

639.3
Б91

И.В. Бурлаченко

*А*КТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БЕЗОПАСНОСТИ
КОМБИКОРМОВ
В АКВАКУЛЬТУРЕ РЫБ

Издательство ВНИРО

Государственный комитет Российской Федерации по рыболовству

Федеральное государственное унитарное предприятие
«Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства
и океанографии» (ФГУП «ВНИРО»)

State Committee for Fisheries of the Russian Federation

Federal State Unitary Enterprise
«Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography»
(FSUE «VNIRO»)



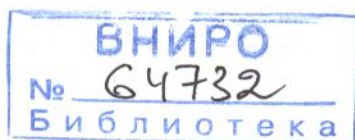
I.V. Burlachenko

**Topical problems of the mixed
feed safety in fish farming**

Moscow • VNIRO Publishing • 2008

И.В. Бурлаченко

**Актуальные вопросы безопасности
комбикормов в аквакультуре рыб**



Москва • Издательство ВНИРО • 2008

Редакционный совет ФГУП «ВНИРО»:

канд. геогр. наук Б.Н. Котенев, д-р биол. наук О.Ф. Гриценко,
д-р техн. наук Л.С. Абрамова, канд. биол. наук В.И. Соколов,
д-р биол. наук Е.В. Микодина, д-р биол. наук А.И. Глубоков,
д-р биол. наук Н.В. Кловач, д-р биол. наук В.М. Борисов

Рецензенты:

член-корреспондент РАСХН, д-р биол. наук, профессор А.М. Багров,
д-р биол. наук, профессор Е.А. Гамыгин

Бурлаченко И.В.

Б 59 Актуальные вопросы безопасности комбикормов в аквакультуре рыб.– М.: Изд-во ВНИРО, 2008.– 183 с.

В книге содержатся сведения об особенностях воздействия контаминантов комбикормов на живые организмы. Приведены результаты исследований наименее изученного на сегодняшний день вопроса – микробной контаминации комбикормов для рыб. Представлена многоуровневая характеристика негативных процессов, происходящих в организме осетровых рыб под воздействием наиболее распространенных групп микроорганизмов кормов. Предложена модификация экспресс-системы для качественной и количественной характеристики микробной обсеменности комбикормов. Обоснована и экспериментально подтверждена эффективность применения пробиотических препаратов для повышения резистентности осетровых рыб в условиях интенсивного культивирования.

Книга предназначена для специалистов в области аквакультуры и кормопроизводства, смежных отраслей, научных работников, аспирантов, студентов специализированных учебных заведений.

Burlachenko I.V.

Topical problems of the mixed feed safety in fish farming.– М.: VNIRO Publishing, 2008.– 183 p.

The book contains information about peculiarities of impact made by the mixed feed contaminants on live organisms. There are also results of research on the least studied problem, i.e. the microbial contamination of the fish mixed feed with a multilayer description of processes which are triggered in the organism of the sturgeon species by the commonest groups of the feedstuff microorganisms. Modification of the express-system for qualitative and quantitative assessment of the microbial contamination of the mixed feeds is suggested. The book presents argumentation and experimental verification of effective application of probiotic drugs which promote resistance of sturgeon species under conditions of intensive rearing.

The book is destined for experts in aquaculture and feed production, allied industries, research workers, graduate students, and students of specialized colleges.

© И.В. Бурлаченко, 2008

© I.V. Burlachenko, 2008

© Издательство ВНИРО, 2008

© VNIRO Publishing, 2008

Введение

Согласно данным ФАО, опубликованным в конце 2007 г., доля аквакультуры в общей продукции водных биологических ресурсов, составлявшая в 2005 г. 45% (48 млн. т), к 2020 г. возрастет до 75 % [FAO, 2007]. Во многом этот рост обеспечивается активной научной поддержкой. Сегодня актуальные задачи науки в этой области значительно меньше чем ранее, связаны с созданием технологий культивирования. На первый план выходит выявление узких мест, изучение механизмов, сдерживающих реализацию продуктивного потенциала объектов, и разработка биологически оправданных предложений по коррекции действия лимитирующих факторов [Карпевич, 1985, 1998; Душкина, 1998, *Aquaculture Europe*, 2004; 2006; *World Aquaculture*, 2005, 2006]. Особенно остро эти вопросы стоят при индустриальном культивировании, где экологические условия приближены к оптимальным, а их качественная сторона в высокой степени определяется человеком.

Для нашей страны в этом аспекте актуален вопрос об аквакультуре осетровых рыб. Уникальный опыт их заводского воспроизводства, обязанный во многом воплощению результатов эколого-физиологических исследований Н.Л. Гербильского [1949, 1953, 1962, 1966], В.В. Мильштейна [1940, 1962], Г.С. Карзинкина [1942, 1952], И.Ф. Вельтищевой [1951, 1955], Б.Н. Казанского [1957, 1963], Ю.Ю. Марти [1972, 1979] и других ученых явился, в свое время, основой сохранения промысла осетровых рыб. Это происходило в условиях антропогенного воздействия, практически полностью исключившего естественный 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 молоди, предназначенной для выпуска в естественные водоемы и производства востребованной пищевой продукции [Строганов, 1968; Николюкин, Бурцев, 1969; Бурцев, Николаев, 2004].

Интенсивное культивирование позволяет в наиболее эффективном режиме добиться реализации биологического потенциала объектов. Однако следует подчеркнуть, что реальная интенсификация возможна только при условии оптимизации основных факторов – качества среды выращивания и кормления.

Рациональное кормление, основанное на применении высокоэффективных комбикормов, является одной из важнейших основ производства продукции при интенсивном культивировании любых видов животных. Благодаря успехам науки о питании, созданы комбикорма, состав которых в основном соответствует пищевым потребностям рыб и задачам культивирования [Щербина, 1973, 1979; Гамыгин, Пономарев и др., 1990;

Остроумова, 1978, 1983, 1988, 2001; Гамыгин и др., 2004; Щербина, Гамыгин, 2006]. Ассортимент комбикормов постоянно расширяется за счет разработки новых рецептур, соответствующих различным направлениям аквакультуры, введения новых компонентов и совершенствования способов изготовления, позволяющих на основе ресурсосберегающих технологий выпускать продукцию все более высокого качества.

Известно, что комбикорма представляют собой набор компонентов, которые в естественных условиях животными используются либо очень ограниченно, либо не используются совсем. Компоненты комбикормов, являясь продуктами рыбного промысла, сельскохозяйственного производства, микробиологического синтеза, а также отходами этих и ряда других производств, помимо необходимых элементов питания, зачастую имеют в своем составе контаминанты. Контаминанты – это чужеродные вещества, обязанные своим происхождением естественным свойствам компонентов или накоплением в них различных загрязнений, способных оказывать отрицательное действие на общее состояние здоровья живых организмов [Тутельян, 1985].

В естественной среде обитания, благодаря широкому спектру и избирательности питания, животные имеют возможность избегать неблагоприятные кормовые источники. При культивировании, особенно интенсивном, где животные полностью зависимы от человека, разнообразие кормов резко сужено. Используемые продукты представляют собой концентраты, причем не только питательных веществ, но и присутствующих в них контаминантов. В связи с этим возможность их отрицательного влияния на живые организмы резко возрастает. Следует подчеркнуть, что контаминанты могут накапливаться в пищевых цепях, что в конечном итоге, представляет реальную опасность для человека [Codex alimentarius, 1963], поскольку, согласно древней поговорке, «мы едим то, что мы едим». Именно поэтому, в связи с интенсификацией производства пищевой продукции, в последнее время все больше внимания уделяется вопросам ее безопасности – узаконенному нормированному ограничению уровней содержания в сырье, кормах, кормовых добавках нежелательных веществ, представляющих потенциальную опасность для животных, человека или окружающей среды.

В странах Европейского Союза обеспечение высокого уровня безопасности и ее контроля в продуктах питания на всех этапах – от изготовления сырья для комбикормов до реализации готовой продукции, признано одним из политических приоритетов [Livre blanc, 2000; Directive 2002/32/CE, Reglement (CE), 2005]. В Азиатско-Тихоокеанском регионе, являющемся основным производителем продукции аквакультуры, этим вопросам уделяется гораздо меньше внимания, несмотря на их остроту. В России в этом направлении в рамках закона «О техническом регулировании» [ФЗ, № 184-ФЗ, 2002] идет разработка специализированных тех-

нических регламентов «О требованиях к безопасности кормов и кормовых добавок» и «О требованиях к безопасности продукции животного происхождения».

Сегодня в нашей стране вопросы безопасности кормов для животноводства регулируются действующими ГОСТами и регламентируются в соответствии с особенностями влияния контаминантов на организм. В связи со сравнительно недавней историей индустриального культивирования рыб, многие показатели безопасности комбикормов, в силу своей недостаточной изученности, приняты, по аналогии с теплокровными животными, без учета биологических особенностей рыб и специфики их выращивания [ГОСТ Р 51899-2002; ТУ 9296, 2003].

В то же время, для рыб серьезную опасность представляют контаминанты, присутствие которых в комбикормах обусловлено особенностями их пищевых потребностей – высоким содержанием белка и липидов. К ним относятся продукты перекисного окисления жиров и жизнедеятельности микроорганизмов – грибов и бактерий. Вопросы воздействия на рыб продуктов окисления липидов и микотоксинов, продуцируемых грибами, изучались достаточно подробно [Абрамова и др., 1981; Шабалина, 1974, Шабалина и др., 1986; Галаш, 1988, 1990; Остроумова, 2001; Головина, 2003]. Бактериальное заражение кормов 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 макроорганизма [Чернышов, Панин, 2000].

С позиций современной теории питания [Уголев, 1985, 1991; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005], нормальная микрофлора пищеварительного тракта 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. Их разрушение способствует снижению резистентности организма и проникновению бактерий из пищеварительного тракта во внутренние органы. Это сопровождается сокращением функциональной активности органов и 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 комплексное влияние на рыб наиболее значимых групп микроорганизмов, поражающих комбикорма, изучено недостаточно. Между тем, познание его особенностей необходимо для понимания их специфического воздействия на состояние здоровья и реализацию продуктивного потенциала рыб.

В этой работе мы постарались обобщить обширный фактический материал о действии различных контаминантов комбикормов на живые организмы, дополнив его собственными данными. Исследования затрагивают наименее изученный вопрос контаминации комбикормов – их микробное заражение. Оно представляет собой сложное комплексное воздействие как непосредственно на организм рыб, так и опосредованно – через ухудшение качество корма и среды обитания. В работе также обоснованы и апробированы современные методы контроля микробного заражения кормов и биологический метод преодоления у рыб последствий подобного заражения.

Экспериментальная часть работы имеет две методические особенности. Во-первых, почти все опыты выполнены на одном «модельном» объекте (стерляди). Сегодня такой подход является наиболее применимым к исследованиям в интенсивной аквакультуре. Он связан с тем, что при индустриальном выращивании различных видов рыб, диапазон действия экологических факторов, свойственных естественным условиям обитания, резко сужен, что ограничивает проявление межвидовых различий. Во-вторых, условия интенсивного культивирования (высокие плотности посадки, ограничение подвижности, несвойственная пища, высокий пресс болезнетворных агентов и т.д.) являются достаточно близкими для объектов любого вида. Поэтому результаты, полученные на модельном объекте, могут, с учетом видовых особенностей, быть достаточно легко адаптированы к любому виду, культивируемому в аналогичных условиях. Вторая особенность работы, в противовес относительной «узости» первой, – параллельный, многоуровневый охват процессов, происходящих в организме рыб, отражающийся в рыбоводных, морфологических, физиологических, метаболических характеристиках. Этот подход позволил выявить и достаточно полно оценить влияние негативных факторов культивирования, связанных с вопросами безопасности комбикормов, и, на этой основе, предложить биологически обоснованный метод повышения резистентности рыб к сложным условиям интенсивной аквакультуры.

Выполнение этой работы было бы невозможным без деятельного участия учителей и коллег. Автор выражает свою искреннюю признательность и благодарность всем, чьи знания, умение, опыт, ценные советы и поддержка оказали огромную помощь в выполнении работы: директору ВНИРО канд. геогр. наук Б.Н. Котеневу, Ж.Т. Дергалевой, профессору М.А. Щербине, д-ру биол.наук, профессору Е.В. Микодиной, К.Б. Аветисову, канд. вет. наук Е.В. Малику, канд. биол. наук Л.Н. Юхименко, канд. биол. наук Л.И. Бычковой, канд. биол. наук Н.В. Войновой, И.В. Яхонтовой, К.В. Дудину, а также сотрудникам лаборатории сохранения биоразнообразия ценных гидробионтов ВНИРО.

Глава 1

Комбикорма как фактор безопасности индустриального культивирования рыб

1.1. Особенности индустриального культивирования и их влияние на организм рыб

Индустриальное культивирование рыб, в отличие от экстенсивных технологий, неизбежно связано с весьма существенным ограничением положительного действия ряда экологических факторов. В частности, это относится к естественному ходу температурного и светового режимов, наличию естественной пищи, невысокой нагрузки биомассы на единицу площади, то есть всего того, что способствует поддержанию достаточно высокого уровня естественной резистентности рыб. Кроме того, при интенсивном культивировании, как уже было сказано выше, живой организм подвергается комплексному воздействию, несвойственному естественной среде обитания. Это – высокая концентрация животных на малой территории, существенное ограничение их подвижности, неблагоприятные условия среды, навязываемый состав пищи и ритм питания, токсические вещества, растворенные в воде или поступающие с кормом, вирусные и бактериальные агенты, паразитические организмы, а также многочисленные биотехнические приемы, связанные с интенсификацией. Все это, на фоне сравнительно короткой истории интенсивного культивирования рыб, отсутствия их целенаправленной селекции в направлении повышения устойчивости к подобным условиям, представляет собой комплекс факторов стресса, постоянно воздействующих на рыб в индустриальных условиях [А. Щербина, 1960; Остроумова, 1976, 2001; Вейдемейер и др., 1981; Грищенко, Рудиков, 1985].

Как известно, результатом стресса являются адаптивные биохимические и физиологические, а также морфологические разнонаправленные изменения [Selye, 1973]. Они могут обеспечивать поддержание постоян-

ства внутренней среды организма или же, наоборот, за счет структурных перестроек поддерживать или изменять функциональную активность систем органов [Хочачка, Соммеро, 1988]. В том случае, когда отрицательное влияние превышает адаптивные возможности организма, его нормальное функционирование нарушается. Это сопровождается развитием заболеваний, истощением, обратимыми или необратимыми патологиями различных систем органов или организма в целом, и снижает его шансы на выживание [Selye, 1973; Ведемейер и др., 1981; Смит, 1986; Рудиков, Грищенко, 1985; Зайчик, Чурилов, 2005].

Подобные процессы, различные по интенсивности и продолжительности, приводят к изменению направления реализации потенциала животного от его продуктивной составляющей к нейтрализации последствий негативного воздействия и мобилизации сил для повышения резистентности к неблагоприятным условиям культивирования.

Реальная оценка отрицательного воздействия подобных факторов на живые организмы, знания об их защитных свойствах, позволяют поддерживать устойчивое равновесие во взаимоотношениях организма и среды выращивания. Своевременная помощь со стороны человека при нарушениях этого равновесия, является непременным условием защиты культивируемых объектов и обеспечения возможности для более полной реализации их продуктивного потенциала.

Одним из главных элементов постоянного взаимодействия организма и окружающей среды является его пищеварительная система. Именно она представляет собой своеобразный защитный барьер между внутренней средой организма и чужеродной внешней средой и эволюционно выработанное приспособление, обеспечивающее организм питательными веществами и энергией, необходимыми для осуществления жизнедеятельности. Следует подчеркнуть, что при культивировании, где создаются условия, близкие к оптимальным, корм, его качество и безопасность становятся наиболее значимыми внешними факторами. Именно поэтому, при культивировании, роль пищеварительной системы в выполнении защитной функции многократно возрастает. В этой связи, мы посчитали целесообразным более подробно остановиться на важнейших аспектах защитной функции пищеварительной системы, тем более, что значимость этой функции в полной мере обозначена сравнительно недавно и исследована значительно меньше, чем широко известная функция переваривания и усвоения пищи.

1.2. Роль пищеварительной системы в осуществлении защитных функций организма

1.2.1. Защитные барьеры пищеварительной системы

Согласно современным представлениям, создатель новой теории «адекватного» питания А. М. Уголев и его последователи, рассматривают прием пищи и ее переваривание не только с позиций обеспечения организма веществами, необходимыми для осуществления его жизнедеятельности, но и одновременно как аллергическую и токсическую агрессию [Уголев 1972, 1984, 1985, 1986; Уголев и др., 1992; Уголев, Кузьмина, 1993].

В соответствии с постулатами этой теории, нейтрализация негативного воздействия различного рода пищевых веществ (белков, пептидов, антигенов, токсических веществ и др.), а также взаимодействие организма с бактериями, вирусами, паразитами обеспечивается широким спектром функций пищеварительной системы, среди которых одной из важнейших является защитная. Эта функция – результат сложного взаимодействия нескольких уровней защиты энзиматического и структурного характера. Она осуществляется различными отделами желудочно-кишечного тракта, выделяющими ферменты, присутствием и деятельностью симбионтной микрофлоры, а также лимфатической и эндокринной системами [Уголев, 1984, 1985; Кузьмина, 1999; Кузьмина и др., 2004].

Под действием пищеварительных ферментов чужеродные вещества, в частности белки, которые представляют особую опасность для организма, так как, в силу своей видовой специфичности, они являются мощными аллергенами, подвергаются разложению на более простые и менее специфичные соединения [Уголев, 1984, 1985; Кузьмина, 1999]. Обезвреженные мономеры, образовавшиеся в результате ферментативной деградации питательных веществ пищи, в частности белков, уже не несут в себе аллергенного начала и могут без ущерба использоваться организмом.

Важнейшим структурным элементом защитной функции являются клетки слизистой оболочки кишечника (энтероциты), на поверхности которых происходят заключительные этапы расщепления и всасывания мономеров, образовавшихся при ферментативной обработке пищи. Слизистая оболочка представляет собой барьер между полостью пищеварительного тракта и внутренней средой организма. Форма и размер эпителиальных клеток слизистой оболочки у рыб и других позвоночных животных достаточно близки [Gas, Noaillac Depeyre, 1981; Bergot et al., 1975]. Мембраны энтероцитов обладают ограниченной проницаемостью для водорастворимых молекул со сравнительно небольшой молекуляр-

ной массой (менее 300–500 Да) и непроницаемы для полимеров, к которым относятся белки, мукополисахариды, другие субстанции, обладающие антигенными свойствами, а также токсические вещества [Физиология всасывания, 1977; Ferguson, 1979; Walker, 1979]. Малые размеры пор мембраны (0,4–0,6 нм) являются также и непреодолимым препятствием для бактерий, населяющих полость желудочно-кишечного тракта [Уголев, 1972, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005].

К ряду наиболее важных защитных механизмов, имеющих и взаимодействующих в пищеварительной системе, относится также и мощный печеночный барьер, детоксицирующий ядовитые вещества пищи, не обезвреженные при ее ферментативном расщеплении. Сюда же относится и иммунная функция слизистой кишечника – ее энтероциты продуцируют антитела и факторы клеточного иммунитета.

Другой важный защитный барьер – лимфоциты пищеварительного тракта, которые препятствуют поступлению токсических веществ и антигенов во внутреннюю среду организма [Сапин, 1987; Уголев и др., 1992].

Помимо лимфоцитов и макрофагов, представляющих собой совокупность свободных и фиксированных в различных органах клеток, в состав иммунной системы входит и сложный комплекс гуморальных факторов. К гуморальным факторам иммунитета рыб относят неспецифические факторы (лизозим, белки системы комплемента, различные цитокины, С-реактивный белок и другие белки и пептиды) и специфические – антитела. К органам и тканям иммунной системы относят почки (головной и туловищный отделы), тимус – центральный орган иммунной системы, селезенку [Лукияненко, 1989; Кондратьева и др., 2001].

Особое значение в формировании и осуществлении защитных свойств организма принадлежит нормальной микрофлоре кишечника. Принимая во внимание все возрастающий интерес к роли микрофлоры в осуществлении помимо защитной, тесно связанных с ней функций пищеварения и усвоения пищи, остановимся на них более подробно.

1.2.2. Микрофлора пищеварительного тракта

Физиологическое значение нормальной микрофлоры. Согласно А.М. Уголеву [1985], сосуществование микро- и макроорганизмов является древнейшим эволюционным приспособлением и отмечается уже на уровне примитивных многоклеточных организмов. Бактериальная флора представляет собой необходимый атрибут существования сложных организмов, которые, по современным представлениям, рассматриваются как единая система более высокого иерархического уровня, чем отдельный индивидуум. При этом макроорганизмы, по отношению к микроор-

ганизмам, выполняют функцию доминанта и регулятора всей системы в целом [Уголев, 1972; Куваева, 1976; Блохина, Дорофейчук, 1979].

Известно, что бактериальная флора обеспечивает разрушение избыточных компонентов пищи (в частности, пищевых волокон) и образование недостающих продуктов, например витаминов, незаменимых аминокислот и др. [Уголев, 1985]. Кишечная микрофлора участвует в расщеплении белков и аминокислот, влияет на метаболизм жиров, осуществляя их частичное расщепление и эмульгирование, что увеличивает их пищевую ценность и улучшает всасывание [Jonsson, Ollson, 1985]. К примеру, у жвачных животных ни слюна, ни слизистая оболочка преджелудка не имеют пищеварительных ферментов. Поэтому микрофлора играет существенную роль в превращении основных питательных вещества корма в форму, доступную для использования не только самими микроорганизмами, но и организмом животного-хозяина. Наряду с пищеварительной деятельностью, бактерии в результате собственного обмена веществ образуют значительно большее количество витаминов и аминокислот, чем им это необходимо, поэтому остаточные количества используются организмом хозяина [Бергнер, Кетц, 1973].

Присутствие микрофлоры в пищеварительном тракте высших животных активизирует размножение клеток слизистой кишечного эпителия [до 30% по Haenel, Schulze, 1979], а также стимулирует ускорение процесса их обновления и активного функционирования [Ranken et al. 1971; Levin, 1979]. Эти процессы способствуют активизации пищеварительной и защитной функций кишечника.

Характеристика микрофлоры пищеварительного тракта. Желудочно-кишечный тракт взрослых животных содержит комплекс микроорганизмов разных видов, формирующий фон микрофлоры, характерный для каждого хозяина. Микрофлору кишечника условно делят на две группы. Первая группа объединяет основных представителей нормальной непатогенной кишечной микрофлоры, к которой относятся лактобактерии, бифидобактерии, стрептококки, пропионовокислые бактерии, часть спорообразующей микрофлоры и некоторые дрожжи и грибы [Зинченко, Панин, 2000; Панин и др., 2002].

Вторая группа объединяет условно-патогенную (так называемую оппортунистическую) микрофлору, обладающую различными факторами патогенности для животных, но не всегда проявляющую их. Это бактерии группы кишечной палочки, энтерококки, иерсинии, кампилобактерии, стафилококки, протей, клостридии и многие другие микроорганизмы. Они также являются составной частью кишечного биотопа.

Многие микроорганизмы, в частности бактерии кишечной группы, в процессе эволюции приспособились к паразитическому способу существования и приобрели патогенные свойства. В настоящее время они явля-

ются возбудителями многих болезней человека и животных, особенно при ослаблении организма хозяина. При этом, по мере усиления патогенности, у бактерий снижается изначально высокая ферментативная активность. Это объясняется тем, что в ходе адаптации к паразитическому образу жизни микроорганизмы теряют ставшие ненужными ферменты, которые ранее расщепляли содержимое кишечника [Черкес и др. 1987]. Наряду с потерей ферментов, активным приспособлением к паразитическому существованию служит способность многих видов бактерий к образованию токсинов. Токсинообразование является активной приспособительной функцией микроорганизмов бактерий, позволяющей им разрушать клетки организма хозяина [Стейниер, 1979].

У здоровых животных наблюдается динамический баланс между полезной и условно-патогенной микрофлорой с многочисленными симбиотическими и конкурентными взаимоотношениями между ними.

Формирование и селекция микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте происходят под воздействием химических и механических факторов. Химическая селекция осуществляется благодаря ингибирующим агентам, подобным лигнинам, жирным кислотам, желчи, лизоциму, лизолектину, количество которых колеблется в зависимости от состава корма и свойств микрофлоры [Fuller et al., 1989]. Преодолевают ее только те виды бактерий, которые резистентны к указанным ингибирующим агентам.

Механическая селекция идет под действием перистальтических движений кишечника в проксимо-дистальном направлении. Избежать механической эвакуации бактерии могут или прикрепившись к эпителиальным клеткам, выстилающим кишечник, или за счет высокой популяционной скорости размножения, превышающей скорость их удаления из кишечника [Fuller, 1982]. В результате этих двух процессов и формируется комплекс микрофлоры, который у разных авторов имеет различные названия – бактериальный антагонизм, барьерный эффект [Dubos. 1963], колонизационная резистентность [Duchuzeau et al., 1970] и т.д.

Формирование кишечной микрофлоры в организме начинается очень рано. По мнению А.М. Уголева [1985], появление основного типа симбионтов возможно только тогда, когда иммунологическая резистентность еще невелика. Для наземных животных самый важный источник бактерий – мать, во время контакта с которой происходит быстрая передача ее микрофлоры новорожденному. Именно в момент прохождения плода через родовые пути матери и получения первых порций молозива определяется соотношение нормальной и условно-патогенной микрофлоры в кишечнике новорожденного, так как еще не сформированная иммунная и ферментативные системы новорожденного животного не могут оказывать селективного давления на общую популяцию бактерий [Панин, 2002; Зинченко, Панин, 2000].

Защитная функция кишечной микрофлоры. Благодаря исследованиям А.М. Уголева и его школы, пристальное внимание биологов в нашей стране и за рубежом привлекла защитная функция сообщества кишечных микроорганизмов. Было выяснено, что нормальная кишечная микрофлора является физиологическим компонентом макроорганизма. Ее положительное влияние обеспечивает физиологическую целостность многих систем организма, связанных с формированием общей иммунной системы и локального местного иммунитета слизистой кишечника, а также периферической иммунной, гормональной и эндокринной систем.

Защитный эффект нормальной микрофлоры имеет мультифакторный характер и обеспечивается за счет комплекса свойств микроорганизмов кишечника. В этот комплекс входит способность микроорганизмов к адгезии (т.е. прикреплению) к эпителию слизистой кишечника, что предотвращает ее заселение патогенными штаммами. Помимо этого, нормофлора свойственна антимикробная активность, достигаемая за счет образования в процессе жизнедеятельности различных органических кислот, низкомолекулярных антибиотиков, ферментов, перекиси водорода и ряда других веществ, тормозящих развитие чужеродной микрофлоры.

Следует подчеркнуть, что бактериальная микрофлора кишечника, хотя и является древнейшим весьма специфичным эволюционным приспособлением макроорганизма, может быть достаточно легко нарушена при различных воздействиях, в частности, при изменении диет, заболеваниях желудочно-кишечного тракта, воздействии экстремальных факторов (стрессов), применении антибиотиков и др. ([Вальдман, 1972; Knoke, Bernardt, 1977, 1980; Haenel, Schulze, 1979; Lindblad et al., 1979; Grutte, Haenel, 1980; Чахава и др., 1982].

Стресс оказывает быстрое и выраженное действие на микрофлору кишечника. При стрессе ослабляется перистальтика, изменяется скорость кишечного транзита. В связи с тем, что перистальтика является одним из основных механизмов контроля численности бактерий, в случае снижения ее интенсивности в кишечнике происходят резкие изменения. Они выражаются в накоплении токсических продуктов метаболизма микрофлоры, нарушении процессов микробного пищеварения, что оказывает негативное воздействие на физиологический статус животных [Панин, 2002].

Возникающий при стрессах повышенный уровень гормонов приводит к резкому уменьшению секреции слизи (муцина) и кислых мукополисахаридов на поверхности слизистой кишечника, являющихся пищей лактобацилл и бифидобактерий. Поэтому в условиях нехватки пищи количество бифидо- и лактобактерий заметно снижается при возрастании количества условно-патогенных эшерихий, сальмонелл, стафилококков с преобладанием паразитических свойств [Панин и др., 2002].

Стресс создает условия, снижающие адгезию нормофлоры, дегенеративно-дистрофические изменения микроворсинок эпителия, что приводит к проникновению кишечных микроорганизмов, в том числе и патогенных, в лимфатические узлы и внутренние органы животного-хозяина. Одновременно снижается способность к обезвреживанию пищевых токсинов, нарушаются процессы развития иммунокомпетентных органов, регуляция минерального, ферментного, гормонального и витаминного обменов [Панин, 2002].

Известно, что количественные и качественные нарушения равновесия между нормальной и патогенной микрофлорой под воздействием экзо- и эндогенных факторов диагностируется как дисбактериоз. Современные данные свидетельствуют, что он приводит к формированию иммунодефицита, недостаточному энергетическому обеспечению функций генетического аппарата, снижению общей жизнеспособности организма [Малик, 2002].

Как было сказано выше, в естественных условиях обитания у организмов существует целый комплекс механизмов защиты, в том числе и кишечная микрофлора, являющихся эволюционной, выработанной адаптацией к экзотрофии – питанию, пищеварению и всасыванию [Уголев, 1985]. Он представляет собой надежную защиту организма от неблагоприятных факторов воздействия внешней среды. Согласованная работа всех механизмов защиты в обычных условиях существования позволяет организму эффективно нейтрализовать негативное воздействие питания.

При интенсивном культивировании ситуация значительно меняется. Существенное ограничение разнообразия питания и применение комбикормов является важнейшим фактором, отличающим выращивание животных человеком от их обитания в естественных условиях. По многим показателям, комбикорма весьма далеки от естественной пищи, что оказывает значительное влияние на жизнедеятельность организма. Именно поэтому комбикорм сам по себе является постоянно действующим фактором, требующим определенных адаптаций для соответствующего обеспечения пищеварительной и защитной функций.

С этих позиций, учитывая постоянство действия этого фактора, присутствие в комбикормах любых токсических веществ является существенным дополнительным риском, способным нарушить баланс в сложной системе взаимодействия объектов выращивания, условий культивирования и ожидаемой продукцией.

Для получения представления о реальной опасности контаминантов комбикормов, в обзоре литературных данных, приводимом ниже, мы обобщили доступные нам сведения о контаминантах в аспекте их воздействия на живые организмы.

1.3. Контаминанты комбикормов как факторы негативного воздействия на живые организмы

1.3.1. Краткая характеристика комбикормов и их контаминантов

Комбикорма для рыб, как и для всех животных, являются смесью сырьевых компонентов растительного, животного или микробного происхождения. Они подбираются по определенному рецепту в соответствии с потребностями рыб в питательных веществах и с учетом их способности извлекать из комбикорма эти питательные вещества при переваривании. В составе всех комбикормов обязательно содержатся три основные группы органических веществ (белки, жиры, углеводы), минеральные соединения и витамины. Органические вещества, принимая участие в процессах метаболизма, выделяют энергию, которая используется в обмене веществ, а также обеспечивает деятельность всех систем организма и движение. Попадая в пищеварительный тракт в виде полимеров, питательные вещества комбикорма подвергаются ферментативному расщеплению до мономеров, лишенных видовой специфичности, которые всасываются во внутреннюю среду организма. Применяемые для изготовления комбикормов источники сырья, помимо питательных веществ, содержат контаминанты – структурные соединения, вызывающие токсические эффекты, а так же ядовитые вещества, образуемые при неправильном хранении. Их многообразие отражено на рис. 1.

Эти соединения оказывают повреждающее действие на пищеварительные, биосинтетические процессы и функции различных систем организма [Черняев, 1985; Щербина, 1984; Щербина, Гамыгин, Буховец, 1996; Чернышов, Панин, 2000]. Их отрицательный эффект значительно усугубляется недостатками балансирования кормов по отдельным компонентам, с точки зрения их питательности и безопасности для объектов культивирования. Важное значение имеет также непредсказуемость количественного присутствия и набора контаминантов различного происхождения в сырьевых источниках и трудность их контроля при производстве сырья и комбикормов.

Согласно мнению В.А. Тутельяна [1985], контаминанты условно делятся на вещества химической и биологической природы (в более поздней классификации – техногенные и биогенные контаминанты). К приоритетным загрязнителям первой группы относят соли тяжелых металлов (свинец, кадмий, ртуть, мышьяк, сурьма и др.), радиоизотопы стронция, цезия, йода. К этой группе принадлежат также пестициды, их метаболи-

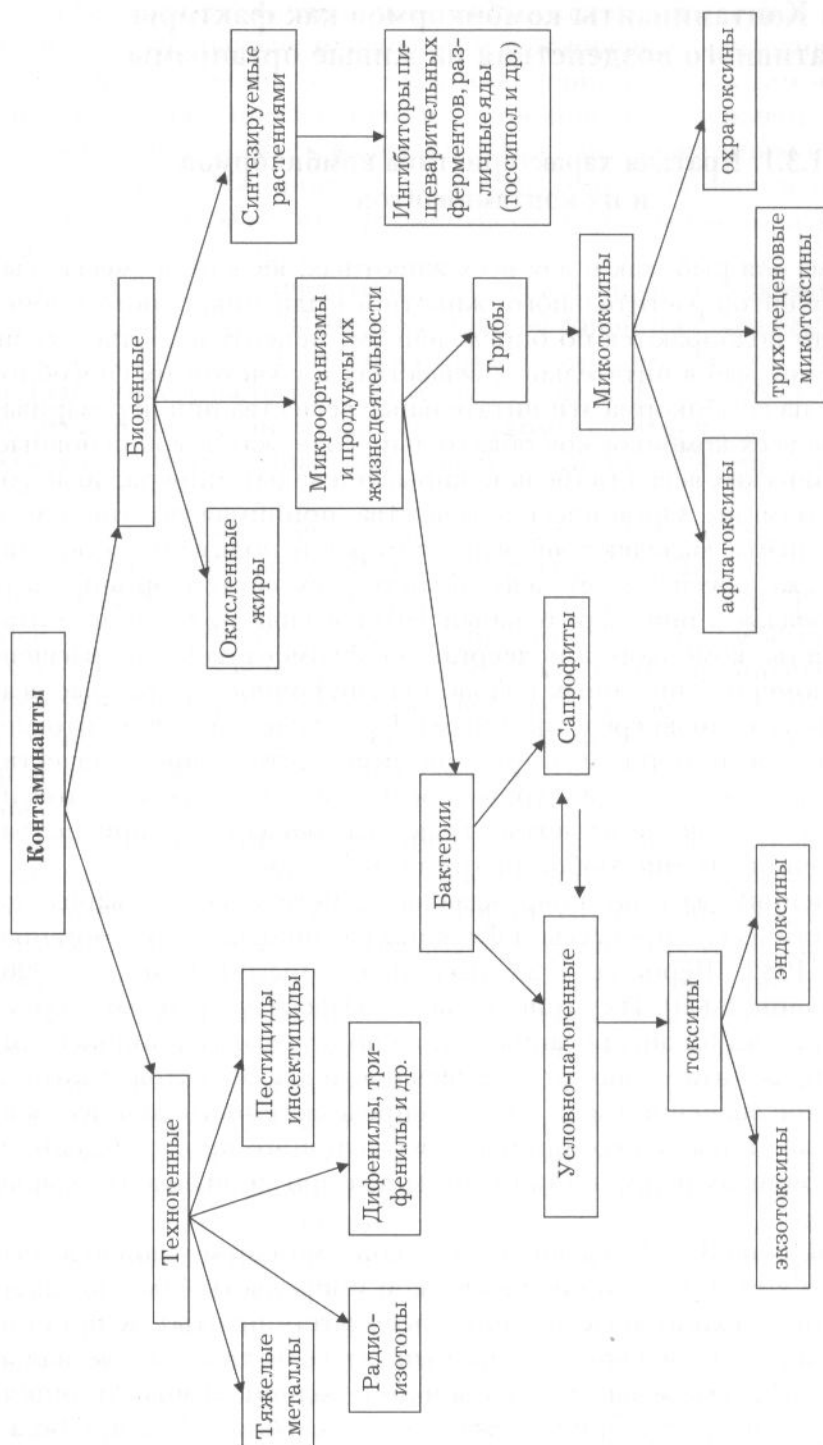


Рис. 1. Контаминанты комбикормов

ты и продукты деградации; нитраты, нитриты, полициклические ароматические углеводороды, полигалогенные ди- и терфенилы, фтористые соединения и др.

1.3.2. Техногенные контаминанты

Вопросам воздействия на рыб техногенных контаминантов, содержащихся в водной среде, посвящено множество токсикологических работ. Мы же остановимся на том влиянии, которое оказывают техногенные контаминанты, присутствующие в кормах.

Тяжелые металлы. Тяжелые металлы рассматриваются как приоритетные химические поллюанты (загрязнители), представляющие особую опасность для организмов и биоценозов, поскольку многие из них, обладая биологической активностью, не подвергаются биodeградации, способны аккумулироваться в тканях различных организмов [Строганов, 1968; Лукьяненко, 1983].

У животных при нарушении кишечного эпителия, поступающие с кормом соли тяжелых металлов, очень легко всасываются. Эти соли представляют собой сильные протоплазматические яды и ингибиторы ферментов и, особенно, синтеза серосодержащих аминокислот, играющих важную роль в процессах детоксикации. Тяжелые металлы осаждают белки даже в очень разведенных растворах, при этом структура белков нарушается. Острое отравление, вызываемое тяжелыми металлами, проявляется в параличе нервной системы, сердца и быстрой гибели животных. При медленно протекающем отравлении происходит белковое и жировое перерождение печени и разрастание соединительной ткани. В почках наблюдается белковое перерождение эпителия клубочков и канальцев, в сердце – перерождение мышечной ткани [Чернышов, Панин, 2000].

Следует отметить также и свойство тяжелых металлов к кумуляции. К примеру, ртуть, попадая в организм, практически не удаляется и на 95% остается там, аккумулируясь в эритроцитах. Свинец депонируется, в основном, в скелете (до 85%), а также в печени. Действуя на различные ферментные системы, свинец может явиться причиной нарушения белкового, углеводного, фосфорного и других видов обмена, а также может быть причиной гиповитаминозов С и В₁ [Чернышов, Панин, 2000].

Действие тяжелых металлов на рыб имеет тот же характер, что и на теплокровных животных. Так, присутствие ртути в корме снижает показатели линейно-весового роста карповых рыб [Голованова, 2004]. При высоких концентрациях токсикантов наблюдается поражение жабр, почти полное разрушение кишечного эпителия, многочисленные изъязвления и кровоизлияния на покровах [Лоянич, Шерстнева, 1987]. Тяжелые

металлы накапливаются в органах, для которых характерно активное протекание процессов метаболизма, таких как печень, почки, селезенка. В печени наблюдается нарушение структуры, полиморфизм гепатоцитов и их ядер, замещение паренхиматозной ткани соединительной (цирроз печени), а также жировая дистрофия. В почках развивается геморрагический нефрит [Алабастр, Ллойд, 1984]. По данным Т.Б. Лапировой (2004), под действием ртути происходит увеличение гепатосоматического индекса до 60% и относительной массы селезенки – до 30%.

У рыб, так же как и у теплокровных животных, ионы тяжелых металлов инактивируют ферменты, нарушая при этом метаболические процессы, изменяют проницаемость клеточных мембран, соотношение форменных элементов крови, ингибируют окислительное фосфорелирование, синтез белков, нуклеиновых кислот, разрушают структуру иммунокомпетентных клеток [Балобанова, 1998; Лапирова, 2001]. Под влиянием ионов ртути в крови рыб появляются лимфоциты, не содержащие РНК, происходит подавление клеточного и гуморального иммунитета, резко снижается фагоцитарная активность лейкоцитов, а также бактерицидная активность сыворотки крови и интенсивность антителообразования [Шлейфер, Дахолян, 1979].

Средства химической защиты растений. К наиболее известным относятся пестициды. Пестициды, применяемые для борьбы с насекомыми, вступают в химическое взаимодействие с белками, жирами, углеводами, ферментами, витаминами растений, в результате чего происходят необратимые изменения питательных и биологически активных веществ растений, используемых в качестве сырьевых компонентов. У животных под влиянием пестицидов кормов наблюдается снижение плодовитости, появление уродливого потомства или полная стерилизация [Чернышов, Панин, 2000].

Хлороорганические пестициды (ДДТ, ГХЦГ, алдрин, гептахлор и др.) являются наиболее опасными. В организме они быстро всасываются, но медленно выводятся. При этом они поражают центральную нервную систему и паренхиматозные органы. Опасность пестицидов связана со стойкостью их структуры и способностью к аккумуляции в жировой ткани. Это свойство обуславливает и их накопление в пищевых цепях, в частности, в жирах рыб и других водных животных.

Фосфорорганические соединения, применяемые для борьбы с насекомыми, в большинстве своем разлагаются в течение одного месяца. Их остатки могут разрушаться при термической обработке сырья, однако среди них имеются и высокотоксические вещества – метафос, базудин, фибром и др.

В основе механизма токсического действия большинства этих соединений лежит угнетение действия ферментов, ответственных за механиз-

мы передачи нервных импульсов, что сопровождается дегенеративными изменениями и гибелью нервных клеток.

Пристальное внимание в последнее время уделяется так же *полихлорированным дифенилам и терфенилам* – соединениям, используемым в промышленности и электротехнике. Они могут попадать из загрязненной атмосферы, воды, почвы в компоненты кормов в период роста и развития злаков. Все эти углеводороды токсичны. При систематическом поступлении в организм они вызывают нарушение функции кроветворения и, кроме того, обладают канцерогенным действием [Чернышов, Панин, 2000]. По ходу пищевой цепи они накапливаются в высоких концентрациях в тканях рыб и других водных организмов и при кормлении животных рыбной мукой могут попадать в мясо, молоко, а также яйца домашней птицы. Отравление этими веществами приводит, в частности, к нарушению функций дыхания.

У рыб ароматические углеводы подавляют фагоцитарную активность макрофагов почек, приводят к снижению титра антител в сыворотке крови и подавлению размножения лимфоцитов, развитию злокачественных новообразований [Кондратьева, Киташова, 2002].

Интересно обратить внимание на различия действия техногенных загрязнителей как факторов водной среды обитания и как токсических веществ комбикормов. В первом случае их влияние на живые организмы имеет, как правило, залповый, непродолжительный характер. Если доза токсиканта не летальна, то со временем состояние организма имеет шансы нормализоваться. Ситуация с контаминацией комбикормов иная. Реальная практика свидетельствует, что корма в хозяйствах приобретают один – два раза за сезон. Поэтому, при наличии в кормах загрязнителей, их воздействие имеет продолжительный характер. Его негативный эффект с течением времени только усугубляется. Сами загрязнители, большинство которых способно к аккумуляции, накапливаясь в организме рыб, могут представлять опасность и для потребителей рыбной продукции.

Учитывая то, что количество техногенных загрязнителей в корме при хранении не изменяется, перед началом его использования целесообразна тщательная проверка соответствия показателей безопасности нормативному уровню.

1.3.3. Биогенные загрязнители

Загрязнители этой группы заслуживают особого внимания. Количественные характеристики их содержания (за исключением антипитательных факторов растений) могут подвергаться значительным изменениям с усилением токсического эффекта в процессе изготовления, хранения и использования комбикормов. Эта группа загрязнителей включает токси-

канти смешанной природы. Остановимся на наиболее интересных и значимых.

Антипитательные факторы растений

К ним относятся вещества, синтезируемые растениями, имеющие как ядовитые свойства, так и являющиеся ингибиторами различных биологических процессов. Их активность определяется генетическими свойствами, зависит от условий культивирования или технологической обработки перед включением в комбикорма. Можно привести пример сортов рапса, содержащих или не содержащих ядовитую для животных эруковую кислоту (22:1 n-4), ингибиторы трипсина бобовых, в частности соевого шрота, или госсипол хлопчатникового, которые могут инактивироваться при различных видах технологической обработки [Щербина, 1984; Guillaume, 1999; Щербина, Гамыгин, 2006].

Кроме того, образование подобных веществ, может происходить непосредственно в процессе технологической обработки сырья, изготовления и хранения комбикормов. К ним относятся резистентные к действию пищеварительных ферментов комплексы незаменимой аминокислоты лизина с углеводами или минеральными веществами, образующиеся при нагревании в результате реакции Мейллара и т. д. [Щербина, 1971; 1973; Буховец, 1983, 1984; Щербина, Буховец, 1992; Чернышов, Панин, 2000; Щербина, Салькова и др. 2001; Kaushik, 1990].

Знания о подобных особенностях отдельных компонентов комбикормов позволяют значительно уменьшить их возможное токсическое действие на объекты культивирования за счет правильной балансировки содержания таких компонентов в кормах или технологической обработки [Щербина, Гамыгин, 2006].

Окисленные липиды

В связи с тем, что качество липидов корма является одним из важнейших показателей безопасности рыбных комбикормов, считаем целесообразным подробно остановиться на литературных данных, посвященных процессам перекисного окисления липидов и их влиянию на культивируемых рыб.

В процессе перекисного окисления липидов образуются соединения, представляющие большую опасность для объектов культивирования, в силу непредсказуемости своего действия, способности к накоплению, инициированию процессов образования токсических веществ кормов. Это связано с высоким (до 35% в кормах для ценных видов рыб) содержанием липидов и их качественным составом, а именно – присутствием большого числа легко окисляемых полиненасыщенных жирных кислот [Щербина, Абросимова, Сергеева, 1985; Гамыгин, 1987; Гамыгин, Поно-

марев и др., 1990; Остроумова, 2001; Гамыгин и др., 2004; Щербина, Гамыгин, 2006; NRC 1981, 1983; Corrigan, 1999]. В результате этого, корма для рыб, по сравнению с кормами для теплокровных животных, окисляются быстрее даже при наличии одинаковых условий хранения [Шабалина и др., 1997].

Изменения, происходящие в процессе перекисного окисления липидов комбикормов, подробно описаны в работах Л.Н. Егоровой и В.И. Трещевой [1971], Ж.И. Абрамовой с соавторами [1981]. Согласно их данным, окисление липидов – это цепь сложных последовательных и параллельных преобразований, идущих с образованием первичных промежуточных продуктов окисления, а на более глубоких стадиях – вторичных. К первой группе относятся гидроперекиси, образующиеся в результате взаимодействия ненасыщенных соединений с кислородом. Гидроперекиси характеризуются высокой активностью и, вступая в последующие реакции, образуют другие перекисные соединения, а в дальнейшем – более устойчивые вторичные продукты окисления – альдегиды, кетоны, оксикислоты [Остроумова, 2001].

Было установлено, что в процессе перекисного окисления липидов в комбикормах разрушаются многие полиненасыщенные жирные кислоты [Егорова, Трещева, 1971; Шабалина, 1976; Watanabe, 1982; Гольденберг и др., 1993], а также витамины А, С, Е [Кизеветтер, Алексеева, 1972; Остроумова и др., 1991]. Кроме того, по данным Ф.М. Ржавской [1976], резко снижается растворимость белков в воде, затрудняется их гидролиз. Отмечается также, что свободно-радикальный цепной механизм полимеризации белков при окислении липидов имеет большое сходство с механизмом воздействия на белки γ -облучения. Однако степень денатурации белков при радиационном облучении во много раз выше [Ржавская, 1976].

В результате процессов окисления липидов снижается питательная ценность кормов и ухудшается их качество. У разных видов рыб при питании окисленными кормами наблюдается торможение роста и ухудшение физиологических показателей [Остроумова и др., 1975; Шабалина и др., 1986; Остроумова, 1978; Костюничев, 1988; Лысенко и др., 1989].

Реакция различных видов рыб на недоброкачественность жира кормов неодинакова. Радужная форель гораздо более чувствительна к перекисному окислению липидов, чем карп. Рыбы теряют активность, у них бледнеют жабры, нередко наблюдается некроз плавников, пучеглазие, потемнение покровов. Характерными признаками является анемия (снижение уровня гемоглобина и числа эритроцитов), белая кровь теряет свойственный рыбам лимфоидный характер. Наблюдается жировая инфильтрация печени, которая затем переходит в циротидную дегенерацию [Остроумова, 2001]. Наиболее частым признаком воздействия окислен-

ных липидов на карпа, по данным японских авторов, является дистрофия мышц [Watanabe, 1982]. Причем проявляется она после длительного использования кормов, лишенных витамина Е – естественного антиоксиданта.

Меньшая, по сравнению с форелью, чувствительность карпа к присутствию в кормах окисленных липидов, по мнению И.Н. Остроумовой [2001], может быть связана с его способностью синтезировать в кишечнике в достаточном количестве аскорбиновую кислоту, являющуюся природным антиоксидантом, и отсутствием такой способности у лососевых. Кроме того, корма форели зачастую лишены астаксантина – каротиноида, относящегося к сильным биологическим антиокислителям, который в большом количестве содержится в естественной пище лососевых рыб.

В связи со значимостью воздействия на рыб окисленных липидов, их присутствие в отличие от кормов для сельскохозяйственных животных, нормируется для кислотного числа не более 70 мг КОН/г (30 мг для молоди); перекисного числа 0,2–0,3 % J_2 (ТУ на комбикорма для лососевых [ТУ 9296-002-13250589-2002] и осетровых рыб [ТУ 9296-003-13250589-2002]).

Микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности

Отрицательное воздействие этой группы загрязнителей на комбикорма и рыб также носит непостоянный, главным образом, нарастающий характер. Поражая комбикорма, они не только уничтожают и разрушают их питательные вещества, но и выделяют токсические метаболиты, способные вызывать заболевания и гибель выращиваемых объектов. К наиболее активно действующим относятся грибы и бактерии [Марченко, 1987].

Микроскопические грибы и микотоксины. Это большая, особо опасная группа загрязнителей кормов. Микотоксины являются вторичными метаболитами микроскопических грибов. Они отличаются высокой токсичностью, а многие из них обладают также мутагенными, тератогенными (способствующими развитию аномалий и уродств) и канцерогенными свойствами. В настоящее время известно более 250 видов различных микроскопических плесневых грибов, которые продуцируют около ста в той или иной степени токсических метаболитов. Микотоксины были найдены в кормовом сырье и продуктах растительного и животного происхождения практически во всех странах мира [Тутуельян, 1985б].

Говоря об опасности микотоксинов, следует отметить, что наиболее выраженными токсическими свойствами и широким распространением выделяются афлатоксины, охратоксины, трихотеценовые микотоксины, зеараленон, патулин, цитрин и другие. Плесневые грибы, продуцирующие микотоксины, поражают продукты как растительного, так и живот-

ного происхождения на любом этапе их производства, поэтому возможность контаминации ими сырья и комбикормов для рыб достаточно велика.

Афлатоксины – наиболее изученные из всех известных микотоксинов. Источником афлатоксинов являются продукты, пораженные грибами *Aspergillus flavus*. Афлатоксины обнаружены в различных зерновых и масляных продуктах, в орехах, бобах, арахисе и продуктах животного происхождения во всех странах. Эта группа токсических веществ практически не разрушается при обычной термической обработке пищевых продуктов. По характеру действия афлатоксины относят к сильнейшим поражающим печень токсическим и канцерогенным веществам [Тутельян, 1985б; Саркисов, 1985]. Под действием малых доз, недостаточных для отравления, но многократно поступающих в организм, развивается цирроз или рак печени. Афлатоксины подавляют синтез белка, связывая ДНК и ингибируя синтез РНК-полимеразы, снижают в крови содержание протромбина (фактора свертывания крови), отрицательно влияют на репродуктивную способность и прочность костей. Присутствие афлатоксинов в кормах вызывает различные обменные заболевания, нарушения в иммунной системе животных [Чернышов, Панин, 2000].

Трихотеценовые микотоксины представляют собой группу из более чем 40 соединений. Продуцируются многими видами грибов рода *Fusarium*. В естественных условиях трихотецены в высоких концентрациях обнаруживаются во многих зерновых и кукурузе. В качестве природных загрязнителей кормов наибольшее значение имеет Т-2 токсин и дезоксиниваленол (ДОН). Оба токсина химически устойчивы и термостабильны, не разрушаются в процессе изготовления кормов.

Трихотеценовые микотоксины оказывают повреждающее действие на кроветворные и иммунокомпетентные органы: костный мозг, селезенку, вилочковую железу, лимфоидную ткань. Их действие проявляется в виде дегенеративных процессов – атрофии и омертвения тканей [Котик, Труфанова, 1977; Кравченко и др., 1985; Hayes et al., 1980; Friend et al., 1983]. Кроме того, эти токсины обладают свойствами иммунодепрессантов и действуют преимущественно на клеточные формы иммунного ответа [Тутельян, 1985].

Несмотря на широкое распространение микотоксинов в природе, в сырьевых компонентах и комбикормах, их воздействие на рыб, по сравнению с теплокровными животными, изучено не столь подробно.

Имеются ограниченные данные о действии на рыб афлатоксинов и трихотеценовых микотоксинов. Содержание в кормах афлатоксина в количестве 0,03–0,06 мкг/кг корма вызывало массовую гибель мальков радужной форели, а 0,5 мг/кг оказывало летальное действие на взрослых рыб [Мирзоева, 1990]. Известно, что афлатоксины вызывают у рыб по-

ражение печени и желудочно-кишечного тракта. При содержании их в корме до 1 мкг/кг у семги и тихоокеанских лососей наблюдались опухоли пищеварительного тракта, главным образом в области пилорических придатков, реже – в среднем и заднем отделах кишечника, у форели отмечены опухоли печени. При этом печень увеличивалась в размерах за счет отмирания и перерождения ткани. У таких рыб снижалась плодовитость, а их потомство отличалось слабой жизнестойкостью. У карпов при афлатоксикозах отмечено снижение темпа роста и упитанности. Одновременно наблюдались водянка, язвы, дистрофия печеночной ткани, снижение содержания гемоглобина и количества эритроцитов в крови, увеличение числа лейкоцитов [Мирзоева, 1990].

Действие на рыб трихотеценовых микотоксинов подробно описано в работах В.Т. Галаша [1988, 1990]. Им исследована специфическая клиническая картина и течение токсикозов, вызываемых Т-2 токсином и ДОН-ом. Изучены биохимические и гематологические изменения, характеризующие процесс токсикоза. Установлена прямая зависимость скорости развития острой интоксикации от температуры. Был обнаружен интересный факт, что карп в 8–12 раз более чувствителен к поражающему действию трихотеценовых токсинов, чем форель и млекопитающие. Выполненные впервые В.Т. Галашем и его коллегами [Галаш, Головина, 1987; Галаш, Головина, Соболев, 1987] описания особенностей течения токсикозов, вызываемых трихотеценовыми микотоксинами, внесли весьма существенный вклад в изучение и диагностику алиментарных патологий рыб.

Подводя итог анализу особенностей действия микотоксинов, как и в случае тяжелых металлов, следует отметить значительное сходство клинических признаков патологий, вызываемых микотоксинами у рыб и теплокровных животных. Это свидетельствует о сходных механизмах действия ядов на животных, несмотря на различия в температуре тела и среде обитания.

Следует отметить, что здесь приведен далеко не полный, постоянно пополняющийся перечень токсических веществ, которые попадают в комбикорм. Однако из приведенных данных хорошо видно, что реакция организма рыб и теплокровных животных на токсические вещества имеет много общего. В работах Л.Д. Буховец [1983, 1984] на примере яда госсипола, содержащегося в хлопчатниковом шроте, было показано, что, несмотря на низкую температуру тела, действие этого яда на организм рыб сходно с его действием на высших позвоночных животных. На основании этих аналогий можно предположить, что и другие яды могут оказывать одинаковое действие, как на гомойотермных, так и на пойкилотермных животных.

Эти аналогии послужили основанием для использования нормативных показателей безопасности комбикормов для теплокровных живот-

ных применительно к рыбным кормам. Однако существующее сходство применимо в большей степени к механизмам действия токсических веществ. В то же время критические уровни содержания в кормах для рыб большинства токсикантов специально не исследовались. При этом, на основании экспериментальных данных [Галаш, 1988, Остроумова, 2001 и др.], показано, что по ряду показателей, рыбы в большей степени, чем вышшие позвоночные, чувствительны к уровням содержания токсических веществ в кормах. В частности, можно привести пример окисленных липидов, содержание которых в кормах для сельскохозяйственных животных и птиц не регламентируется. Допустимые уровни присутствия в кормах для рыб микотоксинов, кадмия, фтора и ряда других токсических веществ существенно ниже [ГОСТ Р 51899-2002, ТУ 9296..., 2003]. Этот факт свидетельствует о том, что для реального обеспечения безопасности комбикормов для рыб необходимо получение недостающих экспериментальных данных по наиболее существенным токсическим веществам.

Как уже было сказано выше, к наименее изученным вопросам контаминации кормов относится их микробная обсемененность, которой посвящены следующие разделы.

Глава 2

Микробная контаминация комбикормов, ее влияние на корма, среду культивирования и организм рыб

2.1. Характеристика микробной обсемененности сырья и комбикормов

При изготовлении комбикормов для теплокровных животных и рыб используются одни и те же компоненты. Однако рыбные корма имеют иное соотношение растительного и животного сырья (табл. 1), что обусловлено значительно более высокими требованиями рыб к уровню белка и жира [Щербина и др., 1985; Гамыгин, 1987; Остроумова 2001; Щербина, Гамыгин, 2006].

Подобные корма, особенно при нарушениях технологии их изготовления или хранения, в частности в условиях повышенной влажности и тем-

Таблица 1. Содержание питательных веществ и соотношение компонентов в комбикормах для рыб и сельскохозяйственных животных

Показатели, %	Корма для теплокровных животных	Корма для рыб в условиях хозяйств различных типов	
		прудовые	индустриальные
Сырой протеин	13–26	23–26	40–65*
Сырой жир	3–5	3–7	8–20
Компоненты животного происхождения	1–8	2–9	20–60
Компоненты растительного происхождения	90	50–80	30–40

*За исключением продукционных кормов для карпа.

пературы, (что характерно для рыбоводных хозяйств), являются потенциальным субстратом для развития микроорганизмов. Известно, что в благоприятных условиях за сутки один микроорганизм способен произвести 1 600 000 себе подобных [Чернышов, Панин, 2000]. В то же время, литературные данные о микробном фоне комбикормов для рыб ограничены. В отдельных литературных источниках содержатся, в основном, сведения об уровне общей бактериальной обсемененности сырьевых компонентов, а также комбикормов для сельскохозяйственных животных и птиц.

Наиболее полно эти вопросы освещены в работах, проведенных в Институте комбикормовой промышленности (ВНИИКП) В.В. Соколовым с соавторами. Они выполнили микробиологические исследования более 1000 образцов комбикормового сырья и кормов для сельскохозяйственных животных. Согласно приводимым ими сведениям, общая микробная обсемененность сырья растительного происхождения и продуктов его переработки в 70% случаев не превышает уровня 5×10^5 КОЕ/г, а животного сырья – в 60% случаев (КОЕ – количество колонии образующих единиц в 1 г корма). При этом наибольший уровень обсемененности – $1,2 \times 10^6$ – имели образцы гороха, наименьший – $2,3 \times 10^5$ – кукурузы [Соколов и др., 1982]. Среди компонентов животного происхождения наиболее высокой обсемененностью обладали образцы мясокостной муки – в среднем $2,4 \times 10^6$ микробных клеток, для рыбной муки средние значения составляли $4,5 \times 10^5$ [Соколов и др., 1987].

Рыбная мука, содержание которой в кормах для ценных видов рыб достигает до 50–60%, представляет собой благоприятную среду для развития микроорганизмов. По данным Т.М. Сафроновой и В.И. Шендерюк [2001], сразу после изготовления рыбная мука с низким содержанием жира обсеменена в меньшей степени, по сравнению с более жирной мукой ($4,9 \times 10^4$ и $6,5 \times 10^5$ КОЕ/г соответственно). Эти же авторы описали повторное обсеменение муки в процессе хранения. Наиболее активно микрофлора развивается при содержании воды в муке более 14–16%. В этих условиях максимальное накопление микроорганизмов обычно происходит на 30-е сутки хранения, что соответствует наибольшей концентрации в муке продуктов деградации белков и липидов. В дальнейшем развитие микрофлоры идет значительно медленнее, с одной стороны, из-за недостаточного количества воды и воздуха, с другой, – за счет усиливающегося токсического действия продуктов распада белков и липидов и накопления метаболитов самих микроорганизмов. Поэтому, после 90 суток хранения число микроорганизмов уменьшается, при этом плесневые грибы почти исчезают.

Большинство данных о структуре микробного фона кормового сырья и комбикормов ограничено частотой встречаемости трех групп микроор-

ганизмов, присутствие которых нормируется в комбикормах для теплокровных животных. Это патогенные бактерии группы кишечной палочки, стафилококки и плесневые грибы. По данным В.В. Соколова [2002], зараженность сырья растительного происхождения и продуктов его переработки кишечной палочкой наблюдается в 35% случаев, стафилококками – в 38%, плесневыми грибами – около 50%. В компонентах животного происхождения количество образцов, характеризовавшихся присутствием кишечной палочки и стафилококков, было заметно выше и составило, соответственно, 60 и 50%. Присутствие плесневых грибов обнаруживалось в 70% образцов незерновых сырьевых компонентов. Анализируя частоту встречаемости вышеперечисленных групп микроорганизмов в разном сырье, следует отметить, что на фоне сравнительно близкого уровня общей микробной обсемененности, зараженность кишечной палочкой, стафилококками и плесневыми грибами в большей степени присуща высокобелковым компонентам. Более значимая обсемененность этих компонентов связана с присутствием в них белков и жиров, легко разрушающихся при незначительных изменениях условий хранения (температура, влажность и др.).

Н.И. Чернышов и И.Г. Панин в своем обзоре [2000] приводят данные о встречаемости в компонентах животного происхождения, в частности в рыбной и мясокостной муке, помимо выше перечисленных бактерий, представителей родов *Salmonella*, *Campilobacter*, *Listeria*, *Clostridia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*. Эти бактерии могут вызывать токсикоинфекции. Они возникают как при попадании с кормом токсинов, так и при их продуцировании в организме животных. В частности, для накопления токсинов, при инфицировании продуктов стафилококками, при температуре 36–37 °С достаточно 4–5 часов. Этот процесс идет сравнительно интенсивно и при комнатной температуре.

Бактериологические исследования сырьевых компонентов рыбных комбикормов, проведенные В.Ю. Жезмер и Е.В. Ляшенко [1991], выявили, что обсемененность сырья животного происхождения (рыбная, мясокостная, крилевая мука, сухое молоко) составляла 1×10^5 – 5×10^5 КОЕ/г. Доминирующий фон бактериального загрязнения сырьевых компонентов составляли бактерии рода *Bacillus* и *Micrococcus*. Несколько более низкие значения были определены для молочнокислых бактерий (роды *Streptococcus*, *Lactobacillus*) и коринеформных бактерий. Энтеробактерии – представители родов *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Ervinia* *Serratia*, *Hafnia* были изолированы практически из всех проб сырья.

Следует также отметить, что способность многих бактерий к спорообразованию позволяет им переносить кратковременное увеличение температуры в процессе изготовления корма. Споры сохраняют жизнеспособность в таких условиях, где вегетативные клетки погибают. Большин-

ство спор хорошо переносят высушивание. В сухом состоянии споры погибают лишь при сильном нагревании (150–160 °С) в течение нескольких часов [Емцев, Мишустин, 2005]. В дальнейшем в процессе упаковки, транспортировки и хранения обсемененность комбикормов в значительной степени повышается [Жезмер, Ляшенко и др. 1991], еще больше обсемененность возрастает при нарушении условий хранения (повышенной температуре и влажности). Общая бактериальная обсемененность комбикормов для рыб, по данным различных литературных источников, колеблется в пределах 1×10^3 – 1×10^7 КОЕ/г корма, но может достигать и 1×10^{10} [Мирзоева, 2002].

Что касается структуры бактериального фона, то сведения о нем весьма ограничены. Имеются отдельные публикации, где приведены данные о встречаемости в гранулированных кормах для карпа бактерий рода *Bacillus* и дрожжеподобных грибов рода *Candida* [Войнова, 1991]. В кормах для канального сома, выращиваемого в установках с замкнутым циклом водоснабжения, а также в пастообразных кормах, приготовленных на основе селезенки крупного рогатого скота, обнаружены бактерии родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Hafnia* [Жезмер и др., 1991]. По сведениям Л.В. Ларцевой и И.Ю. Рогаткиной [1996], в комбикормах, использованных при выращивании бестера, были отмечены бактерии родов *Bacillus*, *Aerococcus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*.

Следует подчеркнуть, что имеющиеся сведения об общей микробной обсемененности кормов или встречаемости отдельных групп микроорганизмов, как правило, касаются критических случаев – заболеваний рыб, вызванных некачественными кормами. Однако все упомянутые выше микроорганизмы, наряду с обычными сапрофитными формами, имеют разновидности, склонные к паразитированию, токсинообразованию, являющиеся возбудителями заболеваний [Стейниер и др. 1979; Черкес и др. 1987; Емцев, Мишустин, 2005]. Поэтому для реальной практики рыбоводства несомненный интерес представляют ответы на вопросы: какова опасность микробной обсемененности комбикормов, как и при каких условиях, она может представлять угрозу для здоровья культивируемых рыб.

2.2. Структура микробного фона комбикормов для рыб и характеристика доминирующих групп

Для ответа на эти вопросы были проведены исследования более 100 образцов комбикормов, выпускаемых отечественными заводами («Ассортимент Агро», Гипрорыбфлот-Экос», Провими, НПЦ БИОС и др.), а также ведущими мировыми производителями – Биомар, Аллер-Аква, Коппенс, Рейху-Райсио. Комбикорма были получены непосредственно от заводов-изготовителей или предоставлены рыбоводными хозяйствами.

Отбор проб и подготовку их к микробиологическому анализу проводили в соответствии с ГОСТ 13496.0-80 (методы отбора проб) и ГОСТ Р 51426-96 (подготовка испытуемых проб). Для определения общей микробной обсемененности 1 г корма растирали в 10 мл стерильного физиологического раствора и готовили ряд последовательных разведений вытяжек исследуемого вещества, начиная с соотношения 1:10 [ГОСТ Р 51426-99]. Посевы проб проводили в чашках Петри на стандартных плотных питательных средах: эритрит-агаре – для определения общего количества микроорганизмов, для выявления энтеробактерий использовали среду Эндо, для дрожжей и грибов – среду Сабуро. Первичный подсчет колоний выполняли через 24 часа инкубации проб в термостате при температуре 37 °С. Для более полного выявления грибов и плесеней наблюдение за посевами продолжали в течение двух последующих недель.

Идентификацию микроорганизмов проводили после выявления их культуральных свойств на специальных 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. В проведении анализов комбикормов принимали участие сотрудники ВНИИ прудового рыбоводства (ВНИИПРХ) канд. биол. наук Л.Н. Юхименко, канд. биол. наук Л.И. Бычкова, а также – центра сертификации НП РЦС «Донтест» (г. Ростов-на-Дону).

Согласно проведенным определениям, диапазон микробной обсемененности комбикормов для рыб составляет от $2,9 \times 10^3$ до $2,0 \times 10^9$ КОЕ/г. При этом основное количество комбикормов характеризовалось обсемененностью более чем в $10^5 - 10^6$ степени, что выше нормативного показателя безопасности – 5×10^5 КОЕ/г [Комбикорма для осетровых и лососевых рыб; ТУ, 2003]. Эти значения также превышают обычный уровень бактериальной обсемененности комбикормов для сельскохозяйственных животных и птиц, который в основном составляет менее $5,0 \times 10^5$ КОЕ/г [Соколов, 2002].

Полученные различия, как указывалось выше, связаны, скорее всего, с высоким содержанием в рыбных кормах продуктов животного происхождения (в частности, рыбной и мясокостной муки), для которых изначально характерен более значимый уровень бактериального заражения [Чернышов, Панин, 2000; Соколов, 2002].

На основании анализа микрофлоры удалось установить, что структура бактериального фона комбикормов для рыб, как правило, представлена ассоциацией микроорганизмов, включающей от 2 до 6 (в большинстве случаев 3–4) групп. Основные группы и частота их встречаемости схематически обобщены на рис. 2. В связи с тем, что исследованные образцы комбикормов различались по многим параметрам, на рисунке приведены

обобщенные данные без детального анализа связи качественных и количественных характеристик микробной обсемененности с продолжительностью, условиями хранения кормов, их химическим или компонентным составом.

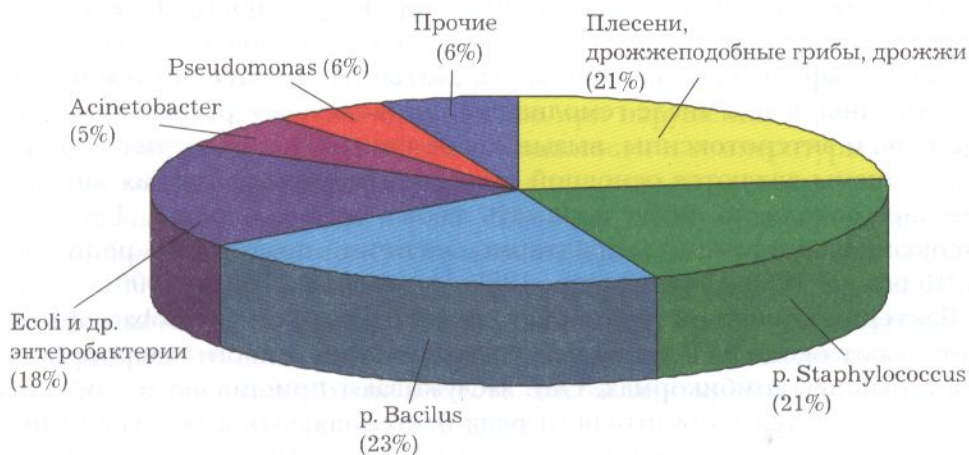


Рис. 2. Основные группы фоновых микроорганизмов и частота их встречаемости в рыбных комбикормах

Можно видеть, что в рыбных комбикормах доминируют бактерии рода *Bacillus* и *p. Staphylococcus*, плесени (*Penicillium*, *Mucor*), дрожжеподобные грибы (*Candida*), бактерии кишечной группы (в основном *E. coli*). Остановимся подробнее на этих группах микроорганизмов.

Бактерии рода *Bacillus*. Бациллы, на долю которых приходится 23% микроорганизмов комбикормов, распространены повсеместно – в почвах, воде, на растениях, покровах и в пищеварительном тракте животных. Они относятся к сапрофитам и являются основными участниками разложения белковых субстратов. Благодаря высокой активности, часто проявляют антагонистические свойства по отношению к другим микроорганизмам. Образование спор позволяет им сохранять жизнеспособность при неблагоприятных условиях внешней среды (в том числе и при влаготепловой обработке сырья и кормов в процессе гранулирования и экструдирования).

Некоторые виды бактерий рода *Bacillus* относятся к возбудителям заболеваний человека, животных, насекомых и растений (в частности, сибирской язвы, ботулизма, пищевых отравлений, парши корнеплодов и др.).

Стафилококки (*p. Staphylococcus*) – столь же многочисленная группа, составляющая 21%. Наиболее часто в кормах этот род представлен *St. epidermidis* (эпидермальный или белый стафилококк) и *St. saprophyticus*, реже – *St. aureus* (золотистый стафилококк). Их присутствие обусловлено высо-

ким содержанием этих микроорганизмов в исходном сырье, как животного, так и растительного происхождения [Соколов, 2002; Чернышов, Панин, 2000]. Стафилококки относятся к условно-патогенным микроорганизмам и обладают мощными защитными механизмами, противостоят высушиванию и замораживанию. Они широко распространены в воздухе, на объектах окружающей среды, на кожных покровах человека и животных. Стафилококки способны вырабатывать достаточно устойчивые экзотоксины, в том числе гемолизины, 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 [А.Щербина, 1960; Черкес и др., 1987; Чернышов, Панин, 2000].

Бактерии кишечной группы (энтеробактерии – сем. Enterobacteriaceae) составляют около 18% от общей частоты встречаемости микроорганизмов в рыбных комбикормах. Они заслуживают пристального внимания, так как являются возбудителями ряда бактериальных заболеваний рыб, связанных с питанием комбикормами [Жезмер, 1988, 1991; Бычкова и др., 1995; Ларцева, 2003]. Энтеробактерии одинаково успешно существуют во внутренней среде живых организмов и в окружающей среде. Приспосабливаясь к различным условиям, активно проявляют многообразие своих свойств. Они могут являться симбионтами желудочно-кишечного тракта, активно участвовать в процессе расщепления его содержимого, а также, что очень важно, в формировании неспецифического иммунитета.

Считается, что родоначальником всей этой группы микроорганизмов была кишечная палочка. В процессе эволюции ее разновидности приспособились и к паразитическому способу существования, часть приобрела патогенные свойства. Ферментативная активность бактерий этой группы наиболее выражена у сапрофитов и уменьшается по мере усиления патогенности. Это объясняется тем, что микроорганизмы, приспособляясь к паразитическому образу жизни, утрачивают ставшие ненужными ферменты, ранее необходимые для извлечения питательных веществ из различных субстратов. При изменении условий существования (например, ослаблении организма хозяина), они могут трансформироваться в возбудителей заболеваний человека и животных [Черкес и др., 1987].

Энтеробактерии, являясь представителями непостоянной, 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 у потребителей [Ларцева, 2003].

Дрожжеподобные грибы и дрожжи – следующая крупная группа микроорганизмов комбикормов, на долю которой приходится 21%. Они широко распространены на всех естественных субстратах: почвах, растительных и животных остатках, продуктах питания и т. д. [Фробишер, 1965; Емцев и др., 2005]. Среди них также 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 у теплокровных животных и рыб [Головина, 2003]. Так, представители рр. *Fusarium* и *Candida*, присутствовавшие в комбикормах, были признаны причиной заболеваний и гибели различных видов рыб [Галаш, 1988, 1990; Войнова, 1991; Исаева, Козиненко, 1999]. Грибы рода *Candida*, и плесени рода *Penicillium* могут вызывать снижение выживаемости осетровых рыб, изменения в обмене веществ, дисбактериоз, накапливаться в их внутренних органах [Бурлаченко, 2004].

В тоже время, грибы и дрожжи широко используются в различных отраслях промышленности для получения дрожжевого сырья, биологически активных добавок, производства антибиотиков и др.

Микроорганизмы других групп, по нашим данным, присутствуют в комбикормах в ограниченных количествах [Бурлаченко и др., 2002]. Однако некоторые из них также представляют опасность. В частности, некоторые бактерии рр. *Pseudomonas* и р. *Acinetobacter*, так как могут иметь условно-патогенные и патогенные формы и являться возбудителями инфекционных заболеваний.

Таким образом, микробный фон комбикормов для рыб характеризуется ограниченным числом групп микроорганизмов. Все они имеют широкое распространение в природе, высокую активность ферментов, которые расщепляют различные органические субстраты. Большинство – имеют сапрофитные и паразитические формы, а также способны к токсинообразованию и обладают факторами патогенности – гемолитической и протеолитической активностью. Многие из них, с одной стороны, являются представителями нормальной микрофлоры рыб и среды их обитания, с другой, будучи достаточно активными, при наступлении определенных условий (ослаблении 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.

2.3. Изменения бактериальной обсемененности комбикормов при различных условиях хранения

Полученные данные об уровнях общей микробной обсемененности, структуре микробного фона комбикормов свидетельствуют о потенциальной опасности этих микроорганизмов для объектов культивирования. Принимая во внимание, что скорость размножения микроорганизмов очень высока, можно ожидать накопление и наслаивание отрицательных свойств в случае их попадания в условия, благоприятные для роста. Подобные явления нередки в рыбоводных хозяйствах, где по различным причинам, не соблюдаются условия хранения кормов, что способствует повышению уровня их обсемененности.

В этой связи, представлялось целесообразным установить особенности динамики бактериальной обсемененности комбикормов в стабильных условиях хранения и при повышении влажности, что, как правило, имеет место в промышленных рыбхозах. Наблюдения за изменениями численности микроорганизмов были проведены на фоне кормов одного состава, но имеющих различный начальный уровень заражения.

В исследованиях использовали свежий стартовый комбикорм для осетровых рыб (влага – 8,3%, сырой протеин – 42%, жир – 7,8%, энергия – 3560 ккал/кг). Его начальная обсемененность составила $2,1 \times 10^4$ КОЕ/г, при этом значительная доля (более 76%) приходилась на бактерии р. *Staphylococcus*. При моделировании условий хранения, часть корма была подвергнута кратковременному увлажнению (влажность корма возросла на 10% в течение 12 часов) и экспериментальному заражению стафилококком. Предполагаемые уровни обсеменения были выбраны, исходя из обобщенных данных, приведенных в предыдущем параграфе, которые свидетельствовали об отрицательном влиянии микроорганизмов комбикормов на рыб [Бурлаченко и др., 2001, 2002].

В качестве заражающего агента был использован эталонный штамм *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990. Начальный уровень обсемененности кормов после заражения составил 3×10^4 , $1,3 \times 10^6$ и $1,2 \times 10^8$ КОЕ/г. Заражение кормов и контроль в них микробиологических показателей проводился в лаборатории микробиологии Ростовского центра по сертификации «Донтест».

В ходе трехмесячных наблюдений за бактериальным фоном корма, принятого за контроль (3×10^4 КОЕ/г), было отмечено некоторое снижение общего уровня обсемененности. Следует отметить, что корм хранился в благоприятных и стабильных условиях температуры и влажности. В то же время, даже незначительное и кратковременное увлажнение отдельной партии корма привело к резкому и быстрому (в течение 48 часов) возрастанию общей бактериальной обсемененности более чем в 6 раз

(рис. 3). Далее, к концу месяца произошла стабилизация на первоначальном уровне.

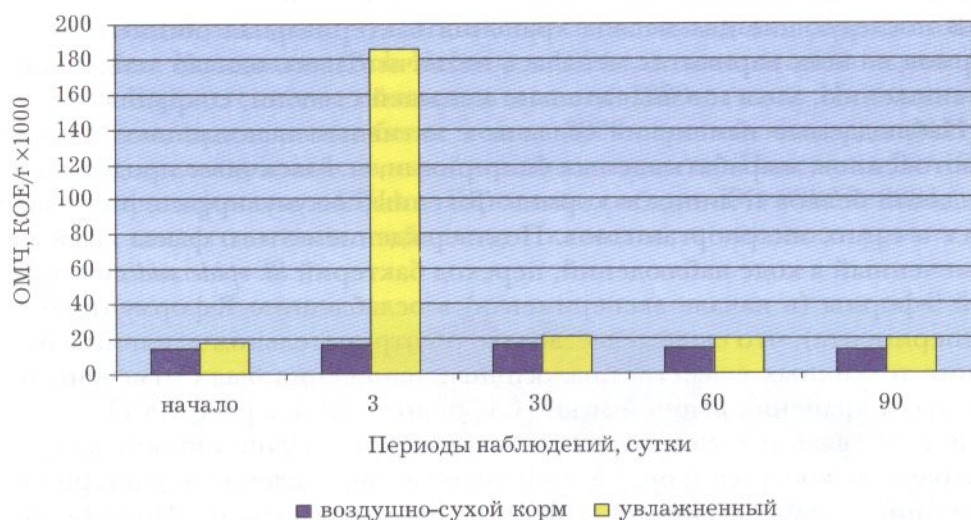


Рис. 3. Динамика бактериальной обсемененности комбикорма при стабильных условиях хранения и кратковременном увлажнении

Столь быстрый рост численности бактерий при незначительном и непродолжительном увлажнении корма, свидетельствует о высокой степени риска микробного заражения кормов при несоблюдении условий хранения.

Наблюдения в течение 3-х месяцев за экспериментальными партиями корма, зараженными культурой *St. epidermidis*, позволили выявить сходную тенденцию изменений (табл. 2).

Максимальный уровень зараженности после внесения в корм культуры стафилококка был отмечен на третьи сутки. К концу первого месяца хранения во всех вариантах, независимо от степени заражения, произошло

Таблица 2. Динамика микробной обсемененности комбикорма с различной степенью заражения *St. epidermidis*, КОЕ/г корма

Степень заражения, КОЕ/г	Период опыта, сут.				
	1	3	30	60	90
10^4	3×10^4	$2,7 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
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	$1,2 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$2,7 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$

снижение показателя общей микробной обсемененности. Причем в варианте наиболее сильного заражения падение численности микроорганизмов было максимальным – от $2,6 \times 10^8$ до $2,7 \times 10^5$ КОЕ/г.

В последующие два месяца хранения бактериальная обсемененность кормов во всех вариантах менялась незначительно, однако тенденция к ее снижению, хотя и в значительно меньшей степени, сохранилась.

Наблюдаемые изменения связаны с активным накоплением в корме экзотоксинов, вырабатываемых бактериями, и токсичных продуктов деградации белков и липидов кормов. Токсины, аккумулируясь, подавляют 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 свидетельствовало об отрицательном влиянии накопления токсичных веществ. Аналогичные изменения были отмечены и в процессе хранения рыбной муки [Сафронова, Шендерюк, 2001].

В этой связи необходимо 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 при нарушении условий хранения в результате жизнедеятельности бактерий. В этой связи особое значение для хозяйств приобретает мониторинг микробной обсемененности кормов.

2.4. Тест-система для микробиологической характеристики рыбных комбикормов

В обычной практике, за исключением случаев массовых заболеваний или гибели рыб, когда осуществляется тотальный контроль хозяйства с целью выявления источника заболевания, микробиологический контроль кормов не проводится. Во многом это связано с тем, что процедура микробиологического анализа сложна, продолжительна по времени и трудоемка. Подготовка и проведение анализов возможны лишь в специализированных бактериологических лабораториях и должны осуществляться квалифицированным персоналом. Детальная идентификация основных групп микроорганизмов, необходимая в случае возникновения экстренных ситуаций, достаточно длительна (не менее 7–10 дней). 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 процедуры микробиологического анализа комби-

кормов и обеспечения возможности его проведения непосредственно в хозяйствах или на комбикормовых заводах, не имеющих соответствующих лабораторий, мы предложили модификацию современной тест-системы Petrifilm 3М (рис. 4). Эта экспресс-система была разработана в США Бобом Нельсоном (Bob Nelson) в 1984 г. и постоянно совершенствуется. В Европе система появилась в конце 1980-х годов. На сегодняшний день она применяется более чем на 3000 европейских предприятий пищевой и сельскохозяйственной промышленности. Пластины Petrifilm 3М сертифицированы в США и Европе по системе ISO 9002 и 9001, что является свидетельством стабильного качества и высокого уровня их производства.

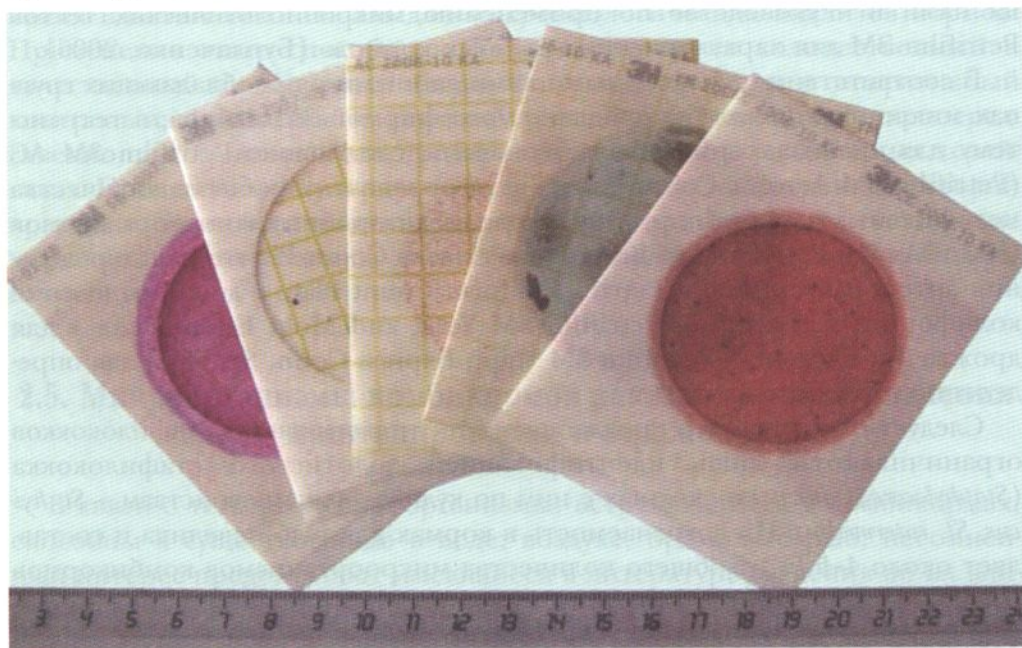


Рис. 4. Тест-пластины Petrifilm 3М

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

Микробиологический анализ на пластинах имеет существенные преимущества перед традиционным, проводимым на чашках Петри. Использование пластин с готовыми стандартными питательными средами позволяет отказаться от обычной процедуры их приготовления из сухих сред, нанесения на чашки, охлаждения. При этом нет необходимости в

стерильном помещении и автоклаве, большом количестве посуды, ее подготовке и стерилизации. Срок хранения пластин – более года. Сам процесс посева также упрощен. Для проведения анализов на пластинах, в отличие от традиционных, выполняемых в микробиологических лабораториях, не требуется специальной подготовки и высокой квалификации персонала. Стоимость комплексного анализа одного образца комбикорма, проводимого на пластинах, при существующем уровне цен, не менее чем в 2 раза ниже стоимости аналогичного анализа в отечественных микробиологических лабораториях. Предложенная нами модификация метода предусматривает его использование применительно к микрофлоре, обычно населяющей сырье и комбикорма для рыб. Она подробно описана нами в «Руководстве по применению микробиологических тестов Petrifilm 3М для характеристики рыбных кормов» [Бурлаченко, 2006].

В соответствии с полученными нами данными о преобладающих группах микроорганизмов, из предлагаемого фирмой 3М набора, в тест-систему для анализа кормов были включены следующие: Petrifilm 3М AC (Petrifilm 3М Aerobic Count Plate) – для определения общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ); Petrifilm 3М Enterobacteriaceae Count Plate – для определения энтеробактерий; 3М Petrifil Coliform Count Plate – для определения колиформных бактерий; Petrifilm 3М Yeast and Mold Count Plate – для дрожжей и плесеней; Petrifilm 3М Staph Express Count System – для определения стафилококков.

Следует отметить, что предлагаемые тест-пластины для стафилококков ограничиваются лишь идентификацией золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) и сходных с ним по культуральным свойствам – *St. hyicus*, *St. intermedius*. Их встречаемость в кормах для рыб невелика и составляет около 4–5 % от общего количества микроорганизмов комбикормов (остальные бактерии этой группы представлены, в основном, белым стафилококком (*St. epidermidis*). Однако, принимая во внимание патогенность и опасность золотистого стафилококка для человека, мы включили в тест-систему пластины для определения этих бактерий.

Для подтверждения возможности использования пластин Petrifilm 3М при бактериологических анализах комбикормов были проведены сравнительные посевы 18 образцов кормов на тест-пластинах и на стандартных средах: эритрит-агаре, среде Эндо и среде Сабуро. Подготовка проб, посевы и их инкубация велись в соответствии с традиционными методиками и рекомендациями фирмы 3М для тестов Petrifilm.

Полученные результаты, подробно описанные ранее [Бурлаченко, 2007], показали возможность определения общего количества микроорганизмов, качественных и количественных характеристик отдельных, наиболее важных групп. Так, при определении общего количества аэроб-

ных бактерий пластины Petrifilm 3М (по сравнению с эритроит-агаром) в 78% случаев зафиксировали большее или сопоставимое количество микроорганизмов. Более детальный анализ, проведенный традиционным способом на специализированных питательных средах, дал возможность установить, что тест-пластины не выявили, главным образом, присутствие бактерий *p. Acinetobacter*, встречаемость которых в кормах невелика. В тоже время, пластины показали более высокую чувствительность при определениях дрожжей и плесеней. Бактерии кишечной группы также в сопоставимых количествах были идентифицированы как на тест-пластинах, так и на традиционных питательных средах.

Полученные данные продемонстрировали перспективность использования пластин Petrifilm 3М для микробиологических анализов кормов. Применение этого способа многократно упрощает количественный и качественный анализ микробного фона комбикормов и оперативный контроль их безопасности, как в лабораторных условиях, так и непосредственно на комбикормовых предприятиях, а также в рыбоводных хозяйствах. Проведение регулярного контроля, наряду с соблюдением условий хранения кормов, позволит своевременно принять соответствующие меры по предотвращению дальнейшего развития их микробного заражения.

2.5. Микроорганизмы комбикормов как источник загрязнения среды культивирования и заражения рыб

В связи с тем, что микроорганизмы, встречающиеся в комбикормах, способны к существованию в воде, воздухе, организме рыб, несомненный интерес представляют имеющиеся в литературе сведения об их влиянии на среду культивирования.

Неполное поедание рыбами кормов, их накопление в воде усиливает ее органическое загрязнение. При этом, в видовом составе микрофлоры биоценозов и экосистем, возрастает количество патогенных представителей [Thune et al., Noga, 1995]. На подобном фоне размножение бактерий, попадающих в воду с кормами, многократно ускоряется.

Это подтверждают сведения Л.В. Ларцевой и И.Ю. Рогаткиной [1996], согласно которым использование при выращивании бестера кормов, обсемененных энтеробактериями и плесневыми грибами, привело к изменению микробного пейзажа среды культивирования. Кроме того, произошло вытеснение этими группами бактерий представителей типично водной микрофлоры – бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*. Одновременно уровень общей микробной обсемененности воды, в которой содержалась рыба, увеличился на порядок с 1×10^4 до 1×10^5 КОЕ/мл.

По сообщению Н. В. Войновой [1991] кормление карпов в прудах комбикормами, обсемененными дрожжами рода *Candida* и бациллами – *Bac. cereus* вызывало увеличение количества грибов в воде в 800 раз, бацилл – в 123 раза. Повышенное содержание этих микроорганизмов в воде отмечали в течение практически всего периода кормления рыб.

Еще более выражено меняется микробиоценоз среды культивирования в системах с замкнутым циклом водообеспечения. Согласно данным В.Ю. Жезмер и Е.А. Галдиной [1991], при выращивании канального сома и карпа в подобных установках отмечено существенное снижение в структуре водного микробиоценоза обычных форм (аэромонад, грамотрицательных бактерий, грамположительных кокковых форм) при одновременном возрастании энтеробактерий, спектр которых соответствовал их содержанию в использованных кормах.

Даже в естественных водоемах, по данным И.П. Погореловой и соавторов [1992], высокая частота встречаемости в образцах волжской воды ряда условно-патогенных микроорганизмов (в частности *Aeromonas sobria*, *A. caviae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas* spp.) сопровождалась их более значимым, по сравнению с другими микроорганизмами, присутствием на жабрах, в мышцах, паренхиматозных органах осетровых рыб, выловленных из этой воды. Причем, в наибольшей степени заражению подвергались перечисленные органы, а также гонады. Следует также отметить, что микроорганизмы, частота встречаемости которых в воде была незначительной (*A. Salmonicida*, различные представители рода *Vibrio* и др.), либо вообще отсутствовали, либо были обнаружены только у 1–2 % от обследованных рыб.

В условиях интенсивного культивирования, при нарушениях технологии бактериальное загрязнение воды идет гораздо более интенсивно, что, соответственно, в значительно большей степени сказывается на выращиваемых рыбах.

В своей работе П.М. Хуторной [1989] приводит данные о том, что обсемененность паренхиматозных органов у белых амуров в прудах с высокой интенсификацией рыбоводного процесса была в 1,2–1,6 раз выше, чем у рыб, содержащихся на естественной пище. При этом в крови рыб, которых культивировали на естественной пище, бактерии обнаружены не были.

Есть наблюдения, что в печени и крови бестера, стерильных на начальных этапах выращивания, в процессе культивирования были обнаружены споровые палочки и кокки, присутствовавшие в воде бассейнов и в кормах [Ларцева, Рогаткина, 1996]. В работе Л.И. Бычковой [2002] приводятся данные о тесной корреляции между содержанием в воде и во внутренних органах форели, выращиваемой в садках, вибрионов, аэромонад, протея, цитробактера.

Высокое содержание микроорганизмов в среде культивирования повышает напряженность в работе защитных систем организма рыб, которые при достижении определенных концентраций бактерий в воде, уже не справляются с натиском микрофлоры. Более того, в ряде публикаций сообщается, что вирулентные свойства микроорганизмов значительно усиливаются после заражения рыб, находящихся в условиях стресса. Полагают, что причиной этого являются сбои в иммунных механизмах культивируемых рыб [Черкес и др., 1987; Юхименко и др., 1998, 2001; Исаева, Козиненко, 1999].

Приведенные данные являются убедительным свидетельством чувствительности водной среды и объектов культивирования к микробному воздействию, связанному, в том числе, и с кормами. При этом следует подчеркнуть, что как сами микроорганизмы, так и другие составляющие культивирования, особенно интенсивного (стрессы, высокие плотности посадки, невысокое качество воды, кормов и т.д.), способствуют нарастанию неблагоприятной в микробиологическом отношении ситуации, которая может привести к снижению сопротивляемости организма рыб и повышению риска их заболеваний.

2.6. Пути проникновения бактерий в организм рыб и развитие бактериальных заболеваний

Рыбы, как и другие животные, имеют естественные защитные механизмы, препятствующие проникновению чужеродных агентов во внутреннюю среду организма. Однако с высокой концентрацией микроорганизмов справиться гораздо труднее, особенно если речь идет о патогенных формах. В этой связи представлялось интересным рассмотреть, каким образом обычные фоновые микроорганизмы могут стать опасными и проявить свою патогенность.

Согласно современным взглядам, патогенность – это способность микроорганизмов вызывать клинические проявления заболевания. Однако патогенность – понятие относительное, связанное для каждого микроба с определенным видом, возрастом, полом и физиологическим состоянием макроорганизма, в ткани которого он внедряется. С этих позиций, патогенность – это видовое, генетически детерминированное свойство микроорганизмов, но проявляется оно при контакте с малоустойчивым к нему макроорганизмом [Лукьяненко, 1989]. Согласно мнению известного инфекциониста, академика И.В. Давыдовского [1956], «патогенны, в собственном смысле этого слова, не микробы, а те физиологические корреляции, которые в данный момент имеют место в данном организме или в данном коллективе и которые связаны с нарушениями регулятор-

ных систем организма. Роль внешней среды проявляется в том, что ее состояние определяет конкретное проявление видовых особенностей данного микроба, в частности патогенности. Суть взаимодействия между микробом и макроорганизмом состоит не в предопределенной борьбе на истребление, а во взаимном приспособлении обоих звеньев цепи «хозяин-паразит».

Одним из проявлений взаимного приспособления макро- и микроорганизмов является возникновение и совершенствование неспецифических и специфических механизмов защиты макроорганизма, которые направлены на нейтрализацию факторов патогенности микроорганизмов (токсинов, ферментов).

Как было указано выше, под влиянием неблагоприятных факторов среды на фоне ослабления организма рыб, патогенные свойства многих условно патогенных микроорганизмов возрастают. При этом рыбы связаны с водой значительно теснее, чем наземные животные с воздухом. Водная среда создает более благоприятные условия для жизнедеятельности микроорганизмов. Они практически не подвержены опасности высыхания, легче и более длительно могут существовать вне рыб, образуя резервуары инфекций, а также легче передаются от одной особи к другой контактными, оральными и другими путями. Возбудители приспособились не только к условиям среды, но и к биологическим свойствам рыб, как пойкилотермных животных. Температурный оптимум, при котором они могут размножаться и вызывать заболевания, колеблется в значительно более широких пределах, чем у теплокровных животных [Schäperclaus, 1979].

Реализация патогенного потенциала бактерий, вызывающих заболевания, предопределяется степенью их накопления и уровнем естественной резистентности выращиваемых объектов [Жезмер и др., 1991; Бычкова и др., 1995; Грищенко, Смирнов, 1997]. В процессе нарастания численности бактерий в среде культивирования организм рыб перестает справляться с растущей агрессивностью среды. Гистопатологическими и экспериментальными методами доказано, что бактериальное заражение рыб начинает развиваться в кишечнике, откуда они мигрируют во все органы и ткани [Miyazaki, 1990; Syvokiene, 1991], в результате чего количество бактерий в печени и почках значительно возрастает. Согласно мнению А.Е. Каховского [1991], присутствие бактерий в печени указывает на напряженное состояние иммунитета рыб, когда агрессивность окружающей среды превышает резистентность организма. Аналогичное мнение высказывают Л.Н. Юхименко и ее соавторы [1987], которые также считают, что появление бактерий во внутренних органах рыб свидетельствует не только о высоком бактериальном прессинге воды, но и о снижении резистентности их организма.

Проникновение бактерий в организм рыб возможно также и через жа-

бры. Их травматизация и другие воздействия, способствуют внедрению возбудителей в организм. Например, в экспериментах А. Bowers и J.B. Alexander [1982] было установлено, что кишечная палочка проникает в кровоток через жаберный эпителий.

В ходе заболеваний патогенные микроорганизмы накапливаются во внутренних органах. По мнению Н.И. Рудикова и Л.И. Грищенко [1985], при различных заболеваниях имеются свои особенности в локализации возбудителей, однако, как правило, наиболее интенсивное накопление бактерий происходит в паренхиматозных органах и крови рыб. В наибольшей степени (85–95% случаев) поражаются почки, печень и селезенка. Бактериальное заражение приводит к некрозу почек, селезенки, отделов кишечника, печени. Бактериальный антиген может также обнаруживаться и в мышцах [Nelson et al., 1985]. Все это свидетельствует о значительном поражении организма рыб и существенных нарушениях жизненно-важных функций, связанных с выведением продуктов обмена, детоксикацией чужеродных веществ и т.д. [Fleischer, 1989].

Размножение, внедрившихся в организм рыб, патогенных микроорганизмов вызывает у них, как и у других позвоночных животных, комплекс защитно-приспособительных реакций, являющихся ответом на патогенное действие микроба. Реакция выражается в биохимических, морфологических и функциональных изменениях, в иммунных ответах и направлена на сохранение постоянства внутренней среды [Грищенко, Рудиков, 1985]. Включение приспособительных механизмов характеризуется, прежде всего, гиперфункцией. При этом, интенсивность жизнедеятельности клеток переходит на более высокий уровень. В них возрастает количество функционирующих структур. Размеры клеток, за счет увеличения массы и числа внутриклеточных элементов, увеличиваются (гипертрофия). Кроме того, увеличивается и число самих клеток (гиперплазия). Эти процессы сопровождаются увеличением потребления энергии. Если под действием негативных факторов создается постоянно прогрессирующий дефицит энергии, то изменения в живой системе приобретают необратимый характер и приводят к ее деградации [Зайчик, Чурилов, 2005].

Воспалительная реакция рыб во многом сходна с внешними признаками проявления воспаления у млекопитающих. Она зависит от температуры воды. Внешне наиболее четко у рыб она проявляется в виде покраснения и опухания тканей. Температурная реакция выражена слабо из-за высокой теплопроводности воды. Воспаление характеризуется сочетанием различных типов патологических процессов. Это нарушения кровообращения, увеличение числа клеток местных тканей и т.д. Характерным для рыб является частое сопровождение сосудистой реакции покраснением кожи, обширными отеками. Обязательным компонентом воспаления у рыб является разрастание элементов соединительной ткани, про-

текающее так же, как и у других животных [Schäperclaus, 1979; Евдокимова, 2003]. В крови происходит снижение гематокрита, количества эритроцитов, возникает анемия. Последнее, предположительно, обусловлено разрушением эритроцитов гемолизом бактерий. Наиболее сильно поражение рыб бактериями наблюдается в условиях голодания и при колебаниях температуры [Takahashi, 1984a, 1984b].

Вместе с тем, несмотря на принципиальное сходство работы иммунной системы рыб и высших позвоночных, у рыб она более лабильна и в ней интенсивнее функционируют врожденные механизмы, которые обеспечивают немедленное, но не продолжительное реагирование на внешнее воздействие. У рыб, как указывают И.А. Кондратьева и А.А. Киташева [2002], в системе иммунитета доминируют неспецифические факторы защиты – лизоцим, белки системы комплемента, естественные антитела, пропердин, интерлейкины, факторы активации макрофагов и ряд других.

В связи с наличием в живом организме чуткого к различным отрицательным воздействиям и одновременно мощного комплекса защитных функций, патогенные микроорганизмы в ходе своей эволюции приобрели ряд свойств, позволяющих им сопротивляться иммунной системе. Прежде всего, это относится к инвазивности патогенных микроорганизмов – то есть их способности проникать в клетки организма хозяина. Такими свойствами обладают, например, сальмонеллы, иерсинии, шигеллы. Они проникают через щеточную кайму эпителиальных клеток кишечника и вызывают там формирование очага воспаления и истончение ткани кишечника. Помимо этого, наблюдается разрушение лимфоидной ткани, формирующей макрофаги, происходит проникновение бактерий внутрь фагоцитов. В этом случае, макрофаги уже не могут поглощать чужеродные клетки, но, оставаясь живыми, напротив могут способствовать передвижению патогена в организме хозяина [Vladoianu et al., 1990]. Кроме того, разрушаются клетки, способные участвовать в секреции иммуноглобулинов. Таким образом, происходит подавление иммунного ответа лимфоидной ткани кишечника, являющейся первым барьером на пути проникновения патогенов в органы и ткани [Watarani et al., 1995].

Важнейшим фактором патогенности, позволяющим микроорганизмам сопротивляться противодействию иммунной системы организма-хозяина, является токсинообразование. Токсины способны оказывать подавляющее действие на клетки иммунной системы [Fleischer, 1989]. В связи со способностью многих типичных представителей микроорганизмов комбикормов к токсинообразованию, считаем не безинтересным привести информацию, касающуюся классификации, происхождения и механизмов действия токсинов. Это позволит более полно оценить процессы течения бактериальных заболеваний и их последствия.

2.6.1. Бактериальные токсины и особенности их воздействия на животные организмы

Традиционно считается, что роль токсинов определяется их участием в инфекционном процессе [Черкес и др., 1987]. Однако существуют данные о выполнении токсинами и других функций. Среди них – защита их продуцента-хозяина от хищников в почвенных и водных биоценозах [Бухарин, Литвин, 1997]. В качестве примера можно назвать токсины сине-зеленых водорослей, защищающие их от поедания беспозвоночными и рыбами; антагонистические свойства токсинов в микробных сообществах; участие токсинов в авторегуляторных процессах в бактериальных популяциях и так далее.

Существует несколько определений бактериальных токсинов, отражающих как их роль в развитии заболеваний, так и их функциональные особенности. По определению B. Finlay и S. Falkow [1997], токсины – это секретируемые микроорганизмами протеины, как правило, в форме ферментов, которые убивают клетки макроорганизма, действуя в очень малых концентрациях. Ю.В. Вертиев [1996] расширил медицинское толкование функции бактериальных токсинов, определив их как «регуляторные элементы, действующие в клеточных системах макроорганизма вне их контроля и сдвигающие равновесие протекающих в них физиологических процессов».

Вполне естественно, что наиболее полно изучены токсины, образуемые возбудителями инфекционных заболеваний человека и сельскохозяйственных животных. Поэтому, учитывая универсальность бактерий, данные об особенностях их воздействия на высших позвоночных могут быть использованы и для получения представления о действии токсинов на организм рыб.

Согласно существующей классификации, бактериальные токсины подразделяются на эндо- и экзотоксины. *Экзотоксины* являются продуктами метаболизма микроорганизмов, которые выделяются в окружающую среду. Они имеют белковое происхождение, что обуславливает их малую устойчивость к внешним воздействиям. Экзотоксины характеризуются высокой токсичностью и выраженной специфичностью. Каждый вид токсина поражает определенные органы или ткани. Например, столбнячный токсин – нервную систему, а дифтерийный токсин – мышцы сердца и т.д. По своей биологической активности токсины неодинаковы: некоторые полностью определяют картину заболеваний (столбнячный, дифтерийный, ботулинический токсины), другие – вызывают нетипичные по клиническим проявлениям реакции (например, гемолитические токсины стафилококков, токсины кишечной палочки и др.). Действие *экзотоксинов* всегда имеет узкую направленность. Попадая в клетку путем эндоцитоза, экзотоксины растворяют цитоплазматическую мембрану, вызывают

необратимые изменения в клетке путем образования неполноценного внутриклеточного протеина и блокируют синаптические связи [Русский медицинский журнал, 1999].

Эндотоксины являются обычными структурными компонентами клеточных стенок многих грамотрицательных бактерий и представляют собой комплексы липополисахаридов с белками. Тесная связь эндотоксинов с клетками микроорганизма обуславливает их устойчивость к температурному и другим внешним факторам. Эндотоксины относительно неспецифичны, они вызывают во многом сходные клинические и патологические симптомы, характеризующие общую интоксикацию [Стейннер и др., 1979] (табл. 3).

Эндотоксины, в отличие от экзотоксинов, оказывают прямое повреждающее действие на клетки эндотелия. Но основным их механизмом является взаимодействие со специфическими видами клеток и системами макроорганизма. Они вызывают множество функциональных нарушений вследствие образования большого количества медиаторов, провоцирующих активацию фагоцитов, высвобождение гормонов в гипоталамусе, нарушения регуляции воспаления и другие патологические реакции. Клинически это выражается в появлении лихорадки, головокружениях, повышении проницаемости капилляров, кровоизлияниях, понижении артериального давления.

Большинство токсинов имеют двухкомпонентную структуру. Один компонент связывает токсин с поверхностью клетки хозяина и способствует его транспортировке в клетку. Второй компонент проявляет энзиматическую (токсическую) активность [Finlay, Falkow, 1997].

Таблица 3. Особенности экзо- и эндотоксинов
[по Черкес и др., 1979; Русский медицинский журнал, 1999]

Особенности	Токсины	
	экзотоксины	эндотоксины
Связь с микроорганизмом	Не являются структурными компонентами микробной клетки	Связаны с телом микробной клетки
Химическая структура	Белок	Липополисахаридно-протеиновый комплекс
Степень токсичности	Высокая	Слабая
Устойчивость к температуре	Термолабильны	Термостабильны
Специфичность действия	Избирательно действуют на органы и ткани	Вызывают общие явления интоксикации
Происхождение	Образуются в основном грамположительными бактериями	Образуются в основном грамотрицательными бактериями

По механизму действия токсины подразделяют на 5 типов [Smitte et al., 1999]:

1. *Токсины, повреждающие мембраны.* Они образуют вставку в клеточной мембране и формируют поры, приводящие к разрушению клетки за счет притока или оттока ионов. К токсинам этого типа относится α -гемолизин кишечной палочки, α -токсин золотистого стафилококка, аэролизин аэромонад и др.

2. *Токсины – ингибиторы белкового синтеза.* Субстратами для этих токсинов служат факторы элонгации и рибосомальная РНК [Езепчук, 1985]. Токсины, инактивируя их, подавляют синтез белка в клетках, что приводит к их гибели [Вертиев, 1996]. К этой группе относятся дифтерийный токсин, шига-токсин, образуемый шигеллами, кишечной палочкой; экзотоксин А, образуемый синегнойной палочкой.

3. *Токсины, генерирующие образование вторичных меседжеров (посредников).* Эти токсины воздействуют на функции отдельных белков клетки, не приводя к ее гибели, усиливая или искажая клеточную реакцию на внеклеточные сигналы [Smitt et al., 1999]. Например, ботулинический токсин вызывает протеолиз белков в нейронах, что приводит к предотвращению мышечных сокращений – возникновению вялого паралича [Halpern, Neale, 1995]. К этой группе принадлежат различные токсины, образуемые кишечной палочкой: цитотоксический некротизирующий фактор, термолабильный и температурно-стабильный токсин, а так же коклюшный дермoneкротический токсин, токсины ботулизма, холерный токсин и др.

4. *Токсины – активаторы иммунного ответа.* Они действуют непосредственно на Т-клетки иммунной системы, вызывая их пролиферацию (разрастание). Затем следует высвобождение γ -интерферона, факторов некроза опухолей [Schlivert, 1997]. Совместно эти соединения вызывают повышение давления, высокую температуру, диффузные кожные воспаления [Smitt et al., 1999]. Токсины этого типа характерны для случайных и факультативных паразитов. Это, например, энтеротоксины золотистого, пиогенного (*St. pyogenes*) стафилококков и др.

5. *Трехсоставные токсины.* К ним относятся структуры, имеющие три субъединицы. Одна из них участвует в связывании токсина с рецептором, а две другие проявляют различную энзиматическую (токсическую) активность в клетке хозяина. Интересно, что при экспериментальном заражении введение одного из компонентов такого токсина не приводит к каким-либо патологическим последствиям. Введение комбинации двух субъединиц сопровождается проявлением свойств, характерных для каждой из них. А введение трех компонентов – сопровождается проявлением синергического эффекта [Smitt et al., 1999].

Вопрос о происхождении токсинов вызывает много споров. Было об-

наружено сходство между токсинами и ферментами эукариотических клеток. Изучение микроорганизмов из отдаленных семейств и даже родов, занимающих различные экологические ниши и вызывающих различные инфекционные болезни, позволило выявить сходство по механизму действия. По мнению Ю.В. Вертиева [1996], бактериальные токсины, а также важнейшие участники процессов обеспечения жизнедеятельности животного организма – интерфероны, бактериоцины и гормоны имеют много общих свойств. Эти вещества синтезируются одним типом клеток в чрезвычайно низких концентрациях. Они обладают сходной молекулярной организацией и имеют сходные звенья молекулярного механизма действия. Кроме того, они обладают сходной кинетикой биологического эффекта, и, наконец, все эти вещества токсичны. Благодаря сходству описанных свойств, токсины в организме хозяина используют уже готовые структуры, которые участвуют в эндокринной, паракринной и синаптической сигнализации. Именно этими особенностями и обусловлена стремительность действия бактериальных токсинов и их высокая опасность.

* * *

Подводя итог обзору литературных и собственных экспериментальных данных, которые характеризуют особенности накопления и воздействия на живой организм и среду выращивания комплекса факторов, связанных с микробным заражением комбикормов, можно говорить о весьма значимой опасности его присутствия. Эта опасность многократно возрастает в специфических условиях интенсивного культивирования, следствием которых зачастую является усиление напряженности защитных сил выращиваемых рыб, снижение их резистентности, что сопровождается ограничением возможности реализации их продуктивного потенциала.

Приводимые в литературных источниках сведения по этим вопросам, относятся к рыбам различных видов, возраста, отдельным микроорганизмам и носят разрозненный характер. При этом многие вопросы, касающиеся реальной оценки действия на организм рыб микробного заражения кормов наиболее типичными представителями микрофлоры, остаются открытыми.

В этой связи, нам представлялось целесообразным получить более полное представление о влиянии микрофлоры комбикормов на организм рыб с тем, чтобы реально оценить степень опасности и особенности действия этого фактора. Результатам экспериментальных работ, в которых на единой методической основе была осуществлена оценка этого воздействия, посвящена следующая часть этой книги.

Глава 3

Особенности воздействия преобладающих форм микроорганизмов комбикормов на молодь осетровых рыб

3.1. Методы исследований

Особенности водной среды и отсутствие возможности индивидуально-го наблюдения, а так же продолжительный, хронический характер воздействия микробной контаминации кормов, приводят к тому, что видимая человеческому глазу реакция организма рыб на действие повреждающих факторов, не имеет столь выраженного характера, как у теплокровных животных – то есть повышения температуры, изменения поведения, потери аппетита и т.д. Симптомы хорошо заметны, когда уже становятся массовым явлением, при достаточно глубокой патологии. Поэтому для оценки влияния отдельных микроорганизмов комбикормов на физиологическое состояние органов, их систем, процессы метаболизма, рост и выживаемость рыб мы применили комплексный методический подход. Этот подход имеет ряд существенных преимуществ перед принятыми в ветеринарии косвенными методами для живых (осмотры, анализы крови, мочи и др.), или патолого-анатомическими (фиксирующие посмертные изменения) – для погибших животных. Сочетание результатов ростовых экспериментов с клиническим и микробиологическим обследованием рыб, а также изучение их химического состава, позволило получить комплексную оценку особенностей влияния на рыб отдельных микроорганизмов.

Изучали рыбоводно-биологические и физиологические характеристики и особенности обмена веществ. Учитывая ограниченность внешних проявлений и отсроченный характер реакции рыб на действие факторов, связанных с качеством кормов, параллельно с наблюдениями за выживаемостью и темпом роста рыб, особое внимание было уделено состо-

янию внутренних органов. Наибольший интерес в этом плане представляли органы, выполняющие детоксикацию и удаление ядов из организма, являющиеся важнейшими структурными элементами иммунной системы – печень, почки и кишечник. Оценку вели на основании визуально выявляемых изменений цвета, размеров и консистенции органов, характеризующих норму или степень развития воспалительного или патологического процесса. При этом использовали критерии нормы и патологии при различных заболеваниях, которые приводятся в работах по ихтиопатологии [А. Щербина, 1973; Мусселиус, 1983; Головина, 2003]. Картина патологических изменений дополнялась характеристикой качественных и количественных изменений в микробиоценозе кишечника и обсемененности внутренних органов. В связи с имеющимися в литературе данными о роли микроорганизмов, как возбудителей различных заболеваний людей, в ряде опытов, как продукт питания человека, исследовали мышцы.

Параллельно с этими наблюдениями проводилось исследование динамики химического состава тела рыб и направленности процессов биосинтеза. Физиолого-биохимическую характеристику обмена веществ проводили по схеме «питание-голодание» на основании изучения накопления у рыб массы, пластических веществ и энергии при питании. Выживаемость, степень регенерации внутренних органов, направленность обменных процессов при голодании позволяли характеризовать последствие и уровень негативного воздействия изучаемых факторов. На основании общей выживаемости рыб в процессе кормления и последующего голодания (соответствующего по количеству градусо-дней зимнему в естественных условиях), определяли их общую жизнеспособность.

В качестве модельного объекта была использована молодь стерляди – объекта 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 быстрорастущего организма к повреждающим агентам, вследствие незаконченного формирования защитных функций, а также возможностью 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.

Для моделирования реальных условий рыбоводных хозяйств в опытах использовали свежие отечественные комбикорма, полученные непосредственно от завода-изготовителя. В целях создания благоприятных усло-

вий питания подопытной молодежи применяли высокобелковые стартовые корма для осетровых, содержащие набор необходимых питательных веществ в следующем соотношении: влага – 6,3–8,7%, сырой протеин – 51–55%, сырой жир – 10–12%, энергия – 1,3–1,5 МДж. Какого-либо дополнительного обеззараживания кормов не проводили.

В связи с тем, что поражение корма микроорганизмами приводит к накоплению бактериальных клеток, продуктов их метаболизма, токсинов, изменяет химический состав и питательность корма, суммарный эффект комплексного воздействия (из-за сложности определения каждого элемента в отдельности) характеризовали как общую микробную обсемененность, выраженную в «колонии образующих единицах на 1 г корма» (КОЕ/г) по ГОСТ Р 51426-99.

При проведении опытов применяли экспериментальное заражение комбикормов в трех концентрациях. В качестве заражающих агентов использовали культуры микроорганизмов, выделенные непосредственно из комбикормов (*Bacillus mesentericus*, *Escherichia coli*, *Citrobacter sp.*), а также эталонные штаммы 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], «Методических указаниях по диагностике алиментарных токсикозов у рыб» [1999], а также собственных данных [Бурлаченко и др., 2002 а,б].

Для экспериментального заражения культуры микроорганизмов наращивали на плотных питательных средах (эритрит-агаре и среде Эндо) в течение двух суток в термостате при 25 и 37 °С соответственно. Затем делали смыв культур физиологическим раствором. Концентрацию микроорганизмов определяли по стандарту оптической мутности [Черкес и др., 1987] и проводили соответствующие разбавления. Растворы с культурами вносили в порции корма и тщательно перемешивали. Для определения уровня заражения проводили посевы этих кормов на те же питательные среды. Максимальная концентрация микроорганизмов составляла – 10^9 КОЕ/г, сверхвысокие концентрации не применяли. В качестве контроля использовали тот же комбикорм, без дополнительного внесения культур микроорганизмов.

Химический статус рыб определяли по содержанию в организме воды и пластических веществ. Содержание воды – путем высушивания образцов до абсолютно сухого веса при 105 °С. Определение общего азота – колориметрическим методом Несслера с некоторыми модификациями. Сырой протеин (общее количество азотистых соединений) рассчитыва-

ли по содержанию общего азота, путем умножения его на коэффициент 6,25. Содержание сырого жира оценивали гравиметрическим способом по его общему количеству в эфирных вытяжках, после экстракции в аппаратах Сокслета. Минеральные вещества определяли методом сухого озоления в муфельной печи при температуре около 500°C. В связи с тем, что на долю углеводов приходится основная часть остатка изучаемых органических веществ, а также технической сложностью определения в условиях проведенных опытов всего комплекса углеводистых соединений, их содержание было рассчитано по разности. Валовую энергию устанавливали расчетным способом, используя коэффициенты Рубнера. Определения проводились по прописям, изложенным в методическом руководстве М.А. Щербины [1983].

Темп роста рассчитывали по формуле:

$$CW = [2 (M_t - M_0) / (M_t + M_0) \cdot t] \cdot 100,$$

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

Накопление и утилизацию веществ и энергии – интегральные показатели, характеризующие обменные процессы, рассчитывали в соответствии с формулой, предложенной М.А. Щербиной [1983]:

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

где N – накопление веществ или энергии в г, ккал на 100 г первоначальной массы рыб; M_0 , M_t и P_0 , P_t – масса и содержание веществ или энергии в теле рыб в начале и конце экспериментов, г, % или ккал/100 г. Для большей наглядности, данные по накоплению и утилизации веществ и энергии были пересчитаны по отношению к контрольному варианту, значения показателей в котором принимали за 100%. Полученные данные, представленные в виде диаграмм, позволяют получить четкое представление о влиянии исследуемого фактора, на фоне контрольного варианта, где он отсутствует.

Принимая во внимание тот факт, 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 ..., ТУ, 2002].

Все рыбоводные эксперименты были выполнены совместно с К.Б. Аветисовым. Клинико-морфологическая оценка состояния внутренних органов и их микробной обсемененности – совместно с сотрудниками лаборатории ихтиопатологии ВНИИПРХ канд. биол. наук Л.И. Юхименко и

канд. биол. наук Л.И. Бычковой [Бурлаченко и др., 2001, Бурлаченко и др., 2002а, б; Бурлаченко и др., 2006; Bourlatchenko et al., 2005]. Экспериментальное заражение комбикормов проводили в лаборатории ихтиопатологии ВНИИПРХа и Ростовском центре по сертификации НП РЦС «Донтест».

Комплекс методов, описанный выше, позволил на единой методической основе охарактеризовать особенности воздействия выявленных ранее основных групп микроорганизмов комбикормов на рост, физиологическое состояние и обмен веществ молоди осетровых рыб.

3.2. Энтеробактерии (сем. *Enterobacteriaceae*)

Изучению воздействия на рыб бактерий этой группы было уделено особое внимание. Как было установлено ранее, на долю энтеробактерий приходится около четверти микроорганизмов, встречающихся в комбикормах. Кроме того, они являются возбудителями ряда заболеваний рыб – протейной инфекции, цитробактериоза и др., связанных с питанием комбикормами, зараженными бактериями этой группы [Жезмер, 1988, 1991; Бычкова, 1995; Ларцева, 2003; Ожередова 2006]. Широкое распространение энтеробактерий в воде, воздухе, а также внутренней среде живых организмов, их способность инфицировать комбикорма, вызывая заболевания рыб, или же просто сохраняться в живых рыбах или рыбной продукции, являясь при этом возможным источником пищевых токсикоинфекций человека, послужили основанием для подробного изучения их воздействия. В качестве представителей энтеробактерий были выбраны кишечная палочка (*Escherichia coli*), протей (*Proteus vulgaris*) и цитробактер (*Citrobacter* sp.).

3.2.1. Кишечная палочка (*Escherichia coli*)

Кишечная палочка (*E. coli*) – это типичный представитель 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 способны активно расщеплять пищевые субстраты различной природы, тем самым участвуя в пищеварении макроорганизма. Продуктом жизнедеятельности кишечной палочки являются некоторые витамины (в частности, ряд витаминов группы В и витамин К), которые также используются организмом хозяина. Она обладает антагонистическими свойствами по отношению к ряду патоген-

ных микроорганизмов, защищая макроорганизм от их вторжения. Однако при снижении резистентности последнего, нарушениях пищевого режима, инфекционных заболеваниях, кишечные эшерихии могут проникать в другие органы и ткани, проявляя там свои патогенные свойства и вызывая заболевания [Коляков, 1957; Черкес и др., 1987]. У людей, по данным Н.В. Сафоновой и соавторов [1991], на долю этого возбудителя приходится около 10% всех кишечных заболеваний. У теплокровных животных роль кишечной палочки является определяющей в возникновении неинфекционного расстройства пищеварения новорожденных поросят и колибактериозов у птиц [Малик, Панин, 2001; Панин, 2002].

Детальных сведений о заболеваниях рыб, связанных с кишечной палочкой, в доступной нам литературе найти не удалось. В то же время, в условиях аквакультуры кишечная палочка часто обнаруживается в комбикормах, среде и организме рыб [Ларцева, 1997; Бычкова, 2002; Котлярчук 2004]. Можно полагать, что накопление кишечной палочки в среде культивирования способно вызывать инфицирование выращиваемых рыб, так как благодаря своим малым размерам эти бактерии способны проникать в организм через жабры и поступать далее в кровь [Грищенко, Рудиков, 1985]. В этой связи, весьма важным является и тот факт, что в водной среде кишечная палочка сохраняет свою жизнеспособность от 19 до 157 суток [Kavka, 1984].

С этих позиций представлялось важным исследовать характер воздействия *E. coli* на организм рыб.

Изначальная фоновая обсемененность использованного в опытах корма составляла $2,0 \times 10^6$ КОЕ/г, в том числе 85% приходилось на бактерии группы кишечной палочки (БГКП), 7% – споровые палочки, 9% – флавобактерии. Три партии корма были подвергнуты экспериментальному заражению различными концентрациями ассоциации бактерий группы кишечной палочки, выделенной из этого же корма. После этого, фактический уровень их обсемененности кишечной палочкой 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 (2×10^6 КОЕ/г), был почти на порядок выше допустимых значений присутствия микроорганизмов в комбикормах. Это свидетельствовало о нарушениях контроля микробной обсемененности корма на заводе-изготовителе.

Опыты проводили на молоди стерляди начальной массой 6,5–7,5 г. Температура воды колебалась около $23,7^\circ\text{C}$, продолжительность периода кормления составила 60 суток, период голодания – 50 суток (средняя температура $19,2^\circ\text{C}$). Схема опыта и его рыбоводные результаты приведены в табл. 4.

Можно видеть, что в конце этой серии экспериментов различия в средней массе молоди стерляди между вариантами находились в преде-

лах ошибки средней, но по мере возрастания степени обсемененности корма проявилась явная тенденция к торможению роста. Это подтверждается сокращением показателей среднесуточного прироста от 7% в варианте с наименьшей обсемененностью, до 23 % – с наибольшей. Выживаемость рыб во всех вариантах была выше нормативной для исследуемой весовой группы (80%) и одинаковой с контролем, за исключением, варианта с максимальной степенью заражения корма кишечной палочкой (ниже на 6%).

Таблица 4. Результаты выращивания молоди стерляди на комбикормах с различной степенью заражения кишечной палочкой

Варианты кормления; уровень обсемененности кормов <i>E. coli</i> , КОЕ/г	Средняя масса рыб, г		Прирост			Выжива- емость, %
	начало опыта	конец опыта	абсолют- ный, г	среднесуточный		
				CW, %	% к конт- ролю	
2,0×10 ⁶ (контроль)*	7,1±2,5	24,1±6,4	17,0	1,6	100	93
1,9×10 ⁷	6,0±1,6	18,4±6,6	12,4	1,5	93	93
3,8×10 ⁸	7,6±2,3	20,4±5,1	12,8	1,3	83	93
6,5×10 ⁹	6,5±1,7	15,9±3,8	9,4	1,2	77	87

*Естественный фон обсеменения *E. coli*.

Клинико-морфологическое обследование внутренних органов стерляди в начале опытов свидетельствовало об их относительном благополучии (табл. 5). Незначительные нарушения структуры печени и небольшие изменения толщины слизистой оболочки кишечника были отмечены у четверти рыб. Почки были в норме. Известно, что в норме печень имеет коричневый цвет и плотную консистенцию, желчный пузырь – темно-зеленый, почки должны иметь четкую границу и, так же как селезенка, быть темно-вишневыми [Евдокимова, 2003; Головина, 2003].

Имевшие место в начале опыта изменения цвета и структуры печени, почек и кишечника к концу периода питания стали более заметными у рыб всех вариантов, в том числе и в контроле, где корм был в наименьшей степени обсеменен кишечной палочкой.

К концу экспериментов почти у всех рыб печень приобрела серый или серо-глинистый цвет и рыхлую, легко разрушающуюся при прикосновении структуру. Почки были заметно увеличены, темного цвета, часто наполнены кровью, частично некротизированы.

Таблица 5. Признаки патологий внутренних органов молоди стерляди после питания в течение 60 суток комбикормами с различной степенью заражения кишечной палочкой (*E. coli*)

Варианты кормления, уровень обсемененности кормов <i>E.coli</i>	Количество рыб с патологиями внутренних органов, % к общему количеству подопытных рыб					
	печень		почки		слизистая кишечника	
	цвет	структура	цвет	структура	истончение	нарушения секреции
<i>До начала опыта</i>						
	0	25	0	0	25	0
<i>После питания</i>						
Контроль* ($2,0 \times 10^6$)	80	80	80	100	100	30
$1,9 \times 10^7$	50	100	50	100	100	50
$3,8 \times 10^8$	60	100	100	100	100	80
$6,5 \times 10^9$	100	100	100	100	100	80

*Фоновый уровень обсеменения корма *E.coli*

В различных вариантах опыта нарушения структуры печени и почек – основных органов, паренхиматозные клетки которых выполняют функцию детоксикации чужеродных веществ, были обнаружены в 100% случаев. Отмеченные изменения цвета и структуры паренхиматозных органов являются отражением различных этапов течения воспалительных процессов. Известно, что на начальных этапах для воспаления характерно усиление циркуляции крови, повреждения 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 и угнетением защитных функций [Коляков, 1952; Журавель и др., 1968; Schäperclaus, 1979; Евдокимова, 2003].

За редким исключением можно было отметить прямую связь между уровнем заражения корма и изменениями в состоянии паренхиматозных органов. Выраженность патологических процессов у рыб из варианта с наименьшей степенью заражения корма (контроль – естественный фон обсемененности *E. coli*), была несколько ниже, чем в других вариантах. Все вышеперечисленные признаки являлись проявлением патологии и свидетельствовали о неблагоприятном состоянии организма. Сходные явления были обнаружены и В. Ю. Жезмер с соавторами [1991] при поражении канального сома протеем (*Pr. vulgaris*).

Несомненный интерес представляет бактериологический анализ внутренних органов. Он показал, что увеличение обсемененности корма приводит к бактериальному заражению печени и почек с преобладанием кишечной палочки (табл. 6).

Таблица 6. Уровень заражения и микробиоценоз внутренних органов рыб после питания кормами, обсемененными кишечной палочкой

Варианты кормления, уровень обсеменен- ности кормов <i>E. coli</i>	Доля рыб (%)с контаминированными органами (более 10 колоний)				Микробиоценоз кишечника
	печень		почки		
	%*	микробио- ценоз**	%*	микробио- ценоз**	
До начала опыта					
	0	<i>Acinetobacter</i>	0	0	<i>E. coli</i> <i>Citrobacter</i> , <i>A. sobria</i>
После питания					
Контроль (2,0×10 ⁶)	0	<i>E. coli</i> , <i>Flavobacterium</i>	0	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>St. epidermidis</i> , <i>Flavobacterium</i>
1,9×10 ⁷	0	<i>E. coli</i>	0	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> , <i>Moraxella</i>
3,8×10 ⁸	0	<i>E. coli</i> <i>Bac. sp.</i> , <i>Moraxella</i>	60	<i>E. coli</i> , <i>Bac. sp.</i>	<i>E. coli</i>
6,5×10 ⁹	0	<i>E. coli</i> , <i>Moraxella</i>	70	<i>E. coli</i> , <i>A. sp. 5</i> , <i>Moraxella</i>	<i>E. coli</i> , <i>Moraxella</i>

*Не включены рыбы с единичными колониями во внутренних органах.

** Доминирующие микроорганизмы, в том числе в случаях низкой (<10 колоний) обсемененности.

Почки были поражены у большего количества рыб, чем печень. Этот факт является косвенным подтверждением данных В.Р. Микрякова [1991], который установил с помощью радиоактивного мечения бактерий, вводимых рыбам, более активное участие почек в процессе удаления из организма чужеродных микроорганизмов.

Следует отметить, что уровень обсемененности почек возрастал по мере увеличения степени заражения корма. Подобное явление, согласно мнениям А.Е. Каховского [1991] и Л.Н. Юхименко с соавторами [1987], указывает на напряженное состояние иммунитета рыб и его снижение под действием бактериального прессинга. Оно проявляется в случае, если агрессивность окружающей среды превышает резистентность организма. В наших условиях снижению резистентности рыб способствовали также и изменения в микробиоценозе кишечника, которые выразились в сужении спектра видов кишечной флоры и переходе микроорганизмов в ослабленную форму с ярко выраженными паразитическими свойствами, конкурентными для макроорганизма.

Кишечники рыб за период экспериментов также претерпели патологические изменения (см. табл. 5). У 100% рыб из всех вариантов их стенки истончились, уменьшилось образование слизи. Наблюдаемое истончение слизистой оболочки указывает на сокращение поверхности кишечного эпителия, абсорбирующего питательные вещества, что неизбежно влечет за собой нарушение процессов переваривания и усвоения пищи. Эти изменения приводят не только к нарушениям заключительных этапов расщепления и всасывания пищи, но и открывают доступ во внутреннюю среду организма болезнетворным бактериям [Уголев 1985, 1992; Кузьмина, 2005]. Что и произошло в условиях наших опытов.

Исследования микрофлоры кишечников позволили выявить определенные сдвиги в ее составе. Место бактерий родов *Aeromonas*, *Citrobacter* заняли *E.coli*, преимущественно в ослабленной R-форме. Как указывалось выше, сужение спектра видов кишечной микрофлоры, свидетельствует о существенном ограничении ее функционального значения. Обнаруженный переход кишечной палочки в R-форму, которая характеризуется ослабленными ферментативными свойствами, является свидетельством прекращения ее активного участия в разложении и усвоении непереваренных веществ кишечного содержимого и ее переходу к конкуренции с макроорганизмом, т.е. к паразитированию. Преобладание в кишечной микрофлоре бактерий с ослабленными ферментативными свойствами указывает на начало дисбактериоза.

Согласно литературным данным, у теплокровных животных уменьшение секреции слизи (муцина) на поверхности слизистой кишечника, ограничивает пищевой потенциал нормальной микрофлоры, в отличие от условно-патогенных микроорганизмов, использующей муцин в качестве источника углерода и энергии. Отмечено, что в условиях нехватки пищи количество бифидо- и лактобактерий в кишечнике заметно снижается, при возрастании доли условнопатогенных (эшерихий, сальмонелл, стафилококков). При этом преобладают формы со сниженной ферментативной активностью, что свидетельствует об усилении их паразитических свойств [Панин и др., 2002]. Как видно из полученных результатов, у молоди стерляди наблюдались аналогичные явления. Следствием чего было угнетение роста рыб.

Анализ представленных материалов дает основание полагать, что именно высокая обсемененность кормов бактериями группы кишечной палочки – единственного переменного фактора в условиях экспериментов – вызвала у молоди стерляди перечисленные патологические сдвиги. Они выразились в изменении цвета и структуры паренхиматозных органов, истончении стенок, сокращении секреции слизи в кишечнике, изменениям в составе его микробиоценоза. Нарушение целостности слизистой оболочки кишечника привели к проникновению кишечной микрофлоры во внутренние органы и их обсеменению кишечной палочкой.

В связи с вышеописанными проявлениями патологии и наряду со снижением интенсивности роста молоди, представлялось целесообразным выяснить, каково влияние обсемененности комбикормов кишечной палочкой на обмен веществ у рыб. Данные о химическом составе рыб в различные периоды эксперимента приведены в табл. 7.

Таблица 7. Химический состав тела молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными кишечной палочкой, и последующем голодании

Варианты кормления; уровень обсеменен- ности кормов <i>E. coli</i> , КОЕ/г	Содержание веществ, % сырой ткани					Энергия, ккал/ 100 г	
	Вода	Сухое вещество	Органические вещества				Минераль- ные веществ- ва (сырая зола)
			сырой протеин	сырой жир	углеводы (по разности)		
<i>До начала кормления</i>							
	82,2	17,8	11,2	1,6	1,6	3,4	85,8
<i>После кормления</i>							
2,0×10 ⁶ (контроль)*	77,1	22,9	14,3	4,3	1,3	3,0	127,8
1,9×10 ⁷	79,5	20,5	13,4	1,6	0,8	4,7	94,9
3,8×10 ⁸	78,9	21,1	13,3	2,6	1,5	3,7	107,0
6,5×10 ⁹	79,9	20,1	13,5	2,2	0,7	3,7	100,8
<i>После голодания</i>							
2,0×10 ⁶ (контроль)*	78,6	21,4	13,6	1,9	1,5	4,4	101,9
1,9×10 ⁷	82,9	17,1	10,9	0,8	1,5	3,9	76,0
3,8×10 ⁸	82,7	17,3	11,6	0,9	1,1	3,7	79,3
6,5×10 ⁹	82,9	17,1	10,7	1,2	1,3	3,9	77,9

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

Из таблицы видно, что по сравнению с молодью, получавшей комбикорма с наименьшей степенью заражения, у рыб других вариантов произошло обводнение тканей, а содержание в теле рыб сухого вещества снизилось на 8–12%. В основном это явилось следствием значительного сокращения уровня общих липидов (на 40–63%) и заметно меньшего – белка (около 7%). При этом, обеспеченность энергией организма молоди из разных вариантов была на 15–25% ниже, чем в контрольном варианте.

В связи с тем, что химический состав указывает, главным образом, на соотношение основных групп питательных веществ в организме рыб в конкретный момент времени, а в ходе экспериментов масса молоди из

различных вариантов изменялась неравномерно, для получения интегральной характеристики, отражающей количественные изменения в метаболизме рыб, были рассчитаны показатели накопления веществ и энергии за весь период опыта (табл. 8).

Таблица 8. Накопление массы, веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания в течение 60 суток комбикормами, зараженными кишечной палочкой, и их утилизация при последующем голодании

Варианты кормления; уровень обсеменности кормов <i>E. coli</i> , КОЕ/г	Масса	Вещества						Энергия	
		Вода	Сухое вещество	Органические вещества			Минеральные вещества (сырая зола)	общая, ккал/ 100 г	белка, % общей
				сырой протеин	сырой жир	углеводы (по разности)			
Накопление, г/100 г массы до питания									
2,0×10 ⁶ (контроль)*	240,4	180,2	60,2	37,5	13,0	2,9	6,8	349,4	61,2
1,9×10 ⁷	207,5	162,3	45,2	30,0	3,2	0,9	11,1	205,2	83,3
3,8×10 ⁸	167,2	128,6	38,6	24,3	5,3	2,5	6,5	199,4	69,5
6,5×10 ⁹	144,6	113,2	31,4	21,8	3,8	0,1	4,7	160,8	77,3
Утилизация, г/100 г массы до голодания									
2,0×10 ⁶ (контроль)*	8,3	5,0	3,3	1,8	2,6	+0,1**	+1,0	35,4	29,0
1,9×10 ⁷	10,8	5,5	5,3	3,7	0,9	+0,5	1,2	27,6	76,1
3,8×10 ⁸	21,5	14,0	7,5	4,2	1,9	0,6	0,8	44,5	54,2
6,5×10 ⁹	25,8	18,4	7,4	5,6	1,5	+0,5	0,8	43,0	74,1

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

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

Анализ данных, представленных в табл. 8, позволил выявить тенденцию к снижению накопления сухого вещества в теле рыб по мере возрастания зараженности кормов. Аналогичную направленность имели процессы накопления в организме рыб белка и энергии (рис. 5).

Наиболее значимым было угнетение синтеза липидов и углеводов – основных источников энергии. По мере возрастания уровня обсеменения отмечено обезвоживание организма молоди на 10–37%, угнетение синтеза белка на 20–42%, липидов – на 59–75%, а также существенное (до 41–54%) сокращение обеспеченности организма энергией. Это дает основание говорить о ее преимущественном использовании для нейтрализации действия токсинов.

Более полно охарактеризовать изменения, произошедшие у молоди стерляди под воздействием различных уровней загрязнения кормов кишечной палочкой, позволили результаты экспериментального голодания. Для этого кормление подопытных рыб было прекращено и их выдерживали в течение 50 суток при температуре 19,2 °С. По количеству градусо-дней (960) это приблизительно соответствует периоду зимнего голодания молоди в естественных условиях (табл. 9).

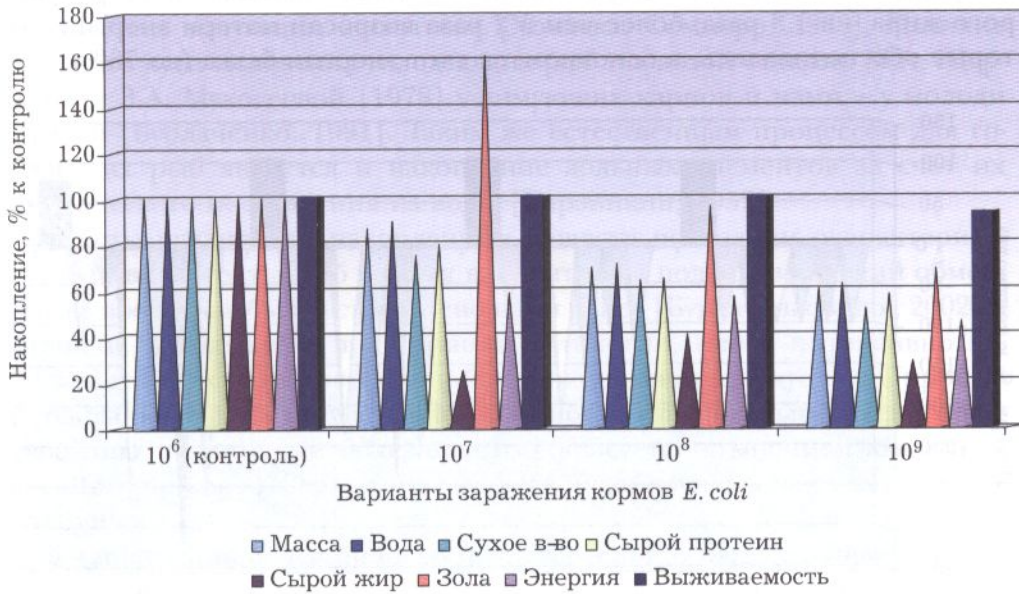


Рис. 5. Выживаемость, накопление массы, веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными кишечной палочкой (% к контролю)

Таблица 9. Выживаемость и изменения массы молоди стерляди за период экспериментального голодания

Варианты кормления; уровень обсемененности кормов <i>E. coli</i> , КОЕ/г	Средняя масса рыб, г		Потери массы		Выжива- емость, %
	начало голодания	окончание голодания	абсолют- ные, г	относитель- ные, %	
2,0×10 ⁶ (котроль)*	24,1±6,4	22,1±6,9	2,0	8,3	75
1,9×10 ⁷	18,4±6,6	16,4±5,7	2,0	10,9	80
3,8×10 ⁸	20,4±5,1	16,0±6,0	4,4	21,6	80
6,5×10 ⁹	15,9±3,8	11,8±5,2	4,1	25,8	60

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

Согласно данным табл. 9, за период голодания смертность рыб достигла 20–25%, а в варианте наибольшего заражения погибло 40 %.

Расчеты утилизации веществ за этот период у выживших рыб (см. табл. 8, рис. 6) показали, что между степенью заражения комбикормов *E. coli* и тратами веществ и энергии при голодании, а также потерями массы существует прямая зависимость. При голодании рыб, по мере увеличения заражения корма, в 2–3,5 раза возросли потери массы, а воды – в 4 раза. Роль белка в поддерживающем обмене усилилась в 3,8 раз, сырого жира – в 1,3 раза; более чем в 2 раза возросли потери энергии, которые обеспечивались, в основном, за счет энергии белка (до 76%).

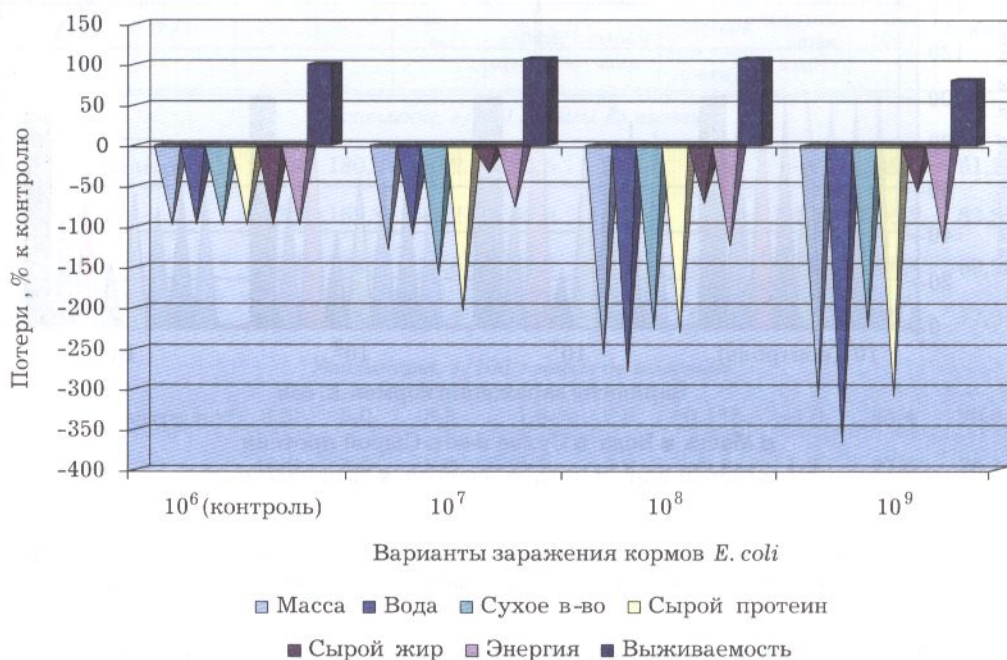


Рис. 6. Выживаемость, утилизация при голодании массы, веществ и энергии в теле молоди стерляди, питавшейся комбикормами, зараженными кишечной палочкой (% к контролю)

Таким образом, обсеменение комбикорма кишечной палочкой (от $2,0 \times 10^6$ до $6,5 \times 10^9$ КОЕ/г) привело к резкому изменению хода обменных процессов у молоди стерляди. В поддерживающем обмене при голодании, по мере увеличения степени обсемененности корма, возрастал расход белка и снижалось участие липидов. При этом, траты энергии обеспечивались, в значительной мере, за счет белка. Все описанное свидетельствует о недостаточном накоплении энергии в организме молоди стерляди при питании комбикормами, зараженными *E. coli*.

Одновременно с интенсивным расходом белка и липидов у молодежи двух вариантов, получавшей менее зараженные корма, было отмечено новообразование углеводов, а в контрольном варианте – накопление минеральных элементов.

Регистрируемые при голодании накопление или минимальные траты углеводов, несмотря на их активное участие в обменных процессах, обусловлены их постоянным новообразованием из белков и липидов посредством глюконеогенеза. Этот естественный процесс свойственен всем голодающим или зимующим животным [Хочачка, Соммеро, 1988]. Наличие подобного пути снабжения голодающих рыб глюкозой описано М.А. Щербиной и З.А. Мукосеевой [1978] у зимующих карпов и нами – у молодежи кефалей [Бурлаченко, 1991]. Таким же естественным процессом для голодающих рыб является и накопление зольных элементов за счет их осмотического поступления из воды [Карзинкин, 1952].

Расчеты утилизации накопленных веществ позволили охарактеризовать основные траты рыб разных вариантов на поддерживающий обмен. В то же время, как было установлено нами ранее [Бурлаченко и др., 2002б], организм, находящийся в состоянии патологии, менее интенсивно накапливает вещества и энергию, и более экономно расходует их в процессе голодания. В этом случае, он вместо гибели приспосабливается к существованию в состоянии болезни, что согласуется с мнением академика В.А. Шатерникова [1985], наблюдавшего подобные явления у высших позвоночных.

Для получения более полного представления о направленности обмена веществ мы рассчитали остаточные (от накопленных при питании) количества веществ, сохранившихся у рыб после голодания.

На рис. 7, где приведена диаграмма, характеризующая эти показатели, четко видна прямая зависимость между увеличением степени обсемененности кормов кишечной палочкой и снижением уровня обеспеченности организма рыб запасом пластических веществ и энергии после окончания голодания.

В вариантах более высокого заражения кормов кишечной палочкой сохранность белка и липидов была крайне низкой, что нашло свое отражение и в обеспеченности молодежи энергией. Её запасы сократились на 30–40%. Это свидетельствовало об усилении процессов разложения веществ и повышении расхода энергии у рыб, обусловленного токсическим действием метаболитов кишечной палочки, по мере возрастания степени обсемененности кормов.

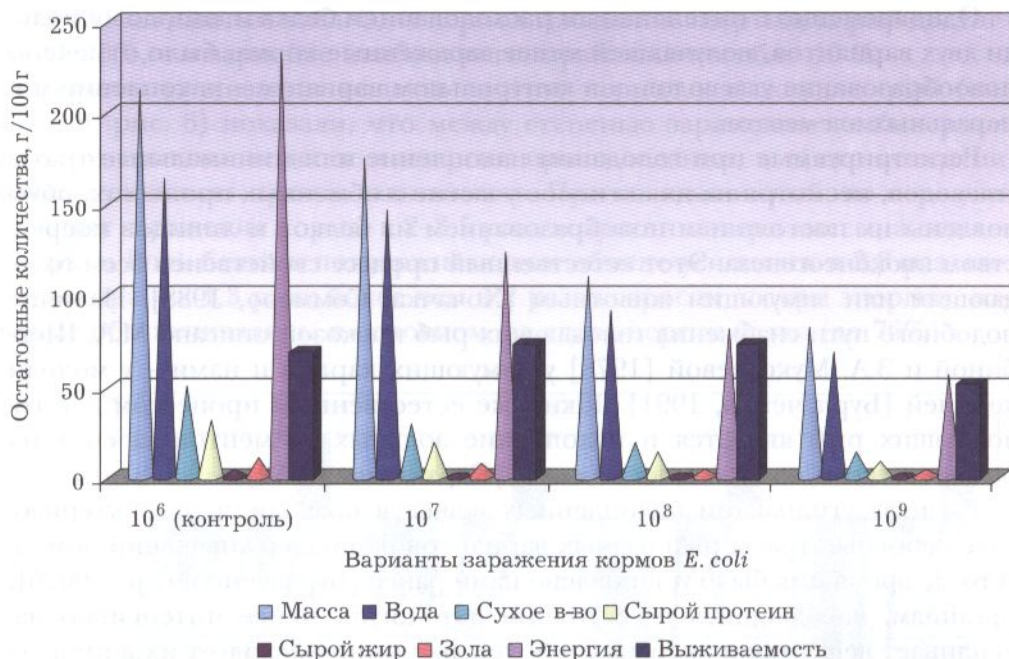


Рис. 7. Остаточные количества веществ и энергии, сохранившихся после голодания, от накопленных в теле молоди стерляди при питании кормами, зараженными кишечной палочкой (г/100 г начальной массы)

Результаты выполненных исследований дали основание сделать вывод о негативном воздействии кишечной палочки и ее метаболитов, присутствовавших в комбикормах, на обмен веществ, состояние внутренних органов, рост и выживаемость молоди стерляди. Важнейшим фактом, характеризующим развитие патологии алиментарного происхождения, явилось зафиксированное у всех осмотренных рыб истончение стенок слизистой оболочки кишечника и сокращение отделения кишечной слизи, а также проявление признаков дисбактериоза и обсеменение кишечной палочкой почек, стерильных в начале опыта.

Между уровнем бактериальной обсемененности корма и степенью угнетения синтеза белка, липидов, сокращением накопления энергии и остающимися после голодания резервами, выявлена достаточно четкая прямая связь. Наблюдаемые изменения в метаболизме были обусловлены смещением направленности биосинтетических процессов, развитием в организме воспалительной реакции в ответ на действие токсических веществ корма.

Таким образом, первый же пример многофакторного исследования воздействия микроорганизмов комбикормов на рыб позволил сделать вывод о том, что, несмотря на внешнее благополучие (достаточно высокая выживаемость и темп роста), под действием кишечной палочки и ее метаболитов внутри организма рыб происходят значительные изменения. Подобные изменения являются отражением классической картины бактериального заболевания пищевого происхождения. В условиях выполненных экспериментов кишечные палочки, попавшие в организм с кормом, вызвали нарушения микробиоценоза кишечника. Нормальная микрофлора была вытеснена кишечной палочкой, которая к тому же приобрела паразитические свойства. Это сопровождалось морфологическим и функциональными изменениями в кишечнике (истончение стенок, нарушение отделения слизи) и снижением его защитной (барьерной) функции. Затем через повреждения в стенках слизистой, последовало проникновение кишечной палочки во внутреннюю среду организма рыб, ее накопление в печени и почках, что, в свою очередь, способствовало их дегенеративным изменениям. В условиях наших экспериментов они проявились в усиленном кровенаполнении или некрозе почек, разрушении ткани или изменении цвета печени, анемии почек и селезенки.

Сопровождавшее эти изменения снижение активности печени и почек замедлило разрушение токсинов и выведение продуктов метаболизма. Это явление, наряду с нарушениями процессов пищеварения в кишечнике, в связи уменьшением поверхности слизистой оболочки, дисбактериозом и вызываемым этим ухудшением переваривания и всасывания пищи, отразилось и на интенсивности биосинтетических процессов, которые проявились в угнетении синтеза белка и липидов, сокращении накопления энергии. Благодаря адаптационным возможностям организма молоди, эти процессы внешне отрицательно на рыбах не сказались. Однако имитация «зимнего» голодания показала неспособность большей части молоди, питавшейся зараженными кормами, пережить столь обычный этап в жизни рыб, как зимовка.

На этом фоне важно было выяснить, насколько полученные результаты являются типичными и могут ли другие микроорганизмы оказывать подобное воздействие.

3.2.2. Протей (*Proteus vulgaris*)

Протей, наряду с кишечной палочкой, является не менее значимым и распространенным представителем энтеробактерий. Род *Proteus* – «изменячивый» (лат.) включает многообразную группу бактерий, обладающих значительными адаптационными возможностями, которые позволяют им легко приспосабливаться к условиям внешней среды. Они часто контаминируют комбикорма и продукты питания человека.

Протеи устойчивы к действию низкой температуры, высушиванию, способны долгое время сохраняться на различных субстратах. К биохимическим свойствам протеев относится их гемолитическая, протеолитическая и лецитиназная активность, что, как правило, свойственно патогенным микроорганизмам. Кроме того, они обладают способностью продуцировать сильнодействующий эндотоксин – энтерогемолизин, вызывающий разрушение эритроцитов.

Протеи характеризуются ярко выраженными антагонистическими свойствами по отношению к различным представителям микрофлоры кишечника, а также способностью к активной адгезии (прикреплению) к слизи, при этом они устойчивы к большинству антибиотиков [Черкес и др. 1987; Миронюк и др., 2000; Urbanova et al., 2000; Ларцева, 2003].

Бактерии группы протеев вызывают у человека пищевые токсикоинфекции, дисбактериозы кишечника, гнойные и септические процессы в полостных органах, заболевания мочевыводящих путей [Табидулин и др., 1985; Байрамова, 1989; Watanakunakorn et al., 1994].

У рыб, так же как и у высших позвоночных животных, протеи являются возбудителями инфекционных заболеваний, как в естественных условиях, так и при культивировании. Известны сведения об инфицировании протеем волжских и каспийских промысловых рыб различных видов, особенно придонных [Ларцева, 1998; Ларцева и др., 2002]. Та же группа исследователей [Ларцева и др., 1988] сообщает о протейной инфекции сазана в авандельте Волги. Заболевание, по мнению авторов, было связано с маловодьем, высокой концентрацией рыб в этой зоне, заиленностью и фекальным загрязнением, источником которого было обилие птиц. Л.И. Бычковой с соавторами [1995] описана массовая гибель форели в садках, вызванная присутствием высоковирулентного штамма протеев. В системе с замкнутым циклом водоснабжения были отмечены заболевание и гибель канального сома [Жезмер и др., 1991]. В последних двух случаях этиологическая роль протеев была подтверждена гибелью здоровых рыб при проведении их экспериментального заражения возбудителями протеев, выделенными от заболевших рыб.

В связи с высокой патогенностью протеев для рыб и человека, было предложено внести бактерии этой группы в перечень санитарных ихтиопатологических показателей при оценке воды и грунта водоемов, качества рыбной продукции, кормов [Радин, 1986; Бычкова и др. 1995].

Все эти свойства протеев, а также имеющиеся сведения об их этиологической роли в развитии заболеваний рыб, литературные и собственные данные, послужили основанием для подробного изучения влияния на рыб заражения им комбикормов.

В опытах использовали молодь стерляди начальной массой около 7 г. Температура воды во время опытов была в среднем 21,7 °С. Период кормления продолжался 55 суток.

Фоновая обсемененность экспериментального корма составляла $7,4 \times 10^4$ КОЕ/г корма. Для заражения использовали эталонный штамм *Proteus vulgaris*. Реальная обсемененность комбикормов протеом, в условиях экспериментов, составила $6,0 \times 10^4$, $8,3 \times 10^6$, $1,0 \times 10^8$ КОЕ/г. Контролем служил тот же комбикорм, который, в целях сохранения равных условий эксперимента так же, как и остальные опытные партии, был подвергнут увлажнению физиологическим раствором, не содержащим заражающего агента.

Схема опытов и их рыбоводные результаты приведены в табл. 10.

Из данных таблицы видно, что темп роста рыб во всех вариантах этой серии опытов, включая контроль, был невысоким. При нормальных условиях содержания, которые поддерживались на протяжении всего периода экспериментов, это могло свидетельствовать, с одной стороны, о неполном соответствии корма пищевым потребностям рыб, с другой – о неудовлетворительном состоянии их здоровья или же о низком качестве подопытной молодежи.

Таблица 10. Результаты выращивания молодежи стерляди на комбикормах с различной степенью заражения протеом

Варианты кормления; уровень обсемененности кормов <i>Pr. vulgaris</i> , КОЕ/г	Средняя масса рыб, г		Прирост		Выживаемость, %
	начало опыта	конец опыта	абсолют- ный, г	среднесуточ- ный, СВ, %	
Контроль	7,5±1,6	14,4±3,6	6,9	1,2	83
$6,0 \times 10^4$	7,4±1,5	11,8±2,6	4,4	0,9	93
$8,3 \times 10^6$	7,4±1,6	13,1±3,1	5,7	1,0	91
$1,0 \times 10^8$	7,1±1,6	12,9±3,1	5,8	1,1	39

Масса рыб в конце опыта составляла от 11,8 до 14,4 г, без статистически значимых различий между вариантами. Выживаемость молодежи в контрольном варианте была даже ниже на 8–10%, чем в двух первых вариантах. Визуальные симптомы негативного воздействия проявились у молодежи стерляди уже в варианте с наиболее низким обсеменением корма – 6×10^4 КОЕ/г. Они характеризовались максимальным проявлением торможения роста на 25%. В варианте с наивысшим заражением корма (10^8 КОЕ/г) выживаемость рыб составила всего 39%. При этом, возможность случайной гибели рыб по техническим причинам полностью исключалась.

В табл. 11 приведены сведения о состоянии внутренних органов стерляди в начале и конце экспериментов. Обследованию были подвергнуты 10% рыб, использованных в опытах.

Таблица 11. Признаки патологий во внутренних органах молоди стерляди после питания в течение 55 суток комбикормами с различной степенью заражения протеом и последующем голодании

Варианты кормления, уровень обсемененности кормов <i>Pr. vulgaris</i> , КОЕ/г	Количество рыб с патологиями внутренних органов, % к общему количеству подопытных рыб					
	печень		почки		слизистая кишечника	
	цвет	структура	цвет	структура	истончение	нарушения секреции
<i>До начала опыта</i>						
	40	40	30	10	10	10
<i>После питания</i>						
Контроль	66	70	45	50	0	17
$6,0 \times 10^4$	100	83	100	68	10	66
$8,3 \times 10^6$	83	83	50	17	32	51
$1,0 \times 10^8$	83	83	32	17	17	66
<i>После голодания</i>						
Контроль	60	40	60	40	–	17
$1,0 \times 10^8$	60	40	100	80	–	–

После окончания периода кормления число рыб с изменениями цвета и нарушениями структуры печени в контрольном варианте возросло в полтора раза, что можно связать с естественной динамикой численности микрофлоры и накоплением в корме токсических продуктов ее метаболизма в течение двух месяцев.

В вариантах, где рыбы питались кормами, зараженными протеом, количество патологий увеличилось в два раза. При этом, интересно отметить, что существенных изменений в видовом составе микроорганизмов не обнаружено (табл. 12).

Состояние почек у рыб, из разных вариантов опыта, за период кормления также ухудшилось, но не одинаково. Обращает внимание, что в худшем состоянии были почки у стерляди из варианта с минимальным заражением корма. Наоборот, в варианте максимального заражения протеом, цвет и структура почек выживших рыб претерпели меньшие изменения даже по сравнению с контролем. На первый взгляд, это может показаться неожиданным, особенно на фоне значительного отхода молоди в этом варианте. Однако если принять во внимание, что погибли самые слабые и больные рыбы, то, естественно остались в живых наиболее устойчивые.

Таблица 12. Уровень заражения и микробиоценоз внутренних органов рыб после питания кормами, обсемененными протеем

Варианты кормления, уровень обсеменен- ности кормов <i>Pr. vulgaris</i> , КОЕ./г	Доля рыб (%) с контаминированными органами (более 10 колоний)				Микробиоценоз кишечника
	печень		почки		
	%*	микробиоценоз**	%	микробиоценоз	
До начала опыта					
	17	<i>St.epidermidis</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Proteus</i> , БГКП	17	<i>A. sp. 11</i> , <i>St. epide- midis</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Proteus</i> , БГКП	<i>St.epidermidis</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>A. sp.</i> , БГКП
После питания					
Контроль	30	<i>A. sobria</i> , <i>Acinetobacter</i> , БГКП	30	<i>A.***sobria</i> , <i>A. sp. 5</i> , БГКП	<i>A.sobria</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Candida</i> , БГКП
6,0×10 ⁴	30	<i>A. sp.</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Candida</i> , БГКП	17	<i>A. sp.</i> , <i>Acinetobacter</i> , БГКП	<i>Acinetobacter</i> , <i>Candida</i> , <i>A. sp. 5</i> , БГКП
8,3×10 ⁶	30	<i>A. sp.</i> , <i>Acinetobacter</i> , БГКП	17	<i>A. sp.</i> , <i>Acinetobacter</i> , БГКП	<i>Candida</i> , <i>A. sp. 5</i> , БГКП, плесень
1,0×10 ⁸	30	<i>A. sp.</i> , <i>Acinetobacter</i>	17	<i>A. sp. 5</i>	<i>A. sp. 5</i> , <i>Candida</i> , <i>A. hydrophyla</i> , <i>A.caviae</i>
После голодания					
Контроль	50	БГКП, <i>Acinetobacter</i> , <i>A. sp.</i> , <i>Candida</i> , <i>A. caviae</i>	50	БГКП, <i>Acineto- bacter</i> , <i>A. sp</i> , <i>Candida</i> , <i>A.caviae</i>	—
1,0×10 ⁸	30	<i>A. sp.</i> , БГКП <i>Acinetobacter</i>	70	<i>Bac. sp.</i> , <i>Acineto- bacter</i> , БГКП	—

*Не включены рыбы с единичными колониями во внутренних органах.

**Доминирующие микроорганизмы, в том числе в случаях низкой (<10 колоний) обсемененности.

***А – бактерии рода *Aeromonas*.

Что касается обсемененности внутренних органов, то доля рыб, где она была значимой, составила 17–30%. Учитывая то, что осмотру подвергали только живых рыб, а смертность в разных вариантах опыта составила от 7 до 61%, можно с уверенностью говорить, что доля молоди с высокой обсемененностью внутренних органов была намного выше. Доминировали бактерии р. *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, бактерии группы кишечной палочки (БГКП). Протеи во внутренних органах обнаружены не были (см. табл. 12).

Состояние кишечника у рыб из контрольного варианта, которое можно было бы считать относительно нормальным в начале кормления, после его окончания изменилось незначительно, хотя число рыб с нарушениями отделения слизи возросло. Изменения толщины слизистой у молоди, питавшейся зараженными кормами, по сравнению с контрольным вариантом, наблюдались в большем числе случаев. В то же время, вновь обращает внимание несколько лучшее состояние кишечника у молоди из варианта с наибольшей степенью поражения корма протеом. В кишечниках, вне зависимости от вариантов кормления, в составе микрофлоры присутствовали бактерии группы кишечной палочки (БГКП), различные виды аэромонад, эпидермальный стафилококк.

Бактериологические исследования мышц присутствия в них микроорганизмов не обнаружили.

В связи с тем, что в опытах, проведенных ранее, после голодания четкой зависимости между степенью обсемененности корма и уровнем регенерации органов выявлено не было [Бурлаченко и др., 2002], в описываемой серии мы исследовали органы и ткани рыб только из варианта с наибольшим заражением корма протеом.

Анализ результатов клинко-морфологического и бактериологического обследований позволил установить, что у рыб из всех вариантов (за исключением контрольного) после голодания отмечено ухудшение состояния внутренних органов. Описанные изменения свидетельствуют о крайне неблагоприятном физиологическом состоянии молоди стерляди, ее ослаблении и отсутствии оздоравливающего и регенерирующего эффектов, которые, как правило, сопровождают голодание. Худшее, по сравнению с контролем, состояние почек, частично – кишечника и печени у молоди, питавшейся кормами, зараженными протеом, позволяет предположить, что его присутствие в корме привело к развитию необратимых изменений, усилившихся во внутренних органах в стрессовой ситуации голодания.

Патологии внутренних органов были теснейшим образом связаны с изменениями в химическом статусе рыб и обмене веществ.

Анализ содержания пластических веществ и энергии в теле молоди стерляди (табл. 13) дает основание полагать, что ее питание зараженными кормами привело к слабой потере воды организмом (в пределах 4%). Это произошло за счет увеличения общего количества органических веществ (сырого протеина, сырого жира и углеводов). Различия между контрольным и опытными вариантами по этим показателям не превышали 5–8%, за исключением содержания липидов у рыб из варианта с максимальной степенью заражения корма протеом. В этом случае, уровень сырого жира был почти на 50% выше, чем в контроле.

Подобное увеличение содержания липидов, вероятно, связано с нарушениями в обмене веществ при интоксикации. Сходные явления наблюдала М.А. Щербина [1984а] при наличии в кормах контаминантов естественного происхождения (госсипол, рицин, аллиловые масла горчицы и др.).

Таблица 13. Химический статус молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными протеом, и последующем голодании

Варианты кормления; уровень обсемененности кормов <i>Pr. vulgaris</i> , КОЕ/г	Содержание веществ, % сырой ткани					Энергия		
	Вода	Сухое вещество	Органические вещества			Минеральные вещества (сырая зола)	ккал/100 г	белка, % от общего
			сырой протеин	сырой жир	углеводы (по разности)			
До начала кормления								
	81,4	18,6	12,5	2,2	0,9	3,0	94,1	75,8
После кормления								
Контроль	81,0	19,0	12,3	2,0	1,5	3,2	95,4	73,5
6,0×10 ⁴	80,2	19,8	12,7	1,9	1,8	3,4	98,1	73,8
8,3×10 ⁶	80,7	19,3	12,5	2,1	1,3	3,2	96,8	73,7
1,0×10 ⁸	80,2	19,8	12,6	3,1	1,2	2,9	106,3	67,5
После голодания								
Контроль	84,7	15,3	9,1	0,5	1,9	3,8	64,7	80,2
6,0×10 ⁴	84,9	15,1	9,7	0,5	1,3	3,6	64,7	85,5
8,3×10 ⁶	84,8	15,2	10,2	0,6	1,0	3,4	68,0	85,4
1,0×10 ⁸	84,7	15,3	9,7	0,4	1,5	3,7	65,4	84,6

В целом, полученные данные о биохимическом статусе молоди стерляди, выжившей после питания зараженными кормами, могли бы послужить основанием для заключения, что ее питание комбикормами, зараженными протеом, оказывает положительное влияние. Однако материалы, характеризующие интенсивность обмена – показатели «накопления» веществ и энергии, вновь подтверждают мнение о том, что химический статус не является истинным отражением изменений, происходящих в организме, под действием тех или иных факторов (табл. 14).

Данные табл. 14 убедительно свидетельствуют о том, что снижение темпа роста рыб, критическое состояние их внутренних органов теснейшим образом оказались связанными с изменениями в обмене веществ.

Таблица 14. Накопление массы, веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными протеом, и их утилизация при последующем голодании (г/100 г начальной массы)

Варианты кормления; уровень обсе- менности кор- мов <i>Pr. vulgaris</i> , КОЕ./г	Масса	Вода	Сухое вещество	Органические вещества			Мине- ральные вещества (сырая зола)	Энергия	
				сырой протеин	сырой жир	углеводы (по раз- ности)		ккал/ 100 г	% белк- от общей
Накопление, г/100 г массы до питания									
Контроль	92,0	74,1	17,9	11,2	1,6	2,0	3,1	87,2	73,2
6,0×10 ⁴	59,5	46,5	13,0	7,8	0,8	2,0	2,4	60,5	73,6
8,3×10 ⁶	77,1	61,5	15,6	9,6	1,5	1,8	2,7	76,6	71,4
1,0×10 ⁸	81,7	64,3	17,4	10,4	3,4	1,3	2,3	97,1	61,1
Утилизация, г/100 г массы до голодания									
Контроль	27,8	19,7	8,1	5,2	1,6	1,7	+0,4*	51,9	57,0
6,0×10 ⁴	20,4	12,6	7,8	5,0	1,5	0,8	0,5	46,2	61,7
8,3×10 ⁶	33,6	24,4	9,2	5,7	1,7	0,6	0,9	51,2	63,5
1,0×10 ⁸	20,9	13,2	7,7	4,9	2,8	0,2	+0,2	55,3	50,5

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

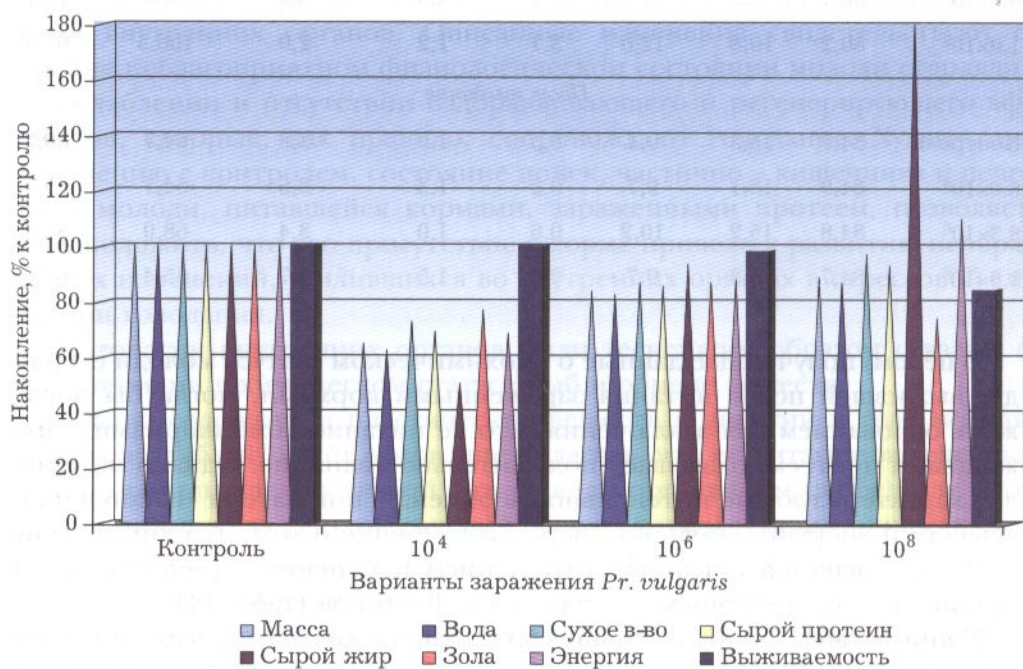


Рис. 8. Накопление веществ и энергии в теле молоди стерляди при питании комбикормами, зараженными протеом (% к контролю)

При минимальной степени заражения корма протеом отмечено наибольшее обезвоживание прироста, резкое – на 30 и 49% – торможение синтеза белка и липидов. В то же время, по мере увеличения обсемененности корма, ожидаемая тенденция еще большего угнетения синтеза белка и сырого жира не проявилась. Напротив, процессы синтеза даже активизировались.

Так, в варианте с максимальным уровнем заражения корма, наблюдалось усиление синтеза жира в два раза. Однако это относилось лишь к небольшой части (39%) выживших в этом варианте рыб, которые, вероятно, обладали повышенной резистентностью.

Это явление на фоне очень низкой выживаемости молоди, с одной стороны, и благополучного состояния внутренних органов у выживших рыб – с другой, может быть объяснено их индивидуальной устойчивостью к наличию в кормах протея или образуемых им токсинов. Погибли слабые рыбы, а выжившие, как показывают результаты расчетов интенсивности биосинтетических процессов, чувствовали себя неплохо, и даже существенно лучше, чем в случаях с меньшим заражением комбикорма протеом.

Для большей наглядности анализа описанных изменений в организме молоди стерляди предлагается рис. 8, где показатели «накопления» даны в % к контрольному варианту, принятому за 100%. Хорошо видно, что по сравнению с контролем, у питавшейся зараженными кормами молоди, особенно из первых двух вариантов, накопление веществ и энергии угнеталось. При этом, обращает внимание обстоятельство, что максимальное торможение синтеза пластических веществ и накопления энергии можно было наблюдать в варианте минимального заражения корма протеом.

Детализировать воздействие на организм рыб протея помогли результаты экспериментального голодания (табл. 15). Из приводимых в таблице данных видно, что наибольшие потери массы были у молоди из варианта, где зараженность корма составила $8,3 \times 10^6$ КОЕ/г, а также в контроле.

Таблица 15. Выживаемость и изменения массы молоди стерляди, питавшейся комбикормами, зараженными протеом, за период экспериментального голодания в течение 35 суток

Варианты кормления; уровень обсемененности кормов <i>Pr. vulgaris</i> , КОЕ/г	Средняя масса рыб, г		Потери массы, г		Выживаемость, %
	начало голодания	окончание голодания	абсолютные, г	относительные, %	
Контроль	14,4±3,6	10,4±2,3	4,0	27,8	80
$6,0 \times 10^4$	11,8±2,6	9,4±3,1	2,4	49,2	40
$8,3 \times 10^6$	13,1±3,1	8,7±2,6	4,4	29,7	73
$1,0 \times 10^8$	12,9±3,1	10,2±3,5	2,7	47,8	40

Трудно объяснимо, но для этих вариантов отмечена и наиболее высокая, особенно в контроле, выживаемость. Значительная гибель молоди (60%) из вариантов обсеменения корма 10^4 и 10^8 КОЕ/г во время голодания является естественным подтверждением отрицательного влияния протеев на жизнеспособность молоди.

Изменения, произошедшие в химическом статусе и расчеты утилизации веществ и энергии в ходе голодания, приведены ранее в табл. 13 и 14. Как видно из табл. 13, различия в уровне содержания пластических веществ и энергии между молодью контрольного и опытных вариантов, как при питании, так и при голодании, не были значительными и находились в пределах 1–10%.

В то же время, их абсолютные траты на поддерживающий обмен, отраженные в табл. 14, и данные пересчетов по отношению к контролю, принятому за 100%, позволили выявить между контрольным и опытными вариантами существенные различия (рис. 9).

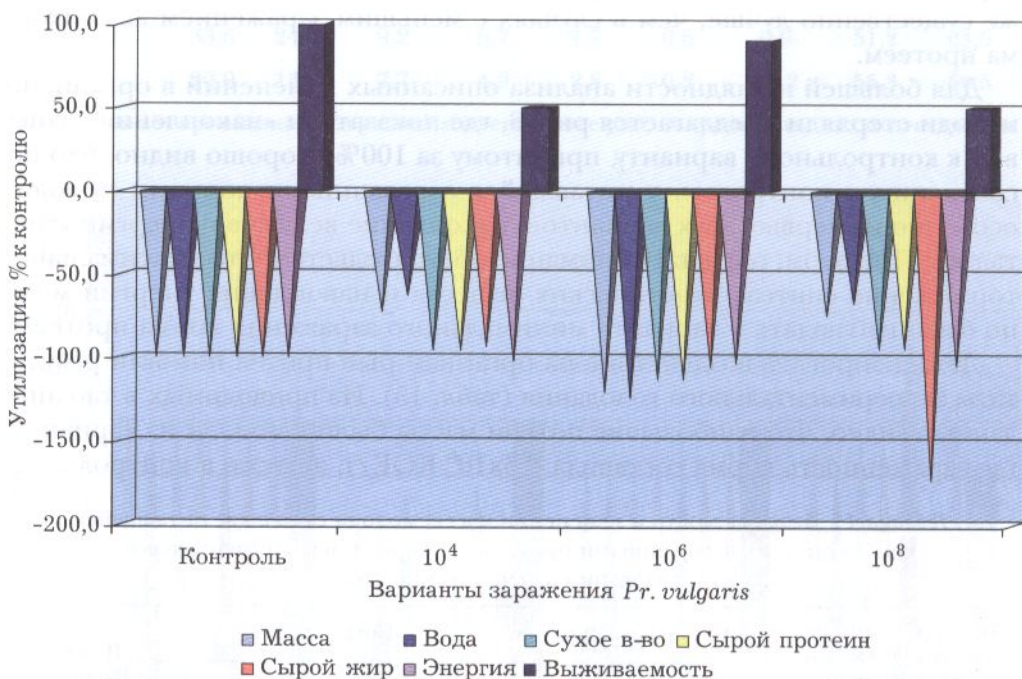


Рис. 9. Выживаемость и потери при голодании веществ и энергии у молоди стерляди, питавшейся комбикормами, зараженными протеем, % к контролю

На рис. 9 отчетливо видно, что достаточно близкие величины трат энергии на поддерживающий обмен в опытных и контрольном вариантах, обеспечивались неодинаково. Наибольшее внимание привлекает

значительно более интенсивный, по сравнению с контролем, расход белка. Это, при его меньшем накоплении в период питания зараженными кормами, свидетельствует о разбалансировке процессов обмена веществ в организме и является следствием наличия в корме протеов и продуктов их метаболизма.

Обращает внимание способность небольшой части рыб (16% выживших) из варианта с максимальным заражением корма протеом, сохранять достаточно высокий темп роста, 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 внешних признаков патологий [Горегляд, 1940; Погорелова и др., 1992; Ларцева, 1997].

Стоит также отметить наиболее интенсивные траты минеральных веществ у рыб из опытных вариантов, накопленные запасы которых, по сравнению с контролем, также были значительно меньшими. Этот факт является подтверждением нарушений минерального обмена у молоди, вызванных питанием комбикормами, зараженными протеом.

* * *

Анализируя полученные результаты, следует обратить внимание на ряд особенностей, отмеченных в ходе опытов с протеом. В частности, наблюдаемые нами изменения во внутренних органах молоди стерляди, имели сходный характер, но меньшую выраженность, по сравнению с патологиями канального сома, вызванными кормом, зараженным протеом, описанными В.Ю. Жезмер с соавторами [1991]. В нашем случае у стерляди, так же как и у сома, наблюдалось кровенаполнение и интенсивное обсеменение внутренних органов. Меньшая степень поражения стерляди может быть объяснена тем, что в наших условиях рыбы находились в проточной воде, что, несомненно, способствовало снижению бактериального пресса со стороны среды культивирования. В то же время, в замкнутой системе фактор влияния загрязненных бактериями кормов оказался еще более выраженным и усиленным дополнительным воздействием патогенной микрофлоры, накапливающейся в воде системы.

Следует особо подчеркнуть, что в отличие от описанной выше протейной инфекции у канального сома, из внутренних органов которого были выделены высоко вирулентные штаммы протея, у молоди стерляди, получавшей зараженные комбикорма, ни в паренхиматозных органах, ни в кишечниках обнаружить представителей бактерий этого рода не удалось.

Этот неожиданный факт может быть объяснен с позиций особенности динамики бактериальной обсемененности комбикормов в процессе их хранения. Как было показано ранее, независимо от степени первоначального заражения, при хранении обсемененность кормов на протяжении первого месяца возрастает. Далее начинает снижаться и к концу третьего месяца бактерии могут исчезнуть полностью, что обусловлено накоплением в кормах токсичных продуктов их жизнедеятельности, подавляющих рост самих микроорганизмов.

В нашем случае, изначально высокая концентрация в корме протеев способствовала накоплению в нем бактериальных токсинов, в частности, сильнодействующих эндоксинов, которые, с одной стороны, способствовали сокращению численности протей в корме, а с другой, – оказали токсическое действие на молодь стерляди. Также можно предположить, что именно с накоплением большого количества токсинов, вызванным высокой обсемененностью корма сразу после заражения, объясняется постепенная гибель более половины всей молоди из варианта с максимальным уровнем протей. При этом, количество протей в корме было соизмеримым с резистентностью к нему выживших рыб, что и предотвратило проникновение протей внутрь организма.

Несомненный интерес при анализе биосинтетических процессов, происходящих у молоди стерляди при ее питании кормами, зараженными протеями, вызывает заметно меньшее, по сравнению с контрольным вариантом, накопление минеральных элементов. Это может служить свидетельством нарушения минерального обмена и одной из причин угнетения роста рыб. Кроме того, недостаточная обеспеченность молоди минеральными веществами (несмотря на то, что осетровые являются хрящевыми рыбами) в дальнейшем, особенно при повышении температуры, может привести к появлению скелетных аномалий.

Известно, что скелетные аномалии, в частности, признаки коллагеновой недостаточности, которые проявляются в искривлении тела и образовании полостей в хрящах, очень часто наблюдаются у осетровых рыб, выращиваемых в промышленных условиях, в том числе – и в замкнутых системах [Головина, 2003]. Наши данные дают основание предполагать, что возможной причиной нарушения минерального обмена у осетровых, помимо дефицита и дисбаланса минеральных элементов в корме и в воде, а также их плохой доступности, является фактор достаточно частого присутствия в замкнутых системах протеев. В подобных установках, на фоне высоких концентраций органических веществ в воде, особенно в случаях недостаточно эффективной работы системы механической очистки, протей способны очень быстро накапливаться и даже, не вызывая инфекции, могут оказывать выраженное негативное влияние.

Подводя итог серии опытов, в которой изучалось воздействие на мо-

лодь стерляди последствий заражения комбикормов протеом, можно отметить следующие наиболее важные моменты. Прежде всего, это скрытый характер влияния – показатель выживаемости, который отражает отрицательное влияние заражения корма протеом в случае, если степень обсемененности корма составляет не менее 10^8 КОЕ/г. В то же время, при зараженности корма протеом в диапазоне концентраций 10^4 – 10^6 КОЕ/г, его отрицательное влияние на рост и выживаемость рыб в течение двух месяцев может не проявляться. Однако и при отсутствии видимых признаков, наблюдаются патологические изменения структуры и увеличение бактериальной обсемененности внутренних органов. Их усиление при голодании позволяет предположить необратимый характер возникших патологий. Питание молоди стерляди комбикормами, зараженными протеом, приводит к нарушению биосинтетических процессов в организме рыб, снижению интенсивности накопления белка, нарушениям в синтезе жира, минеральном обмене (в вариантах с минимальной (6×10^4 КОЕ/г) степенью заражения корма протеом на 30 и 50% соответственно) и сопровождается более активным использованием белка в поддерживающем обмене. Следует подчеркнуть, что незначительное количество молоди стерляди (в пределах 16%) способно адаптироваться к действию протея и его токсинов. Результатом этой адаптации является сохранение жизнеспособности при незначительных изменениях во внутренних органах и обмене веществ.

3.2.3. Цитробактер (*Citrobacter* sp.)

Цитробактер относится к роду *Escherichia* и имеет сходные с кишечной палочкой свойства [Фробишер, 1965]. Он является типичным представителем энтеробактерий и одинаково хорошо существует во внешней среде и в кишечнике. К характерным свойствам этих бактерий относится их гемолитическая и протеолитическая активность, присущая многим патогенным микроорганизмам. Они обнаруживаются в водной среде, экскрементах, моче человека и животных [Берджи, 1997; Сайко, 1999]. У людей некоторые штаммы вызывают токсикоинфекции [Костюковская и др., 1981; Чайка и др., 1986].

По данным Л.В. Ларцевой [1998], в дельте Волги цитробактеры контаминировали сазана, судака, осетровых рыб и белорыбицу, не имевших признаков внешних патологий. Помимо живых рыб, цитробактеры были обнаружены в икре, тушках и балычных изделиях из осетра. При консервном производстве в филе судака, севрюги, сазана эти бактерии оставались жизнеспособными через месяц после хранения при -18°C . Пищевая рыба, пораженная цитробактером, быстро портится и требует значительной

термообработки перед употреблением в пищу, так как эти бактерии термостойки и могут вызывать диспептические явления у людей.

В литературных источниках приводятся также сведения о заболеваниях карпа и форели, вызываемых цитробактером, которые сопровождались значительной гибелью рыб. У заболевших рыб наблюдали энтерит, множественные воспаления внутренних органов, язвы на коже и признаки других патологий [Афанасьев и др., 1997; Сайко, 1999; Ожередова, 2006а, б]. В ассоциации с другими бактериями кишечной группы цитробактеры усиливают их патогенные свойства и тяжесть заболевания рыб [Жезмер и др., 1991].

Перечисленные особенности явились основанием для более детального исследования влияния цитробактера на рыб.

Первоначальная обсемененность использованного в опытах корма составляла $4,8 \times 10^5$ КОЕ/г (в том числе, $2,2 \times 10^5$ споровых форм картофельной палочки (*Bac. mesentericus*) и $2,6 \times 10^5$ *Pseudomonas* sp.). Схема работы предусматривала экспериментальное заражение при увеличении первоначальной обсемененности на один порядок, а затем – ее последовательное двукратное возрастание. Однако фактическая обсемененность кормов цитробактером оказалась иной, составив $6,6 \times 10^6$, $8,5 \times 10^6$, $1,3 \times 10^7$ КОЕ/г. Несоответствие планируемого и фактического уровня заражения кормов было обусловлено действием неучтенных нами факторов, в частности, присутствием в исходном корме споровых форм картофельной палочки и других микроорганизмов.

Начальная масса молоди стерляди, использованной в опытах составляла 7–8 г. Температура воды в период кормления колебалась от 23,0 до 25,6 °С, (в среднем 24,8 °С). Период ростовых экспериментов составил 45 суток, голодания – 40 суток при температуре от 18,0 до 22,0 °С (в среднем 19,9 °С).

Схема экспериментов и рыбоводные результаты выращивания молоди стерляди приведены в табл. 16.

Таблица 16. Результаты выращивания молоди стерляди в течение 45 суток на комбикормах различной степенью заражения цитробактером

Варианты кормления; уровень обсемененности <i>Citrobacter</i> , КОЕ/г	Средняя масса рыб, г		Прирост		Выживаемость, %
	начало опыта	конец опыта	абсолютный, г	среднесуточный, CW %	
Контроль	8,2±1,9	25,7±4,7	17,5	3,0	100
$6,6 \times 10^6$	6,7±1,6	23,5±3,8	16,8	2,9	100
$8,5 \times 10^6$	7,2±1,7	23,3±5,1	16,1	2,8	100
$1,3 \times 10^7$	7,1±2,0	22,7±6,0	15,6	2,5	100

Можно видеть, что питание рыб в течение 1,5 месяцев комбикормами, пораженными цитробактером, не оказало влияния на выживаемость (отход отсутствовал). Однако повышение степени заражения корма (от $6,6 \times 10^6$ до $1,3 \times 10^7$) привело к сокращению скорости роста молоди (до 17%).

Помимо угнетения роста, на разных этапах опыта были отмечены и существенные изменения в состоянии внутренних органов (табл. 17).

Таблица 17. Признаки патологий внутренних органов у молоди стерляди после питания в течение 45 суток комбикормами, с различной степенью заражения цитробактером, и последующем голодании

Варианты кормления, уровень обсемененности кормов <i>Citrobacter</i> , КОЕ/г	Количество рыб с патологиями внутренних органов, % к общему количеству подопытных рыб					
	печень		почки		слизистая кишечника	
	цвет	структура	цвет	структура	истончение	нарушения секреции
<i>До начала опыта</i>						
	50	0	80	0	0	0
<i>После питания</i>						
Контроль	50	100	100	100	0	0
$6,6 \times 10^6$	50	50	100	70	0	0
$1,3 \times 10^7$	50	50	100	50	50	50
<i>После голодания</i>						
Контроль	25	25	100	30	0	0
$6,6 \times 10^6$	50	75	100	50	0	0
$1,3 \times 10^7$	0	0	100	50	0	0

Согласно этим данным, еще до начала опыта, более половины рыб в той или иной степени имели патологические нарушения во внутренних органах. В конце опыта эти изменения усилились и были выявлены у молоди из всех вариантов, в том числе – и контрольного. Они выражались в переходе цвета печени от светло-серого до серо-глинистого.

После голодания у рыб из всех вариантов (за исключением варианта $6,6 \times 10^6$ КОЕ/г) была отмечена некоторая нормализация цвета и консистенции печени, что свидетельствовало о ее частичной регенерации. Бактериальная обсемененность печени в контрольном варианте отсутствовала, а в опытных была представлена единичными колониями (табл. 18).

Состояние почек было значительно хуже. Патология была обнаружена у 50–70% рыб. Наиболее часто встречалось их обводнение и осветление окраски, а также рыхлая или разрушающаяся консистенция. Как упо-

миналось выше, светлая окраска почек, наряду с бледно-розовым цветом селезенки, как правило, является признаком анемии. В ряде случаев, напротив, была отмечена кровенаполненность почек, что обычно связывается с нарушением целостности стенок кровеносных сосудов и воспаленным состоянием органа. После голодания негативные изменения цвета и консистенции почек немного уменьшились, что свидетельствовало об улучшении их состояния.

Таблица 18. Уровень заражения и микробиоценоз внутренних органов рыб после питания кормами, обсемененными цитробактером

Варианты кормления, уровень обсеменен- ности кормов <i>Citrobacter</i> , КОЕ/г	Доля рыб (%) с контаминированными органами (более 10 колоний)				Микробиоценоз кишечника
	печень		почки		
	%*	микробиоценоз**	%	микробиоценоз	
До начала опыта					
	5	A. sp.***	10	A. sp.	A. sp.
После питания					
Контроль	0	A. sp.	0	Acinetobacter	A. sobria, Acinetobacter
6,6×10 ⁶	0	A. sp.	0	0	Aeromonas sp., Bac. mesentericus, плесень
1,3×10 ⁷	0	A. sp.	0	0	Pseudomonas, St. epid- ermidis, Bac. mesentericus
После голодания					
Контроль	0	0	0	Citrobacter	A. sobria, Acinetobacter
6,6×10 ⁶	0	A. sp.	0	A. sp.	A. sp., БГКП
1,3×10 ⁷	0	A. sp.	0	0	Плесень

*Не включены рыбы с единичными колониями во внутренних органах.

**Доминирующие микроорганизмы, в т.ч. в случаях низкой (<10 колоний) обсемененности.

*** *A* – бактерии рода *Aeromonas*.

Бактериальная обсемененность почек не была значительной. У рыб разных вариантов были обнаружены единичные колонии бактерий рода *Aeromonas*, являющихся типичными представителями водных микробиоценозов и обычной микрофлоры рыб. Следует особо отметить, что бактерии рода *Citrobacter* в посевах почек, так же как и печени, не были выявлены.

При исследовании внутренних органов главное внимание было уделено состоянию кишечника рыб, так как именно он является местом непосредственного контакта токсических веществ пищи с организмом. После

окончания ростовых опытов кишечника рыб из контрольного варианта были в нормальном состоянии. В варианте наибольшего заражения корма цитробактером ($1,3 \times 10^7$) у подопытных рыб было констатировано воспаление заднего отдела кишечника, что является одним из признаков алиментарных патологий. После голодания состояние слизистой и заднего отдела кишечника пришло в норму.

Что касается микрофлоры кишечника рыб, то она была представлена преимущественно бактериями родов *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, бактериями группы кишечной палочки (БГКП) и р. *Acinetobacter*. Кроме того, отмечены *St. epidermidis* и плесень. Таким образом, цитробактер даже при максимальной обсемененности кормов ($1,3 \times 10^7$ КОЕ/г) не оказал существенного влияния на микрофлору кишечника молодых стерляди.

Сходные, с отмеченными нами, изменения в печени, почках, кишечнике на фоне более тяжелого, острого течения заболевания, были описаны у двухлеток карповых рыб, выращиваемых в прудах Ставропольского края Н.А. Ожередовой [2006а]. Возбудителем этого заболевания, как было установлено в биопробах, явился представитель рода цитробактер – *Citrobacter freundii*. При этом, был обнаружен интересный факт – при разных способах постановки биопроб к наиболее высокой гибели рыб от цитробактериоза привело заражение бактериями, выделенными из кормов [Ожередова, 2006б]. Этот факт может служить дополнительным подтверждением высокой опасности заболеваний рыб цитробактериозом при контаминации им комбикормов.

Патологии, выявленные у молодых стерляди в ходе экспериментов, являются признаками различных алиментарных токсикозов, и отмечены у многих видов рыб [Галаш, 1988; Метод. указания по диагностике алиментарных токсикозов, 1999; Евдокимова, 2003]. Подтверждением алиментарной природы описанных изменений стала регенерация и нормализация состояния внутренних органов, зарегистрированная после окончания голодания. Однако, несмотря на наличие описанных патологических изменений внутренних органов, присутствия в них самих цитробактеров не обнаружено. Его количество в кишечнике, по сравнению с обсемененностью корма, было незначительным. Это свидетельствует о наличии у молодых стерляди достаточно эффективных защитных механизмов, которые способны препятствовать проникновению в организм из пищеварительного тракта чужеродных бактерий и является подтверждением сведений различных авторов о защитной роли слизистой кишечника рыб в отношении чужеродных бактерий [Guelein, 1962, 1963; Кузьмина, 1995 и др.].

В связи с высокой выживаемостью и отсутствием внешних проявлений патологии у молодых, с одной стороны, и изменениями во внутренних органах – с другой, как и в описанных выше случаях, представлялось целесообразным выяснить, влияет ли обсемененность кормов бактериями

ми на обмен веществ рыб. Изменения в химическом составе молоди приведены в табл. 19.

Таблица 19. Химический статус молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными цитробактером, и последующем голодании

Варианты кормления; уровень обсеменен- ности кормов <i>Citrobacter</i> , КОЕ/г	Содержание веществ, % сырой ткани					Энергия		
	Вода	Сухое ве- щество	Органические вещества			Минераль- ные веще- ства (сы- рая зола)	общая, ккал/ 100 г	белка, % общей
			сырой протеин	сырой жир	углеводы (по раз- ности)			
<i>До начала кормления</i>								
	86,5	13,5	9,0	1,4	1,0	2,1	68,8	74,6
<i>После кормления</i>								
Контроль	77,6	22,4	13,0	4,6	1,7	3,1	124,9	59,3
6,6×10 ⁶	80,1	19,9	11,7	3,9	1,4	2,9	109,6	60,9
8,5×10 ⁶	80,0	20,0	11,0	3,9	2,3	2,8	109,4	57,3
1,3×10 ⁷	81,5	18,5	10,8	3,0	2,0	3,0	98,5	62,5
<i>После голодания</i>								
Контроль	80,9	19,1	11,4	1,9	1,7	4,1	90,2	72,0
6,6×10 ⁶	84,4	15,6	9,7	0,8	1,5	3,6	69,2	80,0
8,5×10 ⁶	83,5	16,5	9,1	0,8	2,4	3,6	75,5	73,2
1,3×10 ⁷	82,7	17,3	10,8	0,8	1,8	3,9	76,7	80,3

Судя по данным этой таблицы, можно говорить о достаточно четком, по мере возрастания обсемененности, проявлении тенденции к снижению содержания сухого вещества, за счет сокращения количества белка и липидов. Наибольшие изменения отмечены в варианте с максимальной концентрацией цитробактера в корме. В этом случае, содержание сухого вещества и белка было на 17% ниже, чем в контроле, липидов – на 35% при близком уровне минеральных веществ. Обеспеченность энергией была ниже на 21%.

Как обсуждалось ранее, химический статус указывает на соотношение основных групп питательных веществ. Поэтому, для получения количественной характеристики, были рассчитаны показатели накопления веществ и энергии по отношению к 100 г начальной массы рыб (табл. 20). Для большей наглядности показатели накопления представлены по отношению к аналогичным данным, полученным для контрольного варианта (рис. 10).

Таблица 20. Накопление массы, веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными цитробактером, и их утилизация при последующем голодании (г/100 г начальной массы)

Варианты кормления; уровень обсемененности кормов <i>Citrobacter</i> , КОЕ/г	Масса	Вода	Сухое вещество	Органические вещества			Минеральные вещества (сырая зола)	Энергия	
				сырой протеин	сырой жир	углеводы (по разности)		ккал/ 100 г	белка, % общей
Накопление, г/100 г массы до питания									
Контроль	208,2	156,7	56,5	31,7	13,0	4,3	7,5	323,1	56,6
6,6×10 ⁶	251,4	195,2	56,2	32,2	12,1	3,9	8,0	315,3	58,3
8,5×10 ⁶	224,4	173,4	51,0	26,8	11,4	5,8	7,0	284,9	53,7
1,3×10 ⁷	219,8	174,3	45,5	25,6	8,2	4,7	7,0	244,1	59,8
Утилизация, г/100 г массы до голодания									
Контроль	10,9	5, 5	5,4	2,8	2,9	0,3	+0,6	44,8	35,7
6,6×10 ⁶	16,4	9,6	6,8	3,6	3,2	0,3	+0,3	51,4	40,0
8,5×10 ⁶	6,0	1,5	4,5	1,9	3,1	0,1	+0,6	40,7	26,5
1,3×10 ⁷	4,8	2,8	2,0	0,5	2,2	+0,2	+0,5	23,0	12,6

*Знак + означает приращение вещества при голодании.

Анализ этих данных у рыб, питавшихся кормами, зараженными цитробактером, позволил установить, что, по сравнению с контролем, прирост массы, более значимый у молоди из опытных вариантов, обеспечивался, в основном, за счет накопления воды (рис. 10). Максимальная обводненность прироста (на 29% выше, чем в контроле) отмечена в варианте с наименьшим обсеменением, причем количество накопленных 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%. Объективность этого вывода подтвердили данные, полученные в ходе экспериментального голодания.

Продолжительность экспериментального голодания составила 40 суток при средней температуре 19,8 °С. Рыбоводные результаты экспериментов приведены в табл. 21.

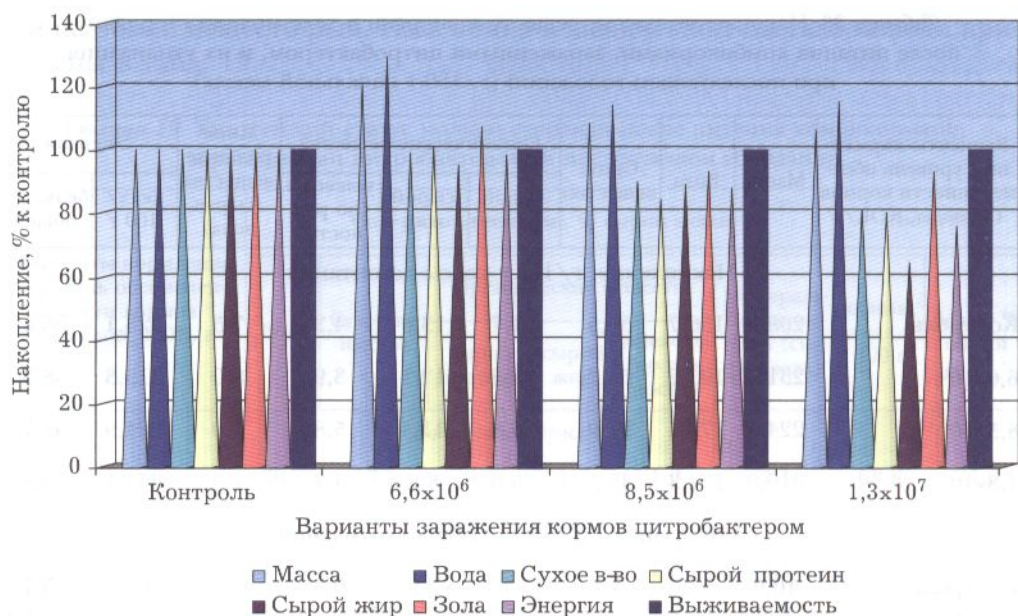


Рис. 10. Накопление веществ и энергии в теле молоди стерляди при питании комбикормами, зараженными цитробактером (% к контролю)

Таблица 21. Изменения массы и выживаемость молоди стерляди, питавшейся кормами, зараженными цитробактером, после голодания в течение 792 градусо-дней

Варианты кормления; уровень обсемененности кормов <i>Citrobacter</i> , КОЕ/г	Средняя масса рыб, г		Потери		Выживаемость, %
	до голодания	после голодания	абсолютные, г	относительные, %	
Контроль	25,7±4,7	22,9±4,5	2,8	10,9	100
6,6×10 ⁶	23,5±3,8	19,7±6,3	3,8	16,2	50
8,5×10 ⁶	23,3±5,1	21,8±5,8	1,4	6,0	98
1,3×10 ⁷	22,7±6,0	21,6±6,1	1,1	4,9	87

По данным о химическом составе рыб (см. табл. 19) видно, что их голодание в течение 40 суток во всех случаях привело к обводнению организма молоди и снижению в нем содержания сухого вещества, протеина и, особенно, липидов. По сравнению с контрольным вариантом, содержание сухого вещества в разных вариантах заражения сократилось на 11–19%, сырого протеина – на 5–20%, липидов – на 58%. Подобные изменения можно отнести к проявлению негативного воздействия бактериального заражения кормов цитробактером.

Расчеты утилизации веществ и энергии, а также степени их участия в тратах на поддерживающий обмен, позволили детализировать характеристику метаболических процессов у голодающей молодежи (см. табл. 20).

У рыб из контрольного варианта в потерях сухого вещества приблизительно равным был расход сырого протеина и сырого жира. Утилизация углеводов была минимальной, а зольные элементы накапливались. У молодежи, получавшей зараженные корма, утилизация веществ имела несколько иной характер. Белок и липиды использовались в большей степени. Максимальные потери влаги и органических веществ обнаружены в варианте с минимальным заражением корма ($6,6 \times 10^6$ КОЕ/г), где наблюдалась наибольшая гибель рыб (рис. 11).

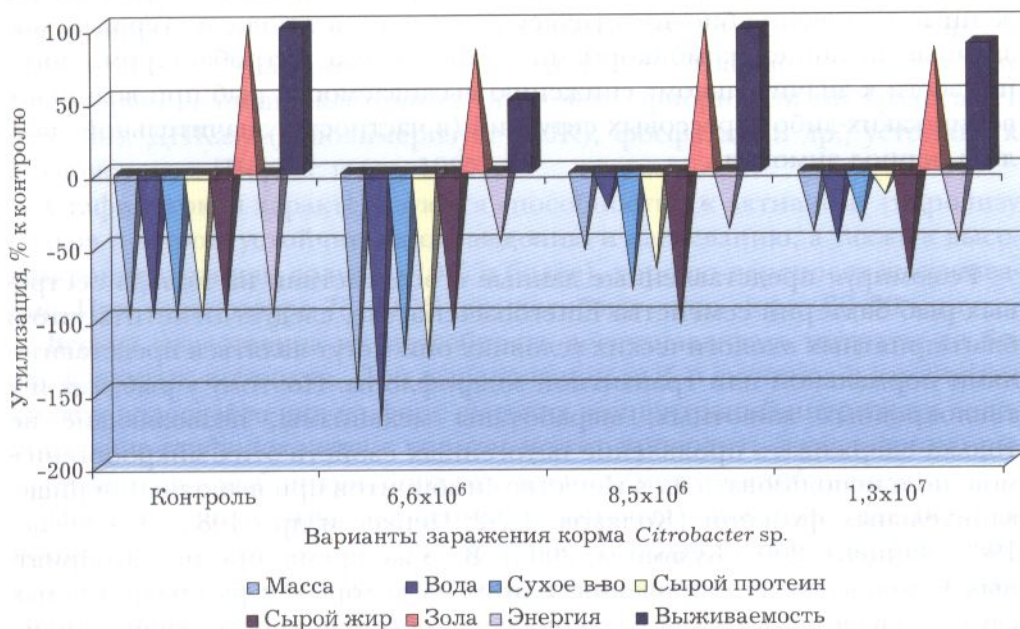


Рис. 11. Выживаемость и потери при голодании веществ и энергии у молодежи стерляди, питавшейся комбикормами, зараженными цитробактером, % к контролю

На этом основании можно полагать, что, как и в вышеописанных экспериментах с другими видами энтеробактерий, более значимое, по сравнению с контрольным вариантом, использование в эндогенном питании белка и липидов связано с интоксикацией продуктами метаболизма цитробактера. По мнению В. А. Шатерникова [1985], «заболевания, связанные с нарушениями питания и являющиеся следствием характерных изменений обмена веществ, можно рассматривать как своеобразную адаптацию организма к неблагоприятным условиям существования, так

как вместо остановки процессов обмена веществ, которая бы повлекла за собой смерть, происходит направленное изменение этих процессов, и организм продолжает жить и функционировать в крайне затрудненных и неблагоприятных условиях (в состоянии болезни)».

Таким образом, воздействие на молодь стерляди бактерий рода *Citrobacter* и продуктов их жизнедеятельности, несмотря на отсутствие смертности рыб и внешних признаков токсикоза, вызывает скрытую интоксикацию. Она выражается в изменении направленности обмена веществ в сторону обводнения организма, последовательного, по мере возрастания обсемененности кормов, угнетении синтеза белка и, особенно, липидов.

Наиболее ранние видимые признаки интоксикации проявляются в изменении состояния паренхиматозных органов и кишечника. Обнаруженные нарушения биосинтетических процессов у молоди стерляди, вызванные питанием комбикормами зараженными цитробактером, могут привести к значительному снижению выживаемости рыб при возникновении каких-либо стрессовых ситуаций (в частности, значительной гибели в период зимовки).

* * *

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 пищеварительных функций [Коляков, 1952; Черкес и др., 1985; Шивокене, 1989; Ларцева, 2003; Кузьмина, 2005]. В то же время, при неблагоприятных условиях культивирования, одним из которых в рассматриваемых случаях является высокая бактериальная обсемененность комбикормов, организм рыб, даже при отсутствии значимых внешних проявлений, достаточно остро реагирует на воздействие энтеробактерий изменениями в состоянии внутренних органов и 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*

3.3. Стафилококки (*Staphylococcus epidermidis*)

Стафилококки являются второй по значимости группой микроорганизмов, доминирующей в комбикормах, частота их встречаемости достигает 20%.

Из группы стафилококков несомненный интерес, в силу очень широкого распространения, в том числе и кормах, представлял 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, то есть в основном он менее агрессивен [Фробшер, 1965]. Как и все стафилококки, он не требователен к питательным средам и биохимически активен, продуцирует такие ферменты патогенности как коагулазу (сворачивает плазму крови), гиалуронидазу (фактор распространения), лецитиназу (растворяет лецитин клеточных оболочек), фибринолизин (разрушает фибрин), ДНКазу (деполимеризует ДНК), фосфатазу и др., устойчив к антибиотикам [Черкес и др., 1987].

Стафилококки характеризуются способностью к активному гидролизу белков и жиров, устойчивы к охлаждению и нагреванию, а также к высоким концентрациям соли (до 10% и более), хорошо переносят высушивание. При температуре 75–80 °C они погибают лишь через 20–30 минут.

Весьма существенна их способность восстанавливать нитраты до более ядовитых нитритов. При выращивании рыб в системах с замкнутым циклом водоснабжения на фоне высоких концентраций нитритов в воде, попадание стафилококков с кормом может приводить к увеличению риска развития у рыб нитритного отравления (метгемоглобинемии).

Перечисленные выше особенности явились основанием для подробного изучения воздействия эпидермального стафилококка (*St. epidermidis*) на рост, обмен веществ, физиологическое состояние и выживаемость молоди стерляди.

В экспериментах в качестве заражающего агента был использован эталонный штамм *St. epidermidis* ATCC 14990. Фактический уровень обсемененности комбикорма после заражения *St. epidermidis* составил 2×10^4 , $1,3 \times 10^6$, $1,2 \times 10^8$ КОЕ/г корма.

Опыты на молоди стерляди (начальная масса 27–29 г) проводили при средней температуре 23 °C (колебания от 19 до 25 °C). Продолжительность опыта составила 55 суток.

По окончании кормления видимой разницы в скорости роста рыб, питавшихся контрольным и зараженными кормами, не обнаружено (табл. 22). Средняя масса молоди составляла 47–49 г без каких-либо значимых различий между вариантами. Выживаемость молоди была близка к нормальной.

Таблица 22. Результаты выращивания молоди стерляди в течение 55 суток на комбикормах, с различной степенью заражения стафилококком

Варианты кормления; уровень обсемененности кормов <i>St. epidermidis</i> , KOE/г	Средняя масса рыб, г		Прирост		Выживаемость, %
	начало опыта	конец опыта	абсолютный, г	среднесуточный, CW %	
Контроль	29,3±5,3	47,9±7,3	18,4	0,9	94
2,0×10 ⁴	27,2±4,2	48,0±10,1	20,8	1,0	89
1,3×10 ⁶	29,3±4,6	48,9±9,3	19,6	0,9	88
1,2×10 ⁸	27,9±4,7	47,1±8,0	19,2	0,9	90

Однако клинико-морфологический анализ состояния внутренних органов молоди стерляди (табл. 23) позволил выявить изменения, связанные с присутствием в комбикормах различных количеств стафилококка.

Согласно приведенным в таблице данным, можно говорить, что в начале этой серии опытов состояние внутренних органов молоди стерляди было благополучным. После питания рыб как зараженными, так и незараженными комбикормами, следует отметить негативное действие контрольного комбикорма, который оказал повреждающее влияние на все обследованные органы и – в максимальной степени – на печень. Это дает основание говорить, что изначально, еще до заражения стафилококками, комбикорм содержал контаминанты неизвестного происхождения с достаточно сильно выраженными токсическими свойствами.

Таблица 23. Признаки патологий и обсемененность внутренних органов молоди стерляди после питания в течение 55 суток комбикормами, с различной степенью заражения эпидермальным стафилококком

Варианты кормления, уровень заражения корма <i>St. epidermidis</i> , KOE/г	Количество рыб с патологиями внутренних органов, %					
	печень		почки		слизистая кишечника	
	цвет	структура	цвет	структура	истончение	нарушения секреции

До начала опыта

0	0	0	0	0	0
---	---	---	---	---	---

После питания

Контроль	42	0	15	15	43	30
2,0×10 ⁴	42	43	15	15	48	48
1,3×10 ⁶	42	71	80	57	43	85
1,2×10 ⁸	85	100	100	57	100	100

Заражение корма бактериями в начальной и увеличивающихся концентрациях (от 2×10^4 до $1,2 \times 10^8$ КОЕ/г корма) и накопление продуктов их метаболизма на протяжении опытного периода, в отдельных случаях, еще более усилило отрицательные эффекты, которые мы могли визуаль-но регистрировать на внутренних органах.

С повышением степени обсемененности корма стафилококками удалось более четко уловить снижение активности функции слизиотделения в кишечнике, которое отмечалось наряду с истончением его стенок.

Как уже было показано ранее в опытах с заражением кормов энотеро-бактериями, уменьшение толщины слизистой оболочки кишечника, так же как и нарушение отделения слизи, являются серьезными проявления-ми патологических процессов, результатом которых становится ухудше-ние эффективности переваривания и всасывания пищи.

Данные о неблагоприятном состоянии внутренних органов были до-полнены их микробиологической характеристикой (табл. 24).

Таблица 24. Уровень заражения и микробиоценоз внутренних органов рыб после питания кормами, обсемененными стафилококком

Варианты кормления, уровень обсеменен- ности кормов <i>St. epidermidis</i> , КОЕ/г	Доля рыб (%) с контаминированными органами (более 10 колоний)				Микробиоценоз кишечника
	печень		почки		
	%*	микробиоценоз**	%	микробиоценоз	
	До начала опыта				
	0	0	0	0	<i>A. sp.</i> ***5, <i>Citrobacter</i>
	После питания				
Контроль	0	0	0	0	<i>A. sp.</i> 5, <i>A. Hydro-</i> <i>phila</i> , <i>Candida</i> , <i>Acinetobacter</i>
2,0×10 ⁴	0	0	0	0	<i>A. sp.</i> 5, <i>E. coli</i> , БГКП, плесень
1,3×10 ⁶	10	<i>Moraxella</i> , <i>A. sp.</i> , <i>St. epidermidis</i>	50	<i>Moraxella</i> , <i>A. sp.</i> 5, <i>St. epidermidis</i> , плесень	<i>A. sp.</i> 5, <i>St. epider-</i> <i>midis</i> , <i>E. coli</i> , БГКП, плесень
1,2×10 ⁸	10	<i>A. sp.</i> , <i>St. epider-</i> <i>midis</i>	10	Плесень	<i>A. sp.</i> 5, <i>St. epider-</i> <i>midis</i> , <i>Citrobacter sp.</i>

*Не включены рыбы с единичными колониями во внутренних органах.

**Доминирующие микроорганизмы, в том числе в случаях низкой (<10 колоний) обсемененности.

***А – бактерии рода *Aeromonas*.

Согласно табл. 24, после питания комбикормами, зараженными *St. epi-*
dermidis в степени $1,3 \times 10^6$ – $1,2 \times 10^8$ КОЕ/г, увеличилось не только коли-
чество рыб, характеризующихся присутствием микроорганизмов во вну-

трених органах, но и значительно возрос уровень их обсемененности. Подобное бактериальное поражение внутренних органов рассматривается как следствие различных нарушений процесса их нормального функционирования, особенно, если речь идет о присутствии таких бактерий, которые являются индикаторами высокого органического загрязнения – *Moraxella*, *Aeromonas hydrophila* и др. Следует также отметить обнаружение стафилококков в печени и почках, а также мышцах рыб, питавшихся кормом, зараженным в $1,3 \times 10^6$ степени. Доля рыб с мышцами, пораженными плесневыми грибами, в вариантах заражения корма стафилококком $1,3 \times 10^6$ и $1,2 \times 10^8$ КОЕ/г, составила 40%, что также свидетельствует о резком снижении их резистентности.

Помимо этого, произошли существенные изменения в бактериальном сообществе кишечников стерляди, питавшейся обсемененными кормами. Они выразились в замене обычного состава микрофлоры (БГКП, *Aeromonas* sp. *Citrobacter*) на более агрессивную и менее специфичную для молоди осетровых микрофлору (*Aeromonas* sp. 5, *E.coli* с пониженной ферментативной активностью, различные плесени). 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 общей резистентности молоди.

Присутствие в кормах стафилококков сопровождалось достаточно четко выраженными изменениями в химическом статусе рыб (табл. 25). Была выявлена обратная связь между степенью заражения корма и относительным содержанием в теле рыб белков и липидов. В опытных вариантах, по сравнению с контролем, можно отметить уменьшение относительного содержания сухого вещества на 7–8%, что означает обводнение организма, а также снижение уровня сырого протеина до 7%. Различия в содержании минеральных веществ составляли от 3 до 13%.

Однако в вариантах с зараженными кормами содержание минеральных элементов было выше, чем в контроле, причем разница по этому показателю последовательно увеличивалась, по мере увеличения степени заражения корма.

Наиболее значимыми были отличия в содержании сырого жира и, по мере увеличения зараженности корма, отмечено его последовательное снижение. По сравнению с контролем, в варианте с минимальной степенью заражения его содержание было ниже на 26%, в двух следующих – на 36%. Этими различиями обусловлена и меньшая (до 14%) обеспеченность рыб энергией.

Расчеты накопления веществ и энергии у молоди стерляди в процессе

Таблица 25. Химический статус молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными стафилококком и последующем голодании

Варианты кормления; уровень обсеменен- ности кормов <i>St. epidermidis</i> , КОЕ/г	Содержание веществ, % сырой ткани					Энергия, ккал/100 г	
	Вода	Сухое вещество	Органические вещества				Минераль- ные веществ- ва (сырая зола)
			сырой протеин	сырой жир	углеводы (по разности)		
<i>До начала кормления</i>							
	79,3	20,7	11,1	2,3	4,5	2,8	104,0
<i>После кормления</i>							
Контроль	77,5	22,5	12,7	3,1	3,8	2,9	117,8
2,0×10 ⁴	79,0	21,0	12,1	2,3	3,6	3,0	105,9
1,3×10 ⁶	79,3	20,7	11,8	2,0	3,8	3,1	102,2
1,2×10 ⁸	78,4	21,6	11,9	2,0	4,4	3,3	105,3
<i>После голодания</i>							
Контроль	82,5	17,5	9,6	1,0	3,4	3,5	78,5
2,0×10 ⁴	82,5	17,5	9,8	0,8	3,7	3,2	79,0
1,3×10 ⁶	83,1	17,9	9,3	0,5	4,6	3,5	77,1
1,2×10 ⁸	82,5	17,5	9,8	1,2	2,0	3,3	80,7

роста (табл. 26) позволили более четко выявить связь между заражением корма стафилококками и изменениями в процессах биосинтеза у рыб. Прежде всего, удалось обнаружить гидратацию прироста, происходившую одновременно с усиленным накоплением минеральных веществ. В начальной степени поражения корма общая доля воды резко (до 32% от массы) возросла. Далее, по мере повышения зараженности, снизилась до 17%. При отсутствии различий накоплений массы рыб – это маскировало неблагоприятное действие зараженного корма. Одновременно наблюдалось очень резкое сокращение синтеза липидов (до 63%), усиление синтеза углеводов на 26–47% и незначительное снижение синтеза белка (на 4–6%). Возросли и затраты энергии (до 25%), что было вызвано необходимостью нейтрализации негативного действия стафилококков.

Эти результаты представлены в виде диаграммы, где полученные значения для большей наглядности приведены в процентах к контролю (рис. 12). Здесь четко просматриваются все особенности описанных выше обменных процессов. Наиболее показательно отображение изменений в липидном и минеральном обменах. По мере повышения в комбикормах концентрации стафилококков просматривается прямая зависимость между степенью их воздействия и уровнем заражения корма.

Таблица 26. Накопление массы, веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными эпидермальным стафилококком, и их утилизация при последующем голодании (г/100 г начальной массы)

Варианты заражения комбикормов, КОЕ/г	Масса	Вода	Сухое вещество	Органические вещества			Минеральные вещества (сырая зола)	Энергия	
				сырой протеин	сырой жир	углеводы (по разности)		ккал/100 г	белка, % от общей
Накопление, г/100 г массы до питания									
Контроль	60,8	45,3	15,5	9,3	2,7	1,6	1,9	85,4	62
2,0×10 ⁴	76,5	60,1	16,4	9,2	1,8	2,9	2,5	87,1	60
1,3×10 ⁶	66,8	53,0	13,8	8,6	1,0	1,8	2,4	66,1	74
1,2×10 ⁸	68,5	52,8	15,7	8,9	1,1	2,9	2,8	73,3	69
Утилизация, г/100 г массы до голодания									
Контроль	0,2	+5,0	5,2	3,2	2,1	0,5	+0,6	40,3	46
2,0×10 ⁴	12,5	6,8	5,7	3,4	1,6	0,9	+0,2	38,4	51
1,3×10 ⁶	11,2	5,9	5,3	3,6	1,6	1,3	+1,2	41,2	50
1,2×10 ⁸	10,8	4,9	5,9	3,1	0,9	1,5	0,4	32,5	55

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

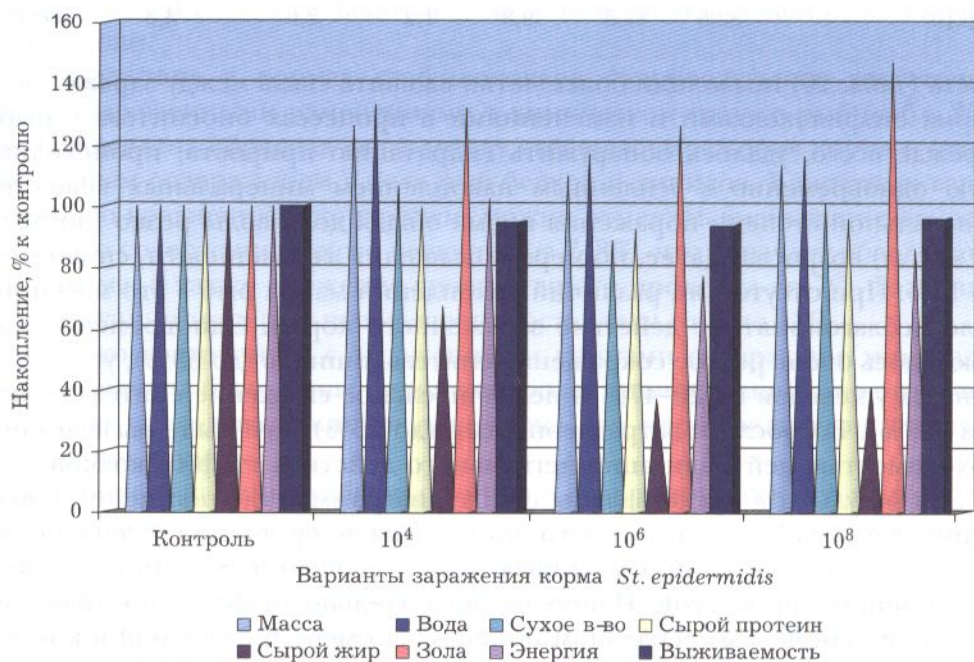


Рис. 12. Выживаемость, накопление веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными эпидермальным стафилококком, % к контролю

Дополнить картину воздействия на рыб заражения корма стафилококками позволили результаты, полученные в ходе экспериментального голодания, продолжавшегося 40 суток при средней температуре 19,8 °С (табл. 27).

Таблица 27. Изменения массы и выживаемость молоди стерляди, питавшейся кормами, зараженными стафилококками, после голодания в течение 40 суток

Варианты кормления; уровень обсемененности кормов <i>St. epidermidis</i> , КОЕ/г	Средняя масса рыб, г		Потери массы		Выживаемость, %
	до голодания	после голодания	абсолютные, г	% контроля	
Контроль	47,9±7,3	46,6±10,3	1,3	100	94
2,0×10 ⁴	48,0±10,1	42,7±10,2	5,3	408	81
1,3×10 ⁶	48,9±9,3	43,1±8,6	5,8	446	89
1,2×10 ⁸	47,1±8,0	42,1±6,3	5,0	385	76

За период голодания смертность и потери массы у молоди контрольного варианта были минимальными (6 и 3% соответственно). В вариантах с кормами средних степеней заражения, потери массы рыб были в четыре с лишним раза больше при снижении выживаемости на 5–25%, что также является подтверждением отрицательного действия стафилококков.

Расчеты абсолютных значений утилизации веществ и энергии, в процессе голодания, не выявили существенных различий между вариантами (см. табл. 26). Исключение составили липиды. Их наибольшие траты в поддерживающем обмене отмечены в контрольном варианте, где в период питания накопление липидов происходило наиболее интенсивно. Минимальный расход липидов (на 57% меньший, чем в контроле) отмечен в варианте самого высокого заражения корма стафилококками, где рыбы в процессе роста накопили на 63% меньше жиров, чем в контроле. Пересчеты полученных значений утилизации по отношению к контрольному варианту, более наглядно позволили проанализировать имеющиеся различия (рис. 13).

Специфика воздействия стафилококков на поддерживающий обмен при голодании выразилась в резком увеличении потерь массы (в основном за счет воды, ограничении утилизации сырого жира) на фоне большего участия в энергозатратах белка (на 10–20%). Все эти изменения отразились 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.

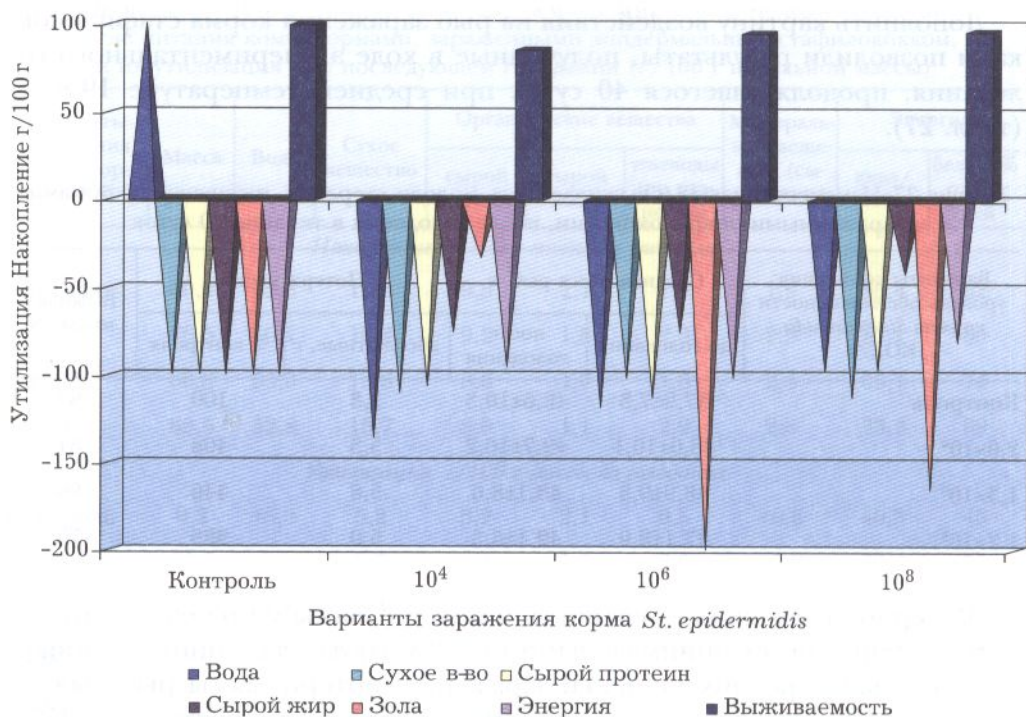


Рис. 13. Выживаемость и утилизация/накопление при голодании веществ и энергии у молоди стерляди, питавшейся комбикормами, зараженными эпидермальным стафилококком, % к контролю

Резюмируя представленные данные, можно сделать вывод, что как и в предыдущих случаях, интоксикация молоди стерляди кормом, зараженным *St. epidermidis* до 10^8 КОЕ/г, имеет скрытую форму, не отражающуюся на темпе роста рыб и выживаемости в процессе питания. В то же время, в организме рыб под действием стафилококков и их метаболитов происходит целый комплекс морфологических, функциональных и обменных нарушений. Изменения в кишечнике приводят к снижению его защитной функции, следствием чего является усиление микробного (в том числе и стафилококкового) заражения печени, почек и мышц, развитие в них патологических процессов. В обменных процессах к наиболее специфичному действию стафилококков следует отнести обводнение организма рыб, резкое угнетение синтеза липидов и усиление накопления минеральных веществ. Эти изменения, не отражающиеся на выживаемости рыб при питании, в поддерживающем обмене приводят к усилению потерь влаги, увеличению доли белка в энергетическом обеспечении, значительным потерям массы и гибели рыб при голодании.

3.4. Бактерии рода *Bacillus*

Известные нам сведения об отрицательном влиянии на рыб представителей рода *Bacillus*, выделенных из комбикормов, ограничиваются данными Н.И. Войновой [1991], которая наблюдала присутствие патогенных форм *Bacillus cereus* в комбикормах и внутренних органах карпов из различных хозяйств Ростовской области.

При проведении экспериментальных работ, в качестве представителя бактерий рода *Bacillus* нами была выбрана картофельная палочка (*Bacillus mesentericus*). Она известна как возбудитель «картофельной болезни» хлеба. Споры картофельной палочки, попадая вместе с мукой в тесто, не погибают при выпечке хлеба, а, прорастая, вызывают его порчу. Эти бактерии широко распространены, встречаются как в аэробных, так и в анаэробных условиях, часто обнаруживаются в комбикормах для рыб. Они обладают высокой ферментативной, в том числе, протеолитической активностью. Кроме того, они являются антагонистами по отношению к другим микроорганизмам, что дало основание предположить агрессивность *Bac. mesentericus* и возможное их отрицательное действие на качество корма и организм рыб. Несмотря на широкое распространение, каких-либо литературных данных о действии этих бактерий на организм и физиологическое состояние рыб в доступных отечественных и зарубежных публикациях нам обнаружить не удалось.

Эксперименты проводили на молоди стерляди начальной массой 7–8 г. Средняя температура воды составила 24,8 °С. Период ростовых экспериментов – 45, голодания – 40 суток при температуре в среднем 19,9 °С. Первоначальная фоновая обсемененность, использованного в опытах корма, была $4,8 \times 10^5$ КОЕ/г (в том числе, $2,2 \times 10^5$ споровых форм картофельной палочки *Bac. mesentericus* и $2,6 \times 10^5$ *Pseudomonas sp.*). Фактическая обсемененность кормов после экспериментального заражения *Bac. mesentericus* составила $4,0 \times 10^5$, $6,0 \times 10^6$, $2,8 \times 10^7$ КОЕ/г. Схема опытов представлена в табл. 28.

Как видно из табл. 28, по сравнению с контрольным вариантом, питание молоди стерляди в течение 45 суток комбикормами с различной зараженностью картофельной палочкой не оказало выраженного влияния на выживаемость и скорость роста рыб. На фоне 100% выживаемости среднесуточный прирост рыб в разных вариантах был меньшим, чем в контроле всего на 2–8%, что могло бы свидетельствовать о незначительном или полном отсутствии отрицательного воздействия.

Однако клинико-морфологический осмотр рыб, проведенный на разных этапах экспериментов, позволил обнаружить изменения во внутренних органах (табл. 29). Согласно данным таблицы, более половины рыб

характеризовались той или иной степенью патологических нарушений. Изменения цвета печени были обнаружены у молодежи всех вариантов, в том числе и контрольного.

Таблица 28. Результаты выращивания молодежи стерляди на комбикормах с различной степенью заражения картофельной палочкой

Варианты кормления; уровень обсемененности кормов <i>Bac. mesentericus</i> КОЕ/г	Средняя масса рыб, г		Прирост		Выживаемость, %
	начало опыта	конец опыта	абсолют- ный, г	среднесуточ- ный, СW %	
$2,2 \times 10^5$ (контроль*)	8,2	25,7	17,5	3,0	100
$4,8 \times 10^6$	8,2	24,7	16,5	2,8	100
$6,0 \times 10^6$	7,0	25,0	18,0	3,0	100
$2,8 \times 10^7$	7,7	26,5	18,9	2,9	100

*Вариант с естественным фоном обсеменения *Bac. mesentericus*.

Таблица 29. Признаки патологий внутренних органов молодежи стерляди после питания в течение 45 суток комбикормами с различной степенью заражения картофельной палочкой и последующем голодании

Варианты кормления, уровень обсеменен- ности кормов <i>Bac. mesentericus</i> , КОЕ/г	Количество рыб (%) с патологиями внутренних органов, к общему количеству подопытных рыб					
	печень		почки		слизистая кишечника	
	цвет	структура	цвет	структура	истончение	нарушения секреции

До начала опыта

	50	0	80	0	0	0
--	----	---	----	---	---	---

После питания

$2,2 \times 10^5$ (контроль)*	50	100	100	100	0	0
$4,8 \times 10^6$	50	0	100	70	0	0
$2,8 \times 10^7$	50	100	100	70	0	50

После голодания

$2,2 \times 10^5$ (контроль)*	25	25	100	30	0	0
$4,8 \times 10^6$	0	0	100	50	0	0
$2,8 \times 10^7$	0	0	70	70	0	0

*Естественный фон обсеменения корма *Bac. mesentericus*.

После голодания, когда, как упоминалось выше, обычно происходит освобождение организма от алиментарных ядов и восстанавливается структура печени, была отмечена некоторая нормализация ее цвета и консистенции, что свидетельствовало о частичной регенерации.

Бактериальная обсемененность печени во всех вариантах практически отсутствовала.

Патологии почек были обнаружены у 50–70% рыб. Наиболее часто отмечалось сильное осветление и обводнение почек, рыхлая или разрушающаяся консистенция, или же их кровенаполнение. Последнее обусловлено нарушением целостности стенок кровеносных сосудов. В совокупности, все описанное выше, свидетельствовало о нарушении функции почек.

После голодания негативные изменения цвета и консистенции почек несколько уменьшились.

Бактериальная обсемененность почек была незначительной – единично были обнаружены бактерии родов *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, а также бактерии группы кишечной палочки. В связи с их крайне незначительной, близкой к норме численностью, табличные данные по обсемененности внутренних органов не приводятся. Следует отметить, что *Bac. mesentericus* в посевах печени и почек не были выявлены, что свидетельствует о достаточной эффективности защитной функции пищеварительного тракта, позволившей предотвратить, в этом случае, проникновение чужеродной микрофлоры в паренхиматозные органы.

Состояние кишечника рыб из контрольного варианта после окончания ростовых опытов было нормальным (см. табл. 29). В вариантах, где корма были заражены, особых изменений также не отмечено. Исключение составил вариант с максимальной степенью обсеменения *Bac. mesentericus*. В этом случае, в кишечниках у 50% рыб отсутствовала слизь, что может служить показателем ухудшения физиологического состояния рыб и проявления патологии.

Что касается микрофлоры кишечника у стерляди из разных вариантов кормления, то она была представлена преимущественно бактериями родов *Aeromonas*, *Pseudomonas*, бактериями группы кишечной палочки родов *Moraxella* и *Acinetobacter*. Кроме того, отмечены *St. epidermidis* и единично – *Bac. mesentericus*. Таким образом, заражение кормов картофельной палочкой, даже при максимальной обсемененности кормов ($2,8 \times 10^7$ КОЕ/г), через 50 суток после заражения не оказало существенного влияния на микрофлору кишечника молоди стерляди.

Более детальную картину влияния картофельной палочки удалось получить на основании исследований химического состава тела рыб. Изменения химического статуса молоди за период экспериментов приведены в табл. 30. Судя по представленным данным, по мере возрастания обсемененности достаточно четко проявилась тенденция к сокращению

содержания сухого вещества за счет снижения уровня сырого протеина и сырого жира.

Таблица 30. Химический статус молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными картофельной палочкой, и последующем голодании

Варианты кормления; уровень обсеменен- ности кормов <i>Bac. mesentericus</i> , КОЕ/г	67,8 Содержание веществ, % сырой ткани						Энергия	
	Вода	Сухое вещество	Органические вещества			Мине- ральные вещества (сырая зола)	общая, ккал/ 100 г	белка, % общей
			сырой протеин	сырой жир	углеводы (по разности)			
<i>До начала кормления</i>								
	86,5	13,5	9,0	1,4	1,0	2,1	68,8	74,6
<i>После кормления</i>								
2,2×10 ⁵ (контроль)*	77,6	22,4	13,0	4,6	1,7	3,1	124,9	59,3
4,8×10 ⁶	78,5	21,5	12,3	4,1	1,2	3,9	114,1	61,4
6,0×10 ⁶	79,4	20,6	11,5	3,9	2,2	3,0	111,8	58,7
2,8×10 ⁷	79,7	20,3	11,4	3,6	2,4	2,9	109,3	59,5
<i>После голодания</i>								
2,2×10 ⁵ (контроль)*	80,9	19,1	11,4	1,9	1,7	4,1	90,2	72,0
4,8×10 ⁶	82,4	17,6	10,6	1,6	1,9	3,5	83,6	77,2
6,0×10 ⁶	83,5	16,5	10,6	1,3	1,1	3,5	77,4	78,1
2,8×10 ⁷	82,5	17,5	10,3	1,3	2,5	3,4	86,6	67,8

*Вариант с естественным фоном обсеменения *Bac. mesentericus*.

Для получения интегральной характеристики, отражающей качественные и количественные изменения в массе тела и химическом составе рыб, были рассчитаны показатели накопления веществ и энергии по отношению к 100 г начальной массы рыб (табл. 31).

Судя по этим данным, у рыб, питавшихся кормами, обсемененными *Bac. mesentericus*, по сравнению с контрольными, наблюдалось большее (на 19–25%) накопление воды и несколько меньшее, накопление сухого вещества, в том числе, на 5–12% – сырого протеина и сырого жира. Синтез углеводов, напротив, был активнее, чем в контроле, с максимумом в варианте наибольшей обсемененности. Накопление энергии в вариантах заражения 4,0×10⁶ и 2,8×10⁷ КОЕ/г было наименьшим.

Оценивая количественные показатели накоплений, можно говорить, что обсеменение кормов картофельной палочкой стимулировало при-

рост массы молоди стерляди в вариантах $4,0 \times 10^6$ и $2,8 \times 10^7$. Однако в основном оно шло за счет накопления воды при снижении синтеза сырого протеина, сырого жира и энергии на фоне увеличения запасов минеральных веществ (рис. 14).

Таблица 31. Накопление веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными картофельной палочкой, и их утилизация при последующем голодании

Варианты кормления; уровень обсемененности кормов <i>Bac. mesentericus</i> , КОЕ/г	Масса	Вода	Сухое вещество	Органические вещества			Минеральные вещества (сырая зола)	Энергия	
				сырой протеин	сырой жир	углеводы (по разности)		общая, ккал/ 100 г	белка, % об- щей
<i>Накопление, г/100 г массы до питания</i>									
2,2×10 ⁵ (контроль)*	213,4	156,7	56,7	31,7	13,0	4,3	7,6	322,9	56
4,8×10 ⁶	201,3	150,0	51,3	28,1	11,0	2,6	9,6	274,9	58
6,0×10 ⁶	257,2	197,1	60,1	32,1	12,5	6,9	8,6	330,5	55
2,8×10 ⁷	244,2	187,8	56,8	30,2	11,0	7,3	7,9	307,4	56
<i>Утилизация, г/100 г массы до голодания</i>									
2,2×10 ⁵ (контроль)*	10,9	5,5	5,4	2,8	2,9	0,3	+0,6	44,8	36
4,8×10 ⁶	13,0	6,8	6,2	3,1	2,7	+0,5	0,9	41,3	43
6,0×10 ⁶	25,2	16,9	8,3	3,6	2,9	1,4	0,4	53,9	38
2,8×10 ⁷	17,7	11,8	5,9	3,0	2,5	0,3	0,1	38,7	44

*Вариант с естественным фоном обсеменения *Bac. mesentericus*.

Таким образом, несмотря на отсутствие смертности и угнетения роста рыб, а также внешних признаков токсикоза, анализ использованных физиолого-биохимических показателей позволил выявить скрытую интоксикацию, вызываемую картофельной палочкой. Она выразилась в изменении направленности обмена веществ в сторону обводнения организма, последовательном, по мере возрастания степени обсемененности кормов, угнетении синтеза белка и, особенно, липидов.

Данные, полученные в ходе экспериментального голодания рыб, которые представлены в табл. 32, подтвердили объективность этого вывода.

По материалам табл. 32, диапазон относительных потерь массы рыб за голодание возрос с 10,9% в контроле до 25,2 (вариант $6,0 \times 10^6$ КОЕ/г). Однако наибольший интерес представляют сведения о значительном снижении выживаемости голодавших рыб от 10 до 37%. При этом, обращает особое внимание максимальная смертность (37%), которая была отмечена в

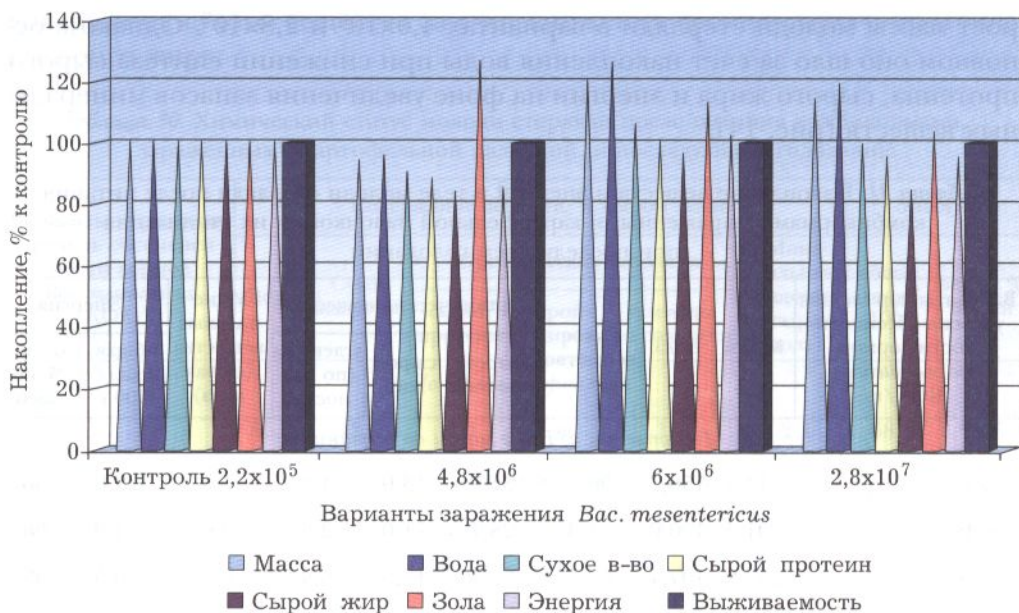


Рис. 14. Выживаемость, накопление веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными картофельной палочкой, % к контролю

Таблица 32. Изменения массы и выживаемость молоди стерляди, питавшейся кормами, зараженными картофельной палочкой, после голодания в течение 792 градусо-дней

Варианты кормления; уровень обсемененности кормов <i>Bac. mesentericus</i> , КОЕ/г	Средняя масса рыб, г		Потери массы		Выживаемость, %
	до голодания	после голодания	абсолютные, г	относительные, %	
$2,2 \times 10^5$ (контроль)*	25,7	22,9	2,8	10,9	100
$4,8 \times 10^6$	24,7	21,5	3,2	13,0	63
$6,0 \times 10^6$	25,0	18,7	6,3	25,2	90
$2,8 \times 10^7$	26,5	21,8	4,7	17,7	80

*Вариант с естественным фоном обсеменения *Bac. mesentericus*.

варианте с минимальной концентрацией бактерий в корме. В контроле гибели рыб не наблюдалось.

Данные о химическом составе позволили установить, что голодание рыб в течение 40 суток во всех случаях привело к гидратации организма и снижению содержания сухого вещества, протеина и сырого жира. В большинстве случаев отмечено повышение уровня зольных элементов.

Максимальные сдвиги наблюдались в варианте заражения картофельной палочкой в степени $4,0 \times 10^6$ КОЕ/г.

Расчеты утилизации веществ и энергии показали (см. табл. 31 и рис. 15), что наиболее значимыми были потери массы и воды. Обезвоживание организма молоди из вариантов с высокой степенью заражения корма превышало потери воды у молоди из контрольной группы в 2–3 раза.

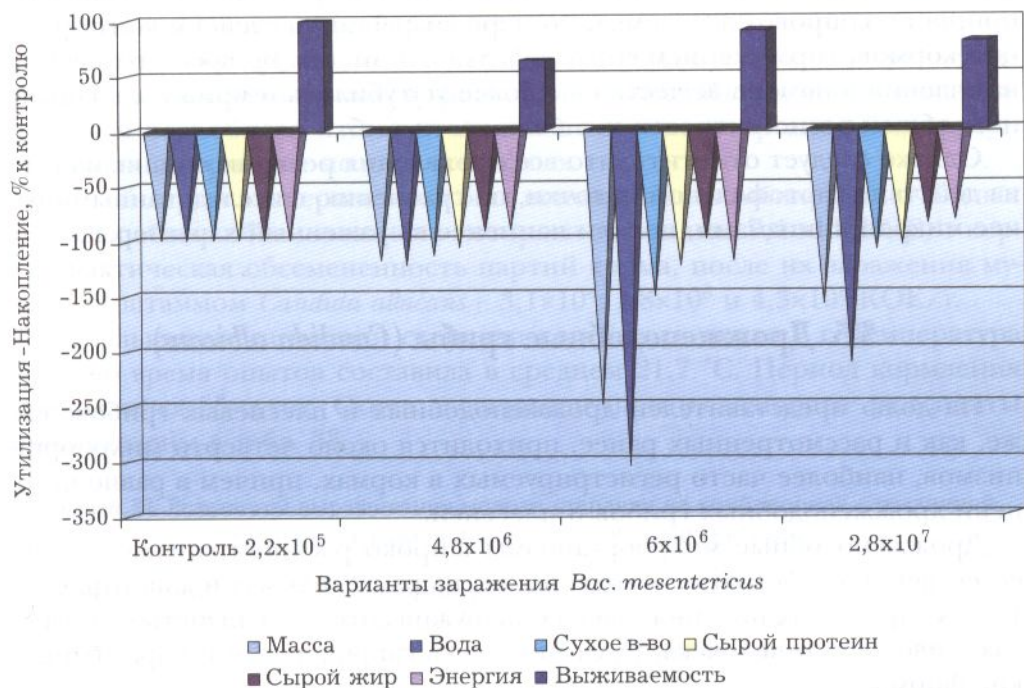


Рис. 15. Выживаемость и утилизация при голодании веществ и энергии у молоди стерляди, питавшейся комбикормами, зараженными картофельной палочкой, % к контролю

Различия в обеспечении энерготрат между подопытными и контрольными рыбами состояли в более интенсивном использовании белка (на 7–29%) и меньших тратах липидов (на 7–14%). У рыб из контрольного варианта отмечена, близкая по значению, убыль воды и сухого вещества. В потерях сухого вещества доли белков и липидов были приблизительно равными. Углеводы в варианте наименьшего обсеменения накапливались, что свидетельствовало об их новообразовании в процессе глюконеогенеза, уже отмеченном ранее в опытах заражения кормов кишечной палочкой.

Подводя итог исследованиям влияния картофельной палочки (при обсемененности корма от $4,0 \times 10^6$ до $2,8 \times 10^7$ КОЕ/г), можно, как и в боль-

шинстве предыдущих случаев, сделать вывод о скрытом характере ее действия, незначительно замедляющем рост рыб при сохранении высокой выживаемости. В то же время, во внутренних органах произошли патологические изменения, вызванные действием микроорганизмов комбикормов и их метаболитами.

Наиболее четко отрицательное влияние заражения кормов *Bac. mesentericus* проявилось на метаболическом уровне и выразилось в обводнении прироста, сопровождающемся, по мере возрастания степени контаминации кормов, торможением синтеза белка и липидов. Во время голодания нарушения в обмене веществ еще более усугубились и привели к снижению общей резистентности и гибели части рыб.

Однако следует отметить, что все проявления реакции организма рыб на действие картофельной палочки, по сравнению с исследованными ранее микроорганизмами, носили наименее выраженный характер.

3.5. Дрожжеподобные грибы (*Candida albicans*)

На долю представителей дрожжеподобных и плесневых грибов, так же, как и рассмотренных ранее, приходится около четверти микроорганизмов, наиболее часто регистрируемых в кормах, причем в равной степени дрожжеподобных грибов и плесеней.

Дрожжеподобные микроорганизмы широко распространены на всех естественных субстратах: в воде, почве, на растительных и животных остатках, продуктах питания, часто обнаруживаются на слизистых оболочках животных и человека. Среди них есть сапрофитные и паразитические формы.

У рыб в естественных условиях обитания дрожжи присутствуют на поверхности кожи, жабрах, в содержимом пищеварительного тракта. Дрожжевая флора рыб тесно связана с их присутствием в водоеме и зависит от его типа, проточности, трофности и других показателей. 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, однако в содержимом кишечника дрожжи более многочисленны, чем в воде [Квасников и др., 1981]. Дрожжи широко использовались в аквакультуре, как один из наиболее ценных компонентов стартовых и продукционных комбикормов [Исаева, Нагорная, 1991; Остроумова, 2001; Щербина, Гамыгин, 2006].

Однако 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 уве-

личение содержания в мышцах и крови 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 данные о патогенности дрожжей для карпов различного возраста, выращиваемых в прудах, а В.А. Триленко и Н.В. Семенова [1975] сообщают о заболеваниях молоди лосося и семги, связанных с поражением дрожжеподобными грибами на Нарвском и Кандалакшском рыбоводных заводах.

Эти и многие другие данные, 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.

В этой серии экспериментов был использован комбикорм, начальная фоновая общая обсемененность которого составляла $7,4 \times 10^4$ КОЕ/г корма. Фактическая обсемененность партий корма, после их заражения мурейным штаммом *Candida albicans* – $3,1 \times 10^4$; $1,8 \times 10^6$ и $4,3 \times 10^8$ КОЕ/г.

Начальная масса молоди стерляди колебалась около 7 г. Температура воды во время опытов составила в среднем 21,7 °С. Период кормления продолжался 55 суток. Схема экспериментов и их основные результаты представлены в табл. 33.

Таблица 33. Результаты выращивания молоди стерляди на комбикормах с различной степенью заражения дрожжеподобными грибами

Варианты кормления; уровень обсемененности кормов <i>Candida albicans</i> , КОЕ/г	Средняя масса рыб, г		Прирост		Выживаемость, %
	начало опыта	конец опыта	абсолют- ный, г	среднесуточ- ный, СW %	
Контроль	7,5±1,6	14,4±3,6	6,9	1,2	83
$3,1 \times 10^4$	8,2±1,8	12,5±3,2	4,3	0,8	93
$1,8 \times 10^6$	8,1±1,6	13,9±3,8	5,8	1,0	92
$4,3 \times 10^8$	7,5±1,4	13,4±3,8	5,9	1,0	96

В начале опыта состояние молоди, использованной в экспериментах, оценивалось как неполностью соответствующее норме. Количество рыб с нарушениями цвета, структуры и контаминацией почек и печени микроорганизмами составляло 30–40%. Патологии кишечника были отмечены у 10% молоди.

Результаты почти 2-х месячного питания стерляди комбикормами, с различной степенью заражения дрожжами, не позволили выявить статистически значимых различий в конечной массе рыб. По окончании пери-

ода 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 тоже время, клинико-морфологический анализ состояния внутренних органов позволил обнаружить значительное ухудшение состояния молоди (табл. 34).

Таблица 34. Признаки патологий внутренних органов молоди стерляди после питания в течение 55 суток комбикормами, с различной степенью заражения дрожжеподобными грибами, и последующем голодании

Варианты кормления, уровень обсемененности кормов <i>Candida albicans</i> , КОЕ/г	Количество рыб с патологиями внутренних органов, % к общему количеству подопытных рыб					
	печень		почки		слизистая кишечника	
	цвет	структура	цвет	структура	истончение	нарушения секреции
<i>До начала опыта</i>						
	40	40	30	10	10	10
<i>После питания</i>						
Контроль	66	70	45	50	0	17
3,1×10 ⁴	83	83	83	17	17	17
1,8×10 ⁶	83	66	17	100	0	17
4,3×10 ⁸	100	83	83	17	17	66
<i>После голодания</i>						
Контроль	60	40	60	40	–	17
4,3×10 ⁸	60	40	60	40	40	10

В контрольном варианте доля рыб с изменениями цвета и нарушениями структуры печени и почек возросла в полтора раза. В почках и мышцах этих рыб, наряду с обычными представителями водной микрофлоры, появились *Aeromonas sobria*, обладающие выраженными патогенными свойствами. Подобное ухудшение состояния молоди из контрольного варианта, скорее всего, было связано с естественной динамикой фоновой микрофлоры корма в течение двух месяцев эксперимента и накоплением в нем токсических продуктов метаболизма микроорганизмов.

В вариантах заражения кормов дрожжами количество рыб с патологиями печени и высокой степенью ее обсеменения увеличилось по сравнению с контролем, соответственно, на 30 и 50% и в два и четыре раза – по сравнению с началом опыта. При этом, у рыб всех вариантов, за исключением контрольного, среди бактерий, обсеменяющих печень, появились дрожжи (табл. 35).

Таблица 35. Уровень заражения и микробиоценоз внутренних органов рыб после питания кормами, обсемененными дрожжеподобными грибами

Варианты кормления, уровень обсемененности кормов <i>Candida</i> , КОЕ/г	Доля рыб (%) с контаминированными органами (более 10 колоний)				Микробиоценоз кишечника
	печень		почки		
	%*	микробиоценоз**	%	микробиоценоз	
До начала опыта					
	17	<i>St.epidermidis</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Proteus</i> , БГКП***	17	<i>A. sp.</i> 11, <i>St. epidermidis</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Proteus</i> , БГКП	<i>St. epidermidis</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>A. sp.</i> , БГКП
После питания					
Контроль	30	<i>A. sobria</i> , <i>Acinetobacter</i> , БГКП	30	<i>A. sobria</i> , <i>A. sp.</i> 5 БГКП	<i>A. sobria</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Candida</i> , БГКП
3,1×10 ⁴	10	<i>A. sp.</i> <i>Acinetobacter</i> , <i>Candida</i> , БГКП	17	<i>A. sp.</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Candida</i> , БГКП	<i>Acinetobacter</i> , <i>Candida</i> , <i>A. sp.</i> 5, БГКП
1,8×10 ⁶	17	<i>A. sp.</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Candida</i> , БГКП	17	<i>A. sp.</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Candida</i> , БГКП	<i>Candida</i> , <i>A. sp.</i> 5, БГКП, плесень
4,3×10 ⁸	70	<i>A. sp.</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Candida</i> , БГКП	17	<i>Aeromonas sp.</i> 5	<i>A. sp.</i> 5, <i>Candida</i> , <i>A. hydrophyla</i> , <i>A.caviae</i>
После голодания					
Контроль	50	БГКП, <i>Acinetobacter</i> , <i>A. sp.</i> , <i>Candida</i> , <i>A.caviae</i>	50	БГКП, <i>Acinetobacter</i> , <i>A. sp.</i> , <i>Candida</i> , <i>A.caviae</i>	—
4,3×10 ⁸	5	<i>Candida</i> , БГКП <i>Acinetobacter</i>	70	<i>Bac. sp.</i> , <i>Candida</i> <i>Acinetobacter</i>	<i>Bac. sp.</i> , <i>Acinetobacter</i> , БГКП, <i>Candida</i>

*Не включены рыбы с единичными колониями во внутренних органах.

**Доминирующие микроорганизмы, в том числе в случаях низкой (<10 колоний) обсемененности.

***БГКП – бактерии группы кишечной палочки.

В состоянии почек произошли сходные изменения, однако увеличения количества рыб с высокой степенью их контаминации не произошло. Так же как и в печени, в почках молоди всех вариантов были обнаружены дрожжи, отсутствовавшие в начале опыта. Помимо дрожжей там присутствовал довольно широкий спектр аэромонад, а также бактерии группы кишечной палочки (БГКП), ацинетобактер, плесени. В то же время, в мышцах, после окончания питания, дрожжи не были обнаружены. Следует обратить внимание, что внутренние органы рыб из всех вариантов с зараженными кормами были в худшем состоянии, чем в контроле, где, как уже говорилось выше, также были отмечены весьма значимые негативные изменения.

Состояние кишечника у рыб из контрольного варианта, которое можно было бы считать относительно нормальным в начале опыта, после его окончания изменилось незначительно, хотя несколько возросло количество рыб с нарушениями отделения слизи и истончением слизистой оболочки. Последнее в большей степени было характерно для молодежи стерляди из контрольного варианта, чем для рыб из вариантов с зараженными кормами. Напротив, в случае с максимальным заражением корма дрожжами, нарушений отделения слизи было отмечено гораздо больше, чем в контроле. В кишечниках спектр микроорганизмов оставался достаточно широким, а по окончании опытов, к уже имевшимся в них ранее бактериям, добавились дрожжи.

Анализ результатов клинико-морфологического и бактериологического обследования рыб после голодания позволяет говорить, что состояние печени у стерляди из контрольного варианта и варианта с максимальным заражением корма дрожжами улучшилось. В обоих случаях обращает внимание нормализация структуры печени. В варианте с зараженным кормом улучшение состояния печени сопровождалось также значительным сокращением количества рыб с контаминированными органами. В контрольном варианте, напротив, доля рыб, имевших печень, зараженную бактериями, возросла.

Процесс голодания не оказал положительного влияния на почки, как в контрольном, так и в варианте с кормами, зараженными дрожжами. Количество рыб с нарушениями цвета и структуры почек увеличилось, возросла и их доля с высоким бактериальным заражением. Значимых изменений в видовом составе микроорганизмов в печени и почках за этот период не произошло. Исключением можно считать появление в почках рыб из контрольного варианта бактерий *Aeromonas caviae*, обладающих высокой патогенностью.

Состояние слизистой кишечника после голодания в обоих вариантах ухудшилось. Однако в отличие от контроля, в варианте с зараженным кормом отмечена нормализация отделения слизи, что указывает на некоторое улучшение функции кишечника.

Подводя итог анализу клинического состояния внутренних органов, можно говорить о том, что питание молодежи стерляди комбикормами, зараженными дрожжами, привело к нарушениям целостности кишечника, усилению обсемененности печени и почек патогенными микроорганизмами, в том числе и дрожжами, увеличению количества пораженных рыб. Эти факты явились достаточно убедительным свидетельством ухудшения состояния здоровья рыб, связанного именно с заражением кормов дрожжами.

Результаты обследования рыб и сравнение контрольного и опытного вариантов позволяют говорить о недостаточно высоком качестве исполь-

зованного корма. Его применение, даже без дополнительного заражения микроорганизмами, сопровождалось развитием патологий во внутренних органах, снижением общей резистентности рыб, истощением и усилением заражения паренхиматозных органов и мышц микроорганизмами, в том числе и патогенными. Следует подчеркнуть, что аналогичные явления у молоди из контрольных вариантов были отмечены и в других сериях опытов.

Данные о химическом составе тела молоди стерляди в различные периоды опыта приведены в табл. 36.

Таблица 36. Химический статус молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными дрожжеподобными грибами, и последующем голодании

Варианты кормления; уровень заражения кормов <i>Candida albicans</i> , КОЕ/г	Содержание веществ, % сырой ткани						Энергия, ккал/ 100 г
	Вода	Сухое вещество	Органические вещества			Минераль- ные веществ- ва (сырая зола)	
			сырой протеин	сырой жир	углеводы (по разности)		
<i>До начала кормления</i>							
	81,4	18,6	12,5	2,2	0,9	3,0	96,0
<i>После кормления</i>							
Контроль	81,0	19,0	12,3	2,0	1,5	3,2	95,4
3,1×10 ⁴	80,7	19,3	12,2	2,0	1,8	3,3	93,3
1,8×10 ⁶	79,6	20,4	12,3	3,1	1,8	3,2	105,0
4,3×10 ⁸	79,5	20,5	12,3	2,8	2,2	3,2	103,7
<i>После голодания</i>							
Контроль	84,7	15,3	9,1	0,5	1,9	3,8	64,7
3,1×10 ⁴	85,9	14,1	9,5	0,6	1,1	3,8	54,2
1,8×10 ⁶	85,2	14,8	9,6	0,5	0,8	3,9	60,9
4,3×10 ⁸	84,6	15,4	9,6	0,5	1,3	4,0	61,8

Как можно видеть, питание молоди стерляди комбикормами, зараженными дрожжами, привело к ряду изменений в химическом составе ее тела. В контрольном и варианте с наименьшей степенью заражения корма дрожжами, содержание воды и сухого вещества в теле рыб было достаточно близким. В вариантах с более сильным заражением корма, уровень сухого вещества в теле рыб был несколько выше, чем в контроле. Относительное содержание сырого протеина и минеральных веществ в организме молоди всех вариантов был одинаковым.

Различия в количестве сухого вещества у молоди из вариантов со степенью заражения корма дрожжами $1,8 \times 10^6$ и $4,3 \times 10^8$ КОЕ /г были обусловлены более высоким содержанием сырого жира (выше контроля на 55 и 40%) и углеводов (20 и 47%). В этой связи, потенциальная энергия пластических веществ у рыб из этих двух вариантов была на 9–10% выше.

Величины накопления веществ и энергии, приведенные в табл. 37, позволяют более детально оценить воздействие степени заражения комбикормов дрожжами на процессы синтеза.

Можно видеть, что присутствие дрожжей в корме оказало на прирост массы рыб тормозящий эффект. При этом, проявилось сдерживающее влияние на накопление воды. Обнаружена интересная зависимость между повышением уровня заражения корма и снижением интенсивности накопления воды и пластических веществ, что хорошо видно на диаграмме (рис. 16), где данные приведены в % к контролю. По сравнению с контролем, в варианте с минимальным заражением в теле рыб воды было накоплено меньше на 42%, а в варианте с максимальным – на 13%. Уровень накопления сухого вещества был одинаковым как в контроле, так и в варианте с максимальным заражением корма. В варианте наибольшего заражения ($3,1 \times 10^4$ КОЕ/г) накопление сухого вещества также было минимальным (на 37% меньше, чем в контроле).

Таблица 37. Накопление массы, веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными дрожжами, и их утилизация при последующем голодании (г/100 г начальной массы)

Варианты заражения комбикормов <i>Candida albicans</i> , КОЕ/г	Масса	Вода	Сухое вещество	Органические вещества			Минеральные вещества (сырая зола)	Энергия	
				сырой протеин	сырой жир	углеводы (по разности)		ккал/100 г	% белка от общей
Накопление, г/100 г массы до питания									
Контроль	92,0	74,1	17,9	11,2	1,6	2,0	3,1	87,2	73,2
3,1×10 ⁴	54,4	43,1	11,3	6,4	0,9	1,9	2,1	53,1	68,7
1,8×10 ⁶	79,3	55,7	16,6	8,7	3,1	1,9	2,8	87,1	56,9
4,3×10 ⁸	82,0	64,1	17,9	9,4	2,6	3,2	2,7	91,7	58,5
Утилизация, г/100 г массы до голодания									
Контроль	27,8	19,7	8,1	5,2	1,6	1,7	+0,4	51,9	57,0
3,1×10 ⁴	37,6	27,7	9,9	6,0	1,4	1,4	0,8	53,4	63,7
1,8×10 ⁶	38,1	26,8	11,3	6,4	2,8	1,0	1,1	67,3	54,2
4,3×10 ⁸	33,2	23,0	10,2	5,9	2,5	1,1	0,7	62,0	54,2

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

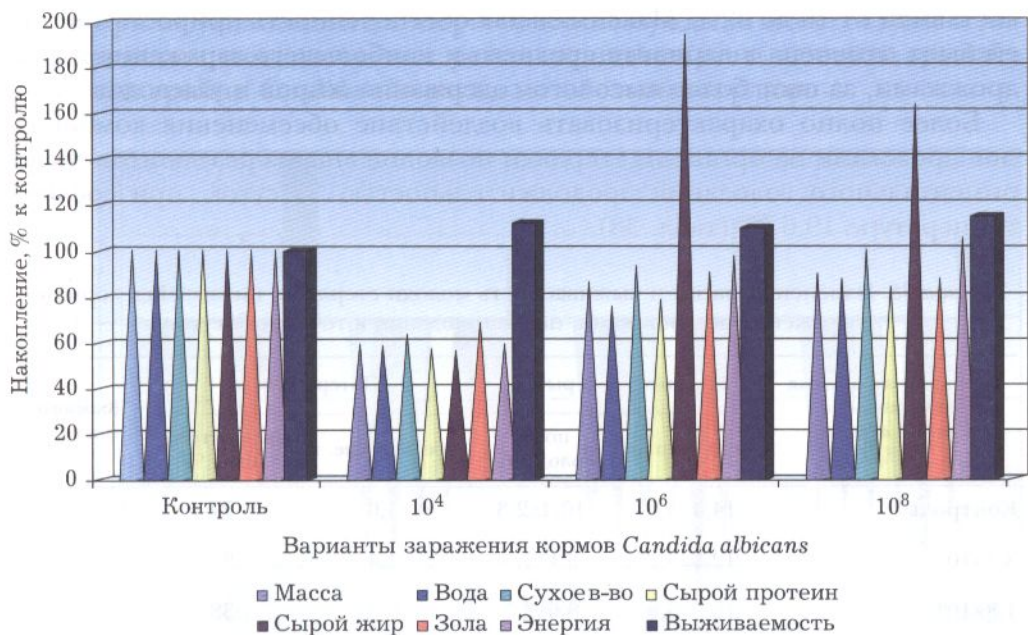


Рис. 16. Накопление веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными дрожжеподобными грибами, % к контролю

Различия в накоплении сухого вещества были обусловлены особенностями синтеза пластических веществ. Отмечено, что присутствие в кормах дрожжей вызвало сокращение синтеза белка. У молоди, из варианта с минимальным заражением корма, его было накоплено на 43% меньше, чем в контроле.

По мере повышения степени обсеменения корма уровень накопления белка возрастал, и в варианте с его максимальным значением различия с контролем сократились до 16%.

Сырого жира больше всего накапливалось у рыб из варианта со средним заражением – $1,8 \times 10^6$ КОЕ/г. Там было отмечено усиление его синтеза, по сравнению с контролем, почти в 2 раза, а при заражении $4,3 \times 10^8$ КОЕ/г – в 1,6 раза. Наблюдаемое явление, по всей вероятности, связано с активным изменением в деятельности микрофлоры кишечника под влиянием большого количества дрожжей и их метаболитов. В любом случае, значительный дисбаланс, выразившийся в усилении синтеза липидов в ущерб синтезу белка, при меньшем, по сравнению с контролем, накоплении массы можно считать нарушением обменных процессов. В варианте с минимальным заражением накопленное количество сырого жира было, наоборот, на 44 % меньше. Минеральные вещества в наибольшей степени концентрировались в теле молоди контрольного варианта, различия

составили от 10 до 32%. Максимальная обеспеченность прироста энергии была отмечена в варианте среднего и наибольшего заражения корма дрожжами, за счет более высокого содержания жиров и углеводов.

Более полно охарактеризовать воздействие обсеменения комбикормов дрожжами на организм стерляди позволил анализ результатов экспериментального голодания продолжительностью 35 суток, при средней температуре 19,6 °C (табл. 38).

Таблица 38. Изменения массы и выживаемость молоди стерляди, питавшейся кормами, зараженными дрожжами, после голодания в течение 35 суток

Варианты заражения комбикормов <i>Candida albicans</i> , КОЕ/г	Средняя масса рыб, г		Потери массы		Выживаемость, %
	до голодания	после голодания	абсолютные, г	относительные, %	
Контроль	14,4±3,6	10,4±2,3	4,0	27	80
3,1×10 ⁴	12,5±3,2	8,1±1,5	4,4	35	33
1,8×10 ⁶	13,9±3,8	8,6±2,7	5,3	38	53
4,3×10 ⁸	13,4±3,8	8,9±2,3	4,5	34	40

Из данных таблицы видно, что за время голодания (сумма тепла 686 градусо-дней) относительные потери массы рыб из контрольного варианта составили 27%. При обсеменении кормов дрожжами потери массы оказались более значимыми и достигли в разных вариантах от 34 до 38%. Кроме того, они сопровождались заметным снижением выживаемости. Если в контроле гибель голодавших рыб составила 20%, то в вариантах с зараженными кормами погибло от 47 до 67%. Причем, и в этом случае, так же как при обсеменении кормов протеом, наибольшая смертность рыб отмечена в варианте с минимальным заражением корма.

Расчеты утилизации веществ и энергии (см. табл. 37 и рис. 17), позволили установить, что по сравнению с контролем, их расход у молоди из вариантов с зараженными кормами шел более интенсивно. В ходе голодания рыбы теряли на 17-40% больше воды. При условии ее меньшего накопления в процессе роста, это можно считать важным отрицательным фактором. Траты сухого вещества у молоди из этих вариантов, также были более интенсивными и превышали таковые в контроле на 22-40%. В сухом веществе, как видно на рис. 17, в наибольшей степени расходовались не жиры, накопление которых в процессе роста шло очень интенсивно, а белок. Его потери были в 1,5-1,8 раза выше, чем у рыб из контрольного варианта. Этот факт является очевидным признаком неполноценности накопленных жиров и возникшими в организме сложно-

стями при их утилизации на энергетические нужды, и может служить дополнительным свидетельством резко отрицательного влияния дрожжеподобных грибов *Candida albicans* на метаболизм стерляди.

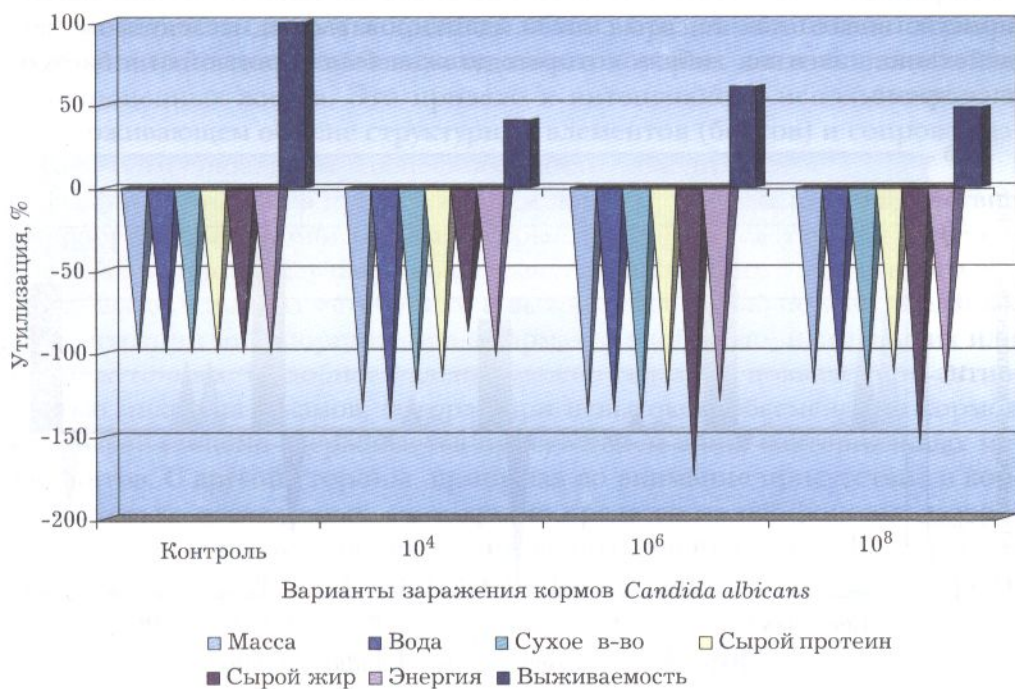


Рис. 17. Траты при голодании веществ и энергии у молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными дрожжеподобными грибами, % к контролю

Описанные патологические изменения, как уже было отмечено, сопровождались значительными потерями массы и высокой гибелью голодавших рыб.

Расчет резервов пластических веществ и энергии, оставшихся у выжившей молоди после голодания (рис. 18), убедительно демонстрирует их заметно меньшее количество у рыб, получавших зараженные корма. Интересно отметить, что из двух вариантов с более высокой степенью заражения корма, менее благоприятная картина наблюдалась в варианте с меньшим присутствием дрожжей ($1,8 \times 10^6$ КОЕ/г).

Этот факт мы можем объяснить тем, что при более высокой степени заражения ($4,3 \times 10^8$ КОЕ/г) отрицательный эффект проявился несколько раньше и сопровождался более ранней гибелью рыб. Выжившие рыбы (40%) смогли в какой-то мере адаптироваться к условиям своего существования. Поэтому на момент окончания голодания, показатели, отражающие наличие жизненных резервов у них были выше, чем у рыб из

варианта с меньшей обсемененностью корма. Отрицательный метаболический эффект заражения уже начал проявляться в снижении выживаемости молоди этого варианта, однако еще не достиг пикового уровня. Есть основание полагать, что среди рыб, взятых на химический анализ, присутствовали как те, что смогли адаптироваться к исследуемому воздействию, так и те, гибель которых должна была произойти в ближайшее время.

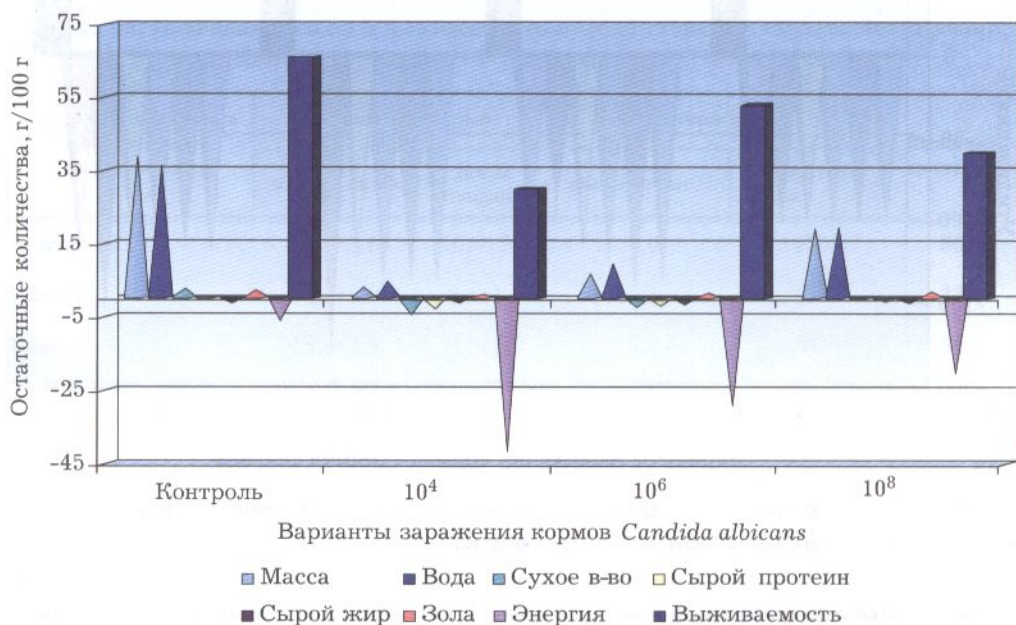


Рис. 18. Общая выживаемость рыб за период опытов и остаточные после голодания количества веществ и энергии у молоди стерляди, от накопленных в период питания комбикормами, зараженными дрожжами (г/100 г начальной массы)

Из представленных на диаграмме трех вариантов, особый интерес привлекает вариант с минимальной степенью заражения корма дрожжами. Как было показано ранее, рыбы этого варианта, в ходе роста, на фоне высокой (93%) выживаемости, накопили существенно меньше массы, веществ и энергии по сравнению с остальными. По окончании голодания у этих, еще живых рыб, отчетливо просматривается отсутствие каких-либо сил и реальной основы для продолжения жизни. Запасы белка, накопленные во время питания, оказались почти полностью исчерпаны. Осталось лишь немного запасов жиров, углеводов и энергии, которых им может хватить на непродолжительное поддержание жизни.

Подводя итог этой серии опытов можно сказать, что последствия заражения корма дрожжами для молоди стерляди явились дополнением к

картине, выявленной ранее, при исследовании влияния микроорганизмов других групп. Как клиническая картина, так и особенности обмена веществ явились признаками развития патологий на структурном, функциональном и метаболическом уровнях. При этом, проявились специфические особенности действия дрожжей. Они выразились в очень сильном нарушении липидного обмена, следствием которых явилось накопление неполноценных жиров. Это привело к интенсивному использованию в поддерживающем обмене структурных элементов (белков) и сопровождалось резким снижением жизнеспособности молоди.

На фоне сходства в проявлениях реакции организма рыб на действие микроорганизмов комбикормов, особый интерес представляет отмеченное в большинстве случаев проявление наивысшего отрицательного эффекта воздействия на метаболизм и выживаемость рыб не максимальных концентраций микроорганизмов в кормах, а наоборот – наименьших или промежуточных. Подобное явление можно связать с повышенной активностью микроорганизмов, которая при невысоком обсеменении кормов в меньшей степени сдерживается присутствием в них бактериальных метаболитов. С другой стороны, принимая во внимание присутствие в корме не только исследуемых, но и других представителей фоновых микроорганизмов, согласно мнению таких видных ученых как Ф.К. Черкес и его соавторов [1987], М. Фробишера [1965], этот эффект может быть связан с синергизмом ассоциации различных видов, куммулятивное действие которых проявляется более мощно, чем влияние каждого из них в отдельности.

3.6. Плесневые грибы (*Penicillium* sp.)

Это последняя из наиболее многочисленных групп микроорганизмов кормов, исследованная нами. Их изучение представляло несомненный интерес, так как отрицательный эффект действия на позвоночных животных микотоксинов, являющихся продуктами жизнедеятельности многих грибов, исследован достаточно подробно. В то же время, сами плесневые грибы, как живые организмы, в аспекте их воздействия на рыб, мало изучены.

Известно, что плесени часто контаминируют комбикорма и их компоненты [Тутельян, 1985; Чернышов, Панин, 2000]. Однако в ряду таких опасных контаминантов комбикормов, как афла-, охра-, трихотеценовые и другие микотоксины, образуемые различными видами микроскопических грибов, метаболитам пенициллума было уделено намного меньше внимания [Тутельян, 1985]. Имеются лишь отдельные сведения, что питание кормами, зараженными этими микроорганизмами в высокой степени, вызывает гибель рыб [Головина, 2003]. Эти факты явились осно-

вой для более детального исследования воздействия комбикормов, зараженных плесенью, на молодь осетровых рыб.

Начальная фоновая обсемененность использованного в этой серии опытов корма составляла $7,4 \times 10^4$ КОЕ/г. Фактическая обсемененность партий корма после их заражения музейным штаммом *Penicillium sp.* – $1,2 \times 10^4$; $7,8 \times 10^6$ и $4,3 \times 10^8$ КОЕ/г. Схема и результаты опытов приведены в табл. 39.

Таблица 39. Результаты выращивания молоди стерляди на комбикормах с различной степенью заражения плесенью (период экспериментов 55 суток)

Варианты кормления; уровень обсемененности кормов <i>Penicillium sp.</i> , КОЕ/г	Средняя масса рыб, г		Прирост		Выживаемость, %
	начало опыта	конец опыта	абсолют- ный, г	среднесуточ- ный, СW, %	
Контроль	7,5±1,6	14,4±3,6	6,9	1,2	83
$1,2 \times 10^4$	7,7±1,5	12,2±2,8	4,5	0,8	90
$7,8 \times 10^6$	7,0±1,4	11,8±3,2	4,8	0,9	58
$4,3 \times 10^8$	7,4±1,6	13,4±3,2	6,0	1,1	90

Масса молоди стерляди до и после окончания кормления зараженными комбикормами, 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 $7,8 \times 10^6$ КОЕ/г, где она составила только 58%.

В табл. 40 обобщены сведения о состоянии внутренних органов молоди стерляди, питавшейся комбикормами, зараженными плесенью. Можно видеть, что в начале опыта состояние внутренних органов у значительного количества рыб было неудовлетворительным. По окончании опыта доля рыб с нарушениями во внутренних органах возросла, в том числе и в контрольном варианте.

Отрицательное 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. При этом, во всех вариантах, наряду с другими микроорганизмами, в кишечниках были обнаружены и плесени (табл. 40, 41). Особое внимание обращает высокая степень контаминации мышц аэромонадами и плесенью у рыб, пи-

тавших зараженными кормами, что является свидетельством крайнего ослабления их организма. Одновременно, патологические изменения внутренних органов наблюдались у половины молоди из контрольного варианта.

Таблица 40. Признаки патологий и обсемененность внутренних органов молоди стерляди после питания в течение 45 суток комбикормами с различной степенью заражения плесенью и последующем голодании

Варианты кормления, уровень обсемененности кормов <i>Penicillium</i> sp., КОЕ/г	Количество рыб с патологиями внутренних органов, % к общему количеству подопытных рыб					
	печень		почки		слизистая кишечника	
	цвет	структура	цвет	структура	истончение	нарушения секреции
<i>До начала опыта</i>						
	40	40	30	10	10	10
<i>После питания</i>						
Контроль	66	70	45	50	0	17
$1,2 \times 10^4$	83	66	83	66	0	17
$7,8 \times 10^6$	83	83	83	83	17	34
$4,3 \times 10^8$	83	83	83	83	17	17
<i>После голодания</i>						
Контроль	60	40	60	40	0	17
$4,3 \times 10^8$	83	83	83	83	17	17

Влияние заражения корма плесенью отразилось и на химическом статусе молоди. Как видно из табл. 42, относительные значения различий были не очень велики. Однако расчеты показателей «накопления» позволили уже при минимальной степени заражения выявить изменения в метаболизме рыб (табл. 43). Направленность этих изменений была сходной с опытами заражения кормов дрожжеподобными грибами, но выраженность ее была более сильной.

Интенсивность накопления массы рыб (по отношению к единице первоначальной) была меньше, чем в контроле на 12–36%, угнетение синтеза белка – до 39%. В то же время, в отличие от опытов с дрожжами, жир накапливался в меньших количествах, чем в контрольном варианте. Особо следует обратить внимание, как и в большинстве предыдущих случаев, на очень низкий уровень накопления пластических веществ в варианте с минимальной степенью заражения корма плесенью (рис. 19).

Таблица 41. Уровень заражения и микробиоценоз внутренних органов рыб после питания кормами, обсемененными плесенью

Варианты кормления, уровень обсемененности кормов <i>Penicillium</i> sp., КОЕ/г	Доля рыб (%) с контаминированными органами (более 10 колоний)						Микробиоценоз кишечника
	печень		почки		мышцы		
	%*	микробиоценоз**	%	микробиоценоз	%	микробиоценоз	
До начала опыта							
	17	<i>St. epidermidis</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Proteus</i> , БГКП	17	<i>A. sp.11</i> , <i>St. epidermidis</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Proteus</i> , БГКП	0	0	<i>St. epidermidis</i> , <i>Acineobacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>A. sp.</i> , БГКП
После питания							
Контроль	30	<i>A.*** sobria</i> , <i>Acinetobacter</i> , БГКП	30	<i>A. sobria</i> , <i>A. sp.5</i> , БГКП	0	0	<i>A. sobria</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Candida</i> , БГКП
1,2×10 ⁴	17	<i>A. sp. 5</i>	17	<i>A. sp. 5</i>	17	<i>A. sp. 5</i>	<i>A. sp. 5</i>
7,8×10 ⁶	50	<i>Flavobacterium</i> , <i>A. hydrophyla</i> , плесень	17	<i>Flavobacterium</i> , <i>A. hydrophyla</i> , БГКП, плесень	50	плесень	<i>Flavobacterium</i> , <i>A. sp. 5</i> , БГКП, плесень
4,3×10 ⁸	30	<i>Flavobacterium</i> , <i>A. sp. 5</i> , БГКП, плесень,	17	<i>Flavobacterium</i> , <i>A. sp. 5</i> , БГКП, плесень	30	БГКП, плесень	<i>Flavobacterium</i> , <i>A. sp. 5</i> , БГКП, плесень
После голодания							
Контроль	50	БГКП, <i>Acinetobacter</i> , <i>A. sp.</i> , <i>A.caviae</i>	50	БГКП, <i>Acinetobacter</i> , <i>A. sp.</i> , <i>Candida</i> , <i>A. caviae</i>	17	<i>A. sp.</i> , <i>Candida</i>	—
4,3×10 ⁸	50	<i>Acinetobacter</i> , БГКП, плесень	70	<i>Bac. sp.</i> , <i>A. cinetobacter</i> , БГКП, плесень	50	БГКП, плесень	<i>Bac. sp.</i> , <i>Acinetobacter</i> , БГКП, плесень

*Не включены рыбы с единичными колониями во внутренних органах.

**Доминирующие микроорганизмы, в т.ч. в случаях низкой (<10 колоний) обсемененности.

***Бактерии рода *Aeromonas*.

Таблица 42. Содержание веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными плесенью и последующем голодании

Варианты заражения комбикормов плесенью <i>Penicillium</i> sp., КОЕ/г	Содержание веществ, % сырой ткани						Энергия	
	Вода	Сухое вещество	Органические вещества			Минеральные вещества (сырая зола)	ккал/100 г	% белка от общей
			сырой протеин	сырой жир	углеводы (по разности)			
До начала кормления								
	81,4	18,6	12,5	2,2	0,9	3,0	96,0	74,3
После кормления								
Контроль	81,0	19,0	12,3	2,0	1,5	3,2	95,4	74,4
3,1×10 ⁴	81,0	19,0	12,2	1,9	1,9	3,0	96,5	72,0
1,8×10 ⁶	81,5	18,5	11,9	2,0	1,8	2,8	93,4	72,6
4,3×10 ⁸	80,0	20,0	13,0	2,3	0,1	3,5	96,3	76,8
После голодания								
Контроль	84,7	15,3	9,1	0,5	1,9	3,8	64,7	80,2
1,8×10 ⁶	85,5	14,5	8,8	0,5	1,4	3,8	60,9	82,4
4,3×10 ⁸	84,3	15,7	10,0	0,7	1,4	3,6	69,6	81,9

Получить более полную информацию о реакции организма стерляди на обсеменение корма плесенью позволили результаты экспериментального голодания (табл. 44).

Можно видеть, что независимо от уровня плесени в кормах, значительная часть молоди, получавшей их, погибла при голодании.

Это явилось свидетельством резко отрицательного воздействия присутствия плесени и ее метаболитов, которое, однако, не было выявлено при питании. Следует обратить внимание, что траты пластических веществ и энергии на поддерживающий обмен при голодании (см. табл. 43), не были очень велики (не более 10% по сравнению с контрольным вариантом). Есть основания полагать, что столь высокий отход молоди из опытных вариантов связан с низким качеством, накопленных при питании, пластических веществ, которые оказались не способными обеспечить поддерживающий обмен. Интересно отметить, что траты веществ и энергии в этой серии опытов были заметно меньшими, чем в вариантах с поражением кормов дрожжами, что свидетельствовало о более высокой токсичности плесени.

Таблица 43. Накопление массы, веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными плесенью, их утилизация при последующем голодании

Варианты заражения комбикормов плесенью <i>Penicillium</i> sp., КОЕ/г	Масса	Вода	Сухое вещество	Органические вещества,%			Минеральные вещества (сырая зола)	Энергия	
				сырой протеин	сырой жир	углеводы (по разности)		ккал/100 г	% белк. от общей
Накопление, г /100 массы до питания									
Контроль	92,0	74,1	17,9	11,2	1,6	2,0	3,1	87,2	73,2
1,2×10 ⁴	58,4	46,9	11,5	6,8	0,8	2,1	1,8	55,2	70,3
7,8×10 ⁶	68,6	56,0	12,6	7,6	1,2	2,1	1,7	63,7	68,0
4,3×10 ⁸	81,1	63,5	17,6	11,0	2,0	1,3	3,3	87,2	71,9
Утилизация, г/100 г массы до голодания									
Контроль	27,8	19,7	8,1	5,2	1,6	1,7	+0,4	51,9	57,0
1,2×10 ⁴	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7,8×10 ⁶	29,7	21,4	8,3	5,7	1,6	0,8	0,1	51,1	63,6
4,3×10 ⁸	27,6	19,0	8,6	5,8	1,8	0,1	0,9	50,6	65,4

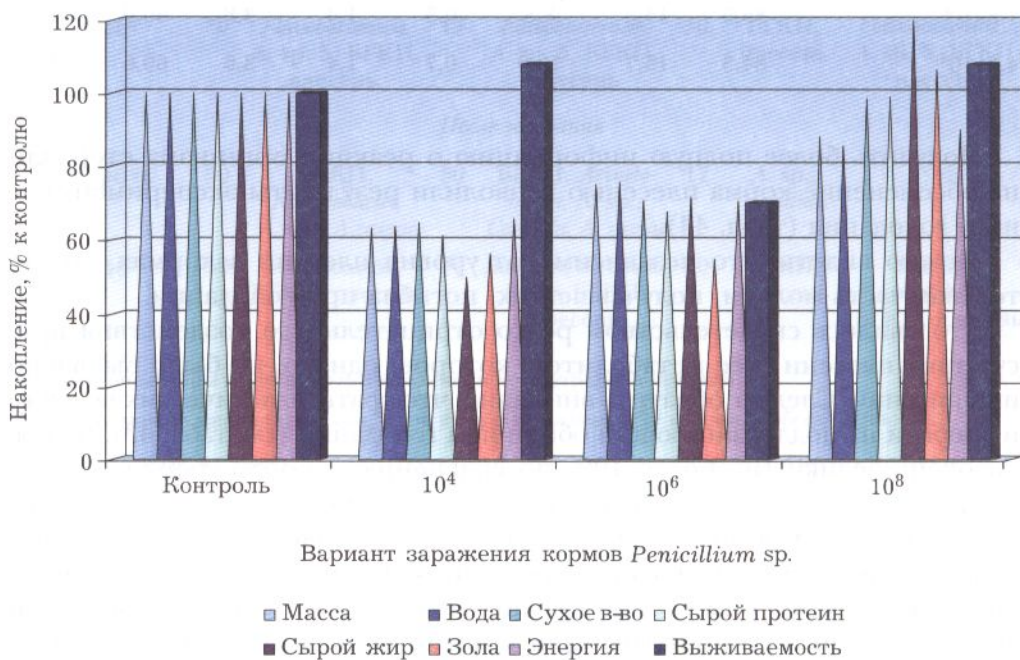


Рис. 19. Накопление веществ и энергии в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными плесенью, % к контролю

Таблица 44. Выживаемость и изменения массы молоди стерляди, питавшейся комбикормами, зараженными плесенью, за период экспериментального голодания в течение 35 суток

Варианты заражения комбикормов, <i>Penicillium</i> sp., КОЕ/г	Средняя масса рыб, г		Потери массы		Выживаемость, %
	начало голодания	окончание голодания	абсолютные, г	относительные, %	
Контроль	14,4±3,6	10,4±2,3	4,0	27,8	80
1,2×10 ⁴	12,2±2,8	8,8±0,6	3,4	27,9	33
7,8×10 ⁶	11,8±3,2	8,3±1,9	3,5	29,7	40
4,3×10 ⁸	13,4±3,2	9,7±1,7	3,7	27,6	40

Дополнением имеющейся картины влияния на молодь стерляди кормов, зараженных плесенью, явились расчеты остаточных количеств веществ и энергии, сохранившихся у рыб после голодания (рис. 20).

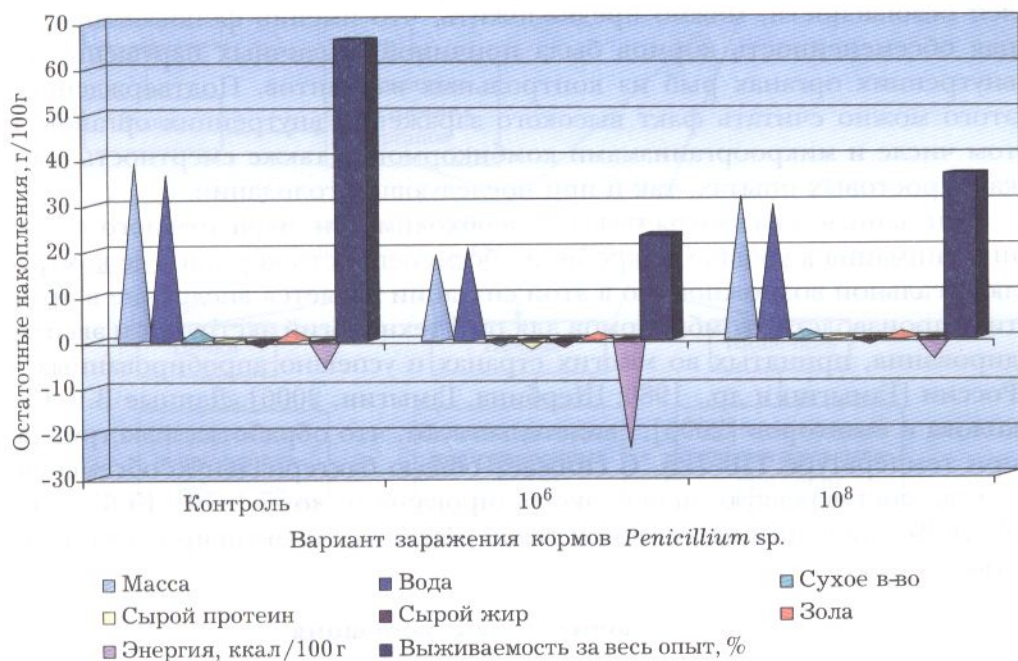


Рис. 20. Остаточные количества веществ и энергии от накопленных в теле молоди стерляди после питания комбикормами, зараженными плесенью, и израсходованных при голодании (г/100 г начальной массы)

На рис. 20 достаточно четко видно, что к окончанию голодания тело рыб, оставшихся живыми, состояло в основном из воды. Крайнее истощение запасов пластических веществ и использование молодью тех резервов, которые у нее имелись еще до начала опыта, сказались на ее выживаемости, которая была намного ниже, чем в контроле. В то же время, уровень запасов, сохранившихся у молоди из контрольного варианта, после питания также был невысок и составлял лишь 6,7 % от массы тела. Это свидетельствовало о неудовлетворительном состоянии молоди и в контрольном варианте, что далее еще более усугубилось патологическими изменениями во внутренних органах.

Следует отметить, что аналогичные негативные изменения во внутренних органах были обнаружены у рыб из контрольных вариантов еще в четырех сериях опытов с другими микроорганизмами (кишечной и картофельными палочками, стафилококками, дрожжами), то есть в пяти сериях из семи выполненных. Учитывая, что условия содержания рыб были близки к оптимальным, корма по содержанию питательных веществ соответствовали пищевым потребностям молоди этого возраста, качество липидов корма находилось в пределах нормативных показателей безопасности, можно предположить, что именно фоновая микробная обсемененность кормов была причиной различных нарушений во внутренних органах рыб из контрольных вариантов. Подтверждением этого можно считать факт высокого заражения внутренних органов, в том числе и микроорганизмами комбикормов, а также смертность рыб, как в ростовых опытах, так и при последующем голодании.

Эти данные свидетельствуют о необходимости значительного усиления внимания к уровню микробной обсемененности кормов и ее контролю. Реальной возможностью в этой ситуации является внедрение в практику производства комбикормов для рыб технологий экструзии и экспандирования, принятых во многих странах и успешно апробированных в России [Гамыгин и др., 1989; Щербина, Гамыгин, 2006]. Данные В.В. Соколова и соавторов [2006], свидетельствуют, что обработка в экструдере при температуре 110–125 °С снижает общую бактериальную обсемененность, составлявшую перед экструдированием до $7,1 \times 10^5$ КОЕ/г на 62–100%; кишечная палочка при такой обработке инактивируется полностью.

Заключительные замечания

Подводя итог комплексу проведенных исследований, следует сказать, что 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 плесневы-

ми (*Penicillium* sp.) грибами, в большинстве случаев, имеет внешне скрытый характер, не отражаясь на нормативных показателях выживаемости. В то же время, микробное заражение кормов вызывает у рыб достаточно значимые изменения. Его длительное воздействие, превышающее адаптивные возможности организма, приводит к необратимым патологиям, хроническим заболеваниям, снижению жизнестойкости и продуктивности. В обобщенном виде воздействие на рыб микробной контаминации комбикормов может быть представлено в виде схемы (рис. 21).

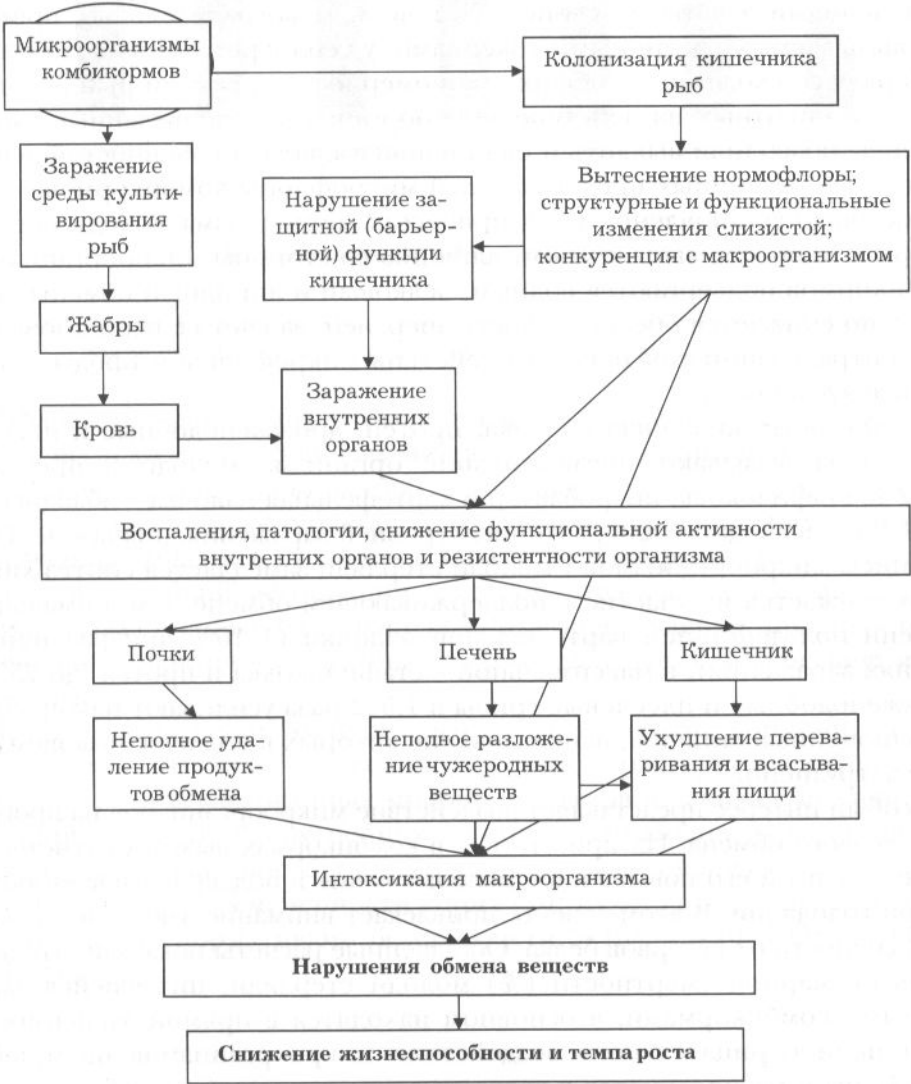


Рис. 21. Схема воздействия микроорганизмов комбикормов на организм рыб

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.

Наряду со сходством в общих закономерностях реакции рыб и теплокровных животных на действие микроорганизмов, проведенные эксперименты позволили выявить и ряд индивидуальных особенностей действия на рыб различных представителей микрофлоры комбикормов.

Так, было установлено, что в процессах метаболизма молоди осетровых рыб, наиболее выраженному влиянию со стороны микроорганизмов комбикормов подвергаются водный, белковый и липидный обмены, значительно снижается обеспеченность энергией, за счет ее использования для нейтрализации токсического действия микрофлоры и продуктов ее жизнедеятельности.

В частности, 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. Под влиянием микроорганизмов 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.

Особый интерес представляет воздействие микроорганизмов на процессы белкового обмена. Их присутствие в комбикормах вызывает угнетение синтеза белка и его повышенное использование в поддерживающем обмене при голодании. В этом аспекте привлекает внимание зависимость жизнеспособности от резервов белка. Обобщенные расчеты показали, что значения суммарной смертности (%) молоди стерляди, питавшейся зараженными комбикормами, в основном находятся в прямой зависимости от степени отрицательного воздействия микроорганизмов на метаболизм белка и располагаются в возрастающем порядке (рис. 22).

Анализируя отрицательное воздействие зараженных комбикормов,

необходимо отметить, что в подавляющем большинстве случаев оно было наибольшим при минимальном или среднем уровне заражения.

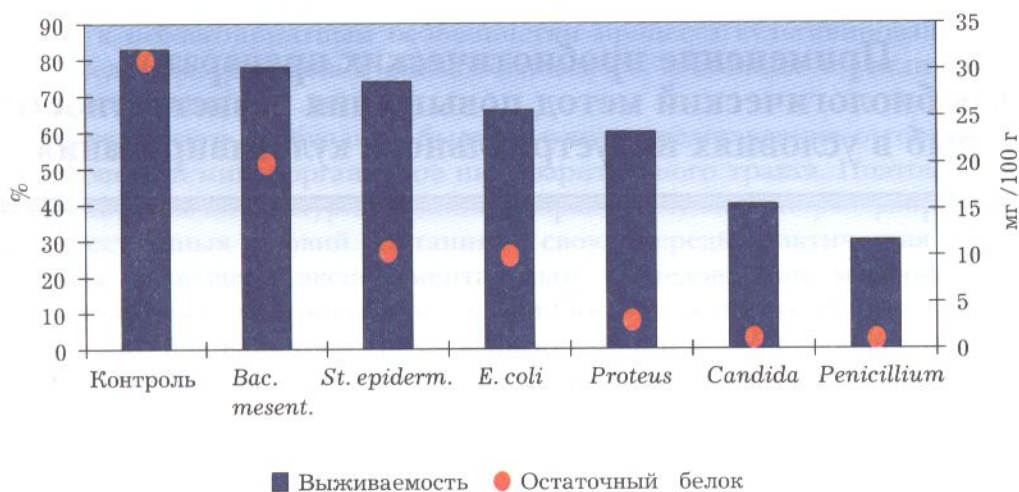


Рис. 22. Суммарная выживаемость и остаточные количества белка у молоди стерляди, после питания зараженными кормами и последующего голодания

Подобный эффект может быть объяснен присутствием в кормах, наряду с исследуемыми, фоновых микроорганизмов, численность которых не была подавлена монокультурой заражающего агента. Развиваясь на питательном субстрате комбикорма, все микроорганизмы продуцировали собственные токсины. Различия в характере и направленности действия токсинов подобной ассоциации микроорганизмов наносят макроорганизму множественные разнонаправленные повреждения, противостоять мозаичной совокупности которых гораздо сложнее, чем действию монокультуры.

Подводя итог серии экспериментов с зараженными кормами, следует подчеркнуть, что значения количественных характеристик отрицательного действия исследованных микроорганизмов на снижение защитных функций, состояние внутренних органов, метаболические процессы, темп роста и жизнеспособность 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].

Глава 4

Применение пробиотических препаратов как биологический метод повышения резистентности рыб в условиях индустриального культивирования

Как было показано в предыдущих главах, внутренние повреждения и патологии, которые развиваются у рыб в ответ на присутствие в корме токсических веществ или микроорганизмов, в большом числе случаев скрыты внешне благополучной обстановкой. Являясь следствием структурных и функциональных нарушений во внутренних органах, обмене веществ, эти патологии проявляются в виде единичного отхода и торможения роста в обычных условиях и значительно больших потерях – в неблагоприятных. Тот факт, что, как правило, эти нарушения носят скрытый, часто обратимый характер, свидетельствует о «пограничности» такого состояния и, следовательно, о возможности его коррекции путем активизации деятельности собственных защитных сил организма рыб. Такой подход, при минимальном внешнем воздействии, позволяет активизировать адаптационные механизмы организма, предоставляя ему большие возможности для реализации ростовой составляющей его потенциала.

Принимая во внимание установленные в ходе проведенных экспериментов особенности воздействия на рыб, негативных факторов комбикормов, а так же роль пищеварительной системы в осуществлении защитных функций организма, мы посчитали наиболее целесообразным использовать средства, способствующие усилению именно этой стороны ее деятельности. Наибольший интерес в этом аспекте представляет микрофлора пищеварительного тракта. Как свидетельствуют литературные источники [Уголев, 1991; Панин, 2000, 2002; Кузьмина, 2005], а так же результаты описанных выше опытов, именно она является одним из первых объектов негативного воздействия чужеродной микрофлоры и наиболее уязвимым звеном, быстро реагирующим изменениями своего состава на различные неблагоприятные условия. С этой точки зрения,

представлялось целесообразным найти способы оздоравливающего воздействия на микрофлору пищеварительного тракта рыб и оценить влияние этого воздействия с позиций усиления общей резистентности организма к неблагоприятным особенностям процесса культивирования и, как следствие, улучшения физиологического состояния и увеличения продуктивности.

Прежде всего необходимо было получить представление о составе и соотношении микроорганизмов пищеварительного тракта. Поэтому, ниже приведены литературные данные, характеризующие нормофлору рыб из естественных условий обитания. В свою очередь практическая часть раздела посвящена экспериментальным исследованиям микрофлоры культивируемых осетровых рыб различного возраста, особенностям ее изменений под влиянием среды выращивания и лечебно-профилактических препаратов и динамикой физиологических и продукционных характеристик, сопровождающей эти изменения.

4.1. Микрофлора кишечника рыб из естественных условий обитания

Литературные данные о начале формирования кишечной микрофлоры рыб противоречивы. Так, по данным Я. Шивокене [1989], М. Cahill [1990], В. Лубянскене и Р. Ястигюнене [1995], R. Buddington и его соавторов [1997], в момент вылупления из икры или рождения, пищеварительный тракт рыб свободен от бактерий. Значительная часть бактерий попадает в организм рыб с водой и пищей в период их перехода на внешнее питание.

В то же время, по сообщению G. Hansen и J. Olafsen [1999], кишечная микрофлора рыб начинает формироваться в момент попадания икры в воду (сразу после оплодотворения), и колонизация оболочки икринки водной микрофлорой происходит уже на самых ранних этапах развития. В связи с тем, что личинки всех видов рыб в естественных условиях питаются зоопланктоном, видовой состав бактерий, заселяющих кишечника у рыб разных видов, но обитающих в одном биотопе, по мнению В.В. Кузьминой [2005], – близок. Однако в дальнейшем, в зависимости от анатомических и физиологических особенностей, а также характера питания макроорганизма, в составе кишечной микрофлоры происходят изменения.

Согласно данным различных авторов, у большинства пресноводных рыб преобладают аэробные грамотрицательные микроорганизмы родов *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* и *Bacillus*, а также анаэробные бактерии родов *Vibrio* и *Clostridium* [Зубкова, 1965; Ларцева, 1997; Trust, Sparrow, 1974; Trust et al., 1979; Prieur et al., 1990; Sakata, 1990;

Gournier-Chateau et al., 1994]. Микрофлоре рыб не свойственно столь значимое разнообразие организмов, как у наземных теплокровных животных [Баздеркина, 1992; Syvokiene et al., 1997; Кузьмина, Скворцова, 2002]. Если в кишечнике жвачных животных обитает более 600 видов микроорганизмов [Панин, 2002], то у рыб, даже бентофагов – на порядок меньше, не говоря уже о хищных видах, в кишечнике которых набор видов еще уже [Зубкова, 1965, 1966; Ларцева 1997]. Вне всякого сомнения, это связано с менее широким диапазоном пищевых источников у рыб и спецификой обитания водных организмов и наземных животных.

Несмотря на более узкий, по сравнению с сельскохозяйственными животными, спектр микроорганизмов, населяющих кишечника рыб и преобладание у них грамотрицательных бактерий, в естественных условиях у пресноводных видов, все же присутствуют лакто- и бифидобактерии [Шивокене, 1989; Abrosimova, 2006], которые у теплокровных животных являются основой нормальной микрофлоры.

У морских видов рыб чаще доминируют бактерии родов *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Corinebacterium*, *Micrococcus* [Horsley, 1977; Cahill, 1990; Sugita et al., 1988]. Имеются данные, что в кишечнике пресноводной тилапии с повышением солености уменьшается количество облигатных анаэробов и возрастает содержание аэробных и факультативно анаэробных грамотрицательных палочек [Sugita et al., 1982]. Эти изменения авторы связывают с процессами адаптации микрофлоры кишечника к морской воде и с повышением чувствительности пресноводных бактерий к увеличению солености. Высокая чувствительность аэробов к солевым растворам (в частности, к NaCl) используется для лечения рыб, инфицированных патогенными бактериями [А. Щербина, 1960; Buddington et al., 1997].

Общая численность микроорганизмов в пищеварительном тракте рыб находится в прямой зависимости от интенсивности питания. При этом, наибольшее их количество соответствует времени, когда наблюдается максимум пищевой активности рыб [Зубкова, 1966; Шивокене, 1989; Баздеркина, 1992; Voveirene, 2002]. По данным В.В. Кузьминой и Е.Г. Скворцовой [2002], численность гетеротрофных микроорганизмов в пустом кишечнике леща в зимние месяцы почти в миллион раз ниже, чем летом, в период активного питания – 6×10^2 и 6×10^7 КОЕ/мл соответственно. Есть также сведения об отсутствии бактерий в кишечнике щуки в период голодания [Margolis, 1953].

Пища является важнейшим фактором, регулирующим не только численность, но и видовое разнообразие микроорганизмов пищеварительного тракта рыб. Так, сравнение микрофлоры кишечника сазана и судака из дельты Волги обнаружило значительно более широкий спектр микроорганизмов, присущих бентофагу. Из кишечника сазана было выде-

лено 49 видов микроорганизмов, принадлежащих к 12 родам, а у судака – 15 видов 7 родов [Зубкова, 1965, 1966]. Характером питания рыб обусловлена также и специфичность микроорганизмов. Так, для растительноядных рыб характерны бактерии интенсивно разлагающие клетчатку или широко распространенные на поверхности растительности [Лубянскене и др., 1989].

Видовой состав и численность микробиоценоза пищеварительного тракта рыб обусловлена способностью бактерий различных видов расщеплять специфические пищевые субстраты до мономеров. Образующиеся продукты полураспада пищевых веществ становятся более доступными для пищеварительных ферментов рыб. Тем самым, микроорганизмы кишечника принимают непосредственное участие в процессе пищеварения рыб. Гетеротрофные и протеолитические бактерии присутствуют, практически, у всех видов рыб. Амилолитические бактерии у хищных рыб имеются в малых количествах, их число резко возрастает при появлении в рационе рыб пищи растительного происхождения [Luczkowich, Stelwag, 1993; Syvokiene et al., 1996; Кузьмина, Скворцова, 2002].

Очень подробно вопросы состава и возможного участия микрофлоры рыб в процессах переваривания пищи, на основе анализа большого количества собственных и литературных данных, освещены в монографии В.В. Кузьминой [2005]. Имеющиеся в распоряжении автора данные, позволили сделать выводы о том, что микроорганизмы, присутствующие в кишечнике водных животных, как и у наземных, способны участвовать в деградации как основных энергетических (белки, жиры, углеводы), так и специфических (хитин, целлюлоза, целлобиоза, ксилоза) компонентов пищи, принимая участие в процессах симбионтного пищеварения. Причем, в ряде случаев они проявляют большую устойчивость к негативному влиянию неблагоприятных факторов среды, чем пищеварительные ферменты рыб и, тем самым, компенсируют недостаточно высокий уровень активности пищеварительных ферментов рыб. Известны факты, что у безжелудочных рыб отсутствует хитиназа, и хитин в ограниченном объеме переваривается за счет микрофлоры кишечника.

Подводя итог приведенным выше литературным данным, следует подчеркнуть, что в природных водоемах качественный и количественный состав кишечной микрофлоры различных видов рыб имеет, в основном, не постоянный характер и определяется условиями их обитания и питания.

4.2. Биологический метод коррекции состава микробиоценоза кишечника

В отличие от природных условий, при культивировании, особенно интенсивном, где, как правило, рыбы лишены естественной пищи и отсутствует самоочищение воды (сильнейшие факторы повышения резистентности рыб), под влиянием микрофлоры воды и кормов, изменения в микробиоценозе кишечника также имеют место. Однако они, как было показано в наших опытах, в основном, носят негативный характер, приводя к ослаблению роста, высокой подверженности рыб заболеваниям, повышенной смертности. Стрессы различного происхождения, неизбежные при интенсивном культивировании, еще более усугубляют ситуацию.

Отсутствие видимой человеческому глазу ранней реакции рыб на подобное 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, встает вопрос о необходимости пересмотра сложившихся методологических подходов к оздоровлению выращиваемых объектов [Панин, 2002].

В связи с тем, что состав кишечной микрофлоры находится в состоянии динамического равновесия, и подвержен действию различных факторов, наиболее целесообразным нам представлялось использование экологического метода 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 из состава кишечного биоценоза. Кроме того, пробиотики, оказывая положительное влияние на иммунный ста-

тус, не вызывают привыкания со стороны условно-патогенной микрофлоры [Шендеров, 2001; Санин и др., 2002]. С этих позиций, пробиотики характеризуются как иммунологические препараты, безопасные для здоровья человека и животных, которые обладают широким спектром протективных свойств [Зинченко, Панин, 2000; Панин, Малик, 2005].

4.3. Характеристика и свойства пробиотиков

Пробиотики (от слов «про био», что означает «для жизни») – это группа препаратов из живых непатогенных микроорганизмов, предназначенных для коррекции экологии открытых и закрытых микробиотопов организма. Они способны продуцировать биологически активные метаболиты, которые могут подавлять рост условно патогенных бактерий, восполняя, тем самым, дефицит нормальной микрофлоры.

В состав пробиотиков входят представители нормальной микрофлоры кишечника, в частности, бифидобактерии видов *Bifidum adolescentis*, *Bif. longum*, *Bif. bifidum*, *Bif. globosum*, *Bif. termophilus*; молочнокислые бактерии *Lactobacillus. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum*; стрептококки *Streptococcus faecium*, *Str. lactis diastaticus*; спорообразующие бактерии *Bacillus subtilis*, *Bac. licheniformis*, *Bac. panthothenticus*, *Ruminococcus albus* [Зинченко, Панин, 2000; Панин, Малик, 2005 и др.].

Важнейшим свойством организмов-пробионтов является адгезия – способность прикрепляться к эпителию слизистой кишечника при помощи специализированных рецепторов. Это позволяет бактериям противостоять перистальтическим движениям и, надежно удерживаясь в кишечнике, усиленно размножаться, тем самым, предотвращая колонизацию слизистой патогенными штаммами, которые также обладают адгезивными свойствами. Способность микроорганизмов к адгезии – явление видоспецифичное. Микроорганизмы, выделенные от одного вида животных, нередко могут характеризоваться слабой адгезией по отношению к энтероцитам других видов [Barrow et al., 1980].

Помимо адгезии, важнейшим свойством кишечных микроорганизмов, участвующих в осуществлении защитной функции, является их антимикробная (антагонистическая) активность. Продукты жизнедеятельности нормальной кишечной микрофлоры, предотвращая адгезию чужеродных микроорганизмов к кишечной слизистой, тем самым, сохраняют активность энтероцитов, продуцирующих локальные антитела, в том числе и иммуноглобулины. Благодаря проявлениям антагонистической активности, в частности лактобацилл, обеспечивается образование продуктов метаболизма (молочной, уксусной, в небольшом количестве – муравьиной и сукциниловой органических кислот), тормозящих жизнедеятельность патогенных бактерий [Kandler, Weiss N., 1986]. Причем, сочетание

действия молочной и уксусной кислот сопровождается взаимно усиливающим (синергидным) эффектом [Adams, Hall, 1988].

Кроме органических кислот, нормофлора (в частности, лактобациллы) способна секретировать также и низкомолекулярные антибактериальные вещества, такие как перекись водорода, антимикробный эффект которой хорошо известен [Condon S., 1987]. Под действием перекиси водорода происходит снижение синтеза белков и факторов адгезии, ограничение передачи генетической информации у грамотрицательных бактерий.

К механизмам, позволяющим ряду бактерий (например, лактобактериям) осуществлять контроль над кишечной микрофлорой, относится также их способность к секреции бактериоцинов и низкомолекулярных антибиотиков. Бактериоцины сдерживают процессы деления клеток бактерий, вызывают нарушения передачи наследственной информации, разрушение рецепторных связей и имеют противоопухолевый эффект. Известно, что бактериоцины различных видов лактобацилл ингибируют развитие листерий, стафилококков, некоторых видов энтерококков и бацилл [Metha et al., 1983; Ali et al., 1995]. Высокой антагонистической активностью, по отношению к патогенной микрофлоре, обладают также и бифидобактерии [Ayaaki, Ishisaki, 1994].

К антибактериальным метаболитам нормальной микрофлоры кишечника относится также и лизоцим, который повышает фагоцитарную активность макрофагов, вызывает снижение колонизационной активности грамотрицательных бактерий, является неспецифическим стимулятором макрофагального иммунитета [Панин и др., 2002].

Несомненным положительным фактором защитных свойств нормофлоры является нейтрализация ею энтеротоксинов, образуемых патогенными бактериями и предотвращение синтеза биогенных аминов, обладающих токсическим действием [Pollman, Danielson, 1980; Talon et al., 1980; Perdington et al., 1986]. Кроме того, следует отметить, что лактобациллы разрушают такие токсичные вещества как нитраты, нитрозамины [Kato, et al., 1983], стимулируют подъем уровня общего сывороточного белка в крови, активность лимфоцитов, фагоцитов и иммуноглобулин-продуцентов кишечника [Perdigon et al., 1988; Семенов и др., 1992].

Проявление адгезивных, бактерицидных, бактериостатических и других, выше перечисленных свойств нормофлоры у высших животных, также как и присутствие в пищеварительном тракте, помимо типичных представителей водных биоценозов, лактобактерий, наряду с закономерностями взаимоотношений симбионтной микрофлоры кишечника, свойственно и рыбам [Шивокене, 1989].

В соответствии с особенностями воздействия, к штаммам микроорганизмов, используемых в пробиотических препаратах, предъявляется

сложный комплекс требований. Согласно R. Fuller и E. Turvey [1971] к ним относятся:

- *отсутствие патогенности*, что является основным требованием для используемых штаммов;

- *жизнеспособность* – бактерии препарата должны сохраняться в живом виде на всем протяжении желудочно-кишечного тракта и выдерживать технологические процедуры, связанные с приготовлением кормов;

- наиболее предпочтительны для использования в пробиотических препаратах *грамположительные бактерии*; они более устойчивы к действию пищеварительных ферментов, а в технологическом аспекте – к замораживанию и лиофильному высушиванию;

- *поддержание оптимального количества* пробиотических бактерий в кишечнике; достижение этого эффекта возможно путем использования штаммов, либо прикрепляющихся к слизистой кишечника, либо размножающихся со скоростью, превышающей скорость их элиминации при перистальтических движениях кишечника;

- *кислотоустойчивость и способность к нейтрализации кислоты* – свойства, необходимые для сохранения жизнеспособности при прохождении бактерий препарата через желудок, а также для снижения кислотности среды в своем микроокружении;

- *толерантность к желчи* – оболочки большинства бактерий очень чувствительны к действию желчи, однако среди кишечных бактерий есть виды, например лактобациллы, достаточно устойчивые к действию желчи;

- *видоспецифичность* – наличие адгезивных свойств к слизистой кишечника конкретных видов животных.

Считается, что лучшими профилактическими и лечебными свойствами обладают пробиотики, содержащие штаммы, выделенные от животных конкретного вида и предназначенные именно для своего хозяина.

В поисках новых стратегий для повышения эффективности пробиотиков предлагаются различные сочетания пробиотических культур с ферментами, иммуномодуляторами, витаминами и другими биологически активными добавками. Значительные успехи достигнуты в генетической модификации пробиотических микроорганизмов с целью создания новых штаммов с лечебными свойствами, в частности, для доставки лекарственных соединений, оказывающих эффект непосредственно на слизистой кишечника или в качестве стимуляторов иммунного ответа [Панин и др., 2002].

Согласно классификации, принятой в животноводстве, пробиотики делятся на следующие группы:

- препараты из монокультуры живых организмов;
- препараты, содержащие комплекс живых организмов;
- препараты из монокультур или комплекса микроорганизмов, вклю-

чая субстанции, стимулирующие их приживание или рост и размножение;

- препараты из генетически модифицированных штаммов микроорганизмов;

- препараты, содержащие, помимо микроорганизмов или средств, стимулирующих их рост и размножение, другие соединения, влияющие на функции клеток органов и тканей макроорганизма.

На сегодняшний день, в нашей стране зарегистрировано около тридцати пробиотических препаратов.

Многофункциональный эффект применения пробиотиков, особенно для новорожденных и молодых животных, выражается, прежде всего, в сокращении сроков формирования нормального кишечного биоценоза, контроле над развитием популяций условно патогенных микроорганизмов. Микроорганизмы пробиотиков способствуют улучшению перевариваемости кормов, участвуют в регуляции ферментного обмена и синтеза гормонов, коррекции минерального, солевого и витаминного обменов, а также оказывает положительное действие при патологиях печени кормового и лекарственного происхождения. Они могут играть значимую роль в морфологическом и функциональном восстановлении клеток слизистой оболочки кишечника. Весьма велико их воздействие и на иммунную систему, так как они стимулируют иммунитет слизистой желудочно-кишечного тракта и способствуют сокращению сроков формирования иммунной системы. Весь комплекс воздействий способствует значительному повышению естественной резистентности организма [Малик, 2002, Панин и др., 2002].

4.4. Опыт использования пробиотиков в рыбоводстве

В настоящее время, в сельскохозяйственном производстве применение пробиотиков является составной частью технологий выращивания 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 от полунтенсивных форм культивирования к внедрению высоко интенсивных технологий, неизбежно приведет к появлению бактериальных заболеваний, с которыми уже давно столкнулись в животноводстве и птицеводстве.

Применение пробиотиков в рыбоводстве было начато за рубежом в 80-х годах прошлого столетия, когда предпринимались попытки применения препаратов, разработанных для наземных животных [Kozasa, 1986; Gatesoupe, 1989; Gatesoupe et al., 1989; Мирзоева, 2001]. В 1990-е годы количество проводимых экспериментов и положительных результатов значительно возросло, а число препаратов расширилось за счет ис-

пользования пробиотиков на основе штаммов автохтонной (собственной) микрофлоры различных видов рыб [Westerdahl et al., 1991; Smith, Davey, 1993; Gatesoupe, 1999].

Были получены положительные результаты применения на рыбах пробиотиков для сельскохозяйственных животных на основе бактерий р. *Bacillus* [Strom, Olafsen, 1990; Nedoluha, Westhoff, 1995; Sugita et al., 1998]. Как и у наземных теплокровных животных, эти микроорганизмы не колонизируют кишечник рыб, однако поддержание их высокой концентрации в пищеварительном тракте канального сома позволило повысить его выживаемость и продуктивность [Queiroz, Boyd, 1998]. Аналогичный эффект дало использование для японского угря препарата на основе *Bacillus toyoi*, разработанного для крупного рогатого скота [Kozasa, 1986]. Применение подобных препаратов сопровождалось не только хорошо выраженным рыбоводным эффектом, но и снижением обсемененности среды культивирования и кормовых организмов (коловраток) патогенными бактериями рода *Vibrio* [Gatesoupe, 1993].

Помимо бациллярных, с успехом применялись препараты, включающие другие виды бактерий. Так, на пробиотиках, содержащих лактобактерии, было получено увеличение выживаемости и темпа роста тюрбо и японского ромба [Gatesoupe, 1989, 1991; Gatesoupe et al., 1989]. На препаратах со *Streptococcus faecium* кроме улучшения роста и усвоения корма, а также подавления развития кишечной палочки в кишечнике карпа, была обнаружена адгезия бактерий препарата к эпителию кишечника [Non et al., 1994; Bogut et al., 1997].

Исследования, направленные на поиск автохтонных штаммов, выделенных из рыб и водных беспозвоночных для разработки видоспецифичных пробиотических препаратов, позволили обнаружить выраженную антагонистическую активность у некоторых штаммов бактерий родов *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* и возможность их использования для улучшения роста молоди рыб и беспозвоночных, выращиваемых в интенсивных условиях [Maeda, Liao, 1992; Marty, Martin, 1992; Berg, 1995; Austin et al., 1997; Maeda et al., 1997 и др.]. Представляет также интерес проявление антагонистической активности у *Carnobacterium divergens* из кишечника семги [Joborn et al., 1997] и лактобактерий из кишечника палтуса [Byun et al., 1997], обнаруженные по отношению к патогенной микрофлоре.

В нашей стране на сегодняшний день используются только препараты, разработанные для сельскохозяйственных животных и птиц.

На лососевых рыбах, на фоне улучшения их физиологического состояния, получен ростостимулирующий эффект при применении сухой культуры ацидофильной палочки [Валова, 1999; Карасева и др., 2000]. Для профилактики и лечения аэромоноза у карпа с успехом используется пробиотик «Субалин» на основе *Bacillus subtilis*, разработанный для тепло-

кровных животных [Юхименко и др., 2000; 2002; Гаврилин, 2004]. Есть сведения об использовании в рыбоводстве пробиотика «Субтилис», основу которого также составляют бактерии *Bacillus subtilis* [Кулаков, 2003]. Получены обнадеживающие результаты применения препаратов, содержащих бифидокультуры – «Бифидум-СХЖ» и «Зоонорм», «Бифилактрин» – для личинок и молоди осетровых. У молоди стерляди, получавшей эти препараты, было отмечено снижение заражения внутренних органов патогенными микроорганизмами, а также существенное увеличение прироста массы тела в два раза и более, у личинок – повышение выживаемости [Трифорова и др., 2003, 2004; Филиппова и др., 2004].

Несмотря на положительные результаты применения пробиотиков в аквакультуре, многие вопросы еще остаются открытыми. В частности, нет четкого ответа – препараты какого происхождения (наземного или водного) более предпочтительны для рыбоводства. С одной стороны, общеизвестна более высокая эффективность видоспецифичных пробиотических препаратов, с другой стороны – штаммы микроорганизмов, выделенные от водных животных, должны полностью отвечать требованиям безопасности с точки зрения отсутствия у них патогенности. Сейчас, в связи с требованиями ЕС, процедура разрешения новых препаратов все более усложняется и ужесточается. Кроме того, еще недостаточно изучены вопросы адгезии микроорганизмов препаратов к слизистой кишечника рыб, стимуляции иммунитета, не отработаны дозы и продолжительность применения препаратов, нет единого мнения о преимуществах однокомпонентных или многокомпонентных препаратов и многое другое, что еще предстоит выяснить.

В последующих частях работы мы попытаемся дать ответ на ряд этих вопросов.

4.5. Направленное формирование микробиоценоза кишечника рыб как основа активизации защитных сил осетровых рыб различного возраста

Эта часть работы объединяет результаты комплекса экспериментов, включающих исследование возможности направленного воздействия на микрофлору кишечника с использованием пробиотических препаратов. Целью подобного воздействия являлось повышение резистентности рыб к условиям культивирования, путем нормализации состава микробиоценоза кишечника, и снижения на этой основе неблагоприятного действия условий выращивания, связанных с микробным заражением кормов или водной среды.

В отличие от исследования воздействия на рыб микробного заражения комбикормов, где все опыты были выполнены по единой схеме в

сходных условиях, на рыбах одного возраста, условия этой экспериментальной части работы были значительно расширены. Опыты проводились на осетровых рыбах, находящихся на различных этапах жизненного цикла и различных условиях культивирования. В экспериментах использовали несколько пробиотических препаратов, различавшихся набором микроорганизмов и принципом действия. Исследовали также дозировки препаратов.

4.5.1. Молодь

Исследования были начаты на молоди, так как активно растущий организм наиболее быстро реагирует на любые положительные или отрицательные воздействия, что позволяет ускорить получение результатов и более точно определить степень влияния изучаемых явлений.

Известно, что свойственная каждому организму микрофлора появляется в кишечнике вскоре после рождения животного и сосуществует с ним всю жизнь [Уголев, 1992; Панин 2002; Панин, Н. Малик, 2005]. Изменения естественной среды обитания приводят к соответствующим качественным и количественным изменениям в составе и численности микрофлоры. В условиях индустриального культивирования, в связи с особенностями содержания и кормления, возможность формирования и поддержания микрофлоры, специфичной для объектов выращивания, весьма ограничена [Шивокене, 1989; Малик Н., Панин, Малик Е., 2000]. Для интенсивно растущей молоди этот фактор может являться весьма существенным ограничением не только для реализации потенциала роста, но и для завершения формирования жизненно важных функциональных систем (в частности, пищеварительной, иммунной и др.).

В этой связи, целью первых серий опытов явилось изучение воздействия пробиотических препаратов на микробиоценоз кишечника молоди осетровых рыб, как фактора улучшения их состояния и увеличения продуктивности. Изучали влияние пробиотиков на продуктивные показатели (продукцию и затраты корма), а также нормализацию общего состояния молоди осетровых рыб после голодания. В экспериментах использовали препараты «Биокорм-Пионер» и «Интестевит», различавшиеся принципом действия и набором микроорганизмов. Препараты были разработаны Центром медико-ветеринарных экологических исследований (ЦМВЕИ) совместно с ВГНКИ (Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов).

Препарат «Интестевит» содержит комплекс лиофильно высушенных культур бифидобактерий *Bifidobacterium globsum*, стрептококков *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis*. Две первые группы бактерий, входя-

шие в этот препарат и являющиеся представителями нормальной микрофлоры теплокровных животных, способны к активной колонизации слизистой оболочки кишечника. Ассоциация микроорганизмов препарата характеризуется взаимным усилением антагонистического эффекта по отношению к условно-патогенным микроорганизмам. Образованные бактериями метаболиты, активно участвуют в процессах переваривания пищи, синтезе витаминов, аминокислот и других жизненно важных элементов, повышают естественную резистентность организма и способствуют восстановлению популяционного уровня представителей нормальной микрофлоры кишечника.

Препарат «Биокорм-Пионер», представляет собой комбинацию лиофилизированных культур двух генетически немодифицированных штаммов *Bac. subtilis*. Находящиеся и размножающиеся в просвете кишечника бактерии этого вида образуют метаболиты, которые подавляют рост патогенной и условно-патогенной микрофлоры. В частности, стафилококков, протей, шигелл, эшерихий, псевдомонад, грибов рода кандиды и других организмов. Препарат предупреждает развитие дисбактериозов, способствует стимуляции клеточных и гуморальных факторов иммунитета. Бактерии *Bac. subtilis* не способны колонизировать кишечник и, после прекращения применения препарата, они постепенно выводятся из организма. Одним из важных преимуществ препарата является способность, включенных в его состав микроорганизмов, к спорообразованию. Это свойство обеспечивает высокую технологичность препарата при введении в корма, так как споры способны выдерживать достаточно жесткие условия обработки при гранулировании и экструдировании в процессе изготовления корма. Кроме того, подобные препараты сохраняют свою жизнеспособность при длительных сроках хранения комбикормов.

Первая серия опытов была проведена совместно с Н.В. Судаковой, Е.И. Балакиревым, Д.А. Мордовцевым на молоди русского осетра начальной массой 8–10 г, которую выращивали в бассейновом цехе НПЦ «БИОС» при плотности посадки 80 экз/м². Температура воды колебалась от 23,3 до 24,8 °С, концентрация кислорода находилась на уровне 70–80% насыщения. Опыты продолжались 30 суток. Препарат («Биокорм-Пионер») вводили в корм путем орошения сухих гранул водным раствором пробиотиков. Расчетные значения концентрации препарата в корме составляли 1×10^5 и 1×10^7 клеток препарата (КОЕ) на 1 г корма. Было проведено два курса кормления с пробиотиками по 10 суток каждый, с десятидневным перерывом между ними.

О действии препарата судили по изменениям в микробиоценозе кишечника рыб, а также темпу роста, выживаемости, затратам корма на единицу прироста, в совокупности характеризовавших действие препаратов на состояние молоди.

По результатам опыта в отношении количественных характеристик отмечено, что при начальном значении численности бактерий в кишечниках рыб равном $2,4 \times 10^4$ КОЕ/г, за период наблюдений у рыб контрольного варианта она возросла до $7,1 \times 10^5$ КОЕ/г. У рыб, получавших «Биокорм-Пионер», существенно выше – до $4,5 \times 10^8$ КОЕ/г. Столь значимые изменения явились свидетельством активизации деятельности микрофлоры под влиянием препарата.

На рис. 23 хорошо видны изменения в соотношении микроорганизмов в биоценозе кишечника молоди 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.

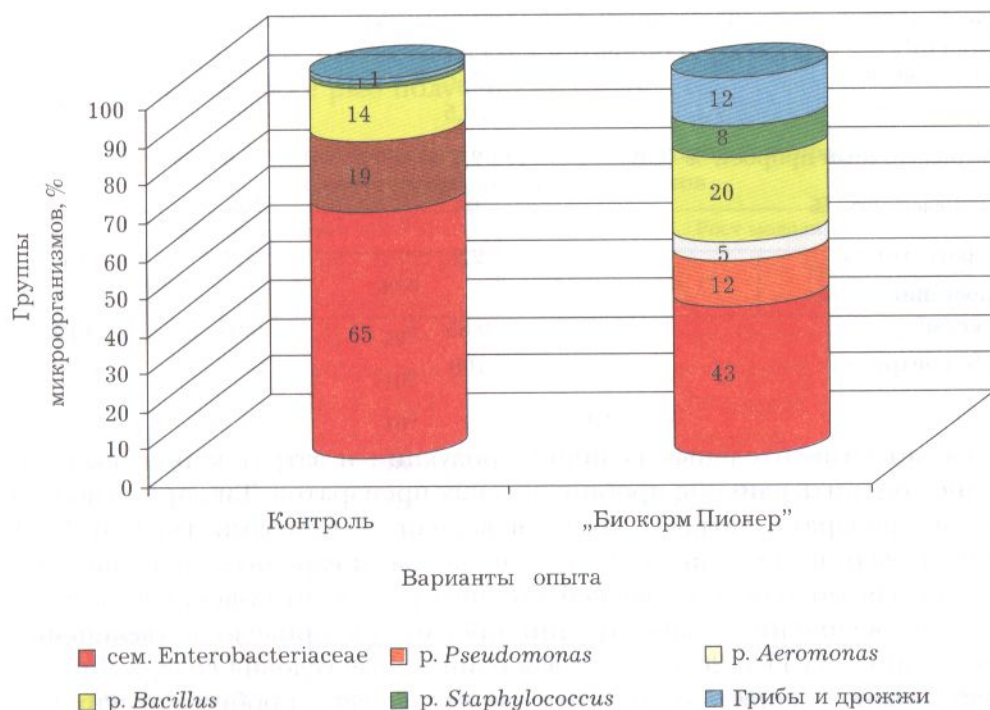


Рис. 23. Влияние пробиотика «Биокорм-Пионер» на микробиоценоз кишечника молоди русского осетра

Согласно литературным данным [Панин, Малик, Вершинина, 2002], подобные изменения в соотношении микроорганизмов кишечника, являются признаками положительной динамики и служат основой для усиления иммунных свойств организма.

Изменения в микробиоценозе кишечника положительно сказались на состоянии рыб. Как видно из табл. 45, применение пробиотиков привело к слабому ускорению темпа роста и увеличению выживаемости молоди (в пределах 3–6%). В то же время, расчет интегрального показателя полученной продукции, учитывающего как изменения массы рыб, так и их выживаемость, обнаружил более существенные отличия между контрольным и опытными вариантами.

Таблица 45. Результаты выращивания молоди русского осетра в зависимости от вида и дозы пробиотиков

Показатели	Варианты опыта		
	Контроль	«Биокорм-Пионер», КОЕ/г	
		1×10 ⁵	1×10 ⁷
Масса рыб, г			
начальная	8,5	8,5	8,3
конечная	20,5	20,5	21,0
Среднесуточный прирост, % (СВ)	2,7	2,8	2,9
Выживаемость, %	93	98	99
Затраты корма	2,2	1,8	1,8
Продукция, кг/м ²	0,85	0,94	1,07
% контроля	100	110,6	125,9

Расчет относительных величин продукции и затрат корма позволил полнее оценить влияние пробиотических препаратов. Так, при использовании препарата, затраты корма в вариантах с дозами 1×10⁵ и 1×10⁷ КОЕ/г были на 18 % ниже, чем в контрольном варианте. Значения продукции для молоди, получавшей пробиотики, были существенно выше, причем увеличение концентрации препаратов привело к увеличению продукции – на 11 и 26%. Учитывая одинаковые условия содержания молоди, можно говорить о положительном действии пробиотических препаратов на ее физиологическое состояние, что благоприятно отразилось на ее выживаемости, росте и, соответственно, продукционных характеристиках.

Положительное влияние на величину продукции и затраты кормов, а также на состояние молоди русского осетра, было подтверждено результатами следующей серии экспериментов, целью которых была оценка влияния пробиотиков на преодоление негативных последствий голодания у молоди стерляди. В этой же серии была продолжена отработка дозировок препарата.

Пробиотики «Биокорм-Пионер» и «Интестевит» вводили в комбикорм в дозах 10^7 , 10^8 и 10^9 КОЕ каждого препарата на 1 г корма.

Испытания проводили на предварительно голодавшей молоди стерляди средней массой $43,2 \pm 4,3$ г. Продолжительность применения препаратов составила 10 суток, период наблюдений – 30 суток. Контролем служили рыбы, получавшие тот же корм без пробиотиков. Об эффективности действия пробиотиков судили по темпу роста рыб, изменениям в химическом составе их тела и относительным показателям накопления пластических веществ и энергии в теле рыб, рассчитанным на 1 г начальной массы.

В табл. 46 представлены данные по росту рыб. Можно видеть, что за период наблюдений масса рыб возросла, в среднем до 62–68 г. В вариантах, где использовались пробиотики, она была несколько выше, чем в контрольных. Однако, статистически достоверных различий между вариантами опыта по массе рыб получено не было.

Таблица 46. Изменения массы и прирост рыб, питавшихся кормом с различными дозами пробиотиков

Варианты опыта		Рост молоди	
пробиотик	доза	средняя масса, г*	среднесуточный прирост (CW), %
«Биокорм-Пионер»	10^7	$65 \pm 5,7$	1,5
	10^8	$64 \pm 4,6$	1,5
	10^9	$64 \pm 6,9$	1,4
«Интестевит»	10^7	$68 \pm 14,3$	1,8
	10^8	$66 \pm 15,2$	1,7
	10^9	$65 \pm 15,8$	1,6
Контроль		$58 \pm 14,6$	1,1

*Масса молоди в начале опыта – $43 \pm 3,4$ г.

Расчеты среднесуточных приростов, по отношению к контрольному варианту, обнаружили несколько больший ростостимулирующий эффект применения препарата «Интестевит». Интересно отметить, что наибольшее влияние на среднесуточную скорость роста рыб оказала наименьшая дозировка препарата «Интестевит» – 10^7 КОЕ/г корма.

Данные о химическом составе тела рыб, получавших препарат «Интестевит» (табл. 47), свидетельствовали об усилении их роста и активном восстановлении запасов веществ, израсходованных при голодании. При этом значимых различий в содержании веществ в теле рыб, получавших пробиотики и рыб из контрольного варианта, не было отмечено.

Таблица 47. Химический состав молоди стерляди, питавшейся комбикормом с пробиотиком «Интестевит» (% массы тела)

Варианты опыта	Химический состав, %					
	Сухое вещество	Сырой протеин	Сырой жир	Углеводы (по разности)	Зола	Фосфор
До начала опыта	17,5	9,9	0,9	2,7	3,5	0,6
«Интестевит», доза 10^7	23,1	11,7	5,9	2,4	2,8	0,3
«Интестевит», доза 10^9	22,9	12,9	4,8	2,0	2,8	0,4
Контроль	22,9	12,4	4,6	2,0	3,5	0,5

Однако расчеты накопления веществ и энергии в процессе роста, позволили гораздо более рельефно оценить эффективность применения препарата для улучшения состояния ослабленной в ходе голодания молоди и стимуляции синтеза органических веществ.

На рис. 24 хорошо видно, что, по сравнению с контролем, накопление массы 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. Наиболее эффективным в этой серии опытов был признан препарат «Интестевит» в дозировке 10^7 КОЕ препарата/г корма.

Таким образом, положительный эффект использования пробиотических препаратов вполне очевиден. Интересно отметить, что этот эффект не имел ярко выраженных внешних проявлений (по росту и выживаемости). Однако, как показали микробиологические анализы кишечника молоди, а так же расчеты накопления пластических веществ, применение препаратов значительно улучшило состояние молоди.

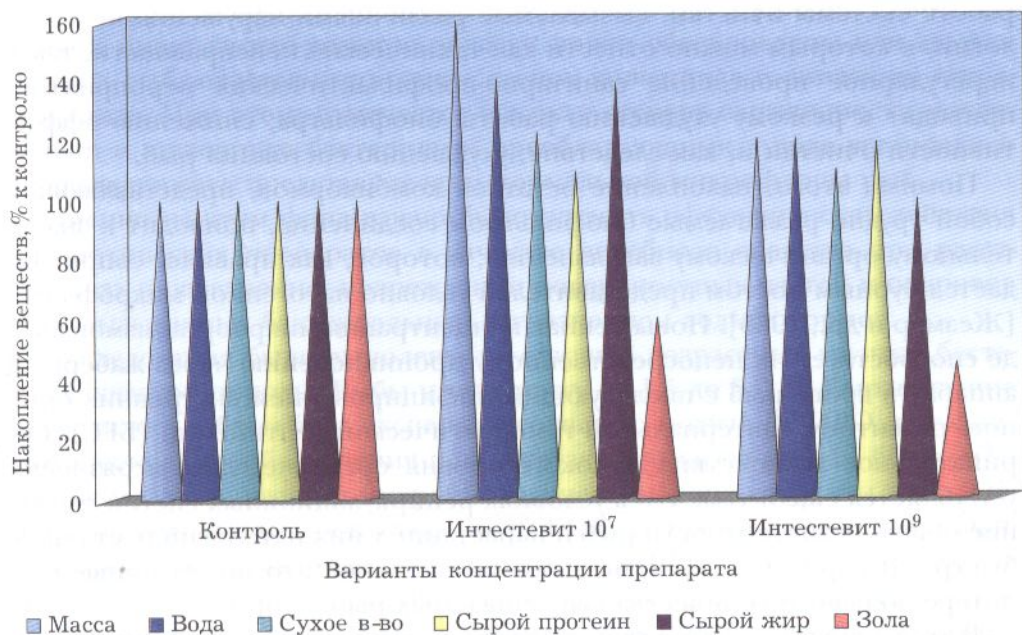


Рис. 24. Влияние препарата «Интестевит» на интенсивность накопления пластических веществ в теле молоди стерляди после голодания, % к контролю

4.5.2. Старшие возрастные группы осетровых рыб

Исследование влияния пробиотиков на рыб старших возрастных групп, явилось логическим продолжением предыдущих серий экспериментов. При этом, особый интерес представляли рыбы, содержащиеся в условиях интенсивного культивирования, то есть – максимального воздействия негативных факторов, связанных с этим типом выращивания рыб, при минимальном присутствии положительного экологического эффекта. Опыты были проведены в системе с замкнутым циклом водообеспечения на производителях бестера.

Выращивание рыб в замкнутых системах – новое, технически и технологически сложное направление индустриального рыбоводства. Оно имеет ряд несомненных преимуществ, связанных со значительной экономией земельных и водных ресурсов, сокращением сроков и стабильностью всесезонного получения товарной продукции. Одной из основных составляющих, которые обеспечивают успех культивирования в подобных установках, является устойчивая работа систем очистки. Она представляет собой тесное взаимодействие технических средств, микроорганизмов биологического фильтра и содержащихся в системе рыб. Сбои в

работе системы очистки, вызываемые различными нарушениями технологии, к которым можно отнести как технические неисправности, так и нерегулярное проведение санитарно-профилактических мероприятий, приводят к резкому ухудшению работы биофильтра, снижению эффективности очистки и, как следствие, ухудшению состояния рыб.

Помимо этого, накопление остатков комбикормов, представляющих собой трудно разлагаемые биофильтром соединения, приводит к значительному органическому загрязнению, которое, как правило, сопровождается бурным ростом представителей условно патогенной микрофлоры [Жезмер и др., 1988]. Повышенная концентрация микроорганизмов в воде способствует их непосредственному проникновению через жаберный аппарат в кровь рыб с последующим инфицированием внутренних органов, развитием бактериальной геморрагической септицемии (БГС). Отрицательное воздействие высокого уровня органического загрязнения усугубляется еще и тем, что в условиях рециркуляционных систем снижение общей резистентности рыб и нарастание у них патологий идет очень быстро. В короткие сроки, исчисляемые сутками, это может привести к потере большого количества выращиваемых 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 позволяет предотвратить гибель большого числа рыб.

По нашим наблюдениям, наиболее показательными внешними признаками, характеризующими пониженную резистентность осетровых, служат покраснения и изъязвления внешних костных образований – жучек. Развитие поражения жучек имеет достаточно четкую последовательность. Как правило, вначале поражаются спинные жучки. При этом, аппетит у рыб существенно снижается, что приводит к увеличению количества несъеденного корма в бассейнах, экстракции из него органических веществ, дальнейшему усилению органического и бактериального загрязнения воды и нарастанию патологий. Вслед за тем, у осетров развиваются повреждения брюшных жучек и покраснение кожных покровов брюха. Рыбы почти полностью прекращают питаться.

Воспаление боковых и хвостовых жучек, их кровоточивость, повреждение мягких тканей хвостового стебля (при отсутствии немедленных лечебных мероприятий) предшествует началу массовой гибели рыб. Помимо повреждений жучек, отмечается воспаление анального отверстия, являющееся характерным признаком энтерита – бактериального поражения кишечника.

При сильной патологии внутренние органы таких рыб анемичны, селезенка имеет светло-розовую окраску, почки обескровлены или же разрушены, наблюдается истончение стенок кишечника и снижение секреции слизи. При этом, отмечается высокая степень зараженности почек, печени и кишечника бактериями, преобладающими в воде установки и не являющимися представителями нормальной микрофлоры рыб.

Именно на этом фоне важно было оценить эффективность действия пробиотических препаратов в качестве лечебного средства при расстройствах пищеварения, повреждении поверхностных частей и покровов тела, вызываемых бактериальным загрязнением воды и кормов.

Исследования были выполнены на старших возрастных группах бестера бурцевской породы. Рыбы имели массу от 1,5 до 6,0 кг. Выращивание проводилось в бассейнах экспериментального модуля ВНИРО, с замкнутым циклом водообеспечения при нагрузке биомассы рыб 40–60 кг/м³ и крайне неблагоприятном микробиологическом фоне кормов и воды. Обсемененность корма составляла 1×10^6 КОЕ/г (преимущественно стафилококк). Уровень обсемененности воды – $2,7 \times 10^4$ КОЕ/мл (из них более половины – бактерии кишечной группы), что повлекло заражение ими печени и почек, а также гибель части рыб. Все рыбы имели слабую подвижность, потерю аппетита, множественные поражения кожи, жучек, рострума, плавников. Почти у всех рыб была воспалена область анального отверстия, что свидетельствовало о развитии энтерита.

При микробиологическом исследовании содержимого толстого отдела кишечника у этих рыб, были выделены эшерихии, стрептококки, спорообразующие бактерии *Bac. mesentericus* и ряд неидентифицируемых микроорганизмов. Последние – в среднем до 40 %. Результаты этих исследований представлены в табл. 48. Такой набор микроорганизмов в кишечнике свидетельствовал о крайне неблагоприятном состоянии рыб.

Для коррекции состава кишечной микрофлоры бестеров использовали препарат «Интестевит» и новый препарат «Аквалакт». Этот препарат был создан нами совместно с Е.В. Маликом, специально для осетровых рыб. Он разработан на основе кишечной микрофлоры осетров из естественных водоемов. В его состав включены видоспецифичные лактобактерии. Испытание препарата проводились впервые.

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

Образцы кишечной микрофлоры отбирали прижизненно из толстого отдела кишечника специальными стерильными тампонами. Для сравнения использовали данные микробиологических исследований образцов содержимого кишечника, взятых от рыб перед началом их питания кормом с пробиотиками, а также – через 5 дней после прекращения применения пробиотиков (то есть через 15 суток после начала опытов).

Учитывали число положительных находок основных представителей микрофлоры кишечника и бактерий, входящих в состав пробиотических препаратов. Результаты микробиологических анализов приведены в табл. 48.

Таблица 48. Динамика численности основных групп микроорганизмов в кишечниках бестеров, питавшихся комбикормами с пробиотиками (% от общего числа обследованных рыб)

Пробиотик, вводимый в корм	Частота встречаемости микроорганизмов													
	Лакто- бациллы		Бифидо- бактерии		Бациллюс субтилис		Эшерихии		Стрепто- кокки		Бациллюс sp.		Неидентифи- цированные бактерии	
	Число*	%	Число	%	Число	%	Число	%	Число	%	Число	%	Число	%
<i>До начала опытов</i>														
«Интестевит»	0	0	0	0	0	0	4	80	4	80	4	80	2	40
«Аквалакт»	0	0	0	0	0	0	3	60	5	100	4	80	2	40
<i>Через 5 дней применения пробиотиков</i>														
«Интестевит»	0	0	4	80	5	100	0	0	1	20	0	0	1	20
«Аквалакт»	4	80	0	0	0	0	1	20	2	40	0	0	1	20
<i>Через 10 дней применения пробиотиков</i>														
«Интестевит»	0	0	3	60	5	100	0	0	1	20	0	0	0	0
«Аквалакт»	4	80	0	0	0	0	0	0	1	20	0	0	1	20
<i>Через 15 дней от начала применения пробиотиков и спустя 5 суток после его прекращения</i>														
«Интестевит»	0	0	0	0	5	100	0	0	1	20	1	20	2	40
«Аквалакт»	2	40	0	0	0	0	2	40	2	40	1	20	2	40

*Число выделенных культур.

Согласно данным таблицы, в пробах материала, взятого из кишечника через 5 дней после начала введения пробиотических препаратов, у 60% обследованных рыб, получавших корм с «Интестевитом», были обнаружены бифидобактерии, а у 100% – спорообразующие бактерии *Vac. sub*

tilis. В то же время, частота обнаружения в образцах химуса бактерий группы кишечной палочки, стрептококков, различных видов *Bacillus* sp. и неидентифицируемой микрофлоры значительно снизилась.

В кишечниках второй группы бестеров, получавших корм с препаратом «Аквалакт», входящие в его состав бактерии, были выделены в 80 % исследованных образцов, что свидетельствовало об активном заселении ими кишечников рыб. Частота встречаемости эшерихий, стрептококков и другой неидентифицируемой микрофлоры в кишечниках рыб обоих вариантов применения пробиотиков составила всего 20–40%.

Изменения в микробиоценозе кишечника бестера, происходившие под действием препарата «Аквалакт», в схематическом виде приведены на рис. 25.

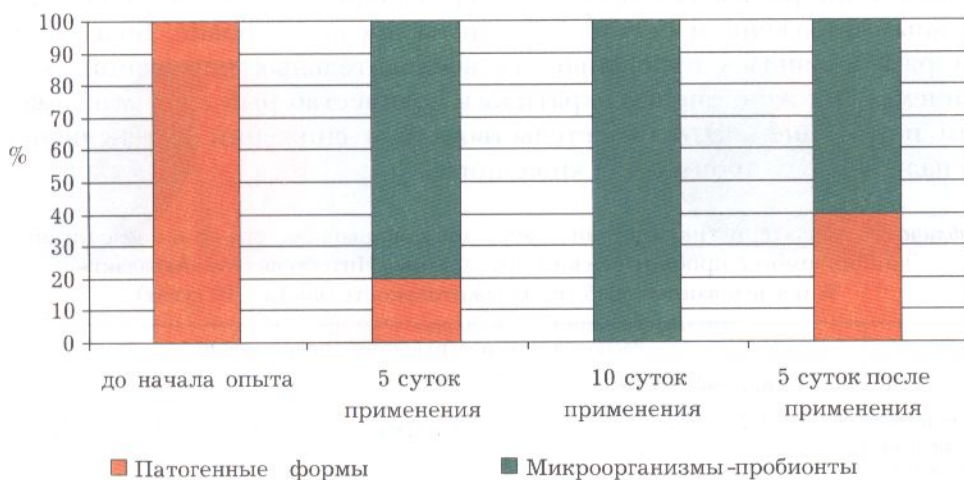


Рис. 25. Микробиоценоз кишечника бестера до и после применения препарата «Аквалакт»

Как видно на рисунке, применение препарата сопровождалось снижением количества патогенных форм в кишечнике и их почти полной заменой организмами-пробионтами после 10 суток введения препарата. После окончания курса пробиотиков в микрофлоре кишечной популяции было отмечено постепенное увеличение количества условно-патогенных бактерий. Так, частота выделения эшерихий, стрептококков, обнаружение картофельной палочки, а также неидентифицируемых бактерий в количестве, достигающем 40% от исследованных образцов, свидетельствовало о высоком прессинге условно-патогенной микрофлоры на микробиоценоз кишечника бестера со стороны комбикорма и окружающей среды выращивания рыб.

Данные микробиологических исследований показали, что продолжи-

тельность положительного влияния пробиотических препаратов на состав кишечной популяции у бестеров сохранялась еще в течение 6–7 суток. При этом, срок действия пробиотиков у рыб оказался таким 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].

Данные об изменении внешних проявлений у рыб приведены в табл. 49. Как можно видеть, 10-ти дневное питание рыб комбикормом с пробиотиком «Интестевит» вызвало существенное улучшение их состояния по внешним признакам. Число особей с нормальными спинными и брюшинными 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 два раза снизилась интенсивность воспалительных поражений ануса, причем в той же степени сократилось количество рыб с его максимальным поражением. Это свидетельствовало о снижении интенсивности воспалительных процессов в кишечнике.

Таблица 49. Характеристика состояния внешних покровов бестера до и после питания комбикормом с пробиотическим препаратом «Интестевит» и «Аквалакт», % обследованных рыб (продолжительность опыта – 10 суток)

Количество и средняя масса рыб	Расположение поверхностных повреждений														
	Внешние костные образования (жучки)						Рострум			Анус			Кайма плавников		
	спинные		брюшные												
	Степень повреждений														
	max	min	N	max	min	N	max	min	N	max	min	N	max	min	N
Вариант с «Интестевитом»															
360 экз. по 2,5 кг	40*	27	33	40	40	20	46	13	40	7	56	37	24	16	60
	33	0	67	36	7	53	43	0	57	13	4	83	24	10	66
Вариант с «Аквалактом»															
300 экз. по 4,5 кг	38	29	33	48	12	40	28	30	42	35	23	42	42	11	47
	18	9	73	23	8	69	0	29	71	8	2	90	27	0	73

*Над чертой – до применения пробиотиков, под чертой – после.

На состояние каймы плавников пробиотик не оказал подобного действия. Количество рыб с максимальным поражением осталось без изменений, с небольшим – несколько уменьшилось.

Включение в комбикорма препарата «Аквалакт» оказало сходный эффект по всем признакам. Количество рыб с нормальными жучками воз-

росло почти в два раза, также, как и в первом случае, в основном за счет особей с их минимальным поражением. Число рыб с нормальным состоянием ануса увеличилось также в два раза (рис. 26).



Рис. 26. Эффект применения препарата «АкваЛакт» для оздоровления бестера

Небольшие отличия от варианта с «Интестевитом» отмечены в исчезновении патологий рострума. Количество особей с нормальным рострумом увеличилось в 1,7 раза. Интересно отметить, что оздоровление этого образования головы, наиболее часто вступающего в контакт с внешними поверхностями рыбоводных емкостей, оказалось наиболее выраженным у сильно пораженных рыб. Препарат «АкваЛакт» лучше залечил поражения каймы плавников.

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 вызывало положительные сдвиги в микрофлоре кишечника, которые сопровождались прекращением отхода и появлением внешних признаков оздоровления рыб. Сравнение действия обоих пробиотических препаратов дало основание говорить о некотором преимуществе нового

видоспецифичного пробиотика «Аквалакт» перед ветеринарным препаратом «Интестевит».

4.5.3. Личинки

Несомненный положительный эффект применения пробиотических препаратов для оздоровления и повышения продукционных характеристик молоди и старших возрастных групп осетровых рыб, поставил вопрос о перспективности использования подобных препаратов на самых ранних этапах культивирования. Именно личинки, в силу незавершенности формирования пищеварительной и иммунной систем, наиболее чувствительны к повреждающему действию суммы неблагоприятных факторов, связанных с искусственными кормами. Как было указано выше, условия интенсивного культивирования, особенно, вносимые в емкости высокобелковые корма, 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, в условиях культивирования осетровых рыб, развитие в воде условно-патогенных микроорганизмов является одной из причин их массовой гибели (до 50% и более), при переходе на внешнее питание и после окончания рассасывания желточного мешка.

В этом случае, применение пробиотиков, как фактора улучшения переваривания пищи и повышения иммунитета, представляется очень актуальным. Однако низкая пищевая активность личинок не позволяет в полной мере использовать пробиотики на самых ранних стадиях. С этих позиций, существенное преимущество имеет технология выращивания личинок морских рыб, которая предусматривает обязательное использование планктонных организмов в качестве живого корма. Поэтому, появляется возможность введения препаратов в зоопланктон, помещая его в раствор с пробиотиками. Являясь фильтраторами, кормовые организмы быстро напитываются раствором и становятся «живыми капсулами», содержащими препарат. Именно поэтому, лучшие результаты по применению пробиотиков для личинок были получены на морских рыбах, в частности, на атлантическом тюрбо [Gatesoupe, 1999].

У личинок, технология кормления которых при индустриальном выращивании не предусматривает использования живых кормов (карповые, осетровые, лососевые, сиговые и др.), такая возможность отсутствует.

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]. Тем более, что есть данные, согласно которым, 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 влияния на формирование микробиоценоза личинок осетровых рыб путем заселения их кишечника пробиотической микрофлорой.

Для исследований были избраны три препарата, используемые для сельскохозяйственных животных: «Интестевит», «Биокорм-Пионер» и Комплекс молочнокислых бактерий. Причиной, побудившей испытать на рыбах этот комплекс, были сведения Я. Шивокене [1989] о том, что молочнокислые бактерии являются облигатными представителями кишечной микрофлоры карповых рыб, а также наши собственные данные о присутствии бактерий этой группы у осетровых рыб, культивируемых в прудах.

Концентрация микроорганизмов в использованных водных растворах пробиотиков составляла 10^7 и 10^9 КОЕ на 1 мл. Начальная дозировка препаратов была избрана с учетом результатов их применения для рыб и сельскохозяйственных животных. Опыты были проведены в течение двух лет на 6-ти партиях икры сибирского осетра, стерляди и бестера. В связи со сходством результатов ниже приведены данные, полученные на сибирском осетре.

В качестве способа введения пробиотиков в организм молоди рыб на ранних стадиях эмбрионального развития была опробована обработка икры водным раствором пробиотических препаратов. Икру обрабатывали в течение 30 мин. дважды перед началом инкубации и перед вылуплением личинок. 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.

Об эффективности действия препаратов судили по наличию у личинок микроорганизмов, входящих в состав использованных в опыте пробиотиков, выживаемости личинок в критические периоды развития – вылупление, переход на внешнее питание (10-е сутки), полный переход на питание комбикормами (21-е сутки) и их росту.

В табл. 50 приведены результаты микробиологических анализов кишечников личинок. Можно видеть, что у личинок, икра которых была обработана препаратами «Биокорм-Пионер» и «Интестевит» была обна-

ружена микрофлора, соответствующая введенной с этими препаратами. Причем, бактерии препаратов сохранялись у личинок не только в момент вылупления, но и в течение двух последующих недель, что свидетельствовало об их проникновении в организм.

Таблица 50. Частота встречаемости пробиотической микрофлоры у личинок осетра в зависимости от длительности экспериментов, % обследованных личинок

Наименование препарата	Микроорганизмы	Возраст личинок, сут.		
		3	10	15
Личинки подопытных групп				
«Интестевит»	<i>Bifidobacterium</i> sp.	30	0	0
	<i>Enterococcus faecium</i>	100	100	60
	<i>Bacillus subtilis</i>	100	100	80
«Биокорм-Пионер»	<i>Bacillus subtilis</i>	100	100	100
Комплекс лактобактерий	<i>Lactobacillus</i> sp.	0	0	0
Личинки контрольной группы				
	<i>Bifidobacterium</i> sp.	0	0	0
	<i>Enterococcus faecium</i>	0	0	0
	<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0
	<i>Lactobacillus</i> sp.	0	0	0

Следует подчеркнуть, что в этом возрасте личинки уже активно питались артемией и комбикормом, несущими свою специфическую и достаточно активную микрофлору. Наиболее устойчивыми в организме личинок оказались бактерии рода *Bacillus*. Они присутствовали у 100% личинок на протяжении всего периода наблюдений. Количество энтерококков, входящих в препарат «Интестевит», к концу второй недели сократилось. Бифидобактерии оказались наименее устойчивыми и полностью исчезли у 10-ти суточных личинок. Лактобактерии не были выделены ни в одном из вариантов. У личинок контрольной группы, не получавшей пробиотика, все перечисленные микроорганизмы отсутствовали.

Различия в составе микробиоценоза личинок отразились на их выживаемости и росте. В табл. 51 приведены сведения о выживаемости личинок в различные периоды выращивания. Четко видны незначительные различия в выживаемости между опытным и контрольным вариантом в момент вылупления (1–4%). В дальнейшем, при переходе на внешнее питание, по сравнению с контрольной группой, выживаемость личинок, обработанных препаратами «Интестивит» и «Биокорм-Пионер», возросла на 12–15%.

Таблица 51. Влияние пробиотических препаратов на выживаемость личинок

Название препарата	Выживаемость, % к контролю		
	Возраст личинок, сут.		
	3	10	21
«Интестевит»	105	115	112
«Биокорм-Пионер»	103	113	108
Комплекс лактобактерий	105	102	103

Отмеченные различия свидетельствовали о пролонгированном положительном действии обработок икры препаратами «Интестевит» и «Биокорм-Пионер» на выживаемость личинок. В то же время выживаемость личинок, обработанных препаратом, содержащим лактобактерии, отличалась от контрольного варианта настолько незначительно, что можно говорить об отсутствии какого-либо заметного эффекта.

Интересно отметить, что через три недели выживаемость личинок, икра которых была обработана первыми двумя препаратами, по отношению к контролю несколько снизилась. Можно предположить, что это связано с постепенной элиминацией микроорганизмов пробиотиков из кишечника личинок под действием таких факторов, как органическое загрязнение воды, связанное с внесением в экспериментальные лотки больших количеств комбикорма, что, в свою очередь, сопровождалось размножением и увеличением числа условно-патогенных микроорганизмов в воде.

Однако, различия в выживаемости (в пределах 7–10%) между личинками опытных вариантов и контрольной группы все же сохранились. В дальнейшем в практическом плане они могут быть достаточно легко скорректированы проведением последующих курсов обработок пробиотиками, но уже путем их введения в комбикорма.

Отмеченные в ходе опыта различия по выживаемости личинок и циркуляции в них культур микроорганизмов сопровождалось изменением интенсивности роста (табл. 52).

Таблица 52. Влияние обработки икры пробиотиками на массу личинок сибирского осетра в возрасте 21 сут.

Вариант опыта	Средняя масса личинок, мг
«Интестевит»	540±30
«Биокорм-Пионер»	490±40
Комплекс лактобактерий	410±40
Контроль	420±30

Как видно из табл. 52, личинки, икра которых была обработана «Интестевитом» и «Биокормом Пионер», имели большую массу (на 28 и 7% соответственно), по сравнению с контролем. Значимых различий воздействия на личинок препаратов разного типа действия («Интестевит» и «Биокорм-Пионер») на основании проведенных опытов – не выявлено. В то же время, после обработки икры лактобактериями темп роста, так же как ранее выживаемость и микрофлора личинок, были сходными с контрольным вариантом.

Наши данные о повышении выживаемости и усилении темпа роста личинок, в основном, согласуются с результатами работ, проведенных на тюрбо [Gatesoupe, 1994]. Однако в этих опытах в качестве пищи для личинок были использованы коловратки, напитанные пробиотиком на основе *Bacillus* sp. Близкие к нашим данные по выживаемости личинок бестера были получены О.П. Филипповой с соавторами [2004]. Однако между упомянутыми исследованиям F.-J. Gatesoupe и О. Филипповой и нашими опытами имелись существенные методические различия. В первом случае личинки тюрбо в течение 10 суток получали живые корма, напитанные пробиотиками, во втором – комбикорма, содержащие препараты. В нашем же случае, при сходном эффекте, были проведены лишь две обработки икры, что позволило не только уменьшить продолжительность обработок, но и сократить количество используемых препаратов.

Полученные результаты дают основание считать, что примененный нами способ введения пробиотиков путем обработки ими икры – достаточно эффективен. Об этом свидетельствовало продолжительное (после введения препаратов) присутствие микроорганизмов-пробионтов у личинок, повышение их выживаемости и темпа роста.

Следует отметить, что в опытах по использовании молочнокислых бактерий положительный эффект не был получен. По нашему мнению, обнаруженный факт связан с большими размерами клеток лактобактерий, что явилось препятствием для их проникновения через оболочку икринки.

В то же время, принимая во внимание положительные результаты опытов, проведенных с этими группами бактерий на личинках и молоди различных видов рыб [Gatesoupe, 1991; Guildberg et al., 1997], можно предположить, что отрицательный результат – это, возможно, артефакт, связанный с методическими особенностями изготовления препарата и выполнения экспериментов.

Резюмируя материалы, полученные в экспериментах с икрой и личинками, можно говорить о реальной возможности направленного формирования микробиоценоза личинок осетровых рыб на ранних стадиях эмбрионального и постэмбрионального развития с использованием достаточно простого и эффективного способа введения пробиотических

препаратов. Результатом этого воздействия является не только ускорение перехода личинок на искусственные корма, но и повышение их выживаемости и роста.

Подводя итог исследованиям завершающей части работы, можно говорить о том, что коррекция состава микрофлоры кишечника культивируемых рыб с использованием представителей нормофлоры, входящих в состав пробиотических препаратов, продемонстрировала реальную возможность снижения отрицательного воздействия факторов интенсивного культивирования, связанных, в том числе, с влиянием микрофлоры кормов.

Заключение

В современной аквакультуре, особенно интенсивной, где искусственно создаются условия среды, близкие к оптимальным, отсутствует пресс хищников и обеспечивается профилактика заболеваний, важнейшим фактором продуктивности объектов становится качество корма. На фоне отсутствия у культивируемых рыб возможности выбора подходящей пищи, вопрос обеспечения безопасности кормления является одним из актуальных. Однако в сегодняшней повседневной практике отечественного рыбоводства о безопасности комбикормов, в целом, и ее микробиологической составляющей, в частности, в силу различных причин, известно не много. Эта работа, на примере микробной контаминации, с позиций ее многофакторного воздействия на организм культивируемых рыб, имела своей целью рельефно продемонстрировать значимость проблемы обеспечения безопасности кормов.

Работа была начата с исследований качественных и количественных характеристик микробной обсемененности комбикормов для рыб, производимых отечественными и зарубежными промышленными предприятиями, и определения основных групп микроорганизмов. Было установлено, что средний фоновый уровень бактериальной обсемененности кормов для рыб (10^5 – 10^6 КОЕ/г) на порядок выше, по сравнению с комбикормами для сельскохозяйственных животных и птиц, и нормативных показателей для рыб (5×10^5 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. В то же время, детальное исследование воздействия 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, продемонстрировало его негативное воздействие.

Подобное воздействие, ранее не привлекавшее внимание в силу отсутствия ярко выраженных внешних проявлений, было выявлено на основе использования комплексного методического подхода. Его применение дало более полную картину, по сравнению с принятыми в ветеринарии косвенными методами для живых или патолого-анатомическими – для

погибших животных. Сочетание результатов ростовых экспериментов с параллельным клиническим и микробиологическим обследованием рыб, изучением их химического состава позволило получить многоуровневую характеристику воздействия на рыб семи наиболее типичных для комбикормов микроорганизмов. Было показано, что оно может иметь скрытую форму и пролонгированный характер. При отсутствии замедления темпа роста и гибели рыб, оно проявляется в сдвигах процессов обмена веществ, возникновении патологий во внутренних органах. Это в полной мере согласуется с мнением академика В.А. Шатерникова [1985], считающего, что таким образом организм адаптируется к неблагоприятным условиям существования и вместо остановки процессов обмена веществ, то есть смерти, существенно изменяя его, продолжает жить и функционировать в крайне затрудненном состоянии – состоянии болезни. Подобное состояние при наступлении любых, более жестких, по сравнению с оптимальными, условий приводит, как было установлено в ходе проведенных экспериментов, к снижению жизнеспособности большего количества рыб.

Результаты комплексных исследований, на примере молоди осетровых, позволили проследить реакцию 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 значительного количества энергетических резервов на борьбу с интоксикацией. Обнаруженные явления аналогичны проявлениям воздействия бактериальных токсинов на теплокровных животных и человека [Вертиев, 1996]. Это обусловлено 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, структурных нарушениях, снижении эффективности работы, угнетении защитных функций печени и почек – органов, ответственных за детоксикацию чужеродных веществ и удаление из организма продуктов обмена. Все это сопровождается сдвигами в метаболизме, снижением темпа роста и жизнеспособности 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.

При этом, необходимо отметить, что 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. В то же время, они служат резервантами патогенной микрофлоры, накопление которой резко возрастает после их отлова для реализации, и представляют 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 [Liston, 1990].

В этой связи, в целях охраны здоровья рыб и здоровья потребителей рыбной продукции, необходимо резкое ужесточение требований к безопасности кормов, в частности, по микробиологическим показателям. Поэтому, настоятельно встает вопрос о кардинальном пересмотре всей технологической цепочки, связанной с обеззараживанием кормов. Она должна включать более жесткий контроль сырья, расширение использования технологий экструдирования и экспандирования при изготовлении кормов, позволяющих получать стерильные корма, а также хранение готовой продукции в условиях защиты от увлажнения и нагревания.

Обобщая результаты проведенных исследований, хотелось бы подчеркнуть, что до настоящего времени столь серьезной проблеме, как бактериальная обсемененность кормов и ее влияние на рыб, достаточного внимания в нашей стране не уделялось. Поэтому, прямой перенос ограничений бактериальной обсемененности рыбных кормов с кормов для сельскохозяйственных животных нельзя считать правомерным. В отличие от теплокровных животных, в частности, жвачных, сама жизнедеятельность которых во многом связана с деятельностью их кишечной микрофлоры, рыбы гораздо менее приспособлены к активному противостоянию ее негативному воздействию. Подтверждением этого является факт наиболее выраженного отрицательного влияния на организм рыб минимальных (из исследованных) концентраций микроорганизмов в кормах. Необходимо подчеркнуть, что этот уровень обсемененности, в ряде случаев, был на порядок ниже, установленных ГОСТом нормативных показателей безопасности.

Помимо решения организационных и технологических вопросов отечественного кормопроизводства, одной из реальных и действенных возможностей поддержания здоровья рыб в процессе их выращивания,

является использование биологически оправданных средств, способствующих активизации деятельности собственных защитных сил.

Принимая во внимание новые теоретические концепции о роли пищеварительной системы и ее микрофлоры в защитных функциях [Уголев, 1984; 1991; Кузьмина, 2005], подобным способом повышения резистентности рыб, является использование 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. Результаты наших опытов показали, что использование ветеринарных пробиотических препаратов и специализированного пробиотика для осетровых «Аквалакт» позволило получить убедительные доказательства возможности коррекции нарушений нормофлоры кишечника и, как следствие, улучшить состояние здоровья и повысить продуктивность личинок, молоди и производителей осетровых рыб.

В то же время, следует понимать, что применение пробиотиков – это, хотя и достаточно эффективная, но временная мера. Она, при устранении причины возникновения патологий, может стабилизировать состояние рыб или помочь им преодолеть негативные последствия микробной контаминации кормов или среды культивирования. Однако постоянное применение пробиотиков на фоне одновременного использования комбикормов, содержащих те или иные контаминанты, вряд ли можно признать целесообразным.

Подводя итог, хотелось бы подчеркнуть, что в аквакультуре, где объектам навязывается очень много противоестественного, рыбы остаются рыбами и только более чутко, 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 резистентности 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.

Литература

- Абрамова Ж.И., Картавецова Н.Е., Николаева Н.А.** 1981. Исследование процессов окисления липидов в искусственных кормах рыб // Сборник научных трудов ГОСНИОРХ. Вып. 176. Л.: ГОСНИОРХ. С. 103–112.
- Алабастер Дж., Ллойд Р.** 1984. Критерии качества воды для пресноводных рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность. 344 с.
- Афанасьев В.И., Наумова А.М., Лашенкова Н.Н и др.** 1997. Энтерит карпа и форели и меры борьбы с ним // Итоги научно-практических работ МИК. М.: Центр. произв. станции по акклиматизации и борьбе с болезнями рыб Минсельхозпрода РФ. С. 38–39.
- Баженов С.В.** 1964. Ветеринарная токсикология. Л.: Колос. 375 с.
- Баздеркина С.А.** 1992. Эколого-физиологическая характеристика микрофлоры пищеварительной системы карповых рыб при выращивании на теплых водах // Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. Борок. 17с.
- Байрамова А.С.** 1989. Микробиологическая характеристика бактерий рода *Proteus*, занимающих разные экологические ниши // Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. Баку. 17 с.
- Балобанова Л.В.** 1998. Влияние тяжелых металлов на ультраструктуру иммунокомпетентных клеток селезенки и почек осетра *Acipenser baeri* Brandt // Биология внутренних вод. № 2. С. 80–85.
- Бергнер Х. Кетц Х.А.** 1973. Научные основы питания сельскохозяйственных животных. М.: Колос. 597 с.
- Берджи.** 1997. Определитель бактерий. М.: Мир. 799 с.
- Блохина И.Н., Дорофейчук В.Г.** 1979. Дисбактериозы. Л.: Медицина. 174 с.
- Бурлаченко И.В.** 1991. Пищевые потребности молоди кефали как основа для создания искусственных кормов // Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. М.: Изд-во ВНИРО. 27 с.
- Бурлаченко И.В.** 2004. 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». М.: Изд-во ВНИРО. С. 131–133.
- Бурлаченко И.В.** 2007. Тест-система Petrifilm 3 М для микробиологической характеристики рыбных комбикормов // Комбикорма. № 5. С. 73–74.
- Бурлаченко И.В., Логвиненко И.А.** 1990. Изменения химического состава и обмен веществ у молоди кефалей в зимний период // Тез. Докл. II Симпозиума по экологической биохимии рыб. Ярославль. С. 23.
- Бурлаченко И.В., Аветисов К.Б., Банищикова И.В., Малик Е.В.** 2006. 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. М.: Изд-во ВНИРО. С. 231–233.

- Бурлаченко И.В., Аветисов К.Б., Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И.** 2001. Бактериальная обсемененность комбикормов // Рыбоводство и рыболовство. № 2. С. 16–18.
- Бурлаченко И.В., Аветисов К.Б., Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И.** 2002. Бактериальная обсемененность комбикормов и ее влияние на молодь стерляди // Труды ВНИРО. Т. 141. М.: Изд-во ВНИРО. С. 194–208.
- Бурлаченко И.В., Аветисов К.Б., Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И.** 2002. Влияние бактериальной обсемененности кормов на физиологическое состояние молоди рыб // Материалы международной научно-практической конференции «Аквакультура начала XXI века». М.: Изд-во ВНИРО. С. 245–253.
- Бурлаченко И.В., Бычкова Л.И.** 2005. Способ клинической оценки состояния осетровых рыб при их культивировании в установках с замкнутым циклом водоснабжения // Рыбное хозяйство. № 6. С. 70–72.
- Бурицев И.А., Николаев А.И.** 2004. Инновационные пути развития осетроводства в России // Моя Москва. № 8/100. С. 68–73.
- Бухарин О.В., Литвин В.Ю.** 1997. Патогенные бактерии в природных экосистемах. Екатеринбург. 26 с.
- Буховец Л.Д.** 1983. О токсическом действии госсипола, содержащегося в компонентах корма для рыб // Сборник научных трудов «Биологические основы рационального кормления рыбы». Вып. 36. М.: ВНИИПРХ. С. 104–120.
- Буховец Л.Д.** 1984. Влияние госсипола на пищевую активность и рост карпа // Сборник научных трудов «Физиология основных объектов рыбоводства». Вып. 42. М.: ВНИИПРХ. С. 59–64.
- Бычкова Л.И.** 2002. Микробиоценоз радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) и водной среды при садковом выращивании форели // Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. М.: МГТА. 25 с.
- Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н., Можарова А.И.** 1995. Этиологическая роль кишечных бактерий в инфекционных болезнях форели и условия их возникновения // Сб. Докл. Всерос. Совещания «Проблемы товарного выращивания лососевых рыб России». Мурманск: ПИНРО. С. 62–65.
- Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н., Можарова А.И.** 1995. Протейная инфекция у форели при выращивании в морских садках // Рыбное хозяйство. Сер. Аквакультура. Информ. пакет «Болезни рыб». Вып. 2. М.: ВНИЭРХ. С. 7–10.
- Валова В. Н.** 1999. Характеристика физиологического состояния молоди тихоокеанских лососей при выращивании на искусственных кормах // Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. М. 24 с.
- Вальдман А.Р.** 1972. Питание и микрофлора // Химические и физиологические проблемы создания и использования синтетической пищи. Рига: Зинантне. С. 60–89.
- Ведемейер Г.А., Мейер Ф.П., Смит Л.** 1981. Стресс и болезни рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность. 128 с.
- Вельтищева И.Ф.** 1951. О некоторых особенностях обмена веществ у молоди осетра и севрюги, выращенной в разных условиях // Труды Саратовского отделения Каспийского филиала ВНИРО. Т. 1. С. 96–112.
- Вельтищева И.Ф.** 1955. Питание молоди осетра при искусственном выращивании и пути повышения продуктивности прудов // Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. Баку. 17 с.

Вертуев Ю.В. 1996. Бактериальные токсины: биологическая сущность и происхождение // Микробиология. № 3. С. 43–46.

Вовк Н.И. 1994. Микрофлора комбикормов, используемых в тепловодных рыбных хозяйствах Украины // Тез. докл. научн. конф. Киев. С. 181–182.

Войнова Н.В. 1991. Кандидамикоз и смешанная инфекция, вызванная грибами *p.Candida* и бактериями *p. Bacillus*, карповых рыб в рыбоводных хозяйствах Ростовской области // Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. М.: ВИЭВ. 25 с.

Габидулин З.Г., Гимфалов И.Б., Ишильдін Х.А. 1985. Характеристика некоторых морфологических и биологических свойств бактерий рода *Proteus* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. № 9. С. 15–17.

Гаврилин К.В. 2004. Методы специфической и неспецифической иммунопрофилактики бактериальной геморрагической септицемии (аэромоноза) карпа (*Cyprinus carpio* L.) // Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. М.: ВНИИПРХ. 24 с.

Галаш В. Т. 1988. Токсико-биологическое действие трихотеценовых микотоксинов на карпа и предельно допустимая концентрация Т-2 токсина в карповых комбикормах // Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. М. 24 с.

Галаш В.Т. 1990. Диагностика и профилактика трихотеценовых микотоксикозов карпа // Экспресс-информация ВНИЭРХ. Рыбное хозяйство. Сер. Рыбохозяйственное использование внутренних водоемов. Вып. 7. С. 1–7.

Галаш В. Т., Головина Н.А. 1987. Гематологическая характеристика острого, подострого и хронического Т-2 токсикоза у карпов // Сборник научных трудов «Вопросы физиол. и биохимии питания рыб». Вып. 52. М.: ВНИИПРХ. С. 109–120.

Галаш В. Т., Головина Н.А., Соболев В.С. 1987. Реакция организма карпа на присутствие в кормах трихотеценовых микотоксинов // Сборник научных трудов «Вопросы физиол. и биохимии питания рыб». Вып. 52. М.: ВНИИПРХ. С. 120–132.

Гамыгин Е.А. 1987. Корма и кормление рыбы // Обзорная информация ЦНИИ-ТЭИРХ. Вып. 1. 82 с.

Гамыгин Е.А., Пономарев С.В., Канидьев А.Н., Щербина М.А. 1990. Методические указания по кормлению рыб новыми комбикормами, выпускаемыми предприятиями Минрыбхоза СССР. М.: ВНИИПРХ. 45 с.

Гамыгин Е.А., Щербина М.А., Передня А.А. 2004. Итоги работ по созданию новых кормов для ценных объектов аквакультуры // Вестник АГТУ. № 2 (21). Астрахань: АГТУ. С. 55–60.

Гербицкий Н.Л. 1949. Экспериментальные и методические основы развития осетроводства в низовьях Куры // Труды лаборатории основ рыбоводства. Т. 2. С. 5–28.

Гербицкий Н.Л. 1953. Внутривидовые биологические группы осетровых и значение их познания для развития осетроводства в связи с гидростроительством // Труды Всесоюзной конференции по вопросам рыбного хозяйства. М.: Изд-во АН СССР. С. 291–300.

Гербицкий Н.Л. 1962. Теория биологического прогресса осетровых и ее применение в практике осетрового хозяйства // Ученые записки ЛГУ. Серия биол. наук. Вып. 48. № 311. С. 48–64.

Гербицкий Н.Л. 1966. Экспериментальное обоснование осетрового хозяйства

в северо-западной части СССР // Тезисы докладов отчетной сессии ЦНИОРХ. Астрахань. С. 13–16.

Голованова И.Л. 2004. Влияние повышения температуры воды и содержания ртути в корме на устойчивость пищеварительных карбогидраз карпа к действию тяжелых металлов // Материалы научно-практической конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб». М. С. 287–294.

Головина Н.А. 2003. Микозы // Ихтиопатология / Под. ред. Головиной, Бауэра. М.: Мир. 448 с.

Головина Н.А. 2003. Незаразные болезни осетровых рыб – актуальная проблема товарного осетроводства // Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов». М. С. 31–32.

Проект «Марикорм» 1993 // Рыбное хозяйство. №5. С. 22–25.

Горегляд Х.С. 1940. Санитарная оценка рыб и раков загрязненных водоемов. Витебск: Изд-во Витебского ветеринарного института.

ГОСТ 13496.0-80. Комбикорма, сырье. Методы отбора проб.

ГОСТ Р 51419-99 (ИСО 6498-98). Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Подготовка испытуемых проб.

ГОСТ Р 51426-99 (ИСО 6887-83). Микробиология. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований.

ГОСТ Р 51899-2002. Комбикорма гранулированные. Общие технические условия. Госстандарт России. М. 8 с.

Грищенко Л.И., Смирнов В.В. 1997. Микрофлора карпов при выращивании в тепловодных хозяйствах // Информ. Бюл. «Итоги научно-практических работ в ихтиологии». М.: Россельхозакадемия. С. 48–50.

Грищенко Л.И., Рудиков Н.И. 1985. Проблемы патологии и иммунитета при инфекционных болезнях рыб // Итоги науки и техники «Ихтиология». Т.1. М: ВИНТИ. С.190–211.

Давыдовский И.В. 1956. Учение об инфекции. М.: Медгиз. 270 с.

Дацун В.М. 2001. Кормовые продукты. Рыбная мука. Технология продуктов и гидробионтов. М.: Колос. С. 403–417.

Домадский И.В. 1997. Вирулентность бактерий как функция адаптации // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. № 4. С. 16–20.

Душкина Л.А. 1998. Новое научное и рыбохозяйственное направление – марикультура // Биологические основы марикультуры. М.: Изд-во ВНИРО. С. 7–29.

Евдокимова Е.Б. 2003. Основы общей патологии // Ихтиопатология / Под ред. Головиной, Бауэра. М.: Мир. 448 с.

Егорова Л.Н., Трещева В.И. 1971. Производство рыбной муки, стабилизированной антиокислителем. М.: Пищевая промышленность. 40 с.

Езетчук Ю.В. 1985. Патогенность, как функция биомолекул. М. 25 с.

Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. 2005. Микробиология. М.: Дрофа. 445 с.

Жезмер В.Ю., Белякова Н.В., Заливака Л.В. 1988. Энтеробактерии в установках с замкнутым циклом водообеспечения // Сборник научных трудов «Индустриальные методы рыбоводства в замкнутых системах». Вып. 55. М.: ВНИИПРХ. С. 84–88.

Жезмер В.Ю., Галдина Е.А., Кутищева Н.В., Лаврова Н.С. 1991. Контроль санитарно-бактериологического состояния водной среды в УЗВ // Сборник научных трудов ВНИИПРХ. Индустриальное рыбоводство в замкнутых системах. Вып. 64. М.: ВНИИПРХ. С. 14–15.

Жезмер В.Ю., Ляшенко Е.В. 1991. Санитарно-бактериологическое качество комбикормов, используемых при выращивании рыбы // Сборник научных трудов ВНИИПРХ. Индустриальное рыбоводство в замкнутых системах. Вып. 64. М.: ВНИИПРХ. С. 19–24.

Жезмер В.Ю., Ляшенко Е.В., Кутищева Н.В., Галдина Е.А. 1991. Протейная инфекция в установках с оборотным водообеспечением // Рыбное хозяйство. № 11. С. 39–40.

Журавель А.А., Кадыков Б.И., Мамин А.И., Косых В. П. 1968. Патологическая физиология сельскохозяйственных животных. М.: Колос. 432 с.

Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. 2005. Общая патофизиология с основами иммунопатологии. СПб.: ООО «ЭЛБИ-СПб». 656 с.

Зинченко Е.В., Панин А. Н. 2000. Иммунобиотики в ветеринарной практике. ОНТИ ПНЦ РАН. 164 с.

Зотин А. И. 1961. Физиология водного обмена у зародышей рыб и круглоротых. М.: Изд-во АН СССР. 319 с.

Зубкова Л.А. 1965. Бактериальная флора органов и тканей сазана (*Cyprinus carpio*) // Труды КаспНИИРХ. Т. 20. С. 117–121.

Зубкова Л.А. 1966. К вопросу о нормальной микрофлоре волжского судака (*Lucioперca lucioперca*) // Труды КаспНИИРХ. Т. 22. С. 81–85.

Иванов В.П., Власенко А.Д. 2001. Реликтовые рыбы Каспия – осетровые // Рыбоводство и рыболовство. № 1. С. 17–21.

Исаева Н.М., Козиненко И.И. 1999. Иммуномодулирующее действие бактерий (их продуктов) на рыб // Вопросы ихтиологии. Т. 39. № 4. С. 527–534.

Исаева Н.М., Нагорная С.С. 1991. Роль дрожжевых микроорганизмов в аквакультуре (обзор) // Гидробиологический Журнал. Т. 27. № 6. С. 30–36.

Казанский Б.Н. 1957. Рационализация курина осетроводства на основе анализа внутривидовых биологических групп // Ученые записки ЛГУ. № 228. С. 33–53.

Казанский Б.Н. 1963. Экспериментальный и гистофизиологический анализ изменения половых циклов рыб под воздействием экологических факторов // Вопросы экологии. Т. 5. С. 88–89.

Калмакарова Л.И. 1989. Распространение условно-патогенных микроорганизмов в продуктах питания // Гигиена и санитария. № 6. С. 72–73.

Карасева Т.А., Воробьева Н.К., Лазаева М. 2000. Влияние препарата «Сухая бактериальная культура ацидофильной палочки» на здоровье и рост радужной форели // Тезисы докладов научно-практической конференции «Марикультура Северо-Запада России». Мурманск. С. 22–23.

Карзинкин Г.С. 1951. К нормативам кормления молоди осетровых и белорыбицы // Труды ВНИРО. Т. 19. С. 25–38.

Карзинкин Г.С. 1952. Основы биологической продуктивности водоемов. М.: Пищепромиздат. 341 с.

Карпевич А.Ф. 1985. Потенциальные свойства гидробионтов как резерв повы-

шения эффективности марикультуры // Биологические основы аквакультуры в морях европейской части СССР. М.: Наука. С. 17–33.

Картевич А.Ф. 1998. Потенциальные свойства гидробионтов и их реализация в аквакультуре // Биологические основы марикультуры. М.: Изд-во ВНИРО. С. 78–100.

Картавецкая Н.Е., Абрамова Ж.И., Тимошина Л.А., Писарева Н.А., Жакевич М.Л. 1986. Оценка качества липидов кормов для рыб // Сборник научных трудов ГосНИОРХ. Вып. 246. Л.: ГосНИОРХ. С. 124–131.

Каховский А.Е. 1991. Профилактика болезней рыб бактериальной этиологии в интенсивно эксплуатируемых рыбоводных прудах. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. М.: ВНИИПРХ. 20 с.

Квасников Е.И., Нагорная С.С., Аристова М.В. 1981. Количественный и видовой состав дрожжей в организме карпа и форели, выращиваемых в сбросных водах Киевской ТЭЦ // Микробиологический Журнал. Т. 43. № 6. С. 709–712.

Кизеветтер И.В., Алексеева Т.И. 1972. Влияние природы жира на сохранность витамина А // Известия ТИНРО. Т. 83. С. 152–156.

Киянова Е.В. 1998. Физиолого-биохимическая характеристика молоди русского осетра при введении в рацион кормовых антибиотиков, эубиотиков и антиоксидантов. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. Ростов-на-Дону. 24 с.

Коляков Я.Е. 1952. Ветеринарная микробиология. М.: Изд-во с/х литературы. 487 с.

Кондратьева И.А., Киташева А.А., Ланге М.А. 2001. Иммунная система рыб // Вестник Московского университета. Сер. биология. № 4. С. 37–40.

Кондратьева И.А., Киташева А.А. 2002. Функционирование и регуляция иммунной системы рыб // Вестник Московского университета. Сер. Сравнительная иммунология. № 3. С. 97–101.

Комбикорма для осетровых рыб. Технические условия. ТУ 9296-003-13250589-2002.

Костюковская О.Н., Гладкая Е.А., Бунин В.Т. и др. 1981. К вопросу о роли бактерий рода *Citrobacter* в этиологии острых кишечных заболеваний // Кишечные инфекции. Киев. 13. С. 74–77.

Костюничев В.В. 1988. Влияние кормов разного качества на рост и физиологическое состояние личинок муксуна // Сборник научных трудов ГосНИОРХ. Вып. 275. Л.: ГосНИОРХ. С. 46–50.

Котик А.Н., Труфанова В.А. 1977. Действие микотоксина Т-2 в рационе на индюшат и цыплят // Микотоксины (продуценты, химия, биосинтез, определение, действие на организм). Оренбург: Оренбургский мед. ин-т. С. 89–90.

Котлярчук М.Ю. 2004. Микробный пейзаж карпа (*Cyprinus carpio* L.) при выращивании в установке с замкнутым циклом водообеспечения. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. Калининград. 22 с.

Кравченко Л.В., Левицкая А.Б., Авреньева Л.И., Кранаускас А.Э., Люкова Г.В. 1985. Биохимические, гематологические и иммунологические критерии оценки хронического Т-2 микотоксикоза у мышей // Вопросы питания. № 4. С. 60–64.

Куваева И.Б. 1976. Обмен веществ организма и кишечная микрофлора. М.: Медицина. 248 с.

Кузьмина В.В. 1995. Защитная функция пищеварительного тракта рыб // Вопросы ихтиологии. Т. 35. № 1. С. 86–93.

Кузьмина В.В. 1999. Трофическая, защитная и трансформационная функции пищеварительной системы рыб // Вопросы ихтиологии. Т. 39. № 1. С. 69–77.

Кузьмина В.В. 2005. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. М.: Наука. 300 с.

Кузьмина В.В., Скворцова Е.Г. 2002. Бактерии желудочно-кишечного тракта и их роль в процессах пищеварения у рыб // Успехи современной биологии. Т. 122. № 6. С. 569–579.

Кузьмина В.В., Шишин М.М., Смирнова Е.С. 2004. Влияние тяжелых металлов на функцию неспецифической защиты пищеварительного тракта рыб // Материалы научно-практической конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб». Москва. С. 101–111.

Кулаков Г.В. 2003. Субтилис – натуральный концентрированный пробиотик. М.: ООО «Типография «Визави». 48 с.

Латирова Т.Б. 2001. Влияние сублетальных концентраций ртути, меди и кадмия на иммунофизиологическое состояние молоди Ленского осетра // Биология внутренних вод. № 3. С. 80–84.

Латирова Т.Б. 2004. Влияние тяжелых металлов (Hg, Cu, Cd) и карбофоса на иммунофизиологическое состояние молоди осетровых и карповых рыб. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. Борок. 24 с.

Ларцева Л.В. 1997. Кишечная микрофлора ценных промысловых рыб дельты Волги // Рыбное хозяйство. Сер. Аквакультура. Информационный пакет «Болезни рыб». Вып. 1. М.: ВНИЭРХ. С. 1–14.

Ларцева Л.В. 1998. Гигиеническая оценка по микробиологическим показателям рыбы и рыбных продуктов Волго-Каспийского региона. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. докт. биол. наук. М. 44 с.

Ларцева Л.В. 2003. Рыбы и гидробионты – переносчики возбудителей инфекционных болезней человека. Астрахань. 99 с.

Ларцева Л.В., Рогаткина И.Ю. 1996. Санитарно-гигиеническая оценка качества кормов, используемых в осетроводстве // Рыбное хозяйство. Сер. Аквакультура. Информационный пакет «Корма и кормление рыб». Вып. 3. М.: ВНИЭРХ. С. 1–6.

Ларцева Л.В., Румянцев В.Д., Хачатрян Т.В. 1988. Случай протейной инфекции сазана в авандельте Волги // Экспресс-информация. Вып. 5. М.: ЦНИИТЭИРХ. С. 1–4.

Ларцева Л.В., Проскурина В.В., Вьюшкова Л.А. и др. 2002. Санитарно-эпизоотическая ситуация Волго-Каспийского региона на рубеже XXI века // Рыбное хозяйство. Сер. Болезни рыб в аквакультуре. М.: ВНИЭРХ. С. 51.

Лоянич А.А., Шерстнева Л.А. 1987. Влияние тяжелых металлов на молодь кижуча // Сборник научных трудов «Морфогенетическая корреляция и селекция рыб». Вып. 263. С. 87–98.

Лубянской В.Н., Вербицкая Ю., Янкявичус К. и др. 1989. Облигатный симбиоз микрофлоры пищеварительного тракта и организма. Вильнюс: Мокслас. 191 с.

Лубянской В.Н., Ястогинене Р. 1995. Микроорганизмы пищеварительного тракта плотвы озера Друшай и их активность // Ecologija T. 3. Vilnius. С. 17–22.

Лукияненко В.И. 1971. Иммунобиология рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность. 364 с.

Лукияненко В.И. 1983. Общая ихтиотоксикология. М.: Легкая и пищевая промышленность. 320 с.

Лукияненко В.И. 1989. Иммунобиология рыб. Врожденный иммунитет. М.: Агропромиздат. 271 с.

Лысенко П.В., Щербина Т.В., Бекина Е.Н. 1989. Влияние окисленного жира в корме на сеголетков и годовиков карпа // Сборник научных трудов «Вопросы разработки и качества комбикормов». Вып. 57. М.: ВНИИПРХ. С. 134.

Малик Е.В. 2002. Пробиотики как способ профилактики желудочно-кишечных болезней свиней // Животновод для всех. С. 7–9.

Малик Н.И., Панин Н.А. 2001. Ветеринарные пробиотические препараты // Ветеринария. №1. М. С. 46–51.

Малик Н.И., Панин А.Н., Малик Е.В. 2000. Пробиотики в промышленном животноводстве // Животноводство. № 3. М. С. 10–16.

Малик Н.И., Чупахина Н.А., Сканичев А.И. 2002. Влияние пробиотической добавки на микробиоценоз кишечника цыплят // БИО. № 2. С. 17–20.

Марти Ю.Ю. 1964. Предисловие редактора // Осетровые южных морей Советского Союза. Труды ВНИРО. Т. 52. М.: Изд-во ВНИРО. С. 7–19.

Марти Ю.Ю. 1979. Проблемы создания осетрового хозяйства в южных морях СССР (от промысла к хозяйству) // Биологические ресурсы внутренних водоемов СССР. С. 73–85.

Марченко А.М. 1987. Актуальность развития научных исследований о зараженности кормов для рыб микроорганизмами и продуктами их обмена // Сборник научных трудов «Вопросы физиол. и биохимии питания рыб». Вып. 52. М.: ВНИИПРХ. С. 113–120.

Методические указания по диагностике алиментарных токсикозов у рыб. 1999 // Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб (часть вторая). М.: АМБ-агро. С. 141–160.

Микряков В.Р. 1991. Закономерности формирования приобретённого иммунитета у рыб. Рыбинск: АН СССР. Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина. 154 с.

Мильштейн В.В. 1940. Выращивание молоди осетровых // Рыбное хозяйство. № 6. С. 31–34.

Мильштейн В.В. 1962. Питание молоди осетровых в прудах дельты Волги // Труды КаспНИРО. Т. 18. С. 167–173.

Мирзоева Л.М. 1990. Алиментарные болезни рыб // Рыбное хозяйство. Сер. Рыбохозяйственное использование внутренних водоемов. Обзорная информация ВНИЭРХ. Вып. 4. С. 67.

Мирзоева Л.М. 2000. Болезни рыб при индустриальном выращивании // Рыбное хозяйство. Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре. Обзорная информация ВНИЭРХ. Вып. 1. С. 58.

Мирзоева Л.М. 2001. Применение пробиотиков в аквакультуре // Рыбное хозяйство. Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре. Аналитическая и реферативная информация ВНИЭРХ. Вып. 2. С. 23–30.

Мирошник И.Ф., Мостовая А.В., Гречко Л.Г. 2000. Динамика бактерий *Proteus*

mirabilis в водной фазе в присутствии энтеросорбента // Доп. Нац. АН Украины. № 5. С. 177–179.

Мусселиус В. А., Ванятинский В.Ф., Вихман А.А. и др. 1983. Лабораторный практикум по болезням рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность. 296 с.

Николюкин Н.И., Буцев И.А. 1969. Инструкция по разведению и товарному выращиванию гибридов белуги со стерлядью. М.: Изд-во ВНИРО. 52 с.

Ожередова Н.А. 2006а. Цитробактериоз у карповых рыб: распространение, клинико-морфологические изменения, диагностика // Рыбное хозяйство. № 2. С. 73–75.

Ожередова Н.А. 2006б. Цитробактериоз карповых рыб в регионе Северного Кавказа // Рыбное хозяйство. № 4. С. 65–67.

Остроумова И.Н. 1976. О морфофизиологических особенностях пищеварительной системы радужной форели (*Salmo irideus* Gib.) в связи с использованием сухих гранулированных комбикормов // Известия ГосНИОРХ «Физиологические основы составления гранулированных кормов для радужной форели». Т. 72. Л. С. 5–26.

Остроумова И.Н. 1978. Роль сбалансированности корма при выращивании карпа на теплых водах // Рыбное хозяйство. № 12. С. 25–27.

Остроумова И.Н. 1983. Повышение эффективности выращивания карпа в тепловодном рыбоводстве путем физиологически обоснованного кормления // Сборник научных трудов «Выращивание рыбы в бассейнах и лотках на теплых водах». Вып. 206. Л.: ГосНИОРХ. С. 84–97.

Остроумова И.Н. 1988. Особенности пищевых потребностей у рыб с различной температурой обитания и пути повышения эффективности кормления // Сборник научных трудов ГосНИОРХ. Вып. 273. Л. С. 5–25.

Остроумова И.Н., Шабалина А.А., Тимошина Л.А. и др. 1975. Составление сухих гранулированных кормов и влияние их на физиолого-биохимические показатели двухлеток радужной форели *Salmo gairdneri* Rich. // Вопр. ихтиологии. Т. 15. Вып. 3. С. 544–553.

Панин А.Н. 2002. Пробиотики: теоретические и практические аспекты // БИО. № 2. С. 4–7.

Панин А.Н., Малик Н.И. 2005. Пробиотические препараты – современная альтернатива кормовым антибиотикам // Материалы международной конференции «Перспективы увеличения производства свинины на основе ресурсосберегающих технологий». М.: Международная промышленная академия. С. 87–93.

Панин А.Н., Малик Н.И., Вершинина И. Ю. 2002. Пробиотики: теоретические и практические аспекты. БИО. №3. С. 9–12

Погорелова Н.П., Ларцева Л.В., Бойко А.В. и др. 1992. Санитарно-микробиологическая характеристика воды и рыбы в дельте Волги // Болезни рыб. Серия Аквакультура. Аналитическая и реферативная информация ВНИИЭРХ. Вып. 1. М. С. 13–17.

Радин И.Д. 1986. Протеометрия в санитарной ихтиопатологии // Тез. докл. V Всесоюз. симпоз. по инфекционным болезням рыб. М. С. 83–85.

Ржавская Ф.М. 1976. Жиры рыб и морских млекопитающих. М.: Пищевая промышленность. 470 с.

- Рудиков Н.И., Грищенко Л.И.** 1985. Микрофлора и бактериальные болезни рыб // Итоги науки и техники «Ихтиология». Т. 1. М.: ВИНТИ. С. 93–161.
- Русский медицинский журнал.** 1999. Разд. Патология. Т. 7. № 6.
- Сайко Д.В.** 1999. Состав микрофлоры воды и корма с карпового хозяйства Калининградского порта // Тезисы докладов молодых ученых «Биомониторинг и Рациональное использование морских и пресноводных гидробионтов». Владивосток. С. 177–178.
- Санин А.В., Литин А.С., Зинченко Е.В.** 2002. Ветеринарный справочник традиционных и нетрадиционных методов лечения собак. М.: Центрполиграф. 596 с.
- Санин М.Р.** 1987. Иммунные структуры пищеварительной системы. М.: Медицина. 218 с.
- Саркисов А.Х.** 1985. Микотоксикозы человека и животных (диагностика и основные меры борьбы) // Проблемы обеспечения безопасности пищевых продуктов. Продуценты микотоксинов и микотоксикозы. Т. 1. М.: Центр международных проектов ГКНТ. С. 119–137.
- Сафонова Н.В., Мухина Л.П., Ващукова С.С. и др.** 1991. Роль малоизученных возбудителей в этиологии острых кишечных заболеваний // Тезисы докладов VI Всесоюзного съезда микробиологов, эпидемиологов и паразитологов. Т. 1. М. С. 126–127.
- Сафронова Т.М., Шендерюк В.И.** 2001. Технология продуктов из гидробионтов. М.: Колос. 458 с.
- Семенов В.В., Мальцева Н.Н., Коршунов В.М.** 1992. Влияние *Lactobacillus acidophilus* Solco на иммунологические показатели тотально деконтаминированных мышей в условиях гнотобиологической изоляции // Клиническая микробиология. Т. 2. С. 12–14.
- Смит Л.С.** 1986. Введение в физиологию рыб. М.: Агропромиздат. 168 с.
- Соколов В. В.** 2002. Ветеринарно-санитарное состояние сырья, комбикормов, комбикормовых предприятий и разработка мероприятий по его улучшению // Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. д-ра вет. наук. М. 50 с.
- Соколов В., Слащилина Т.** 2006. Экструдирование для обеззараживания кормов // Комбикорма. № 5. С. 78.
- Соколов В.В., Стичкин И.П., Барбашина Г.А.** 1982. Общая бактериальная обсемененность аэробами зернового сырья и пшеничных отрубей, поставляемых комбикормовой промышленности и пути ее снижения // Труды ВНИИКП. Вып. 21. М. С. 57–66.
- Соколов В.В., Стичкин И.П. и др.** 1987. Санитарное состояние белкового сырья животного и растительного происхождения, поставляемое комбикормовым предприятиям // Труды ВНИИКП ВНПО «Комбикорм». Вып. 31. М. С. 38–44.
- Солнцева И.О., Виноградова Г.И.** 1983. Дрожжевая флора Белого озера, Шекснинского и Рыбинского водохранилищ // Микробиологический журнал. Т. 45. №3. С. 31–34.
- Солнцева И.О., Виноградова Г.И., Нагорная С.С.** 1987. Дрожжевая флора рыб водохранилищ Камского каскада // Биология внутренних вод. № 76. С. 4–7.
- Стейншер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж.** 1979. Мир микробов. Т. 3. М.: Мир. 486 с.
- Строганов Н.С.** 1968. Аклиматизация и выращивание осетровых рыб в пруду

дах (эколого-физиологические и биохимические исследования). М.: Изд-во Московского университета. 377 с.

Тихонова Л.С., Войнова Н.А., Качан С.Н. и др. 1987. Влияние дрожжеподобных грибов на организм рыб // Ветеринария. № 10. С. 31–32.

Триленко В.А., Семенова Н.В. 1975. Роль α -форм дрожжеподобных грибов в патологии рыб (эльфунгиоз рыб) // Материалы Всесоюзного совещания по болезням рыб. С. 103–110.

Трифонов Е.С., Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н. и др. 2003. Применение пробиотиков для компенсации воздействия агрессивных факторов водной среды при выращивании осетровых рыб в системах с замкнутым водоснабжением // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов». М. С. 130–131.

Трифонов Е.С., Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н. и др. 2004. Эффективность применения пробиотических препаратов «Зоонорм» и «Бифидум-СХЖ» на Можайском ПЭРЗ // Материалы научно-практической конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб». Москва. С. 528–538.

Технические условия 2003. Комбикорма для осетровых рыб ТУ 9296-003-13250589-2002. 74 с.

Технические условия 2003. Комбикорма для лососевых рыб ТУ 9296-003-13250589-2002. 74 с.

Турецкий В.И., Ильина И.Д., Яржомбек А.А. 1989. Об использовании продуктов микробиосинтеза в кормах для карпа // Экологическая физиология и биохимия рыб. Тезисы докладов. Т. 3. Ярославль. С. 184–186.

Тутельян В.А. 1985а. Вредные вещества пищевых продуктов и степень их опасности для здоровья человека // Проблемы обеспечения безопасности пищевых продуктов. Продуценты микотоксинов и микотоксикозы. Т. 1. М.: Центр международных проектов ГКНТ. С. 23–104.

Тутельян В.А. 1985б. Микотоксины: Исторические аспекты и современные представления // Проблемы обеспечения безопасности пищевых продуктов. Продуценты микотоксинов и микотоксикозы. Т. 1. М.: Центр международных проектов ГКНТ. С. 83–104.

Уголев А.М. 1963. О существовании пристеночного (контактного) пищеварения. М.-Л.: АН СССР. 243 с.

Уголев А.М. 1972. Мембранное пищеварение. Полисубстратные процессы, организация и регуляция. Л.: Наука. 315 с.

Уголев А.М. 1984. Достижения физиологии и проблемы питания // Вестник АН СССР. № 6. С. 34–45.

Уголев А.М. 1985. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Л.: Наука. 544 с.

Уголев А. М. 1991. Теория адекватного питания и трофология. СПб.: Наука. 272 с.

Уголев А.М., Кузьмина В.В. 1993. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеиздат. 238 с.

Федеральный закон «О техническом регулировании» (ФЗ № 184-83 от 27.12.2002 г.

Физиология всасывания. 1977 / Под ред. А.М. Уголева. Л.: Наука. 668 с.

Филиппова О.П., Бычкова Л.И., Трифонова Е.С. и др. 2004. Опыт использования пробиотического препарата – бифилактрина на ранней стадии выращивания бестера // Материалы научно-практической конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб». М. С. 534–537.

Фробишер М. 1965. Основы микробиологии. М.: Мир. 678 с.

Хоуэлл М. В. 1985. Плесневые грибы и микотоксины кормов // Новейшие достижения в исследовании питания животных. Вып. 4. М.: Агропромиздат. С. 6–26.

Хочачка П., Сомеро Дж. 1988. Биохимическая адаптация. М.: Мир. 568 с.

Хуторной П.М. 1989. Бактериальная флора белого амура (*Stenopharingodon idella* Val.) в норме и патологии. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. М.: ВИЭВ. 21 с.

Чахава О.В., Горская Е. М., Рубан С.З. 1982. Микробиологические и иммунологические основы гнотобиологии. М.: Медицина. 160 с.

Чайка Н. А., Сафонова Н.В., Вассер Н.Р. 1986. Некоторые малоизученные бактерии – возбудители острых кишечных заболеваний у людей // Острые кишечные инфекции. Л. С. 85–90.

Черкес Ф.К., Богоявленская Л.Б., Бельская Н.А. 1987. Микробиология М.: Медицина. 512 с.

Чернышев Н.И., Панин И.Г. 2000. Компоненты комбикормов. Воронеж: ВНИИКП. 122 с.

Черняев Н.П. 1985. Технология комбикормового производства. М.: Агропромиздат. 255 с.

Шабалина А.А. 1974. Оценка качества жира кормов форели при длительном хранении // Известия ГосНИОРХ. Т. 97. С. 67–73.

Шабалина А.А., Картавцева Н.Е., Калжун В.К. 1986. Влияние кормов разного качества на рыбоводно-физиологические показатели форели // Сборник научных трудов ГосНИОРХ. Вып. 246. СПб. С. 119–123.

Шабалина А.А., Ничуговский Г.Ф., Васильева В.С. 1997. Окисление и гидролиз липидов лососевых кормов и разработка индикаторного экспресс-метода определения их доброкачественности // Сборник научных трудов ГосНИОРХ. Вып. 325. СПб.: ГосНИОРХ. С. 58–57.

Шатерников В.А. 1985. Актуальные проблемы науки о питании // Проблемы обеспечения безопасности пищевых продуктов. Продуценты микотоксинов и микотоксикозы. Т. 1. М.: Центр международных проектов ГКНТ. С. 64–82.

Шендеров Б.А. 2001. Пробиотики и функциональное питание // Серия Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 3. М.: Грант. 288 с.

Шивокене Я. 1989. Симбионтное пищеварение у гидробионтов и насекомых. Вильнюс: Мокслас. 223 с.

Шлейфер Г.С., Дахоян В.К. 1979. Физиологические и иммунологические особенности реакции рыб на изменение среды обитания // Тезисы докладов IV Всесоюзной конференции «Экологическая физиология и биохимия рыб». Т. 1. Астрахань. С. 220–221.

Щербина А.К. 1960. Болезни рыб и методы борьбы с ними. Киев: Изд-во Украинской Академии с/х наук. 334 с.

Щербина М.А. 1973. Переваримость и эффективность использования пита-

тельных веществ искусственных кормов прудовыми рыбами. М.: Пищевая промышленность. 132 с.

Щербина М.А. 1983. Методические указания по физиологической оценке питательности кормов для рыб. М.: ВАСХНИЛ. 83 с.

Щербина М.А. 1984. Влияние качественных различий в питании и температуры среды на пластический обмен у рыб // Сборник научных трудов «Физиология основных объектов рыбоводства». Вып. 42. М.: ВНИИПРХ. С. 3–25.

Щербина М.А. 1984. Изучение пищеварительных процессов у карпа (*Cyprinus carpio* L.). Сообщение. 2. Всасывание азотсодержащих веществ и аминокислот в кишечнике двухлетних карпов при питании злаковыми и бобовыми // Вопросы ихтиологии. Т. 24. Вып. 5. С. 803–813.

Щербина М.А., Абросимова Н.А., Сергеева Н.Т. 1985. Искусственные корма и технология кормления основных объектов рыбоводства: рекомендации // Ростов-на-Дону: АзНИИРХ. 48 с.

Щербина М.А., Буховец Л.Д. 1992. Токсическое действие госсипола хлопчатникового шрота на карпа и возможные пути его детоксикации // Тезисы докладов VIII научной конференции по экологической физиологии и биохимии рыб. Т. 2. Петрозаводск. С. 170–171.

Щербина М.А., Гамыгин Е.А. 2006. Кормление рыб в пресноводной аквакультуре. М.: Изд-во ВНИРО. 364 с.

Щербина М.А., Гамыгин Е.А., Буховец Л.Д. 1996. Влияние экструзионной обработки на продуктивные свойства хлопчатникового шрота в комбикормах для карпа // Рыбоводство и рыболовство. № 3–4. С. 32.

Щербина М.А., Гамыгин Е. А., Салькова И.А. 1996. Влияние экструзии на питательную ценность кормового сырья для рыб // Рыбное хозяйство. Серия Аквакультура. Информационный пакет «Корма и кормление рыб». Вып. 2. М.: ВНИЭРХ. С. 1–11.

Щербина М.А., Мукосеева З.А. 1978. Глюконеогенез как один из источников энергетического обеспечения карпа в период зимнего голодания // Вопросы ихтиологии. Вып. 3. С. 557–561.

Щербина М.А., Салькова И.А., Першина И.Ф. 2001. Сырье и кормовые продукты для рыб // Рыбоводство и рыболовство. № 3. С. 16–19.

Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И., Гаврилин К.В. 2002. Испытания лечебного комбикорма с субалином в рыбхозах Московской области // Рыбное хозяйство. Серия Болезни гидробионтов в аквакультуре. Аналитическая и реферативная информация ВНИЭРХ. Вып. 2. М.: ВНИЭРХ. С. 18–27.

Юхименко Л. Н., Койдан Г.С., Борисенко В.Ф. и др. 1998. Эпизоотическая значимость *Pseudomonas fluorescens* v. *capsulata* // Рыбное хозяйство. Серия Аквакультура. Информационный пакет «Болезни рыб». Вып. 2. М.: ВНИЭРХ. С. 8–13.

Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Бычкова Л.И. 2000. Применение антибактериальных препаратов и профилактика бактериальной геморрагической септицемии (аэромоноза) в рыбоводных хозяйствах // Рыбное хозяйство. Серия Болезни гидробионтов в аквакультуре. Вып. 2. М.: ВНИЭРХ. С. 1–6.

Abrosimova X. 2006. Specificities of symbiotic digestion in young sturgeons (exemplified by *Acipenser gueldenstaedti* Brandt) // World Aquaculture May 9–13. Florence. Italy. P. 9.

- Adams M.R., Hall C.J.** 1988. Growth inhibition of food-born pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures // J. Food Sci. Technol. V. 23. P. 287–292.
- Ali D., Lacrpx C. et al.** 1995. Caracterization of diacetin B, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. bv. *Diacetilactis* UI 720 // Can. J. Microbiol. V. 41. N. 9. P. 832–841.
- Aquaculture Europe** 2004. 2004. «Biotechnologie for quality». October 20–23. European aquaculture societety. Special publication N 34. Barcelona, Spain. 885 p.
- Aquaculture Europe** 2005. 2005. August 5–9. European aquaculture societety, N 35. Trondheim, Norway. 836 p.
- Austin B., Austin D.A., Blanch A.R.** 1997. A comparison of methods for the typing of fish-pathogenic *Vibrio* spp. system // Appl. Microbiol. V. 20. P. 89–101.
- Ayaaki T., Ishisaki J.** 1994. Natural rubber serum that contains a special growth promoter for *Bifidobacterium* // Biosci. Biothec. Biochem. N 9. V. 56 (6). P. 1150–1151.
- Barrow P.A., Brooker B.E., Fuller R.** 1980. The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and is importance in the microbiology of the intestine // J. Appl. Bacteriol. V. 96. P. 161–169.
- Berg O.** 1995. Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hipoglossus hipoglossus*, inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp. // J. Fish Dis. V. 31. P. 31–40.
- Bergot P., Solari A., Luquet P.** 1975. Comparaison des surfaces absorbantes des caecals pyloriques et de l'intestin chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gaudneri* Rich.) // Ann. Hydrobiol. V. 6 (1). P. 27–43.
- Bogut I., Milakovic Z., Bukvic S. et al.** 1997. Influence of probiotic (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content of intestinal microfljra ib carp (*Cyprinus carpio*) // Czech J. Amim. Sci. V. 43. P. 231–235.
- Bourlatchenko I., Soudakova N., Mordovtsev D.** 2005. The effect of use of plants and animals sources proteins in feeds for sturgeons // Aquaculture Europe 2005. August 5-9 2005. European aquaculture societety. N 35. Trondheim. Norway. P. 151–152.
- Bourlatchenko I., Malik E.** 2005. Use probiotics for normalization of physiological condition of young sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) after starvation // 5th International Symposium on Sturgeon. May 2005. Ramsar – Iran. P. 25–26.
- Bowers A., Alexander J.B.** 1982. J. Fish Diseases. 5. N. 2. P. 145–151.
- Buddington R.K., Krogdahl A., Bakke-Mckellep A.I.** 1997. The intestines of carnivorous fish: Structure and functions and relations with diets // Acta fisiol. Scand. P. 67–80.
- Byun T.D., Park S.C., Benno Y. et al.** 1997. Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*) // J. Gen. Appl. Microbiol. V. 43. P. 305–308.
- Calvani M.** 1994. Le infesioni respiratory batteriche emergenti // Pediat. Oggi. Med. E chir. N. 1–2. P. 5–12.
- Cahill M.M.** 1990. Bacterial flora of fishes // Microbiol. Ecol. V. 19. P. 21–41.
- Condon S.** 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxgen // FEMS Microbiol. Rev. V. 46. P. 269–280.
- Corraze G.** 1999. Nutrition lipidique // Nutrition et alimentation des poissons et crustaces: INRA, IFREMER. P. 147–170.
- Directive 2002/32/CE.** Substances et produits indesirables dans l'alimentations des animaux.

Dubos R.J. 1963. Staphylococci and infection immunity // Amer. J. Diseases Children. V. 105. P. 643–645.

Duchuzeau R., Bellizer M., Rainbaud P. 1970. Transit digestif de divers inocullums bacteriens introduits "Per os" chez des souris axentiques holoxeniques: Effect antagoniste de la microflore du tractus gastro-intestinal // Zentralblatt fur Bacteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Higiene. Abt. I. Orig. V. 213. P. 533–548.

FAO Fisheries Circular. N 815. R 11/ 1988–1997.

FAO Fisheries Circular. 2003. N 886 RW. 2.

FAO. 2007. www.fao.org/fishery/topic/17000.

Ferguson A. 1979. Immunology // Scientific basis of gastroenterology / Ed. By H.L. Duthie. K. G. Wormsley. Edinburgh: Livingstone. P. 49–70.

Finlay B., Falkow S. 1997. Common Themes in Microbial Pathogenicity Revisited // Microbiology and Molecular Biology Reviews. V. 61. N 2. P. 136–169.

Fleisher B. 1989. A conserved mechanism of T-lymphocyte stimulation by microbial exotoxin // Microbial Pathogenesis. V. 7. P. 79–83.

Friend S., Babiuk L. Scheifer H. 1983. The effects of dietary T-2 toxin on the immunological function and Herpes simplex reactivation in Swiss mice // Toxicol. Appl. Pharmacol. V. 69. P. 234–244.

Fuller R. 1982. Development and dynamics of the aerobic gut flora in gnotobiotic and conventional animals // Advances in veterinary Medicine. V. 33. P. 7–15.

Fuller R., Newman H.N., Snoeyenbos G.H. 1989. Microbial competition in the mouth and gastrointestinal tract // Natur. Antimicrobial System. Bath University Press. Bath. P. 11–28.

Fuller R., Turvey A. 1971. Bacteria associated with the intestinal wall of the flow (*Gallus domesticus*) // J. Appl. Bacteriol. V. 34. P. 617–621.

Gas N., Noaillac-Depeyre J. 1981. Structure de l'appareil digestif. I. Organisation ultrastructure et fonction du tube digestive des teleosteens d'eau douce // M. Fontaine. Nutrition des poissons. CNRS. Paris. P. 19–44.

Gatesoupe F. J. 1989. Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae, *Scophthalmus maximus* L. // Aquaculture. A Biotechnology in Progress. European Aquaculture society. Bredene. P. 721–730.

Gatesoupe F. J. 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* // Aquaculture. V. 96. P. 335–342.

Gatesoupe F.J. 1993. *Bacillus* sp. Spores as food additive for the rotifer *Brachionus plicatilis*: improvement of their bacterial environment and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* // Fish Nutrition in Practice. V. 61. INRA. Paris. P. 561–568.

Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotic in aquaculture // Aquaculture. V. 180. P. 147–165.

Gatesoupe F. J., Arakawa T., Watanabe T. 1989. The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* // Aquaculture. V. 83. P. 39–44.

Gilliard S.E., Stahly T.E., Bush I.J. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a adjunct // J. Dairy Science. V. 67. P. 3045–3051.

Gournier-Chateau N., Larpent J.P., Castellanos I., Larpent J.L. 1994. Les probiotiques en alimentation animale et humaine // Technique et documentation Lavoisier. Paris. 192 p.

Grütte F.-K., Yaenel H. 1980. Physiologie und Biochemie von Verdauung und Resorption // Biochem. Physiol. Bd. 1. Ernährung. S. 210–239.

Guelin A. 1962. Non-receptivité des alvins de truite à l'infection par les enterobacteries et les enterophages // Ann. Inst. Pasteur. V. 103. P. 79.

Guelin A. 1963. Resultats obtenus par l'innoculation intrastomacale d'enterobacteries chez les alvins de truite à l'aide d'un dispositif approprié // Ann. Inst. Pasteur. V. 104. P. 214.

Guildberg A., Mikkelsen H., Sandaquer E., Ringø E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry Atlantic cod (*Gadus morhua*) // Hydrobiologia. V. 352. P. 279–285.

Guillaume J., Kaushik S., Bergot P., Metailler R. 1999. Nutrition et alimentation des poisson et des crustacees. Ed. INRA –IFREMER. 489 p.

Hansen G.H., Olafsen J.A. 1999. Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish // Microbial Ecology. V. 38. N 1. P. 1–26.

Haenel H., Schulze J. 1979. Contributions of gnotobiology to nutrition science. Folia Microbiol. V. 24. P. 197–204.

Halpern J., Neale E. 1995. Neurospecific binding, internalization and retrograde axonal transport // Curr Top Microbiol Immunol. V. 195. N 1. P. 221–241.

Hayes M.A., Bellamy J.E., Schiefer H.B. 1980. Subacute toxicity of dietary T-2 toxin in mice: Morphological and hematological effects // Canad. J. Comp. Med. V. 44. P. 203–218.

Horsley R.W. 1977. A review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranchs including methods for its analysis // J. Fish Biol. V. 10. N 6. P. 524–553.

Joborn A., Olsson C., Westerdahl A. 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extract by *Carnobacterium* sp. Strain // K. J. Fish Dis. V. 20. P. 383–392.

Jonsson E., Ollson I. 1985. The effect of performance, health and faecal microflora of feeding Lactobacillus strains to neonatal calves // Swedish J. Agric. Res. V. 15. P. 71–76.

Kato I., Yokohyra T., Mutai M. 1983. Macrophage activation by *Lactobacillus casei* in mice // Microbiol. Immun. V. 27. P. 611–618.

Kandler O., Weiss N. 1986. Regular non-spore-forming gram-positive rods // Bergey's Manual of System Bacteriol. V. 2. P. 1208–1234.

Kaushik S. 1990. Nutrition et alimentation des poissons et contrôle des déchets piscicole // Pisc. Franc. N 101. P. 14–23.

Kavka G. 1984. Beitrag zur Frage der Überlebenszeit von *Escherichia coli* // Abst. 3. Int. Hydromikrobiol. Symp. Bratislava. P. 205.

Knöke M., Bernardt H. 1977. Mikroökologie des Magen-Darm-Kanals des Menschen. DDR-Med.-Rep. 6. N 1. S. 3–78.

Knöke M., Bernardt H. 1980. Eubiose und Dybiose im oberen Dünndarm // Gastrointestinale Microflora des Menschen. Leipzig. S. 117–122.

Kozasa M. 1986. Toyocerin *Bacillus toyoi* as growth promoter for animal feeding. Microbiol. Aliment. Nutr. V. 4. P. 121–135.

Levin R.J. 1979. Fundamental concepts of structure and function of the intestinal epithelium // Scientific basis of gastroenterology. Edinbrough, London, New York: Livingstone. P. 308–337.

Luczkowich J.J., Stehwag E.J. 1993. Isolation of cellulolytic microbes from the intestinal tract of the pinfish *Lagodon rhomboides*: size-related changes in diet and microbial abundance // Mar. Biol. V. 116. P. 381–386.

Lindblad B., Alm J., Lundsjö A., Raftar J. 1979. Absorption of biological amines of bacterial origin in normal and sick infants // Development of mammalian absorptive processes / Ed. Elliot, Whelan. Amsterdam etc.: Excerpta Medica. P. 281–288.

Liston J. 1988. Microorganisms as a cause of economic loss to the seafood industry // Oceans' 88. Proc; Baltimor. Oct.31. N 1. P. 52–55.

Livre blanc sur la securite alimentaire. 2000 (COM(1999) 719 final).

MacMilan J.C., Santucci T. 1990. Seasonal trends in intestinal bacterial flora of farmed channel catfish // J. Aquat. Anim. Health. V. 2. N 5. P. 217–222.

Maeda M., Liao I.C. 1992. Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Panaeus monodon* // Bull. Natl. Res. Int. Aquacult. V.21. P. 25–29.

Maeda M., Nogami K., Kanematsu M. 1997. The concept of biological control methods in aquaculture // Hydrobiologia. V. 358. P. 285–290.

Margolis L. 1953. Aerobic bacteria in the intestines and slim of the pike (*Esox lucius*) // Rev. Canad. Biol. V. 11. P. 20–48.

Marty P., Martin Y. 1992. Bacteries heterotrophes aerobies isolees d'invertebres benthiques des eaux cotieres mediterraneennes: caracteristiques des souches, production d'enzymes et d'agents antibacteriens // Mar. Life. V. 1. P. 1–8.

Metha A.M., Patel K.A., Dave P.J. 1983. Isolation and purification of an inhibitory protein from *Lactobacillus acidophilus* AC₁ // Microbios. V. 37. P. 37–43.

Miyazaki T. 1990. Патогистологическое изучение некроза, клиника личинок японской камбалы // Fish. Pathol. V. 25. N. 1. P. 7–13.

Nedoluha P.C., Westhoff D. 1995. Microbial analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) grown in flow-trough tanks // J. Food Prot. V. 58. P. 1363–1368.

Nelson J.S., Rohovec J.S., Fryer J.L. 1985. Location of *Vibrio anguillarum* in tissues of infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) using the fluorescent antibody technique // Fish Pathol. V. 20. N 2–3. P. 229–235.

Non S.H., Han K., Won T.H. et al. 1994. Effect of antibiotics, enzyme, yeast culture and probiotics on the growth performance of Israel carp // Korean J. Anim. Sci. V. 36. P. 480–486.

NRC (National Research Council). 1981. Nutrient requirements of domestic animals. Nutrient requirements of coldwater fishes. National Academy Press. Washington DC. 63 p.

NRC. 1983. Nutrient requirements of warmwater fishes and shellfishes. Nutrient requirements of domestic animals. National Academy Press. Washington DC. USA.

Perdigon G., Nader de Marcias M.E., Alvares S. et al. 1986. Effect of mixture of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* administered orally on the immune system in mice // J. Food Prot. V. 49. P. 986–989.

Perdigon G., Nader de Marcias M.E., Alvares S. et al. 1988. Systematic augmentation of the immune response in mice by feeding milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* administered orally on the immune system in mice // Immunol. V. 63. P. 17–23.

- Pollmann D.S., Danielson D.M. et al.** 1980. Influence of *Lactobacillus acidophilus* inoculum on gnotobiotic and conventional pigs // J. Anim. Sci. V. 51. P. 629-637.
- Prieur D., Mevel G., Nicolas J.L. et al.** 1990. Interaction between bivalve mollusks and bacteria in the marine environment // Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. V. 28. P. 277-352.
- Queiroz J.F., Boyd C.E.** 1998. Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds // J. World. Aquaculture Society. V. 29. P. 67-73.
- Ranken R., Wilson R., Bealmear P.** 1971. Increased turnover of intestinal mucosal cells of germfree mice induced by cholic acid // Proc. Soc. Exper. Biol. Med. V. 138. P. 270-272.
- Reglement du Parlement europeen..** Exigences en matiere d'Hygiene des aliments pour les animaux. (CE) N 183/2005.
- Sakata T.** 1990. Microflora in the digestive tract of fish and shell-fish // Microbiology in Poecilotherms. Elsevier, Amsterdam. P. 171-176.
- Schaperclaus W.** 1979. Fischkrankheiten. Akademie Verlag, Berlin. Teil I. S. 3-37.
- Scholl P.** 1994. MNC class II signaling in B-cell activation // Immun. Today. V. 15. N 9. P. 418-422.
- Selye H.** The evolution of the stress concept // Am. Sci. V. 61. P. 692-699.
- Schlievert P.** 1997. Searching for superantigens // Immunol. Invest. V. 26. N 2. P. 283-290.
- Schmitt C.K., Meysick K.C., O'Brien A.** 1999. Bacterial Toxins: Friends or Foes? // Emerging Infectious Diseases. V. 5. N 2. P. 224-234.
- Smith P., Davey S.** 1993. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad // J. Fish Dis. V. 16. P. 521-524.
- Strøm E., Olafsen J.A.** 1990. The indigenous microflora of wild-captured juvenil cod in net-pen rearing // Microbiology in Poecilotherms. Elsevier. Amsterdam. P. 181-185.
- Syvokene J.** 1991. Interrelation between the microorganism and its digestive tract microorganisms // Экология. Вильнюс. № 4. P. 37-44.
- Syvokiene J., Mikeniene L., Bubinas A.** 1996. The influence of nutrition and microbiological relations on variability of commercial fish from the Baltic Sea // Polish-Swedish symp.: Baltic coastal fishes resources and management. Gdiniya. P. 269-270.
- Syvokiene J., Mikeniene L., Kazlauskiene N., Stasiunaite P.** 1997. Macro- ir mikroorganizmu tarpusavio santykiu ivertinimas lasisinese zuvis imant pavyzdziu slaki // Ekologija. Vilnius. N 4. P. 40-48.
- Sugita H., Ishida Y., Kadota H.** 1982. Bacterial flora in the gastrointestinal tract of *Tilapia nilotica* adapted in seawater // Bull. Jap. Soc. Fish. V. 48. N 7. P. 987-991.
- Sugita H., Miyajima C., Iwata J. et al.** 1988. Intestinal microflora of Japanese coastal fishes // Bull. Jap. Soc. Fish. V. 54. N. 5. P. 875-882.
- Sugita H., Hirose Y., Matsuo N. et al.** 1998. Production of antibacterial substance by *Bacillus* sp. Strain Nm 12 in intestinal bacterium of Japanese coastal fishes // Aquaculture. V. 165. P. 269-280.
- Takahashi Y.** 1984a. Механизмы появления симптомов аэромоноза у карпов // J. Shimonoseki Univ. Fish. V. 32. N 1-2. P. 41-48.
- Takahashi Y.** 1984b. Механизмы появления гематологических симптомов аэромоноза у карпов // Ibid. V. 32. N 3. P. 67-74.

Talon R., Labadie J., Larpent J.P. 1980. Characterisation on the inhibitory power of *Lactobacillus* on meat origin // Central. Bacteriol., Abt. Orig. V. 170. P. 133–142.

Trust T.J., Bull L.M., Currie B.R., Buckley J.T. 1979. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharingodon idella*), gold fish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // J. Fish Res. Board Canada. V. 36. N 10. P. 1174–1179.

Trust T.J., Sparrow R.A.H. 1974. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes // Canada J. Microbiol. V. 20. P. 1219–1228.

Urbanova E., Manova K., Pacova Z. 2000. Bacteria of the proteal – occurrence in raw materials and food, and resistance to antibiotics // Vet. Med. V. 45. N 6. P. 171–176.

Vladoianu I.R. 1990. Expression and host resistance to *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium*; bacterial survival within macrophages and human origin // Microbial Pathogenesis. V. 8. P. 83–90.

Voveriene G. 2002. Hydrocarbon-degrading bacteria in digestive tract of fish // Summary of Doctoral Diss. Biomed. Sci. Vilnius. 54 p.

Walker W. A. 1979. Gastrointestinal host defense: importance of gut closure in control of macromolecular transport // Development of mammalian absorptive processes. Ciba Found. Symp. 70. Amsterdam.: Excerpt Medical. P. 201–219.

Watanabe T. 1982. Lipid nutrition in Fish // Comp. Biochem. Physiol. V. 73 B. P. 3–15.

Watanakunakorn C., Perni S. 1994. *Proteus mirabilis* bacteremia: a review of 176 cases during 1980–1992. Scand. J. Infect. Diseases. V. 26. N 4. P. 361–367.

Westerdahl A., Olsson J.C., Kjelleberg S et al. 1991. Isolation and characterization of turbot *Scophthalmus maximus* –associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum* // Appl. Environ. Microbiol. V. 57. P. 2223–2228.

Watarani M., Tobe T., Yoshikawa M., Sasacava C. 1995. Disulfide oxidoreductase activity of *Shigella flexneri* is reduced for release of Ipa proteins and invasion of epithelial cells // Proc. Natl. Acad. Sci. V. 92. P. 4927–4931.

World Aquaculture 2005. 2005. Bali – Indonesia. 796 p.

World Aquaculture 2006. 2006. Highest quality for the consumer. May 9–13. Florence, Italy. 1068 p.

Оглавление

Введение	5
Глава 1. Комбикорма как фактор безопасности индустриального культивирования рыб	9
1.1. Особенности индустриального культивирования и их влияние на организм рыб	9
1.2. Роль пищеварительной системы в осуществлении защитных функций организма	11
1.2.1. Защитные барьеры пищеварительной системы	11
1.2.2. Микрофлора пищеварительного тракта	12
Физиологическое значение нормальной микрофлоры	12
Характеристика микрофлоры пищеварительного тракта	13
Защитная функция кишечной микрофлоры	15
1.3. Контаминанты комбикормов как факторы негативного воздействия на живые организмы	17
1.3.1. Краткая характеристика комбикормов и их контаминантов	17
1.3.2. Техногенные контаминанты	19
1.3.3. Биогенные контаминанты	21
Антипитательные факторы растений	22
Окисленные липиды	22
Микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности	24
Глава 2. Микробная контаминация комбикормов, ее влияние на корма, среду культивирования и организм рыб	28
2.1. Характеристика микробной обсемененности сырья и комбикормов	28
2.2. Структура микробного фона комбикормов для рыб и характеристика доминирующих групп	31
2.3. Изменения бактериальной обсемененности комбикормов при различных условиях хранения	36
2.4. Тест-система для микробиологической характеристики рыбных комбикормов	38
2.5. Микроорганизмы комбикормов как источник загрязнения среды культивирования и заражения рыб	41
2.6. Пути проникновения бактерий в организм рыб и развитие бактериальных заболеваний	43
2.6.1. Бактериальные токсины и особенности их воздействия на животные организмы	47
Глава 3. Особенности воздействия преобладающих форм микроорганизмов комбикормов на молодь осетровых рыб	51
3.1. Методы исследований	51
3.2. Энтеробактерии (сем. Enterobacteriaceae)	55

3.2.1. Кишечная палочка (<i>Escherichia coli</i>)	55
3.2.2. Протей (<i>Proteus vulgaris</i>)	67
3.2.3. Цитробактер (<i>Citrobacter</i> sp.)	79
3.3. Стафилококки (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	89
3.4. Бактерии рода <i>Bacillus</i>	97
3.5. Дрожжеподобные грибы (<i>Candida albicans</i>)	104
3.6. Плесневые грибы (<i>Penicillium</i> sp.)	115
Заключительные замечания	122
Глава 4. Применение пробиотических препаратов как биологический метод повышения резистентности рыб в условиях индустриального культивирования	126
4.1. Микрофлора кишечника рыб из естественных условий обитания	127
4.2. Биологический метод коррекции состава микробиоценоза кишечника	130
4.3. Характеристика и свойства пробиотиков	131
4.4. Опыт использования пробиотиков в рыбоводстве	134
4.5. Направленное формирование микробиоценоза кишечника рыб и его влияние на состояние осетровых различного возраста	136
4.5.1 Молодь	137
4.5.2. Старшие возрастные группы осетровых рыб	143
4.5.3. Личинки	150
Заключение	156
Литература	160

Contents

Introduction	5
Chapter 1. Mixed feeds as a safety factor in industrial fish farming.	9
1.1. Peculiarities of industrial fish farming and their influence on the fish organism	9
1.2. Role of digestive system in the organism protection	11
1.2.1. The digestive system protective barriers	11
1.2.2. The microflora of digestive tract	12
Physiological importance of the normal microflora	12
Description of the digestive system microflora	13
Protective function of the intestinal microflora	15
1.3. The mixed feed contaminants as factors of negative impact on the organisms	17
1.3.1. Outline of mixed feeds and their contaminants	17
1.3.2. Man-caused contaminants	19
1.3.3. Biogenic contaminants	21
Anti-nutrient factors of plants	22
Oxidized lipids	22
Microorganisms and products of their metabolism	24
Chapter 2. Microbial contamination of mixed feeds: impact on feeds, culturing environments, and fish organisms	28
2.1. Description of the microbial contamination of raw materials and mixed feeds	28
2.2. Structure of the fish feed microbial background and characteristics of the dominant groups	31
2.3. Variations in the microbial contamination of mixed feeds under different storage conditions	36
2.4. Test-system for the microbiological characteristics of the fish mixed feeds	38
2.5. The mixed feed microorganisms as a source of contamination for the farming environment and fish infection	41
2.6. Ways of the bacteria penetration into the fish organism and the bacterial disease development	43
2.6.1. The bacterial toxins and peculiarities of their impact on animals . . .	47
Chapter 3. Peculiarities of impact of predominant forms of the mixed feed microorganisms on young sturgeons	51
3.1. Research methods	51
3.2. Enterobacteria (fam. <i>Enterobacteriaceae</i>)	55
3.2.1. <i>Colibacillus (Escherichia coli)</i>	55
3.2.2. <i>Proteus (Proteus vulgaris)</i>	67
3.2.3. <i>Citrobacter (Citrobacter sp.)</i>	79

3.3. Staphylococci (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	89
3.4. Bacteria of <i>Bacillus</i> genus	97
3.5. Yeastlike fungi (<i>Candida albicans</i>)	104
3.6. Mold fungi (<i>Penicillium</i> sp.)	115
Final remarks	122
Chapter 4. Application of probiotic drugs as a biological method to promote fish resistance under conditions of industrial rearing	126
4.1. The fish intestinal microflora in natural environmental conditions	127
4.2. The biological correction to correct the intestinal microbiocenosis composition	130
4.3. Directional and properties of probiotics	131
4.4. Experience of the probiotic application in fish farming	134
4.5. Controlled formation of the fish intestinal microbiocenosis and its impact on various age groups of sturgeons	136
4.5.1 Young fish	137
4.5.2. Elder age groups of sturgeons	143
4.5.3. Larvae	150
Conclusion	156
Reference	160

Бурлаченко Ирина Виленовна

**Актуальные вопросы безопасности комбикормов
в аквакультуре рыб**

Заведующая редакцией *Г.П. Короткова*

Редактор *С.Г. Филиппова*

Корректор *Ю.А. Павлова*

Художественный редактор *Ю.С. Яковлев, В.В. Веселова*

Технический редактор *И.И. Алиева*

Компьютерная верстка *И.И. Алиевой*

Подписано в печать 24.03.2008.

Печ. л. 11,4. Формат 70×100 1/16.

Тираж 200. Заказ № 640.

Издательство ВНИРО

107140, Москва, ул. Верхняя Красносельская, 17

Тел.: (499) 264-65-33

Факс: (499) 264-91-87