

Микробиота кишечника производителей сиговых на примере *Coregonus nasus* в аквакультуре в нерестовый период

М.М. Вылка¹, А.А. Лютиков¹, С.А. Дьякова¹, Д.С. Карлов², А.А. Жукова¹, В.А. Голотин¹

¹ Санкт-Петербургский филиал Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии («ГосНИОРХ» им. Л.С. Берга), Санкт-Петербург, Россия;

² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Кишечная микробиота — один из главных факторов иммунитета животных, в том числе рыб. Понимание таксономического и количественного состава микробиоты может являться ключом к усилению иммунитета рыб к бактериальным и грибковым инфекциям в аквакультуре и в перспективе позволит оптимизировать процессы управления рыбным хозяйством.

Цель исследования. Определить различия таксономического состава кишечного микробиома здоровых и пораженных сапролегниозом производителей чира (*Coregonus nasus*, Pallas, 1776) в условиях индустриального выращивания с помощью высокопроизводительного секвенирования.

Методы. Состав микробиоты кишечника определяли методами NGS-секвенирования и биоинформатики. Гематологический анализ проводили стандартными методами с использованием микроскопии.

Результаты. Представлены предварительные данные высокопроизводительного молекулярно-генетического скрининга видового разнообразия кишечной микробиоты здоровых и пораженных сапролегниозом особей чира *C. nasus* в период нереста. Показан гематологический профиль, позволяющий достоверно установить клинические индивидуальные различия здоровых рыб и рыб с поражениями сапролегнией. Определены различия в таксономическом и количественном составе кишечного микробиома чира.

Выводы. Для рыб с клиническими признаками сапролегниоза определено доминирование бактерий филы Proteobacteria (в среднем 45,3%). У здоровых рыб доли представителей филы Proteobacteria, Firmicutes и Actinobacteriota были близки (26,67–30,27%).

Ключевые слова: сапролегниоз; гематология; *Coregonus nasus*; NGS-секвенирование; микробиота кишечника.

Original study article

Gut microbiota of healthy and saprolegniosis-affected whitefish (*Coregonus nasus*) producers in aquaculture

Maxim M. Vylka¹, Anatokiy A. Lyutikov¹, Svetlana A. Dyakova¹, Denis S. Karlov², Alina A. Zhukova¹, Vasily A. Golotin¹

¹ Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Saint Petersburg branch, Saint Petersburg, Russia;

² All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: The gut microbiota is one of the main factor influencing the immunity of animals, including fish. Understanding the taxonomic and quantitative composition of the microbiota may hold the key to enhance fish immunity against bacterial and fungal infections in aquaculture that potentially could optimize fish farm management.

AIM: The aim of this work is to determine the taxonomic composition differences of the gut microbiome between healthy and Saprolegnia-affected breeders of broad whitefish (*Coregonus nasus*, Pallas, 1776) under industrial farming conditions using high-throughput sequencing.

METHODS: The gut microbiota composition was analyzed using NGS sequencing and the methods of bioinformatics. Hematological profiling was performed using standard microscopy-based techniques.

RESULTS: Preliminary data from high-throughput molecular genetic screening of the gut microbiota diversity in healthy and Saprolegnia-affected *C. nasus* individuals during the spawning period are presented. The hematological profile reliably distinguishes clinical differences between healthy fish and those infected with Saprolegnia. Differences in the taxonomic and quantitative composition of the gut microbiomes in *C. nasus* has been shown.

CONCLUSIONS: Fish with the clinical signs of saprolegniosis showed a dominance of the phylum Proteobacteria (on average of 45.3%). There were comparable proportions (26.67–30.27%) of Proteobacteria, Firmicutes, and Actinobacteriota observed in healthy fish.

Keywords: saprolegniosis; hematology; *Coregonus nasus*; NGS sequencing; gut microbiota.

ОБОСНОВАНИЕ

Рыба — это богатейший источник белка и эссенциальных жирных кислот омега-3 для человека. Постоянно возрастающая потребность в пищевых ресурсах формирует спрос на увеличение производства пищи, в первую очередь, богатой животным белком. Современные объемы лова рыбы и других гидробионтов в некоторых странах не

Микробиота кишечника чира

сопоставимы с фактическими потребностями населения в рыбной продукции, что компенсируется деятельностью аква- и марикультуры. Интенсивное развитие аквакультуры сопряжено с проблемами, связанными с инфекциями рыб, которые наносят существенный вред рыбным хозяйствам и аквакультурному сектору мировой экономики в целом [1]. Традиционными объектами аквакультуры северных приарктических регионов являются холодолюбивые виды рыб, наиболее ценные из которых — сиговые, к которым относится чир (*Coregonus nasus*, Pallas, 1776). Чир — быстрорастущий вид сиговых рыб, который встречается во всех реках бассейна Северного Ледовитого океана от р. Волонги (Чёшская губа) до Чукотки и Аляски.

Нерест чира проходит при понижении температуры воды до 0°C, что в промышленных условиях усложняет рыбоводные процессы в виду формирования ледяного покрова. Ледяной покров может травмировать кожу нерестящегося чира с последующим развитием на ней патогенных микроорганизмов. Усугубляют положение физиологические изменения в организме рыб, связанные в первую очередь с истощением эндогенных запасов, снижением физиологического статуса и общего иммунитета [2]. Травматизация кожных покровов чира в аквакультуре может быть вызвана классическими рыбоводными манипуляциями: отловом рыб, их бонитировкой перед нерестовой кампанией, получением половых продуктов и др. В условиях аквакультуры травмированные участки кожи чира поражаются возбудителями сапролегниоза — одним из наиболее опасных оомицетных заболеваний пресноводных рыб, вызываемых представителями порядка *Saprolegniales*. Это заболевание является причиной экономических потерь в отрасли аквакультуры во всем мире [3].

Одним из факторов развития сапролегниоза является понижение температуры воды до 2–3°C, что определяет зону риска для сиговых рыб, в том числе чира, нерест которого в аквакультуре начинается при данных температурах. К клиническим признакам заболевания относятся ватообразное, как правило, белого цвета, разрастание патогена на различных участках поверхности тела, плавниках, жабрах, реже на внутренних органах. В отличие от бактериальных и вирусных инфекционных заболеваний, сапролегниоз не протекает в острой и молниеносной формах, что обуславливает достаточно длительное накопление патогена в организме рыбы и определяет наличие бессимптомного носительства у визуально здоровых особей.

На сиговых рыбоводных хозяйствах доля пораженных особей чира не превышает 5%. Однако это количество может быть существенным, учитывая ежегодную гибель производителей и потерю икры, которая могла быть задействована в получении личинок для товарной аквакультуры или воспроизводства. Сапролегниоз как инфекционное

Микробиота кишечника чира

заболевание отражается на физиологических показателях рыб, в том числе на параметрах крови.

Важная составляющая, определяющая качественное состояние иммунного статуса рыб, — кишечная микробиота. Бактериальное население кишечника рыб проявляет антагонистическую активность по отношению к патогенным объектам, а также синтезирует ряд ферментов, повышая биодоступность кормовых объектов, в том числе вовлекая в метаболизм такие сложные полимеры, как целлюлоза, хитин, коллаген [4]. Любое инфекционное заболевание, в том числе и сапролегниоз, оказывает влияние на микробиом кишечника рыб [5]. В настоящее время набирает популярность изучение кишечной микробиоты рыб методом NGS-секвенирования, который позволяет оценить различия в таксономическом составе микробиома и количественное соотношение различных видов [5]. Этот метод может лечь в основу решения актуальной для рыбоводной отрасли проблемы сапролегниоза. В частности, оценка различий в кишечных микробиомах здоровых рыб и рыб, пораженных сапролегнией, поможет подобрать терапию заболевания, включающую редактирование микробиоты путем внесения пробиотических и пребиотических препаратов, что позволит снизить интенсивность инфекционного процесса и минимизировать финансовые потери рыбоводных хозяйств.

Цель исследования

Определить различия таксономического состава кишечного микробиома здоровых и пораженных сапролегниозом производителей чира (*Coregonus nasus*, Pallas, 1776) в условиях промышленного выращивания с помощью высокопроизводительного секвенирования.

МЕТОДЫ

Исследования проводили на рыбоводном хозяйстве ООО «Форват. Сиговый питомник», расположенном на оз. Суходольское (Приозерский р-н, Ленинградская обл.), на котором в промышленных условиях выращивают различные виды сиговых рыб [6]. Производителей чира содержали в делевых рыбоводных садках площадью 100 м² с естественным водообменом и температурным режимом, что способствует достижению половозрелости рыб естественным путем.

Производителей чира в возрасте 5+ в период нерестовой кампании сразу после отбора половых продуктов (11.12.2024, температура воды 1,8°C) помещали в бассейны с проточной водой. Общее количество отобранных рыб составляло 10 экземпляров, в том

Микробиота кишечника чира

числе 5 особей (2 самки и 3 самца) с выраженными клиническими признаками сапролегниоза и 5 особей (2 самки и 3 самца) визуально здоровых рыб (рис. 1).

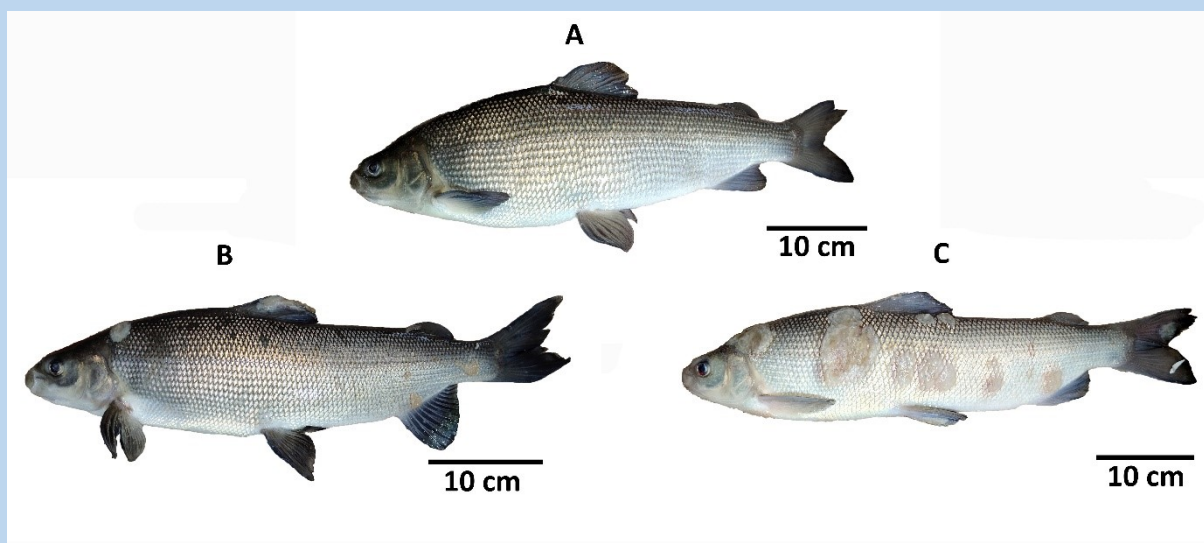


Рис. 1. Типичный внешний вид объектов исследования: *a* — здоровый чир; *b* — чир с незначительным поражением спинного плавника и участков спины. Рыба имеет нормальный экстерьер и пигментацию покровов; *c* — чир с обширным поражением сапролегнией. Рыба по внешнему виду истощена, имеет более светлые покровы тела.

Масса рыб, пораженных сапролегниозом, варьировала от 1110 до 1436 г, без признаков заболевания — от 988 до 1522 г.

У рыб брали образцы крови, асептически извлекали кишечники, печень. Материалы транспортировали короткое время на льду. Кишечники и сыворотку крови до момента анализа хранили при температуре -80°C .

NGS секвенирование

Результаты получены с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ (Санкт-Петербург, Россия).

Для выделения ДНК из образцов, соответствующих количеству рыб ($n=10$), был использован набор реактивов NucleoSpin[®] Soil компании MACHEREY-NAGEL (Германия) согласно инструкции производителя. Из каждого образца была выделена ДНК в трехкратной повторности для получения независимых библиотек.

Таксономический анализ прокариотического сообщества проводили с универсальными праймерами F515/R806 на переменный участок гена 16S рибосомной РНК (pPHK)-v4 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA/GGACTACVSGGGTATCTAAT), специфичными для широкого круга микроорганизмов, включая бактерии и археи [7]. Все

Микробиота кишечника чира

праймеры имели служебные последовательности, содержащие линкеры и баркоды, необходимые для секвенирования по технологии Illumina.

ПЦР была проведена в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 0,5–1 единицу активности полимеразы Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, США), по 5 пкМ прямого и обратного праймеров, 10 нг ДНК-матрицы и 2 нМ каждого dNTP (Life Technologies, США). Смесь денатурировали при 94°C 1 мин, после чего следовало 35 циклов: 94°C — 30 с, 50°C — 30 с, 72°C — 30 с. Финальную элонгацию проводили при 72°C 3 мин. ПЦР-продукты очищали по рекомендованной Illumina методике с использованием AMPure XP (Beckman Coulter, США).

Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов и оценку качества ампликонных библиотек проводили в 1% агарозном геле (Агароза марки Biotechnology Grade, VWR International LLC, США). После электрофореза гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали с помощью системы визуализации Gel-Doc (Bio-Rad, США). В качестве маркера молекулярного веса продуктов гидролиза использовали маркер производства СибЭнзим (100bp+1,5Kb+3Kb).

Дальнейшую подготовку библиотек проводили в соответствии с инструкцией производителя MiSeq Reagent Kit Preparation Guide (Illumina) (<https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistrydocumentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf>). Библиотеки секвенировали в соответствии с инструкцией изготовителя на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США) с использованием набора реактивов MiSeq[®] ReagentKit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2×300 нуклеотидов). Количество прочтений варьировало от 16 до 100 тыс. в зависимости от повторности.

Первичная обработка полученных данных, а именно демультимплексирование образцов и удаление адаптеров, проводили с помощью программного обеспечения компании Illumina (Illumina, США). Для последующего «деноизинга», объединения последовательностей, удаления химерных прочтений, оценки качества сиквенсов, восстановления исходных флотипов (Amplicon sequence variant, ASV) и дальнейшей таксономической классификации полученных ASV, использовали программные пакеты dada2 [8], phyloseq [9] и DECIPHER [10] и базу данных рРНК SILVA релиз 138 [11]. Работу осуществляли в программной среде R [9]. Для представления данных таксономического анализа использовали средства программного пакета QIIME [12].

Гематологический анализ

Микробиота кишечника чира

Перед отбором крови рыб помещали в ванну с анестетиком (гвоздичное масло) [13]. Кровь отбирали из хвостовой вены медицинскими шприцами 2 мл с иглами 23G в гематологические пробирки, предварительно просушив место прокола бумажной салфеткой.

В данной работе использовали классические методы гематологического обследования рыб [14]. Концентрацию гемоглобина определяли колориметрическим методом на спектрофотометре СФ-2000 (Россия) при длине волны 540 нм с использованием раствора Драбкина в разведении 1:250 [14]. Количество эритроцитов подсчитывали в камере Горяева с применением раствора Хендрикса в разведении 1:200 [14]. Содержание гемоглобина в эритроците определяли как отношение общего гемоглобина к общему числу эритроцитов, результат выражали в пикограммах (пг). Скорость оседания эритроцитов измеряли в аппарате Панченкова, для этого кровь разводили 5% раствором цитрата натрия в соотношении 1:4 на часовом стекле. Общий белок сыворотки определяли методом биуретовой реакции (реактив Общий белок-Ольвекс, Россия), оптическую плотность полученных растворов определяли при длине волны 540 нм на СФ-2000.

Мазки крови окрашивали комбинированным способом по Паппенгейму [14]. Клетки крови анализировали на микроскопе МикМед-2 (увел. $\times 1000$) и фотографировали с использованием цифровой камеры Levenhuk I400MPlus (Россия).

Морфофизиологические параметры

У рыб измеряли длину, массу тела и массу печени. На основе измерений вычисляли морфофизиологические индексы: индекс печени и коэффициент упитанности по Фультону [15].

Статистика

Статистический анализ выполняли в программе Statistica. Статистическую значимость отличий между выборками данных определяли с помощью *U*-критерия Манна–Уитни, который используется для сравнения двух независимых выборок. Результаты исследований представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки ($M \pm m$) и минимального и максимального значений (min; max). Отличия считались значимыми при $p < 0,05$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отсутствие клинических проявлений сапролегниоза у рыб не может быть гарантией здоровья, в связи с чем желательно дополнительное подтверждение их состояния по

Микробиота кишечника чира

гематологическим и морфофизиологическим параметрам. Результаты морфофизиологических и гематологических исследований рыб приведены в табл. 1. Статистически значимые отличия установлены только в содержании общего белка в сыворотке крови, которое значительно меньше у чиров с признаками сапролегниоза, что указывало на нарушение обменных процессов у таких рыб. Наблюдалась также тенденция к повышению гепатосоматического индекса у рыб, пораженных сапролегнией.

Таблица 1. Морфофизиологические и гематологические параметры чира ($M \pm m$ / min; max)

Параметр	Здоровые чирь	Чирь с признаками сапролегниоза
Масса, г	1181,0 $\pm$ 103,4 / 966; 1522	1293,0 $\pm$ 58,4 / 1110; 1436
Индекс печени	1,36 $\pm$ 0,1 / 1,04; 1,82	1,67 $\pm$ 0,1 / 1,4; 2,0
Коэффициент упитанности по Фультону	1,41 $\pm$ 0,2 / 0,86; 1,82	1,39 $\pm$ 0,1 / 1,07; 1,70
Гемоглобин, г\л	70,0 $\pm$ 4,6 / 60; 86	52,0 $\pm$ 14,7 / 3; 84
Эритроциты, млн\мкл	0,98 $\pm$ 0,1 / 0,76; 1,21	0,70 $\pm$ 0,2 / 0,06; 1,37
Содержание гемоглобина в эритроците, пг	73,0 $\pm$ 6,2 / 50; 85	73,0 $\pm$ 9,1 / 46; 98
Скорость оседания эритроцитов, мм\ч	2,7 $\pm$ 0,3 / 2,0; 4,0	3,6,0 $\pm$ 1,0 / 2,0; 7,0
Общий белок сыворотки, г\л	52,0 $\pm$ 4,9* / 41; 65	34,0 $\pm$ 8,8* / 6; 61

Примечание. *Различия статистически значимы при $p < 0,05$.

В группе особей с клиническими признаками сапролегниоза выявлена значительная вариабельность гематологических показателей, в связи с чем рыб в данной группе следует рассматривать индивидуально, в зависимости от степени развития инфекции. Так, по мере повышения тяжести поражения кожных покровов сапролегнией у рыб снижались показатели красной крови, при этом не происходило нарушения морфологии эритроцитов, в отличие от особей с тяжелой формой заболевания, для которых характерна анемия (рис. 2). У рыб с клиническими признаками сапролегниоза визуально увеличены нейтрофилы, тогда как у здоровых особей они не превышали размеры эритроцитов.

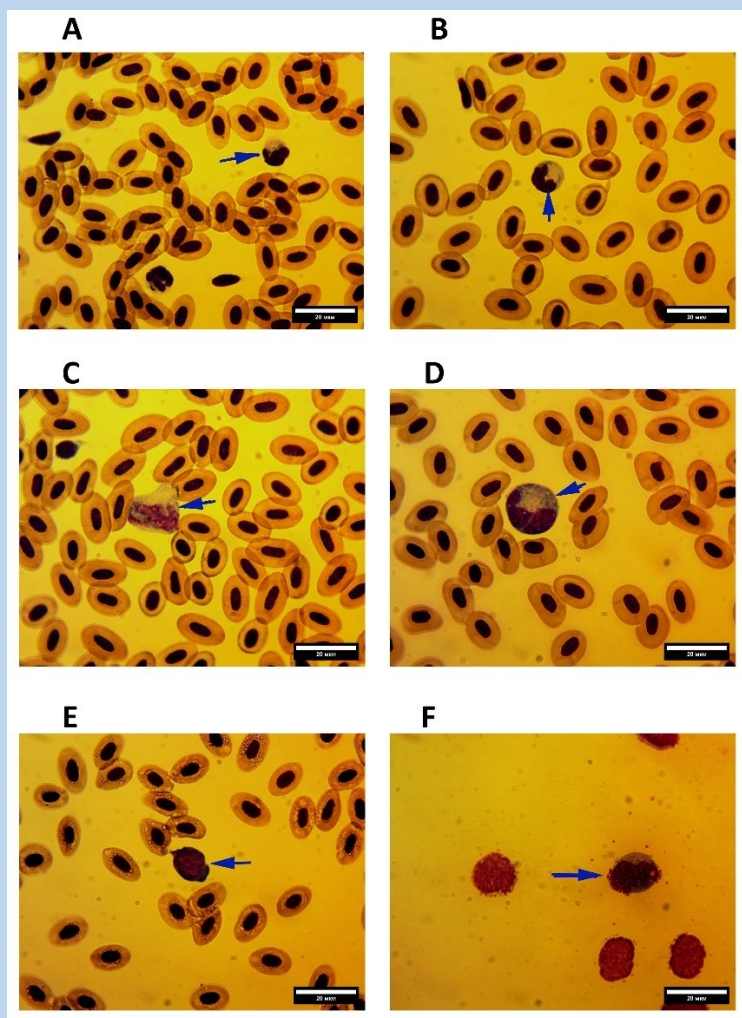


Рис. 2. Клетки крови здоровых рыб, рыб с незначительным поражением и с высокой долей поражения сапролегнией: *a, b* — типичная картина крови здоровых особей (гемоглобин 60–80 г/л); *c, d* — клетки крови особей с незначительным поражением сапролегнией, эритроциты нормальной формы (гемоглобин 60–80 г/л); *e* — типичный мазок крови особей с обширным поражением сапролегниозом, характерна анемия, вакуолизация цитоплазмы эритроцитов (гемоглобин 30–35 г/л); *f* — типичный мазок крови особей с тяжелой формой поражения инфекцией (гемоглобин ниже 20–30 г/л). Стрелками показаны нейтрофилы: у особей с сапролегнией наблюдается тенденция к увеличению размеров этих клеток.

Гематологические параметры являются важными показателями состояния здоровья: рыбы с высоким гемопозом более эффективно справляются с бактериальными инфекциями, а также с сапролегниозом [17]. Пониженные индивидуальные характеристики крови рыб с сапролегниозом свидетельствовали о происходящих патологических изменениях в организме, в данном случае на фоне инфекции. Полученные гематологические данные здоровых особей чира укладывались в нормальный диапазон

Микробиота кишечника чира

физиологических значений для сиговых рыб [14], которые также согласуются с собственными многолетними исследованиями [18].

Таксономический анализ бактериального сообщества, проведенный методом высокопроизводительного секвенирования, позволил идентифицировать представителей 18 фил (табл. 2).

Таблица 2. Представленность фил бактерий в кишечном микробиоме чиров

Таксон	Усредненные доли в кишечном микробиоме чиров, %	
	здоровые	с признаками сапролегниоза
Proteobacteria	29,75	45,37
Firmicutes	30,27	24,91
Actinobacteriota	26,67	19,45
Bacteroidota	1,66	0,99
Fusobacteriota	1,15	0,47
Deinococcota	0,41	0,43
Acidobacteriota	0,13	0,20
Planctomycetota	0,11	0,20
Verrucomicrobiota	0,49	0,15
Cyanobacteria	0,02	0,13
Synergistota	0,03	0,12
Patescibacteria	0,30	0,09
Campilobacterota	0,12	0,03
Desulfobacterota	0,00	0,03
Gemmatimonadota	0,01	0,03
Nitrospirota	0,00	0,01
Bdellovibrionota	0,03	0,00
Мухосoccota	0,03	0,00
Неклассифицированные филотипы	8,84	7,37

К наиболее крупным филам, содержащим суммарно 90% всех обнаруженных операционных таксономических единиц (ОТЕ), относились Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteriota, Bacteroidota, Fusobacteriota. Филы Deinococcota, Acidobacteriota, Planctomycetota, Verrucomicrobiota, Cyanobacteria, Synergistota, Patescibacteria,

Микробиота кишечника чира

Campilobacterota, Desulfobacterota, Gemmatimonadota, Nitrospirota, Bdellovibrionota, Мухососсота отличались низким обилием ОТЕ (менее 0,50%) и в совокупности составляли 1,43 и 1,68% всего кишечного микробиома пораженных сапролегнией и здоровых особей чира соответственно. Доля неклассифицированных филотипов составила 7,37 и 8,84% для рыб с признаками сапролегниоза и без таковых.

Поскольку целью настоящего исследования было изучение таксономического состава прокариотических организмов, населяющих кишечник рыб, в статье не приведены данные о контаминации желудочно-кишечного тракта представителями рода *Saprolegnia*. При этом отмечена разница в бактериальном населении кишечника рыб с клиническими признаками сапролегниоза и здоровых особей. Так, доля фил Proteobacteria, Firmicutes и Actinobacteriota составляла 89 и 86% всех выделенных ОТЕ в кишечных микробиомах пораженных и здоровых чиров соответственно, однако соотношение фил у рыб с патологиями и без разнилось (рис. 3).

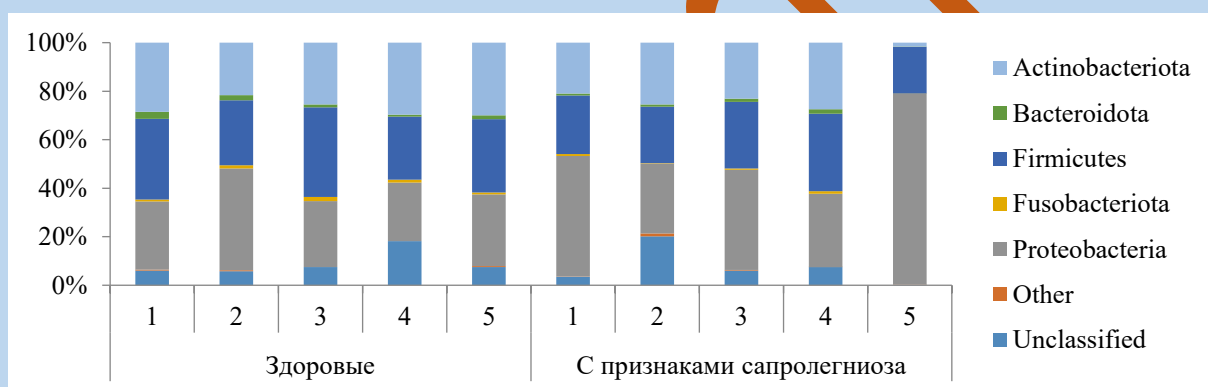


Рис. 3. Соотношение фил в кишечном микробиоме здоровых чиров и чиров с клиническими признаками поражения сапролегнией. Чир с признаками сапролегниоза 1, 2 и 3 были классифицированы как умеренно зараженные, 4 и 5 — с признаками сильного заражения (по данным гематологии, см. рис. 2).

Для рыб с клиническими признаками сапролегниоза определено доминирование бактерий, относящихся к филе Proteobacteria, составляющей 28,50–78,60% от суммы ОТЕ (в среднем 45,30%). Филы Firmicutes и Actinobacteriota субдоминировали в их кишечном микробиоме (средние значения 24,91 и 19,45% соответственно). У здоровых рыб доли представителей филы Proteobacteria, Firmicutes и Actinobacteriota были близки и в среднем составляли 29,75, 30,27 и 26,67% соответственно. Следует отметить, что у здоровых рыб отмечен меньший размах вариации долей вышеуказанных фил по сравнению с особями с

Микробиота кишечника чира

сапролегниозом, что может свидетельствовать о большей стабильности микробиома здоровых рыб.

Филы Bacteroidota и Fusobacteriota представлены значительно меньшим количеством ОТЕ, у пораженных сапролегнией чиров доли представителей данных фил в кишечном микробиоме (0,47 и 0,99%) уступали показателям, выявленным у здоровых рыб (1,15 и 1,66%).

Известно, что представители филы Bacteroidota способны вступать в мутуалистические взаимоотношения (облигатный симбиоз), оказывая положительное влияние на нормальное развитие и функционирование желудочно-кишечного тракта организма-хозяина [19]. Кишечные бактериоды обычно продуцируют бутират, конечный продукт ферментации толстой кишки, который, как считается, обладает полезными хозяину свойствами (например, противоопухолевыми) и таким образом играет роль в поддержании здоровья кишечника [20]. Они также участвуют в метаболизме желчных кислот и инактивации токсических и/или мутагенных соединений [21].

Исследования показали, что фузобактерии активируют воспалительные реакции организма-хозяина, в то же время снижение их количества в кишечнике ограничивает резистентность организма к различного рода патогенам [22]. Это характеризует филу Fusobacteriota как преимущественно полезную микрофлору.

Для пораженных сапролегниозом и здоровых рыб отмечены также различия в кишечном микробиоме на уровне классов (рис. 4).

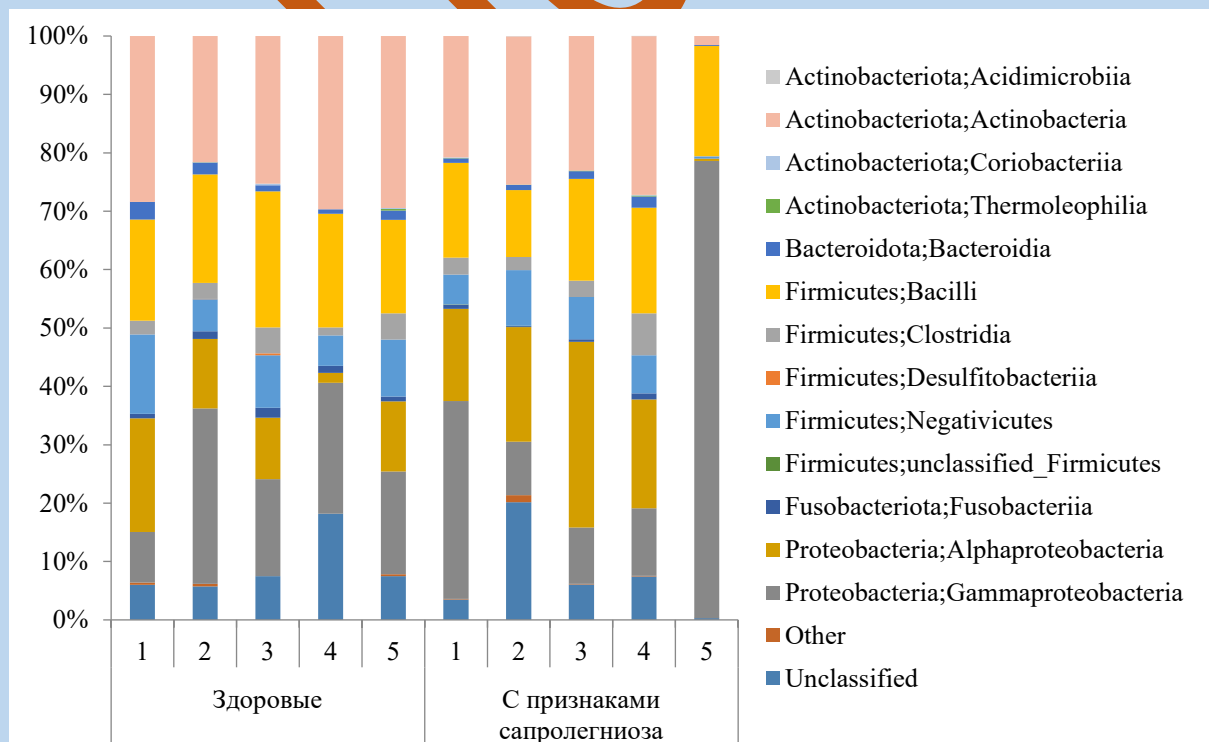


Рис. 4. Соотношение разных классов бактерий в кишечном микробиоме здоровых чиров и чиров с клиническими признаками поражения сапролегнией. Чирь с признаками сапролегниоза 1, 2 и 3 были классифицированы как умеренно зараженные, 4 и 5 — с признаками сильного заражения (по данным гематологии, см. рис. 2)

В филе Actinobacteriota доминирующим классом являлся *Actinobacteria*, доля представителей которого составляла 19,31 и 26,50% для рыб с сапролегниозом и здоровых рыб соответственно. Фила Firmicutes преимущественно представлена классами *Bacilli*, *Negativicutes* и *Clostridia*, содержащих 16,24, 5,57 и 2,99% всего выявленного бактериального разнообразия кишечной микробиоты пораженных сапролегнией рыб. В микробиоме здоровых рыб доля бактерий классов *Bacilli*, *Negativicutes* и *Clostridia* незначительно превышала аналогичные показатели зараженных рыб и составляла 18,67, 8,49 и 3,05% соответственно. Известно, что данные представители являются автохтонными для кишечника рыб и обеспечивают поддержание постоянства микробиоты за счет активного метаболического потенциала [23].

В филе Proteobacteria отмечены классы *Gammaproteobacteria* и *Alphaproteobacteria*. Доля представителей класса *Gammaproteobacteria* в кишечном микробиоме пораженных сапролегниозом особей варьировала в пределах 9,07–78,20%, в среднем составляя 28,36%, тогда как у здоровых рыб среднее число ОТЕ этого класса составляло 18,79%, изменяясь в диапазоне от 8,53 до 29,60%. Класс *Alphaproteobacteria* в микробиоме пораженных сапролегнией рыб был представлен 17,00% ОТЕ (0,40–31,30%), у здоровых рыб — 10,97% (1,63–19,23%). Следует отметить особь под номером 5, с признаками сильного заражения сапролегниозом согласно клиническому анализу крови (рис. 2). Микробиом этой особи характеризовался высокой долей (78,20%) ОТЕ класса *Gammaproteobacteria*, низкой долей представителей класса *Actinobacteria* и отсутствием ОТЕ класса *Alphaproteobacteria* в сравнении с остальными особями, что могло быть обусловлено высокой степенью пораженности сапролегнией данной особи.

Анализ полученных данных показал значительно больший размах вариации долей представителей классов *Gammaproteobacteria* и *Alphaproteobacteria* в кишечных микробиомах чиров с сапролегниозом в сравнении со здоровыми особями. Поскольку размах вариации признака является одним из показателей стабильности системы, можно сделать вывод о большей устойчивости микробиома здоровых особей и дисбалансе кишечной микробиоты особей, пораженных сапролегнией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, инфицирование сапролегниозом воздействовало на организм чиров и находило отражение в составе кишечной микробиоты и в гематологических показателях. Пониженные индивидуальные гематологические показатели у рыб с сапролегниозом свидетельствовали о происходящих патологических процессах в организме, в то время как гематологические данные здоровых особей укладывались в нормальный диапазон физиологических значений для сиговых рыб. Микробиом особей чира с клиническими признаками заболевания отличался от такового здоровых рыб на уровне фил и классов. Из результатов видно, что преобладающими филумами в обоих случаях были *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteriota*, за исключением одной сильно пораженной особи, у которой доминировали представители *Proteobacteria*. Филы *Bacteroidota* и *Fusobacteriota* составляли минорную часть у пораженных сапролегнией и здоровых рыб. При этом был выявлен значительный размах вариации долей класса *Actinobacteria* (фила *Actinobacteriota*), *Gammaproteobacteria* и *Alphaproteobacteria* (фила *Proteobacteria*) у рыб с признаками сапролегниоза по сравнению со здоровыми особями. Высокий размах вариации численности ОТЕ мог указывать на нестабильность микробиома вследствие различных стадий воспалительного процесса у изучаемых особей на фоне развития инфекционного заболевания, что в совокупности с общим стрессом нерестового периода обусловило перестройку бактериального сообщества кишечника рыб. Полученные различия в микробиоте кишечника здоровых чиров и особей, пораженных сапролегниозом, свидетельствуют о необходимости применения профилактической терапии в виде корректировки бактериального компонента кишечника рыб с целью повышения иммунной защиты чиров в условиях интенсивного рыбоводства.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. М.М. Вылка — сбор и обработка материалов, анализ полученных данных; А.А. Лютиков — сбор и обработка материалов; С.А. Дьякова — анализ полученных данных, написание текста; Д.С. Карлов — сбор материалов, анализ полученных данных; внесение окончательной правки; А.А. Жукова — внесение окончательной правки, работа с базой данных; В.А. Голотин — концепция и дизайн исследования, сбор материалов, анализ полученных данных, написание текста, обзор литературы. Авторы одобрили версию для публикации, а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Микробиота кишечника чира

Источники финансирования. Отсутствуют.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента, член редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFO

Author contribution: M.M. Vylka — collection and processing of materials; analysis of the obtained data; A.A. Lyutikov— collection and processing of materials; T.A. Dyakova — analysis of the obtained data, writing the text; D.S. Karlov — collection of materials, analysis of the obtained data; making final edits; A.A. Zhukova — making final edits, working with the database; V.A. Golotin — concept and design of the study, collection of materials, analysis of the obtained data, writing the text, literature review. All the authors approved the version of the draft to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that issues related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Funding sources: No funding.

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities or interests for the last three years related with for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality. No previously obtained or published material (text, images, or data) was used in this study or article.

Data availability statement. All data generated during this study are available in this article.

Generative AI. Generative AI technologies were not used for this article creation.

Provenance and peer-review. This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The peer review process involved two external reviewers, a member of the editorial board, and the in-house scientific editor.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Bene C, Arthur R, Norbury H, et al. Contribution of fisheries and aquaculture to food security and poverty reduction: Assessing the current evidence. *World Dev.* 2016;79:177–196. doi: 10.1016/j.worlddev.2015.11.007
2. Campbell JH, Dixon B, Whitehouse LM. The intersection of stress, sex and immunity in fishes. *Immunogenetics.* 2021;73(1):111–129. doi: 10.1007/s00251-020-01194-2
3. Thakuria D, Khangembam VC, Pant V, et al. Anti-oomycete Activity of chlorhexidine gluconate: Molecular docking and *in vitro* studies. *Front Vet Sci.* 2022;(9):909570. doi: 10.3389/fvets.2022.909570
4. Amillano-Cisneros JM, Hernández-Rosas PT, Gomez-Gil B, et al. Loss of gut microbial diversity in the cultured, agastric fish, Mexican pike silverside (*Chirostoma estor*: Atherinopsidae). *PeerJ.* 2022;7(10):e13052. doi: 10.7717/peerj.13052
5. Borges N, Keller-Costa T, Sanches-Fernandes GMM, et al. Bacteriome structure, function, and probiotics in fish larviculture: the good, the bad, and the gaps. *Annu Rev Anim Biosci.* 2021;9:423–452. doi: 10.1146/annurev-animal-062920-113114
6. Kostyunichev VV, Knyazeva LM, Shumilina AK. Methodological recommendations for growing and forming broodstocks of whitefish (peled, chir, muksun) in industrial conditions on artificial feeds. In: *Proceeding of the methodological recommendations for industrial cultivation of whitefish for reproduction and commercial aquaculture.* Saint Petersburg: GosNIORKh; 2012. P. 103–131. (In Russ.)
7. Bates ST, Berg-Lyons D, Caporaso JG, et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J.* 2010;5(5):908–917. doi: 10.1038/ismej.2010.171
8. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016;13(7):581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869
9. McMurdie PJ, Holmes S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One.* 2013;8(4):e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217
10. Wright ES. Using DECIPHER v2.0 to analyze big biological sequence data in R. *The R Journal.* 2016;8(1):352–359. doi: 10.32614/RJ-2016-025

11. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(D1):D590–D596. doi: 10.1093/nar/gks1219
12. Caporaso GJ, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010;7:335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303
13. Mikodina EV, Sedova MA, Pyanova SV, et al. Guidelines for the use of the anesthetic “clove oil” in aquaculture. In: *Aquaculture. Iss. 6.* Moscow: VNIRO Publishing House; 2011. 58 p. ISBN: 978-5-85382-429-4 (In Russ.)
14. Golovina NA, Romanova NN. *Laboratory practical training on fish physiology.* Saint Petersburg: Lan; 2019. 136 p. (In Russ.)
15. Kotlyar OA. “*Methods of fisheries research*” — on a comprehensive study of commercial fish populations. Rybnoe: ASTU; 2004. 180 p. (In Russ.)
16. Shabir U, Dar JS, Bhat AH, et al. The hidden world of fish fungal pathogens: molecular identification and phylogenetic analysis in common carp, *Cyprinus carpio*. *Arch Microbiol.* 2023;205(9):311. doi: 10.1007/s00203-023-03651-4
17. Saha H, Pal AK, Sahu NP, et al. Effects of fluconazole based medicated feed on haemato-immunological responses and resistance of *Labeo rohita* against *Saprolegnia parasitica*. *Fish Shellfish Immunol.* 2017;71:346–352. doi: 10.1016/j.fsi.2017.09.073
18. Ostroumova IN, Kostinichev VN, Lyutikov AA, et al. The effect of increased temperature on physiological state of whitefish cultivated in aquaculture. *Fisheries.* 2022;(1):69–74. doi: 10.37663/0131-6184-2022-1-69-74 EDN: OGKGVC
19. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 2005;307(5717):915–920. doi: 10.1126/science.1104816
20. Kim YS, Milner JA. Dietary modulation of colon cancer risk. *J Nutr.* 2007;137(11):2576–2579. doi: 10.1093/jn/137.11.2576S
21. Smith CJ, Rocha ER, Paster BJ. The medically important *Bacteroides* spp. in health and disease. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. *The prokaryotes. Vol. 7.* New York: Springer; 2006. P. 381–427. doi: 10.1007/0-387-30747-8_14
22. Kelly D, Yang L, Pei Z. Gut microbiota, fusobacteria, and colorectal cancer. *Diseases.* 2018;6(4):109. doi: 10.3390/diseases6040109
23. Bel’kova NL, Denikina NN, Dzyuba EV. Study of the microbiome of the intestine of the *Comephorus Dybowski* korotneff, 1904. *Biology Bulletin.* 2015;(5):544–551. doi: 10.7868/S0002332915050033

Микробиота кишечника чира

Вылка Максим Михайлович; ORCID: 0000-0001-7583-864X; eLibrary SPIN: 5468-2834; e-mail: vylka.maxim@yandex.ru

Лютиков Анатолий Анатольевич, канд. биол. наук; ORCID: 0000-0003-0418-8218; eLibrary SPIN: 9187-6075; e-mail: tokmo@mail.ru

Дьякова Светлана Александровна, канд. биол. наук; ORCID: 0000-0001-9970-403X; eLibrary SPIN: 4202-4471; e-mail: dyakova@niorh.vniro.ru

Карлов Денис Сергеевич, канд. биол. наук; ORCID: 0000-0002-9030-8820; eLibrary SPIN: 8355-8091; e-mail: ds.karlov@arriam.ru

Жукова Алина Александровна; eLibrary SPIN: 6849-0483; e-mail: gatteriyagreen@gmail.com

***Голотин Василий Александрович**, канд. биол. наук; адрес: Россия, 199053, Санкт-Петербург, ул. Набережная Макарова, д. 26; ORCID: 0000-0003-0385-2463; eLibrary SPIN: 7198-3170; e-mail: golotin@bk.ru

AUTHORS INFO

Maxim M. Vylka; ORCID: 0000-0001-7583-864X; eLibrary SPIN: 5468-2834; e-mail: vylka.maxim@yandex.ru

Anatoliy A. Lyutikov, Cand. Sci. (Biology); ORCID: 0000-0003-0418-8218; eLibrary SPIN: 9187-6075; e-mail: tokmo@mail.ru

Svetlana A. Diakova, Cand. Sci. (Biology); ORCID: 0000-0001-9970-403X; eLibrary SPIN: 4202-4471; e-mail: dyakova@niorh.vniro.ru

Denis S. Karlov, Cand. Sci. (Biology); ORCID: 0000-0002-9030-8820; eLibrary SPIN: 8355-8091; e-mail: ds.karlov@arriam.ru

Alina A. Zhukova, Cand. Sci. (Biology); eLibrary SPIN: 6849-0483; e-mail: gatteriyagreen@gmail.com

***Vasily A. Golotin**, Cand. Sci. (Biology); address: 26 Makarova emb., Saint Petersburg, 199053, Russia; ORCID: 0000-0003-0385-2463; eLibrary SPIN: 7198-3170; e-mail: golotin@bk.ru