секвенирование фрагментов гена 16S рРНК и последующий филогенетический анализ. **Научная новизна.** Получены данные о таксономическом разнообразии культивируемого микробиома кишечника радужной форели. Проведен сравнительный анализ микробиоценозов кишечника рыб и окружающей водной среды. **Результаты и практическая значимость.** В структуре изученных микробных сообществ доминировали гамма-протеобактерии. В составе микробиома как кишечника радужной форели, так и окружающей водной среды были обнаружены представители родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Aeromonas*, которые являются условно-патогенными и в стрессовых условиях могут приводить к вспышке бактериальных инфекций. Однако исследования показали, что окружающий водный микробиом не отражает микробиом водных хозяев. Микробиота кишечника рыб отличалась большим разнообразием. Сравнительный анализ микробиомов пресноводной системы и кишечника радужной форели выявил способность организма-хозяина концентрировать полезные пробиотические микроорганизмы даже в условиях патогенной нагрузки. Полученная коллекция микроорганизмов в дальнейшем будет использована для скрининга потенциальных пробиотических культур.

Ключевые слова: аквакультура *Oncorhynchus mykiss*, радужная форель, микробиом, кишечник, пробиотики.

Для цитирования: Зайцева Ю. В., Доколин Д. А., Злобин И. В. Сравнительный анализ микробиоценозов кишечника радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) и водной среды в условиях садкового хозяйства // Аграрный вестник Урала. 2022. № 12 (227). С. 42–53. DOI: 10.32417/1997-4868-2022-227-12-42-53.

Дата поступления статьи: 30.09.2022, **дата рецензирования:** 19.10.22, **дата принятия:** 28.10.22.

Постановка проблемы (Introduction)

Аквакультура является самым быстрорастущим сектором производства продуктов питания во всем мире. В течение десятилетий исследования физиологии питания и поведения животных заложили основы передовой практики разведения рыбы. В настоящее время рыбная продукция играет большую роль в продовольственной корзине населения, так как она обеспечивает по меньшей мере 30 % потребления животных белков. Кроме того, рыба составляет основу для устойчивого производства высоко-

белковых кормов в рационах сельскохозяйственных животных [1].

Интенсификация технологии разведения, как правило, направлена на увеличение производства товарной рыбы за счет более высокой плотности особей и применения искусственного кормления. В данных условиях увеличивается вероятность взрывного повышения численности бактерий, что может нести негативные последствия, в том числе увеличение бактериальной обсемененности органов рыбы [2]. Возникающие вспышки инфекций

препятствуют высокотехнологичному производству товарной рыбы и устойчивому экономическому развитию предприятий, а также могут оказывать потенциальное негативное воздействие на здоровье населения [3; 4]. Для многих бактериальных заболеваний протоколы вакцинации объектов аквакультуры отсутствуют, а чрезмерное использование антибиотиков и других химических веществ вызывает серьезную озабоченность [5; 6]. Более привлекательной выглядит стратегия защиты рыбы от возникающих болезней за счет создания и поддержания «здорового» микробиома [7; 8].

Известно, что поверхности слизистых оболочек позвоночных населены невероятно плотными и сложными популяциями комменсальной микробиоты. Микробиомы играют критически важную роль в организме хозяина, включая укрепление здоровья и обеспечение «сопротивления» условно-патогенным микроорганизмам [9]. Кишечник рыб, как и у млекопитающих, отличается разнообразной микробиотой, способствующей усвоению питательных веществ и увеличению веса, различной метаболической активности хозяев, а также помогает функционированию иммунной системы и ингибированию патогенов [10–12]. Потенциальные патогены в основном попадают в организм рыб через эпителиальные барьеры их слизистых оболочек. Баланс между членами кишечного микробного сообщества, т. е. комменсалами, симбионтами, или патогенными бактериальными штаммами, в совокупности образующими микробиом, важен для сохранения здоровья рыб. Таким образом, изучение структуры ассоциированных с рыбой микробных сообществ послужит ориентиром для изучения этиологии и патогенеза многих заболеваний.

С другой стороны, корм и вода, в которой выращивается рыба, играют жизненно важную роль в формировании микробиома кишечника [11; 13]. Большинство исследований на сегодняшний день сосредоточено на микробиомах отдельных организмов, связанных с хозяином, однако лишь в немногих исследованиях используется комплексный подход к изучению микробиомов водных позвоночных с учетом как связанной с хозяином, так и свободноживущей микробиоты в экосистеме. Знание микробного разнообразия и химических параметров водоемов также важно для понимания экологии водных бактерий в аквакультуре и объяснения потенциальной роли микроорганизмов в биосфере. Необходимы фундаментальные исследования разнообразия и пространственно-временной динамики микробных сообществ, связанных с рыбами, как молекулярными, так и классическими методами микробиологии.

Целью настоящей работы было исследование структуры и таксономического состава культивируемого бактериального сообщества кишечника радужной форели *Oncorhynchus mykiss* в условиях

садового фермерского хозяйства «Ярославская форель».

На сегодняшний день радужная форель представляет значительную долю рыбной продукции на мировом рынке, поэтому является удобным модельным объектом для исследования разнообразия микробных сообществ, связанных с данным видом [2].

В практическом приложении полученные результаты могут быть использованы для контроля и корректировки условий содержания и разведения радужной форели в промышленных масштабах. В теоретическом аспекте полученные данные могут расширить представления о взаимоотношениях микроорганизмов, хозяина и окружающей среды, что очень важно для создания здорового микробиома в культивируемых организмах, а также в системах аквакультуры.

Методология и методы исследования (Methods)

Объектами исследования являлись культивируемый микробиом кишечника радужной форели, а также культивируемый микробиом водной среды, в которой выращивалась аквакультура. Десять особей радужной форели (*O. mykiss*) были отобраны 12 апреля 2022 г. на рыбном хозяйстве в Ярославской области. Средняя длина особей составляла 38,12 см, средняя масса – 1100 г. Рыбы до отбора содержались в садке в открытом водоеме (глубина садка – 5 м). Параллельно отбирали пробы воды из садка и водоема.

Отбор проб рыбы соответствовал руководящим принципам ARRIVE2, директиве ЕС 2010/63/EU и законам Российской Федерации о защите животных. Протокол отбора проб и применяемые процедуры были рассмотрены с этической точки зрения и одобрены Ярославским государственным университетом (протокол от 01.04.2022).

После изъятия особей из водоема для каждой особи применяли анестетик бензокаин (Merck Life Science LLC, Германия) и разрушали головной мозг. Далее рыбу доставляли в лабораторию и в стерильных условиях проводили вскрытие. После вскрытия иссекали кишечник и отбирали содержимое для определения бактериальной обсемененности. В общей сложности было отобрано и проанализировано 20 проб биологического материала, полученного от особей *O. mykiss*.

Все образцы рыбы были гомогенизированы в 0,9-процентном растворе хлорида натрия с помощью гомогенизатора Ultra-Turrax T 10 basic (IKA, Германия) в соотношении 1/10. Из исходного гомогената выполняли десятичные разведения в 0,9-процентном растворе хлорида натрия и аликвоты по 0,05 мл высевали на обедненный мясопептонный агар (МПА). Инкубацию чашек Петри проводили в аэробных условиях до 48 ч при 28 °С. Затем чашки Петри с посевами извлекали и производили подсчет колоний. Полученные данные использо-

вали для расчета значений КОЕ/мл (для образцов воды) и КОЕ/г (для образцов рыбы). Предварительное определение выделенных бактериальных изолятов проводили по совокупности культуральных, морфологических и биохимических признаков [14]. Основных представителей всех групп выделяли в чистую культуру. Для полученных изолятов определяли биохимические параметры (отношение к O_2 , наличие каталазной и оксидазной активностей, способность к расщеплению желатина и сахарозы). Также определялась граммпринадлежность выделенных штаммов методом окраски по Граму, способность к образованию спор методом окраски препарата по Пешкову (для грамположительных микроорганизмов).

Филогенетическую идентификацию выделенных изолятов проводили с помощью секвенирования фрагментов генов 16S рНК.

Тотальную ДНК из суточных культур микроорганизмов выделяли с помощью набора ExtractDNA («Евроген», Москва) в соответствии с инструкциями производителя. Гены 16S рНК были амплифицированы с использованием универсальных прокариотических праймеров 16S-9F (5'-GAGTTTGTATCCTGGCTCAG), 16S-1512R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT). ПЦР проводилась с помощью коммерческого набора «БиоМастер HS-Тақ ПЦР-Color (2x)», оптимизированного для ПЦР с горячим стартом согласно инструкциям производителя («Биолабмикс», Новосибирск). Условия ПЦР: предварительная денатурация 95 °С – 4 минуты; затем 30 циклов (денатурация 95 °С – 1 минута, отжиг 55 °С – 1 минута, элонгация 72 °С – 1,5 минуты); финальная элонгация 72 °С – 5 минут. Детекция результатов ПЦР осуществлялась методом электрофореза в 1,5-процентном агарозном геле. Выделение и очистка амплифицированных генов 16S рНК производились с помощью набора CleanupMini («Евроген», Москва) согласно инструкциям производителя.

Идентификацию бактерий на основании анализа первичной нуклеотидной последовательности гена 16S рНК проводили с использованием базы данных GenBank и программного обеспечения Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide (BLAST-N), расположенного на площадке NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Филогенетическое дерево было построено с использованием метода максимального правдоподобия и модели Tamura-Nei [15]. Эволюционный анализ проводился с использованием программы MEGA11 [16]. Визуализация филогенетических деревьев проводилась с помощью платформы Interactive Tree of Life (iTOL) [17].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения MS Office (Excel).

Результаты (Results)

Исследования проводились в условиях фермерского хозяйства «Ярославская форель», которое занимается выращиванием аквакультуры *O. mykiss*. Водоем технически разделен на две области: садковая часть, занимающая 10 % от площади водоема, в которой содержится форель, и открытая часть водоема. На момент отбора проб температура воды садковой части составила 2,5 °С, pH = 7,9, концентрация растворенного в воде кислорода – 5,2 мг/дм³. Температура воды открытой части составила 2,5 °С, pH = 7,7, концентрация растворенного в воде кислорода – 5,3 мг/дм³. Гидрохимические показатели характеристик воды в пруду находились в пределах благоприятного диапазона для разведения пресноводных рыб. Температура воды и значения pH как садковой, так и открытой части водоема садкового хозяйства «Ярославская форель» соответствовали оптимальным значениям, необходимым для нормального функционального состояния организма рыб в весенний период [18].

Общее количество микроорганизмов в садковой части водоема составило $1,9 \times 10^2$ КОЕ/мл, в открытой части водоема – $5,2 \times 10^2$ КОЕ/мл. Известно, что 10^4 КОЕ/г является порогом содержания микроорганизмов в водоеме, при его превышении резко возрастает обсемененность внутренних органов рыбы [19]. В данном исследовании показано, что при полученных значениях гидрохимических параметров среды количество микроорганизмов в садковой части водоема не превышало данный показатель.

Обсемененность кишечника у исследованных особей радужной форели составляла $8,1 \times 10^3$ КОЕ/г. Таким образом, плотность бактериальной популяции в кишечнике была в 10 раз выше по сравнению с водной средой. Общее количество микроорганизмов в воде и кишечнике рыб сопоставимо с ранее полученными результатами для данных температурных условий [20].

Проведен анализ разнообразия культивируемого микробиома кишечника клинически здоровой рыбы. Работа была сосредоточена на доминирующей части микрофлоры, поскольку эти организмы могут играть важную роль в естественных условиях. Всего из содержимого кишечника *O. mykiss* было выделено 253 изолята. Проводили учет колоний бактерий разных таксономических групп. Кислая среда кишечника благоприятствует размножению грамотрицательных бактерий [13]. Среди выделенных изолятов абсолютное большинство относилось к грамотрицательным микроорганизмам.

Создана коллекция культивируемых гетеротрофных бактерий, выделенных из кишечника радужной форели. Доминирующие таксоны бактерий выделяли в чистую культуру и идентифицировали по результатам секвенирования нуклеотидных последовательностей гена 16S рДНК. Сравнение по-

следовательностей позволило определить таксономическую принадлежность и расположение штаммов кишечной микробиоты на филогенетическом древе (рис. 1). Выделенные изоляты были представлены филумами *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*.

Предыдущие исследования показали, что микробиом рыб видоспецифичен с точки зрения как бактериального разнообразия, так и структуры бактериального сообщества, демонстрируя высокую изменчивость между особями разных видов. Однако в составе микробиоты кишечника рыб доминируют несколько филумов, включая *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Fusobacteria* [21; 22].

Наши исследования показали, что *Proteobacteria*, особенно *Gamma*proteobacteria, были наиболее распространенным типом микробиоты кишечника радужной форели. Филум *Proteobacteria* представлен 5 родами бактерий: *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Aeromonas* и *Lysobacter* (рис. 1). Доминирующим среди всего бактериального сообщества кишечника радужной форели отмечен род *Psychrobacter* (60 %). *Psychrobacter* представляет собой широко распространенный и эволюционно успешный род бактерий, который ранее также был обнаружен в большом количестве в кишечном микробном сообществе различных видов рыб [23]. На долю рода *Aeromonas* приходилось 12 % от всего микробиома, а на долю родов *Pseudomonas*, *Moraxella* – по 1 %. Род *Lysobacter* был представлен в незначительном количестве (0,37 %) (рис. 2).

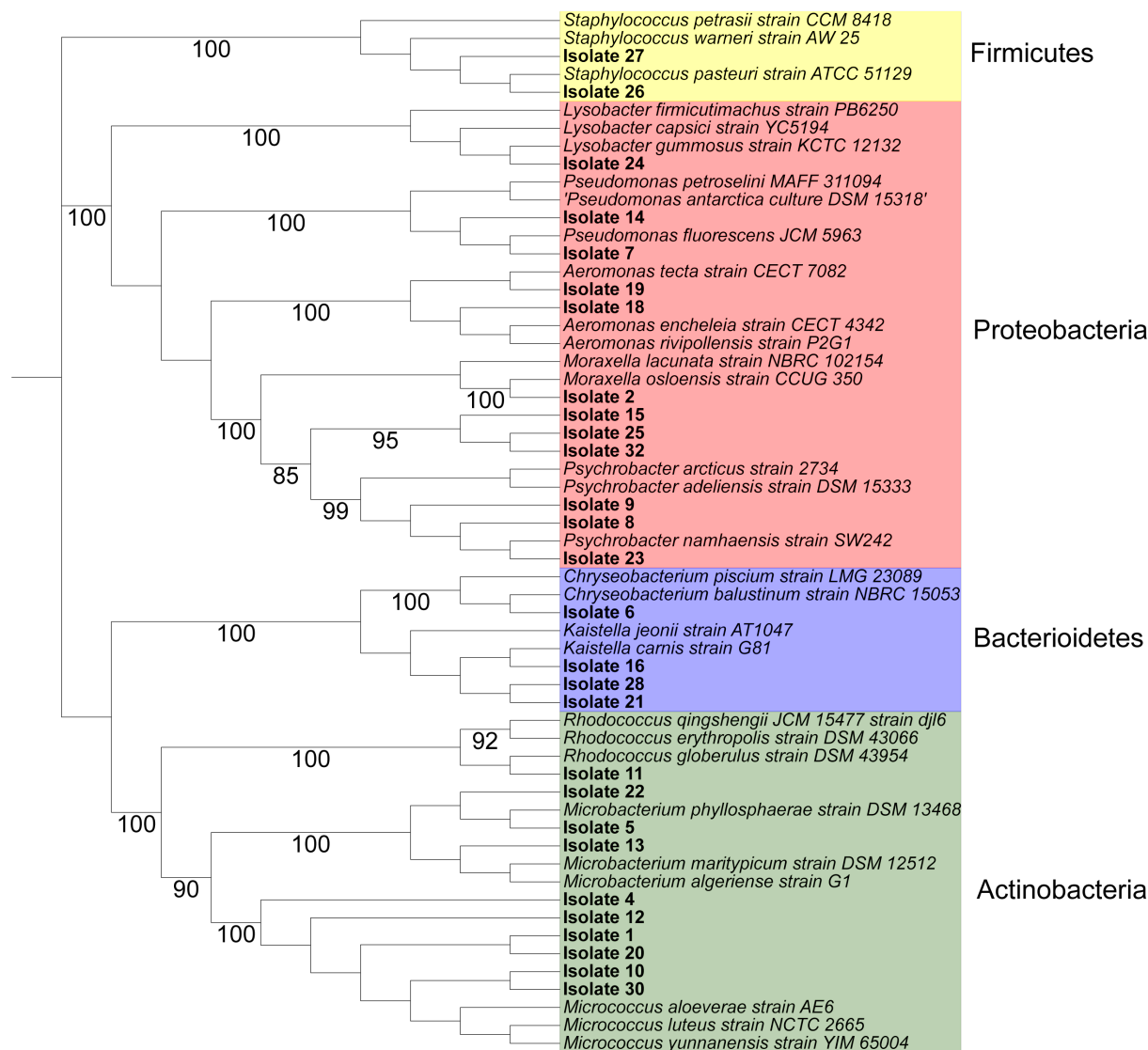


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное по результатам сравнения последовательностей фрагментов гена 16S рРНК штаммов, изолированных из кишечника *O. mykiss*

Fig. 1. Phylogenetic tree constructed based on the results of comparing the sequences of fragments of the 16S rRNA gene of strains isolated from the intestine of *O. mykiss*

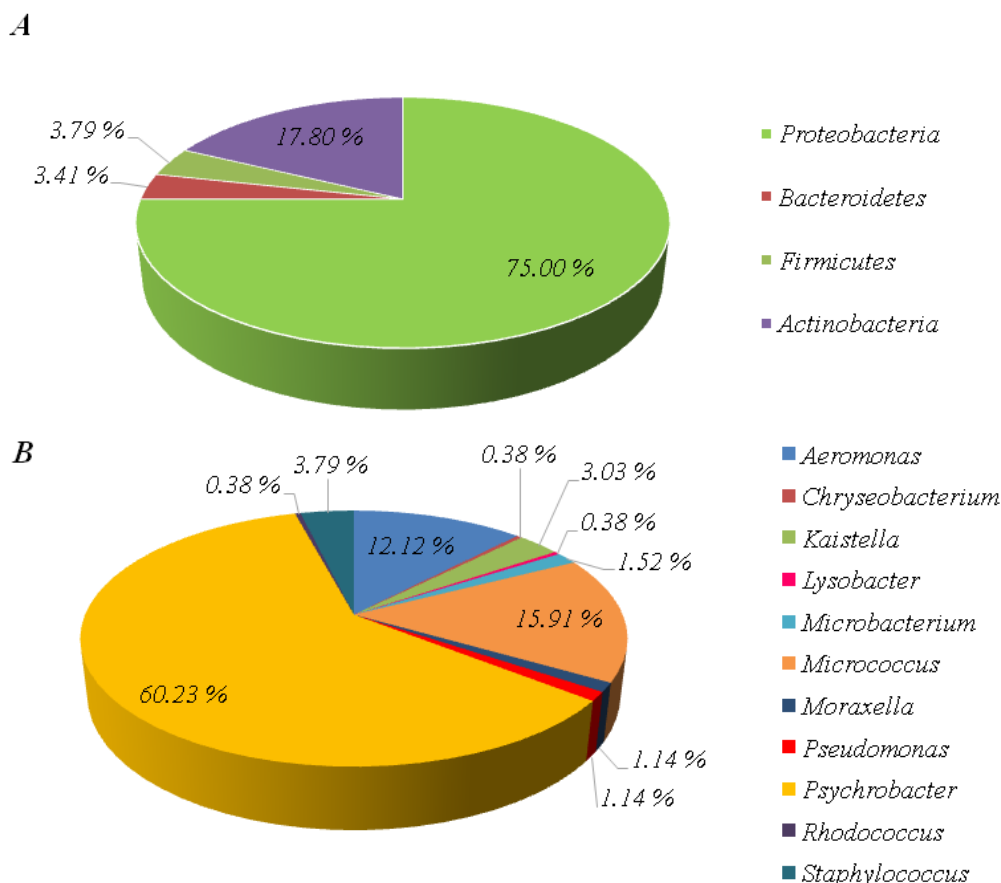


Рис. 2. Состав микробного сообщества кишечника *O. mykiss*:
 А – сравнительное обилие доминирующих филумов прокариот;
 В – разнообразие микробных сообществ на уровне родов
 Fig. 2. Composition of the intestinal microbial community of *O. mykiss*:
 А – comparative abundance of dominant phylum of prokaryotes;
 В – diversity of microbial communities at the level of genera

Примечательно, что актинобактерии также занимали значительную долю микробного сообщества кишечника радужной форели, около 18 %. Возможно, это обусловлено составом используемых кормов. Ранее были обнаружены модулирующие эффекты муки из насекомых и растительных компонентов на микробиом кишечника выращиваемой рыбы [24; 25]. Основные сдвиги в сообществах характеризовались увеличением относительного обилия *Actinobacteria* и *Firmicutes*. В нашем исследовании филум *Actinobacteria* был представлен родами *Micrococcus* (16 %), *Microbacterium* (2 %) и *Rhodococcus* (0,37 %) (рис. 2). Бактерии типа *Actinobacteria* включают таксоны, которые считаются полезными для здоровья рыб и могут продуцировать широкий спектр экзоферментов и вторичных метаболитов. В частности, сообщалось об использовании бактерий родов *Micrococcus* и *Rhodococcus* в качестве пробиотиков в аквакультуре [26; 27].

Филумы *Firmicutes* (4 %) и *Bacteroidetes* (3 %) составляли небольшую часть бактериальных сообществ кишечника радужной форели (рис. 2). Филум *Firmicutes* был представлен единственным родом *Staphylococcus*, доля которого в микробиоме состав-

ляла 4 % (рис. 1, 2) Представителей данного рода относят к аллохтонным видам в составе микробиоты кишечника рыб [28], имеются предположения о возможной роли бактерий рода *Staphylococcus* в развитии различных кишечных инфекций [29].

Филум *Bacteroidetes* был представлен родами *Kaistella* (3 %) и *Chryseobacterium* (0,37 %), относящимися к семейству *Flavobacteriaceae*. Представители этого семейства являются типичными микроорганизмами, колонизирующими рыб, часто их признают опасными патогенами животных [8].

Живые организмы невозможно рассматривать в отрыве от окружающей их среды, поэтому логично было бы предположить, что микробиом среды способен оказывать влияние на состав микробиома организма. Кроме того, хорошо известно, что такие факторы, как диета, качество воды, сезонность, физиология хозяина, инфекции и стресс, могут формировать состав микробиомов рыб и влиять на баланс микробных экосистем [30]. Однако окружающий водный микробиом не всегда отражает микробиом водных хозяев. В предыдущих исследованиях мы продемонстрировали, что микробиом кожи форели отличался от микробиома водной среды [31].

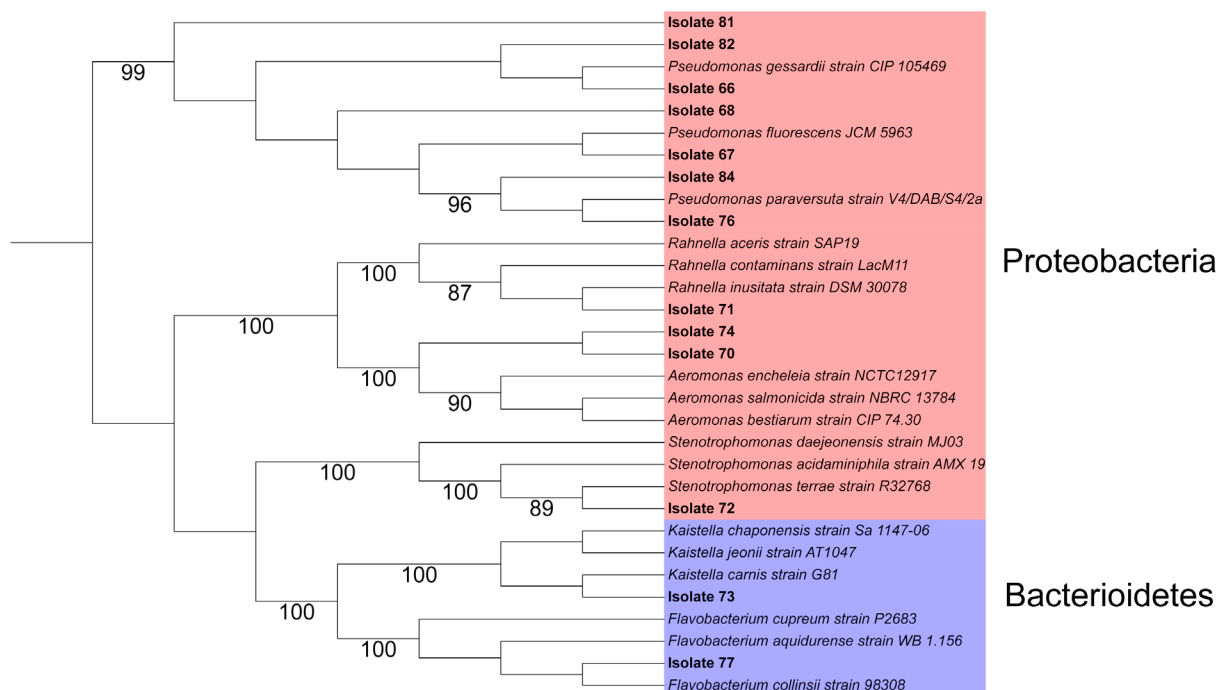


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное по результатам сравнения последовательностей фрагментов гена 16S рРНК штаммов, изолированных из садковой воды
 Fig. 3. A phylogenetic tree constructed based on the results of comparing sequences of fragments of the 16S rRNA gene of strains isolated from cage water

В данном исследовании мы провели анализ взаимосвязи бактериологического профиля кишечника рыб с бактериальным составом водной среды. В нашем случае кишечный микробиом был значительно более разнообразным, чем в образцах воды.

Культивируемое микробное сообщество воды в садке было представлено всего двумя филумами – *Proteobacteria* и *Bacteroidetes* (рис. 3).

Протеобактерии были наиболее многочисленным типом как в кишечнике радужной форели, так и в пробах воды. Подавляющее большинство водных бактериальных изолятов (90 %) относилось к филуму *Proteobacteria*, классу *Gammaproteobacteria*, который был представлен родами *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Rahnella*. Доминирующими были аэробные бактерии рода *Pseudomonas* (52 % от всего бактериального сообщества) и факультативно-анаэробные бактерии рода *Aeromonas* (35 %) (рис. 4). Бактерии аэромонадно-псевдомонадного комплекса являются условно-патогенными и в стрессовых условиях могут приводить к вспышке бактериальных инфекций. Кроме того, некоторые из них являются зоонозными патогенами и могут вызывать инфицирование человека [3; 4].

Представители филума *Bacteroidetes* составляли лишь 10 % бактериальной популяции водной среды. Филум *Bacteroidetes* был представлен единственным семейством *Flavobacteriaceae*, родами бактерий *Flavobacterium* (3 %) и *Kaistella* (6 %) (рис. 4). Известно, что некоторые представители

этого семейства вызывают болезни у пресноводных рыб [8]. Например, *Flavobacterium psychrophilum* является распространенным патогеном лососевых.

Таким образом, водная среда может являться источником патогенных и условно-патогенных комменсальных микроорганизмов. В дополнение к этому используются интенсивные методы выращивания рыбы, часто водоем зарыбляется с высокой плотностью, что способствует развитию инфекций.

Микробные сообщества кишечника тесно связаны с иммунитетом, разнообразный микробиом кишечника рыб в аквакультуре важен для предотвращения неблагоприятной микробной колонизации, и, хотя механизмы полностью не изучены, некоторые ключевые процессы были идентифицированы. Например, некоторые обитатели кишечника рыб могут проявлять ингибирующую активность в отношении патогенов [13]. Сообщалось, что бактерии рода *Psychrobacter*, доминирующего в бактериальном сообществе кишечника радужной форели, могут улучшать автохтонное микробное разнообразие вдоль желудочно-кишечного тракта, пищеварение и врожденный иммунитет рыб [23]. Некоторые представители рода *Psychrobacter* демонстрировали антагонистическую активность против патогенных видов *Vibrio anguillarum*, *Tenacibaculum maritimum* и *Aeromonas salmonicida*, что свидетельствует о дальнейших перспективах использования этих бактерий в качестве пробиотиков, способных оказывать положительное влияние на общее состояние здоровья рыб, тем самым повышая их устойчивость

к патогенам [32–34]. Пробиотические бактерии, используемые в аквакультуре, также способны стимулировать экспрессию воспалительных цитокинов в кишечнике рыб, увеличивать количество слизистого слоя и повышать фагоцитарную активность. Кроме того, в некоторых исследованиях было продемонстрировано, что колонизирующие микробы также могут модулировать экспрессию генов-хозяев для создания благоприятной среды в кишечнике, тем самым ограничивая инвазию патогенов, одновременно способствуя экспрессии генов противовоспалительных и противовирусных медиаторов [5]. Понимание и управление взаимодействием микробов, хозяина и окружающей среды и связанные с этим функциональные возможности в этих областях могут внести существенный вклад в создание более устойчивой отрасли аквакультуры. Использование пробиотиков в аквакультуре является привлекательным биологически безопасным методом снижения воздействия инфекционных заболеваний, но до сих пор не является широко распространенной практикой [7; 13; 32].

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Микроорганизмы играют важную роль в круговороте питательных веществ, поддержании качества воды и здоровье сельскохозяйственных живот-

ных. Все больше фактов указывает на тесную связь между нестабильной микробной средой и возникновением болезней в аквакультуре.

В данной работе было исследовано состояние водоема, определен уровень бактериальной нагрузки, а также проведен анализ структуры и таксономического состава культивируемых микробных сообществ воды и кишечника радужной форели в условиях садкового хозяйства Ярославской области.

На микробиомы обитающих в воде животных оказывает влияние состав микробиома окружающей среды. В микрофлоре *Oncorhynchus mykiss* и воды были обнаружены условно-патогенные виды бактерий, которые могут представлять потенциальную опасность для рыб. Необходим дальнейший мониторинг изменений экологической ситуации и санитарно-эпизоотического состояния водоема, что позволит своевременно принять меры по снижению микробного загрязнения тканей рыб и окружающей среды.

Однако микробиомы водных животных не являются прямым отражением микробиома окружающей воды. Сравнительный анализ микробиомов пресноводной системы и кишечника радужной форели выявил способность организма-хозяина концентрировать полезные микроорганизмы даже в

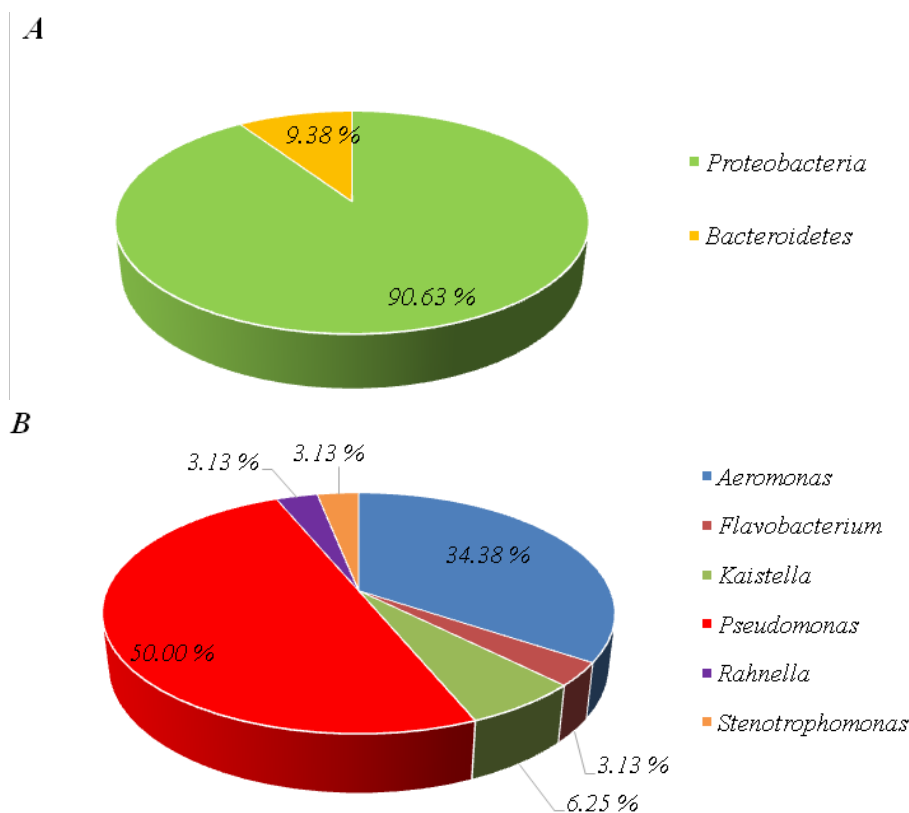


Рис. 4. Состав микробного сообщества садковой воды:
 А – сравнительное обилие доминирующих филумов прокариот;
 В – разнообразие микробных сообществ на уровне родов
 Fig. 4. Composition of microbial community of cage water:
 А – comparative abundance of dominant phylum of prokaryotes;
 В – Diversity of microbial communities at the level of genera

условиях патогенной нагрузки. Полученная коллекция микроорганизмов в дальнейшем может быть использована для скрининга потенциальных пробиотических культур. Пробиотики из автохтонного источника имеют больше шансов конкурировать с резидентными микроорганизмами, способны активно размножаться и быстро становятся преобладающими в составе микрофлоры, что может значительно улучшить устойчивость к болезням, рост и выживаемость рыбы.

Таким образом, мониторинг и манипулирование микробными сообществами в системе аквакуль-

туры имеют большой потенциал не только в поддержании качества воды, но и в борьбе с инфекционными микробными патогенами. Это поможет сократить использование химикатов и антибиотиков в системе аквакультуры. Однако успешное управление аквакультурой путем манипулирования микробиомом в настоящее время затруднено из-за недостатка знаний о соответствующих микробных взаимодействиях и общей экологии этих систем.

Благодарности (Acknowledgements)

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-26-20123.

Библиографический список

1. Лагуткина Л. Ю., Пономарев С. В. Органическая аквакультура как перспективное направление развития рыбохозяйственной отрасли (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2018. № 53 (2). С. 326–336.
2. Тыщенко В. И., Терлецкий В. П. *Oncorhynchus mykiss* в аквакультуре: биотехнологические и генетические основы разведения и селекции // Международный научно-исследовательский журнал. 2021. № 7 (109). С. 141–144.
3. Ziarati M., Zorriehzahra M. J., Hassantabar F., Mehrabi Z., Dhawan M., Sharun K., Emran T. B., Dhama K., Chaicumpa W., Shamsi S. Zoonotic diseases of fish and their prevention and control // Veterinary Quarterly. 2022. Vol. 42. Iss. 1. Pp. 95–118. DOI: 10.1080/01652176.2022.2080298.
4. Авдеева Е. В. Условно-патогенные бактерии рыб в естественных и искусственных водоемах Калининградской области // Труды ВНИРО. 2017. № 167. С. 104–109.
5. Perry W. B., Lindsay E., Payne C. J., Brodie C., Kazlauskaitė R. The role of the gut microbiome in sustainable teleost aquaculture // Proceedings of the Royal Society B. 2020. No. 287 (1926). Article number 20200184. DOI: 10.1098/rspb.2020.0184.
6. Santos L., Ramos F. Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem // International Journal of Antimicrobial Agents. 2018. No. 52 (2). Pp. 135–143. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010.
7. Pérez-Pascual D., Vendrell-Fernández S., Audrain B., Bernal-Bayard J., Patiño-Navarrete R., Petit V., Rigaud-eau D., Ghigo J. M. Gnotobiotic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) model reveals endogenous bacteria that protect against *Flavobacterium columnare* infection // PLoS pathogens. 2021. No. 17 (1). Article number e1009302. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009302.
8. Ikeda-Ohtsubo W., Brugman S., Warden C. H., Rebel J. M. J., Folkerts G., Pieterse C. M. J. How can we define “optimal microbiota”? A comparative review of structure and functions of microbiota of animals, fish, and plants in agriculture // Frontiers in nutrition. 2018. No. 5 (90). DOI: 10.3389/fnut.2018.00090.
9. Vasemägi A., Visse M., Kisand V. Effect of environmental factors and an emerging parasitic disease on gut microbiome of wild salmonid fish // mSphere. 2017. No. 2 (6). Article number e00418-17. DOI: 10.1128/mSphere.00418-17.
10. Xiong J. B., Nie L., Chen J. Current understanding on the roles of gut microbiota in fish disease and immunity // Zoological research. 2019. No. 40 (2). Pp. 70–76. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2018.069.
11. Butt R. L., Volkoff H. Gut microbiota and energy homeostasis in fish // Frontiers in Endocrinology (Lausanne). 2019. No. 10. Pp. 6–8. DOI: 10.3389/fendo.2019.00009.
12. Pérez-Pascual D., Pérez-Cobas A. E., Rigau-deau D., Rochat T., Bernardet J. F., Skiba-Cassy S., Marchand Y., Duchaud E., Ghigo J. M. Sustainable plant-based diets promote rainbow trout gut microbiota richness and do not alter resistance to bacterial infection // Animal microbiome. 2021. No. 3 (1). Pp. 1–13. DOI: 10.1186/s42523-021-00107-2.
13. Sehnal L., Brammer-Robbins E., Wormington A. M., Blaha L., Bisesi J., Larkin I., Martyniuk C. J., Simoin M., Adamovsky O. Microbiome composition and function in aquatic vertebrates: small organisms making big impacts on aquatic animal health // Frontiers in microbiology. 2021. No. 12. Article number 567408. DOI: 10.3389/fmicb.2021.567408.
14. Хоулт Дж., Криг Н. Определитель бактерий Берджи: в 2-х томах. Том 1 / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига; пер. с англ. под ред. акад. РАН Г. А. Заварзина. Изд. 9-е. Москва: Мир, 1997. 429 с.
15. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Molecular Biology and Evolution. 1993. No. 10 (3). Pp. 512–526.

16. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Molecular Biology and Evolution*. 2016. No. 33 (7). Pp. 1870–1874.
17. Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation // *Bioinformatics*. 2007. No. 23 (1). Pp. 127–128. DOI: 10.1093/nar/gkab301.
18. Кушникова Л. Б., Ануарбеков С. М., Евсеева А. А. Лимитирующие факторы при садковом выращивании рыбы в горных водоемах Восточного Казахстана // *Вестник НГАУ*. 2018. № 1 (46). С. 127–135.
19. Морозова М. А., Дьяченко М. А., Абросимова Н. А., Чемисова О. С., Степанова Ю. В., Пархоменко Ю. О. Микрофлора паренхиматозных органов у молоди карповых рыб в товарных рыбоводных хозяйствах // *Комплексные исследования в рыбохозяйственной отрасли: материалы IV Международной научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых*. Владивосток, 2018. С. 80–85.
20. Bisht A., Singh U. P., Pandey N. N. Comparative study of seasonal variation in bacterial flora concomitant with farm raised fingerlings of *Cyprinus carpio* at tarai region of Uttarakhand // *Journal of Environmental Biology*. 2014. No. 35 (2). Pp. 363–367.
21. Gomez J. A., Primm T. P. A Slimy Business: the Future of Fish Skin Microbiome Studies // *Microbial Ecology*. 2021. No. 82. Pp. 275–287. DOI: 10.1007/s00248-020-01648-w.
22. Tyagi A., Singh B., Billekallu Thammegowda N. K., Singh N. K. Shotgun metagenomics offers novel insights into taxonomic compositions, metabolic pathways and antibiotic resistance genes in fish gut microbiome // *Archives of microbiology*. 2019. No. 201 (3). Pp. 295–303. DOI: 10.1007/s00203-018-1615-y.
23. Gao Y. M., Zou K. S., Zhou L., Huang X. D., Li Y. Y., Gao X. Y., Chen X., Zhang X. Y. Deep insights into gut microbiota in four carnivorous coral reef fishes from the South China Sea // *Microorganisms*. 2020. No. 8 (3). Article number 426. DOI: 10.3390/microorganisms8030426.
24. Rangel F., Enes P., Gasco L., Gai F., Hausmann B., Berry D., Oliva-Teles A., Serra C. R., Pereira F. C. Differential Modulation of the European Sea Bass Gut Microbiota by Distinct Insect Meals // *Frontiers in microbiology*. 2022. No. 13. Article number 831034. DOI: 10.3389/fmicb.2022.831034.
25. Wu F., Chen B., Liu S., Xia X., Gao L., Zhang X., Pan Q. Effects of woody forages on biodiversity and bioactivity of aerobic culturable gut bacteria of tilapia (*Oreochromis niloticus*) // *PLoS ONE*. 2020. No. 15 (7). Article number e0235560. DOI: 10.1371/journal.pone.0235560.
26. Abd El-Rhman A. M., Khattab Y. A., Shalaby A. M. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* // *Fish and Shellfish Immunology*. 2009. No. 27 (2). Pp. 175–180. DOI: 10.1016/j.fsi.2009.03.020.
27. Sharifuzzaman S. M., Rahman H., Austin D. A., Austin B. Properties of probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2 isolated from fish guts // *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2018. No. 10 (3). Pp. 534–542. DOI: 10.1007/s12602-017-9290-x.
28. Poteshkina V. A., Uskova I. V. Enzymatic potential of the indigenous microbiota of the intestine of rainbow trout *Parasalmo mykiss* (= *Oncorhynchus*) // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020. No. 539 (1). Article number 012200. DOI: 10.1088/1755-1315/539/1/012200.
29. Kononova S. V., Zinchenko D. V., Muranova T. A., Belova N. A., Miroshnikov A. I. Intestinal microbiota of salmonids and its changes upon introduction of soy proteins to fish feed // *Aquaculture International*. 2019. No. 27 (2). Pp. 475–496. DOI: 10.1007/s10499-019-00341-1.
30. Terova G., Gini E., Gasco L., Moroni F., Antonini M., Rimoldi S. Effects of full replacement of dietary fishmeal with insect meal from *Tenebrio molitor* on rainbow trout gut and skin microbiota // *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2021. No. 12 (30). DOI: 10.1186/s40104-021-00551-9.
31. Evdokimov E. G., Zaitseva Yu. V., Flerova E. A., Dokolin D. A., Zlobin I. V. Influence of conditions of the aquatic environment on the immuno-physiological status of the organism and the microbiome of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in cage farming // *Veterinaria i kormlenie*. 2022. No. 6. Pp. 28–32.
32. Simón R., Docando F., Nuñez-Ortiz N., Tafalla C., Díaz-Rosales P. Mechanisms used by probiotics to confer pathogen resistance to teleost fish // *Frontiers in Immunology*. 2021. No. 12. Article number 653025. DOI: 10.3390/microorganisms8030426.
33. Lazado C. C., Caipang C. M., Rajan B., Brinchmann M. F., Kiron V. Characterization of GP21 and GP12: Two Potential Probiotic Bacteria Isolated from the Gastrointestinal Tract of Atlantic Cod // *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2010. No. 2 (2). Pp. 126–34. DOI: 10.1007/s12602-010-9041-8.
34. Wanka K. M., Damerou T., Costas B., Krueger A., Schulz C., Wuertz S. Isolation and characterization of native probiotics for fish farming // *BMC Microbiology*. 2018. No. 18 (1). Pp. 1–13. DOI: 10.1186/s12866-018-1260-2.

Об авторах:

Юлия Владимировна Зайцева¹, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории эколобиомониторинга и контроля качества, доцент кафедры микробиологии и ботаники, ORCID 0000-0001-9522-010X, AuthorID 226090; +7 980 703-53-01, zjv9@mail.ru

Дмитрий Андреевич Доколин¹, стажер-исследователь лаборатории биотехнологии и прикладной биоэкологической ментологии, ORCID 0000-0003-3064-5945, AuthorID 1167275; +7 960 530-27-62, dimondokolin@yandex.ru

Илья Васильевич Злобин¹, младший научный сотрудник лаборатории эколобиомониторинга и контроля качества, ORCID 0000-0001-7348-222, AuthorID 1167612; +7 910 810-40-45, ily.zlobin21@yandex.ru

¹ Ярославский государственный университет имени П. Г. Демидова, Ярославль, Россия

Intestinal microbiocenosis of rainbow trout in the conditions of a cage farm

Yu. V. Zaytseva¹✉, D. A. Dokolin¹, I. V. Zlobin¹

¹ P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia

✉ E-mail: zjv9@mail.ru

Abstract. The rapid growth of the aquaculture industry using modern intensive farming methods has led to a number of problems related to water quality and the spread of infectious diseases in fish. The intestinal physiological microbiota of fish and the surrounding aquatic environment forming an ecosystem, the balance of which is a key factor in maintaining the health of aquaculture. However, optimizing the microbiota is still a challenging task due to a lack of studies about the dominant microorganisms in aquacultures and the influence of environmental factors on it. **The aim** of this work was to study the structure and taxonomic composition of the cultivatable bacterial gut community of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* under the conditions of the “Yaroslavskaya Trout” cage farm. **Methods.** To identify the isolated strains and characterize the composition of common bacterial communities were used phenotypic and biochemical characteristics, as well as amplification and sequencing of 16S rRNA gene fragments and subsequent phylogenetic analysis. **Scientific novelty.** Data on the taxonomic diversity of the cultivated rainbow trout gut microbiome have been obtained. A comparative analysis of fish intestinal microbiocenoses and the surrounding aquatic environment was carried out. **Results and practical significance.** Gamma-proteobacteria was the most abundant bacteria in the structure of the studied microbial communities. Bacteria of the genera *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, and *Aeromonas* were found in the microbiome of both the rainbow trout intestines and the surrounding aquatic environment, which are opportunistic pathogens and can lead to an outbreak of bacterial infections under stressful conditions. However, studies have shown that the surrounding aquatic microbiome does not always reflect the microbiome of aquatic organisms. A comparative analysis of the freshwater microbiomes and the gut microbiome of rainbow trout revealed the ability of the host organism to concentrate beneficial probiotic microorganisms even under conditions of pathogenic pressure. The resulting collection of microorganisms can be further used for screening potential probiotic cultures.

Keywords: aquaculture *Oncorhynchus mykiss*, rainbow trout, microbiome, intestines, probiotics.

For citation: Zaytseva Yu. V., Dokolin D. A., Zlobin I. V. Mikrobiotsenoz kischechnika raduzhnoy foreli v usloviyakh sadkovogo khozyaystva [Intestinal microbiocenosis of rainbow trout in the conditions of a cage farm] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2022. No. 12 (227). Pp. 42–53. DOI: 10.32417/1997-4868-2022-227-12-42-53. (In Russian.)

Date of paper submission: 30.09.2022, **date of review:** 19.10.22, **date of acceptance:** 28.10.22.

References

1. Lagutkina L. Yu., Ponomarev S. V. Organicheskaya akvakul'tura kak perspektivnoe napravlenie razvitiya rybnokhozyaystvennoy otrasli (obzor) [Organic aquaculture as a promising direction for the development of the fisheries industry (review)] // Agricultural biology. 2018. No. 53 (2). Pp. 326–336. (In Russian.)
2. Tyshchenko V. I., Terletskiy V. P. *Oncorhynchus mykiss* v akvakul'ture: biotekhnologicheskie i geneticheskie osnovy razvedeniya i selektsii [Oncorhynchus mykiss in aquaculture: biotechnological and genetic foundations of breeding and breeding] // International Research Journal. 2021. No. 7 (109). Pp. 141–144. (In Russian.)

3. Ziarati M., Zorriehzahra M. J., Hassantabar F., Mehrabi Z., Dhawan M., Sharun K., Emran T. B., Dhama K., Chaicumpa W., Shamsi S. Zoonotic diseases of fish and their prevention and control // *Veterinary Quarterly*. 2022. Vol. 42. Iss. 1. Pp. 95–118. DOI: 10.1080/01652176.2022.2080298.
4. Avdeeva E. V. Uslovno-patogennyye bakterii ryb v estestvennykh i iskusstvennykh vodoemakh Kaliningradskoy oblasti [Conditionally pathogenic fish bacteria in natural and artificial reservoirs of the Kaliningrad region] // *Trudy VNIRO*. 2017. No. 167. Pp. 104–109. (In Russian.)
5. Perry W. B., Lindsay E., Payne C. J., Brodie C., Kazlauskaitė R. The role of the gut microbiome in sustainable teleost aquaculture // *Proceedings of the Royal Society B*. 2020. No. 287 (1926). Article number 20200184. DOI: 10.1098/rspb.2020.0184.
6. Santos L., Ramos F. Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem // *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2018. No. 52 (2). Pp. 135–143. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010.
7. Pérez-Pascual D., Vendrell-Fernández S., Audrain B., Bernal-Bayard J., Patiño-Navarrete R., Petit V., Rigaud-eau D., Ghigo J. M. Gnotobiotic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) model reveals endogenous bacteria that protect against *Flavobacterium columnare* infection // *PLoS pathogens*. 2021. No. 17 (1). Article number e1009302. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009302.
8. Ikeda-Ohtsubo W., Brugman S., Warden C. H., Rebel J. M. J., Folkerts G., Pieterse C. M. J. How can we define “optimal microbiota”? A comparative review of structure and functions of microbiota of animals, fish, and plants in agriculture // *Frontiers in nutrition*. 2018. No. 5 (90). DOI: 10.3389/fnut.2018.00090.
9. Vasemägi A., Visse M., Kisand V. Effect of environmental factors and an emerging parasitic disease on gut microbiome of wild salmonid fish // *MSphere*. 2017. No. 2 (6). Article number e00418-17. DOI: 10.1128/mSphere.00418-17.
10. Xiong J. B., Nie L., Chen J. Current understanding on the roles of gut microbiota in fish disease and immunity // *Zoological research*. 2019. No. 40 (2). Pp. 70–76. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2018.069.
11. Butt R. L., Volkoff H. Gut microbiota and energy homeostasis in fish // *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2019. No. 10. Pp. 6–8. DOI: 10.3389/fendo.2019.00009.
12. Pérez-Pascual D., Pérez-Cobas A. E., Rigaudeau D., Rochat T., Bernardet J. F., Skiba-Cassy S., Marchand Y., Duchaud E., Ghigo J. M. Sustainable plant-based diets promote rainbow trout gut microbiota richness and do not alter resistance to bacterial infection // *Animal microbiome*. 2021. No. 3 (1). Pp. 1–13. DOI: 10.1186/s42523-021-00107-2.
13. Sehnal L., Brammer-Robbins E., Wormington A. M., Blaha L., Bisesi J., Larkin I., Martyniuk C. J., Simonin M., Adamovsky O. Microbiome composition and function in aquatic vertebrates: small organisms making big impacts on aquatic animal health // *Frontiers in microbiology*. 2021. No. 12. Article number 567408. DOI: 10.3389/fmicb.2021.567408.
14. Khoult J., Krig N. Opredelitel' bakteriy Berdzhii: v 2-kh tomakh. Tom 1 [Bergey's Manual of Determinative Bacteriology: in 2 volumes. Vol. 1] ; translate from English ; under the editorship of academician of the RAS G. A. Zavarzin. Ed. 9th. Moscow: Mir, 1997. 429 p. (In Russian.)
15. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // *Molecular Biology and Evolution*. 1993. No. 10 (3). Pp. 512–526. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.
16. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Molecular Biology and Evolution*. 2016. No. 33 (7). Pp. 1870–1874. DOI: 10.1093/molbev/msab120.
17. Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation // *Bioinformatics*. 2007. No. 23 (1). Pp. 127–128. DOI: 10.1093/nar/gkab301.
18. Kushnikova L. B., Anuarbekov S. M., Evseeva A. A. Limitiruyushchie faktory pri sadkovom vyrashchivaniy ryby v gornyykh vodoemakh Vostochnogo Kazakhstana [Limiting factors in the cage cultivation of fish in mountain reservoirs of East Kazakhstan] // *Vestnik NGAU*. 2018. No. 1 (46). Pp. 127–135. (In Russian.)
19. Morozova M. A., D'yachenko M. A., Abrosimova N. A., Chemisova O. S., Stepanova Yu. V., Parkhomenko Yu. O. Mikroflora parenkhimatoznykh organov u molodi karpovykh ryb v tovarnykh rybovodnykh khozyaystvakh [Microflora of parenchymal organs in juvenile carp fish in commercial fish farms] // *Kompleksnyye issledovaniya v rybokhozyaystvennoy otrasli: materialy IV Mezhdunarodnoy nauchno-tekhnicheskoy konferentsii studentov, aspirantov i molodykh uchenykh*. Vladivostok, 2018. Pp. 80–85. (In Russian.)
20. Bisht A., Singh U. P., Pandey N. N. Comparative study of seasonal variation in bacterial flora concomitant with farm raised fingerlings of *Cyprinus carpio* at tarai region of Uttarakhand // *Journal of Environmental Biology*. 2014. No. 35 (2). Pp. 363–367.
21. Gomez J. A., Primm T. P. A Slimy Business: the Future of Fish Skin Microbiome Studies // *Microbial Ecology*. 2021. No. 82. Pp. 275–287. DOI: 10.1007/s00248-020-01648-w.

22. Tyagi A., Singh B., Billekallu Thammegowda N. K., Singh N. K. Shotgun metagenomics offers novel insights into taxonomic compositions, metabolic pathways and antibiotic resistance genes in fish gut microbiome // Archives of microbiology. 2019. No. 201 (3). Pp. 295–303. DOI: 10.1007/s00203-018-1615-y.
23. Gao Y. M., Zou K. S., Zhou L., Huang X. D., Li Y. Y., Gao X. Y., Chen X., Zhang X. Y. Deep insights into gut microbiota in four carnivorous coral reef fishes from the South China Sea // Microorganisms. 2020. No. 8 (3). Article number 426. DOI: 10.3390/microorganisms8030426.
24. Rangel F., Enes P., Gasco L., Gai F., Hausmann B., Berry D., Oliva-Teles A., Serra C. R., Pereira F. C. Differential Modulation of the European Sea Bass Gut Microbiota by Distinct Insect Meals // Frontiers in microbiology. 2022. No. 13. Article number 831034. DOI: 10.3389/fmicb.2022.831034.
25. Wu F., Chen B., Liu S., Xia X., Gao L., Zhang X., Pan Q. Effects of woody forages on biodiversity and bioactivity of aerobic culturable gut bacteria of tilapia (*Oreochromis niloticus*) // PLoS ONE. 2020. No. 15 (7). Article number e0235560. DOI: 10.1371/journal.pone.0235560.
26. Abd El-Rhman A. M., Khattab Y. A., Shalaby A. M. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* // Fish and Shellfish Immunology. 2009. No. 27 (2). Pp. 175–180. DOI: 10.1016/j.fsi.2009.03.020.
27. Sharifuzzaman S. M., Rahman H., Austin D. A., Austin B. Properties of probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2 isolated from fish guts // Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2018. No. 10 (3). Pp. 534–542. DOI: 10.1007/s12602-017-9290-x.
28. Poteshkina V. A., Uskova I. V. Enzymatic potential of the indigenous microbiota of the intestine of rainbow trout *Parasalmo mykiss* (= *Oncorhynchus*) // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2020. No. 539 (1). Article number 012200. DOI: 10.1088/1755-1315/539/1/012200.
29. Kononova S. V., Zinchenko D. V., Muranova T. A., Belova N. A., Miroshnikov A. I. Intestinal microbiota of salmonids and its changes upon introduction of soy proteins to fish feed // Aquaculture International. 2019. No. 27 (2). Pp. 475–496. DOI: 10.1007/s10499-019-00341-1.
30. Terova G., Gini E., Gasco L., Moroni F., Antonini M., Rimoldi S. Effects of full replacement of dietary fishmeal with insect meal from *Tenebrio molitor* on rainbow trout gut and skin microbiota // Journal of Animal Science and Biotechnology. 2021. No. 12 (30). DOI: 10.1186/s40104-021-00551-9.
31. Evdokimov E. G., Zaitseva Yu. V., Flerova E. A., Dokolin D. A., Zlobin I. V. Influence of conditions of the aquatic environment on the immuno-physiological status of the organism and the microbiome of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in cage farming // Veterinaria i kormlenie. 2022. No 6. Pp. 28–32.
32. Simón R., Docando F., Nuñez-Ortiz N., Tafalla C., Díaz-Rosales P. Mechanisms used by probiotics to confer pathogen resistance to teleost fish // Frontiers in Immunology. 2021. No. 12. Article number 653025. DOI: 10.3390/microorganisms8030426.
33. Lazado C. C., Caipang C. M., Rajan B., Brinchmann M. F., Kiron V. Characterization of GP21 and GP12: Two Potential Probiotic Bacteria Isolated from the Gastrointestinal Tract of Atlantic Cod // Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2010. No. 2 (2). Pp. 126–34. DOI: 10.1007/s12602-010-9041-8.
34. Wanka K. M., Damerau T., Costas B., Krueger A., Schulz C., Wuertz S. Isolation and characterization of native probiotics for fish farming // BMC Microbiology. 2018. No. 18 (1). Pp. 1–13. DOI: 10.1186/s12866-018-1260-2.

Authors' information:

Yuliya V. Zaytseva¹, candidate of biological sciences, senior researcher of the ecobiomonitoring and quality control laboratory, associate professor of the department of microbiology and botany, ORCID 0000-0001-9522-010X, AuthorID 226090; +7 980 703-53-01, zjv9@mail.ru

Dmitriy A. Dokolin¹, research assistant of the laboratory of biotechnology and applied bioelementology, ORCID 0000-0003-3064-5945, AuthorID 1167275; +7 960 530-27-62, dimondokolin@yandex.ru

Ilya V. Zlobin¹, junior researcher of the laboratory of ecobiomonitoring and quality control, ORCID 0000-0001-7348-222, AuthorID 1167612; +7 910 810-40-45, ily.zlobin21@yandex.ru

¹ P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia