

*На правах рукописи*

**КАШИНСКАЯ**  
**Елена Николаевна**

**РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ЖЕЛУДОЧНО-  
КИШЕЧНОГО ТРАКТА РЫБ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ  
ГРУПП ОЗЕРА ЧАНЫ**

**03.02.08 – экология**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Иркутск – 2016

Работа выполнена в лаборатории патологии насекомых Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
**Глунов Виктор Вячеславович**

Научный консультант: доктор биологических наук,  
**Извекова Галина Игоревна**

Официальные оппоненты: **Воронин Леонид Владимирович**,  
доктор биологических наук,  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова», доцент кафедры ботаники и микробиологии

**Катохин Алексей Вадимович**,  
кандидат биологических наук,  
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»,  
лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов, старший научный сотрудник

Ведущее учреждение: ФГБУН Лимнологический институт СО РАН (г. Иркутск)

Защита диссертации состоится 26 мая 2016 г. в 16:00 на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» по адресу: 666003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Байкальский музей им. профессора М.М. Кожова (ауд. 219).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, бульвар Гагарина, 24, и на сайте ИГУ: <http://isu.ru/ru/science/boards/dissert/dissert.html?id=72>.

Отзывы просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1, биолого-почвенный факультет. Тел./факс: (3952) 241855; e-mail: dissovet07@gmail.com.

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
к.б.н., доцент

Приставка А.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Потребление пищи, обеспечивающее организм энергетическими и пластическими материалами, – одна из важнейших сторон жизнедеятельности различных животных, в том числе рыб (Кузьмина, 2005). Важной составной частью пищеварительной системы являются симбионты (Шивокене, 1989). В процессе коэволюции кишечной микробиоты и организма-хозяина, микробное сообщество стало неотъемлемым и жизненно необходимым компонентом пищеварительного тракта многих беспозвоночных и позвоночных животных, оказывающим значительное воздействие на их биологию (Кузьмина, 2005; Wu et al., 2012). Деятельность микроорганизмов зависит от внутренней среды организма и от абиотических факторов внешней среды – среды обитания животных (Шивокене, 1989). Тип питания, по мнению ряда авторов, существенный экологический фактор, влияющий на качественные (таксономический состав) и количественные параметры кишечной микробиоты рыб (Шивокене, 1989; Tanaka et al., 2004; Ringo et al., 2006; Uchii et al., 2006; Yang et al., 2007; Wu et al. 2011; Sullam et al. 2012). В настоящее время основное внимание при изучении разнообразия кишечной микробиоты рыб сфокусировано на влиянии на ее состав однокомпонентных кормов (Parks et al. 2013). Более того, проводимые исследования в основном касаются рыб, разводимых в аквакультуре (Korsnes et al., 2006; Parks et al., 2013). В естественных условиях обитания рыбы потребляют разнообразную пищу. Остается неясным, какое сочетанное влияние потребляемые компоненты пищи оказывают на кишечную микробиоту рыб, а также зависит ли разнообразие микробиоты от характера потребляемой пищи напрямую.

В литературе существуют противоречивые представления о формировании кишечной микробиоты рыб. С одной стороны, кишечная микробиота рыб наиболее сходна с микробиотой пищи, воды и грунта (Romero et al., 2006; Han et al., 2010). Согласно другим данным, кишечная микробиота рыб отлична от микробиоты, ассоциированной с компонентами окружающей среды (Cahill, 1990; Ringo et al., 1999; Olafsen, 2001; Romero et al., 2006). Таким образом, данный вопрос остается дискуссионным.

**Цель исследования** – изучить специфику формирования микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) рыб разных экологических групп, обитающих в естественных водоемах, на основе выявления связей между бактериальным сообществом водного биотопа, гидробионтами и их кишечными бактериями.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. исследовать спектры питания рыб разных экологических групп, обитающих в оз. Чаны;
2. провести сравнительный анализ методических подходов, используемых для выявления структуры и разнообразия микробных сообществ кишечника рыб и компонентов окружающей среды;
3. изучить особенности состава микробных сообществ пищеварительного тракта рыб с различным типом питания;

4. проследить онтогенетические и сезонные изменения микробиоты в кишечнике рыб;

5. изучить влияние бактериального сообщества воды, грунта и объектов питания рыб на формирование кишечной микробиоты разных видов рыб.

**Научная новизна.** С использованием современных молекулярно-генетических методов в единых методических условиях получены наиболее полные данные о разнообразии кишечной микробиоты пресноводных видов рыб (8 видов). Впервые охарактеризована кишечная микробиота рыб разных экологических групп, обитающих в самом крупном эвтрофном озере Западной Сибири – озере Чаны. Дополнены и расширены сведения об ассоциированной микробиоте водных беспозвоночных (объектов питания рыб). Для некоторых водных беспозвоночных, таких как водные клопы (сем. Notonectidae и Corixidae) и личинки ручейников (отр. Trichoptera), впервые установлены особенности разнообразия их ассоциированной микробиоты. Впервые проведено комплексное изучение, направленное на выявление особенностей формирования микробиоты в кишечнике рыб с разным типом питания при участии ассоциированных бактерий водного биотопа и водных беспозвоночных.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты работы позволили значительно расширить знания о разнообразии кишечной микробиоты у рыб, обитающих в естественных водоемах. Полученные сведения о составе и разнообразии кишечной микробиоты рыб являются первым шагом в определении функциональной активности этих бактерий, и установлении возможного вклада кишечной микробиоты в процессы пищеварения у рыб. Полученные результаты могут быть использованы в курсах лекций по экологии, ихтиологии, гидробиологии и микробиологии. Некоторые из исследованных видов рыб – ценные объекты регионального промысла, поэтому результаты исследования могут быть использованы для улучшения их ростовых и других качественных характеристик. Полученные результаты могут быть рекомендованы для создания пробиотиков для профилактики и лечения заболеваний рыб, разводимых в прудовых хозяйствах.

**Положения, выносимые на защиту:**

1) в кишечнике половозрелых особей рыб формируются две группы микроорганизмов: микробиота слизистой кишечника и микробиота его содержимого;

2) зависимость разнообразия микробиоты от типа питания рыб увеличивается от эври- к стено- и монофагам;

3) в формирование микробиоты содержимого кишечника рыб разных экологических групп наибольший вклад вносит ассоциированная микробиота водного биотопа; в формировании микробиоты слизистой кишечника рыб принимают участие бактерии, ассоциированные как с объектами питания, так и водным биотопом.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов подтверждается использованием современных методов, основанных на анализе

генов 16S рибосомной РНК (rRNA). В диссертации используется обширный материал, собранный и проанализированный по общепринятым методам (Белькова, 2008; Schloss et al., 2009; Caporaso et al., 2010 и др.). Для изучения разнообразия кишечной микробиоты использована репрезентативная выборка – 527 образцов. При анализе материала использованы стандартные статистические методы (ANOSIM, SIMPER, критерий суммы рангов Уилкоксона (Манна-Уитни) для двух независимых выборок, ANOVA) и пакеты программ QIIME1.8.0, Mothur 1.31.2, Explicitet 2.9.4, PAST 1.93, phyloseq, BioEdit. Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК депонированы в базе данных EMBL EBI – European Nucleotide Archive (ENA), и в базе данных NCBI – Sequence Read Archives (SRA).

**Личный вклад автора.** Автор принимал непосредственное участие во всех экспедиционных работах, результаты которых вошли в диссертацию. Все результаты получены лично автором, либо при его непосредственном участии в ходе коллективных работ. По результатам проведенных работ в соавторстве подготовлены статьи в рецензируемых изданиях. Автор принимал непосредственное участие в определении цели и задач диссертации, анализе и обобщении имеющейся литературы по теме, и обсуждении полученных результатов в ходе полевых и лабораторных работ.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на XLVIII и XLIX Международных научных студенческих конференциях студентов и молодых ученых «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2010, 2011 гг.), Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов» (Борок, 2012), VI Всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «СИМБИОЗ-РОССИЯ 2013» (Иркутск, 2013), XI Съезде гидробиологического общества при РАН (Красноярск, 2014), 4-м Байкальском Микробиологическом Симпозиуме с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» (Иркутск, 2015), Международной конференции по аквакультуре (Чеджудо, Южная Корея, 2015), на семинарах лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 13 работ, из них 3 статьи в рецензируемых российских изданиях, входящих в список ВАК и индексируемых в Scopus; 3 статьи в зарубежных журналах, включенные в систему цитирования Web of Science и Scopus, а также 7 работ в материалах конференций.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 157 страницах машинописного текста, состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка литературы, списка сокращений и приложения. Работа иллюстрирована 18 рисунками и 15 таблицами. Список литературы включает 201 работу, из которых 164 на английском языке.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую благодарность д.б.н., проф. В.В. Глупову за руководство научной работой; научному консультанту д.б.н. Г.И. Извековой (Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, п.

Борок, Ярославская область) за ценные замечания и помощь в обсуждении рукописи, к.б.н. М.М. Соловьеву (Институт систематики и экологии животных СО РАН) за помощь при сборе материала и в проведении исследований; к.б.н. Бельковой Н.Л., к.б.н. Сухановой Е.В. (Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск) за помощь при проведении исследований и обсуждение результатов; к.б.н. Е.В. Симонову (Институт систематики и экологии животных СО РАН) за помощь в проведении биоинформационного анализа данных; Karl В. Andree (IRTA-SCR, Сан-Карлос-де-ла-Рапита, Испания) за помощь в обсуждении результатов диссертации; Булгаковой Д.А. (Сибирский федеральный университет, г. Красноярск). Особую благодарность приношу своим родным и близким за моральную и финансовую поддержку.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данной главе проанализирована литература о разнообразии микробиоты пищеварительного тракта морских и пресноводных видов рыб, абиотических и биотических факторах, влияющих на структуру их кишечной микробиоты, а также о функциональной роли микробных сообществ, ассоциированных с желудочно-кишечным трактом рыб. Дана характеристика особенностей биологии рыб оз. Чаны, и физико-географическая характеристика района исследования.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сбор материала проводили на территории эстуарной части озера Малые Чаны – нижнее течение р. Каргат (Новосибирская область, Россия, 54°37' N, 78°09' E), с 2011 по 2012 г. Молодь рыб отлавливали мальковым бреднем (размер ячеи 6 мм); половозрелых особей – жаберными сетями (№45, 55, 65). Личинок рыб отлавливали сачком из мельничного газа.

Для сравнения состава кишечной микробиоты в работе использовали 227 особей 8 видов рыб: серебряный карась *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758), золотой карась *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758), сазан *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1759), плотва *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758), елец *Leuciscus leuciscus* (Linnaeus, 1758), язь *Leuciscus idus* (Linnaeus, 1758), окунь *Perca fluviatilis* (Linnaeus, 1758), судак *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758).

Вскрытие рыб проводили в асептических условиях. Отбор бактериального материала из воды (от 30 до 100 мл, n=9), грунта (5 г, n=8), тростника (соскобы, n=6) и объектов питания рыб (гребляк, n=3; гаммарус, n=1; дафния, n=9; личинка хирономиды, n=8; гладыш, n=2; личинка ручейника, n=2) проводили согласно методике, описанной ранее (Белькова, 2008). Выбор компонентов питания основывали на анализе спектра питания рыб. Беспозвоночные и их личинки собраны согласно общепринятым методикам (Руководство..., 1992).

Для выделения тотальной ДНК исследуемые образцы фиксировали в лизирующем растворе коммерческого набора на сорбентах – ДНК-сорб В (МФГУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия).

Для групп-специфичной ПЦР использовали 11 пар праймеров, комплиментарных фрагменту гена 16S рРНК на основные филогенетические группы бактерий: Proteobacteria (классы  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -), Firmicutes, Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Spirochaetes, Euryarchaeota (Manz et al., 1992; Nubel et al. 1997; Ashelford et al., 2002; Muhling et al., 2008).

Клонирование фрагмента рибосомного гена малой субъединицы 16S рРНК проводили по стандартным методикам (Белькова, 2008) с использованием коммерческого набора для клонирования CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania). Нуклеотидную последовательность рекомбинантных клонов определяли с использованием набора Big Dye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem, США) и автоматического секвенатора ABI Prism Genetic Analyzer 3730XL (Applied Biosystem, США, Hitachi, Япония). Редактирование последовательностей, полученных после секвенирования по Сэнгеру, проводили с помощью редактора BioEdit. Последовательности анализировали с использованием программы BLAST сервера NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Для приготовления суммарных образцов ДНК для метагеномного секвенирования использовали эквимоллярные концентрации ДНК каждого образца. Секвенирование гипервариабельных участков V3, V4 гена 16S рРНК проводили на платформе «Illumina» с набором реагентов MiSeq 500-cycle PE kit в приборном центре коллективного пользования СО РАН «Геномика» (Новосибирск, Россия). Биоинформационный анализ полученных данных, расчет коэффициентов разнообразия (Шеннон (H) и Симпсон) проводили с помощью программного обеспечения QIIME 1.8.0 по ранее описанным методам (Schloss et al., 2009; Caporaso et al., 2010).

Для подсчета индекса Брея-Кёртиса ( $D_{B-C}$ ) и критерия Манна-Уитни для двух независимых выборок использовали программу Explicit 2.9.4 (Robertson et al., 2013). Кластерный анализ с использованием алгоритма невзвешенного попарного среднего (UPGMA) проводили в программе PAST 1.93 (Hammer et al. 2001). В той же программе проводили однофакторный ANOSIM (анализ сходства), процедуру SIMPER, построение кривых разрежения сообщества и подсчет индекса Мористы-Хорна ( $D_{M-H}$ ). Неметрическое многомерное шкалирование (NMDS) проводили с использованием программы phyloseq (McMurdie et al., 2013). Частоту встречаемости пищевых компонентов рассчитывали по методике, описанной ранее (Коган, 1969). Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК депонированы в базе данных EMBL EBI – European Nucleotide Archive (ENA): LN828742-LN828921, и в базе данных NCBI – Sequence Read Archives (SRA): SRP056565, SRP065371, SRP065460, SRP065458, SRP065250, SRP065362, SRP056759.

Для определения таксономической принадлежности пресноводных беспозвоночных использовали стандартные определители (Определитель...,

1977; Определитель..., 1995). Для анализа питания рыб разных экологических групп в оз. Чаны исследован 251 образец желудочно-кишечного тракта. Определяемые объекты питания относились к следующим таксономическим категориям:

тип Artropoda, кл. Crustacea: представители сем. Chydoridae, хидориды; Daphniidae, дафниевые; Cercopagidae, битотрефы (битотрефесы); отр. Ostracoda, ракушковые ракообразные, отр. Amphipoda, сем. Gammaridae, род Gammarus (Fabricius, 1775); кл. Insecta: представители отр. Ephemeroptera, поденки; Odonata, стрекозы; Trichoptera, ручейники; Diptera, двукрылые, сем. Chironomidae; Hemiptera, сем. Notonectidae, сем. Corixidae;

тип Mollusca, кл. Gastropoda: сем. Lymneidae, Bulinidae, Bithyniidae;

тип Annelida, кл. Oligochaeta; Hirudinea;

тип Vertebrata, кл. Osteichthyes: сем. Cyprinidae, серебряный карась *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758), плотва *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758);

отдел Embryophyta, подсем. Arundinoideae, тростник обыкновенный *Phragmites australis* (Cav.).

### ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ ПИТАНИЯ РЫБ ОЗ. ЧАНЫ

В спектре питания сазана, серебряного и золотого карася доминировали детрит (37.0, 31.6 и 37.5%, соответственно), личинки и куколки хирономид (23.3, 14.0 и 12.5%, соответственно) (рис. 1). В питании плотвы, ельца и язя значительную долю составляли битотрефесы (18.1, 38.3 и 52.6%, соответственно), у окуня и судака – молодь карповых видов рыб (33.3 и 85.7%, соответственно). Личинки стрекоз, гаммарус и пиявки (2.2, 8.0 и 2.2%, соответственно) отмечены только у окуня; яйца дафний и фитопланктон (7.0 и 1.7%, соответственно) – только у серебряного карася.

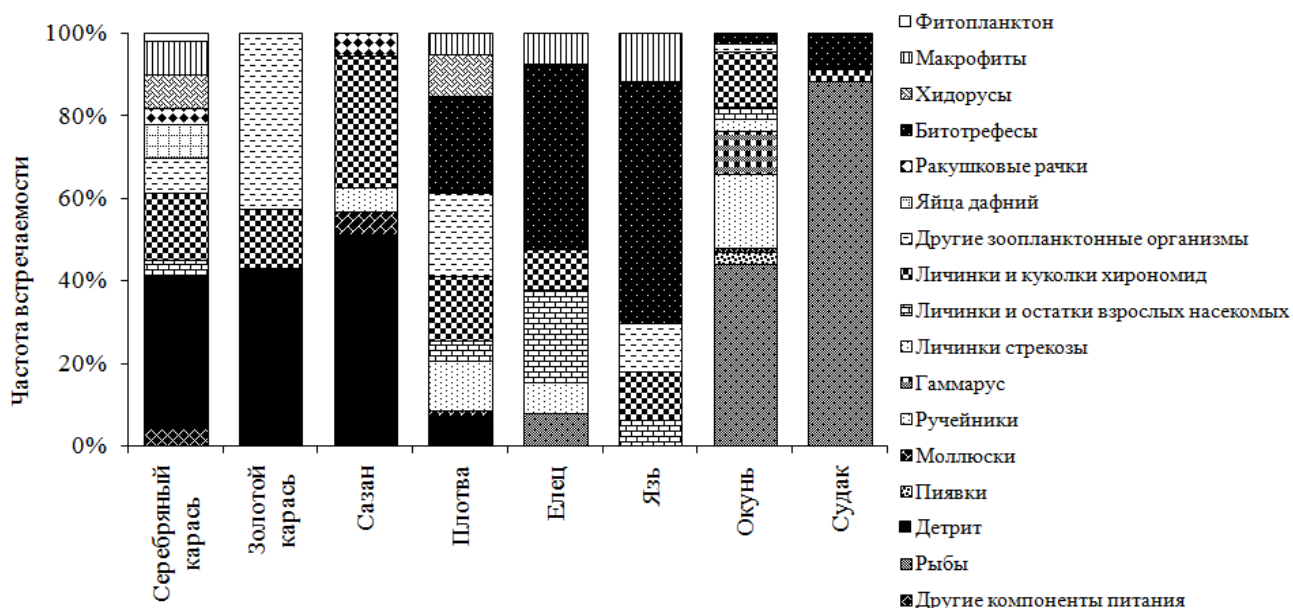


Рисунок 1. Спектр питания рыб разных экологических групп в оз. Чаны (июнь-июль 2012).

На основании расчетов индекса сходства Мористы-Хорна, все исследуемые виды рыб можно разделить на 3 группы: 1) серебряный карась, золотой карась и сазан ( $0.7 < D_{M-H} < 0.85$ ); 2) плотва, елец и язь ( $0.66 < D_{M-H} < 0.89$ ); 3) окунь и судак ( $D_{M-H} = 0.75$ ) (табл. 1).

**Таблица 1.**

Степень сходства спектра питания рыб разных экологических групп по индексу Мористы-Хорна

Вид рыб	Серебряный карась	Золотой карась	Сазан	Плотва	Елец	Язь	Окунь	Судак
Серебряный карась	1.00	0.74	0.85	0.47	0.13	0.14	0.11	0.01
Золотой карась		1.00	0.70	0.51	0.04	0.17	0.08	0.01
Сазан			1.00	0.35	0.11	0.10	0.17	0.02
Плотва				1.00	0.66	0.69	0.27	0.05
Елец					1.00	0.89	0.29	0.20
Язь						1.00	0.11	0.09
Окунь							1.00	0.75
Судак								1.00

На примере серебряного карася и окуня было показано, что в их питании доля зоопланктонных и бентосных организмов с апреля по май снижалась. В целом, в течение сезона в питании серебряного карася увеличивается доля детрита и фитопланктона, в питании окуня – молодь рыб, личинки и куколки хирономид, максимальное обилие которых наблюдали в августе.

Принятое разделение рыб по типу питания и по предпочитаемым кормовым объектам весьма условно, поскольку рыбы могут питаться смешанной пищей, и часто животоядные рыбы могут становиться хищными и наоборот (Никольский, 1954). Как было показано ранее, для некоторых рыб оз. Чаны также характерен смешанный тип питания с преобладанием того или иного излюбленного вида корма.

По типу питания рыб оз. Чаны условно можно разделить на хищных (окунь и судак) и «мирных» рыб (серебряный карась, золотой карась, сазан, плотва, елец, язь). По характеру потребляемого корма – на всеядных или эврифагов (серебряный карась, золотой карась и сазан), планктофагов-бентофагов (плотва, елец, язь), ихтиофага – факультативного бентофага (окунь) и типичного ихтиофага (судак).

## ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА (НА ПРИМЕРЕ СЕРЕБРЯНОГО КАРАСЯ *CARASSIUS AURATUS* И КОМПОНЕНТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ)

### 4.1. Групп-специфичная ПЦР

По результатам групп-специфичной ПЦР общими таксонами бактерий для слизистой, содержимого кишечника серебряного карася, воды, грунта и личинок хирономид выступали Gammaproteobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria и Verrucomicrobia. Количество идентифицированных филумов для каждого образца варьировало: в слизистой кишечника выявлено 6 филумов; в содержимом кишечника – 9; в личинках хирономид – 6; в воде -7; в грунте – 6.

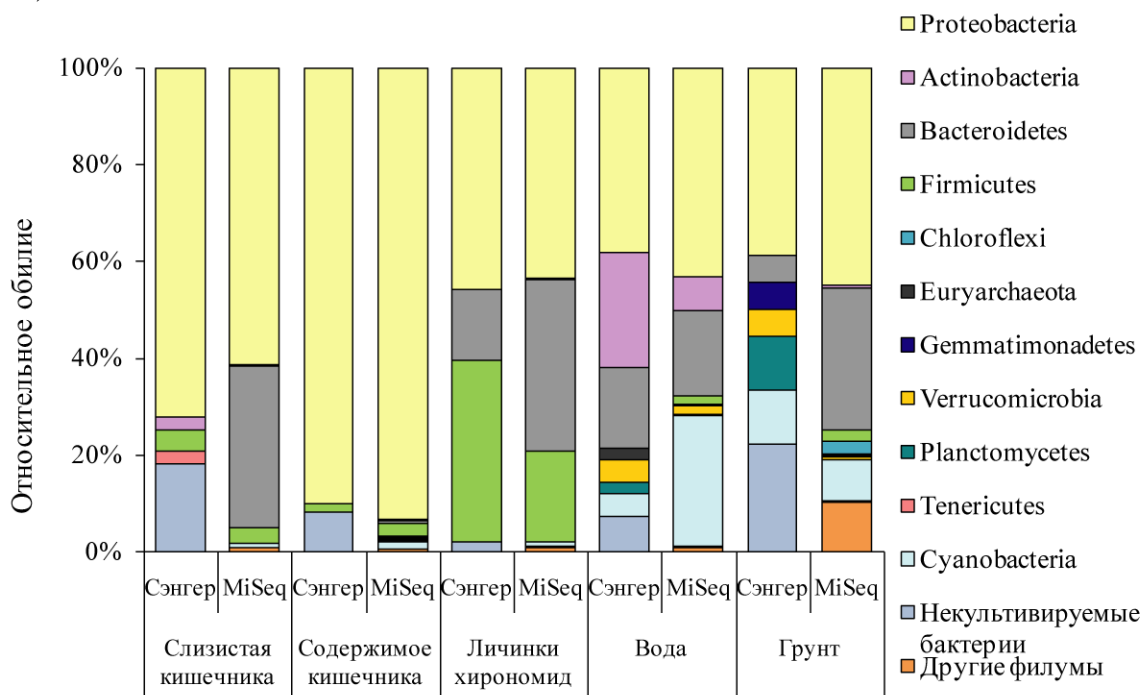
### 4.2. Секвенирование по Сэнгеру

С помощью секвенирования по Сэнгеру идентифицировано 154 операционных таксообразующих единиц (ОТЕ), которые относились к 10-ти филумам эубактерий и 1-у филуму архей (рис. 2).

### 4.3. Метагеномное секвенирование

С помощью метагеномного секвенирования идентифицировано 2933 ОТЕ, которые относились к 18-и филумам эубактерий, 2-м филумам архей и 4-м «фантомным» группам.

По результатам секвенирования по Сэнгеру и метагеномному секвенированию среди идентифицированных ОТЕ доминирующее положение составили Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria и Cyanobacteria (рис. 2).



**Рисунок 2.** Состав кишечного микробного сообщества серебряного карася и компонентов окружающей среды (секвенирование по Сэнгеру и метагеномное секвенирование).

#### 4.4. Разнообразие микробных сообществ, исследованное с помощью различных молекулярно-генетических методов

Для всех сообществ отмечен высокий индекс разнообразия Шеннона, величина которого варьировала от 2.94 – 3.54 (секвенирование по Сэнгеру) до 2.43 – 6.11 (метагеномное секвенирование). Индекс Симпсона для разных образцов также варьировал от 0.94–0.97 при секвенировании по Сэнгеру и до 0.75–0.99 при метагеномном секвенировании (табл. 2).

**Таблица 2.**

Характеристика разнообразия микробных сообществ кишечника серебряного карася и компонентов окружающей среды

Образец	Количество клонов/ прочтений	Количество ОТЕ	Индексы разнообразия		Количество филумов
			Шеннон	Симпсон	
Секвенирование по Сэнгеру/метагеномное секвенирование					
Слизистая кишечника	76/10565	44/152	3.39/2.43	0.94/0.85	4/7
Содержимое кишечника	52/7440	29/498	3.06/2.51	0.94/0.75	2/13
Личинки хирономид	48/5834	26/187	3.09/2.97	0.94/0.90	3/6
Вода	42/6096	37/589	3.54/3.95	0.97/0.93	7/13
Грунт	18/4991	18/1507	2.94/6.11	0.95/0.99	6/20

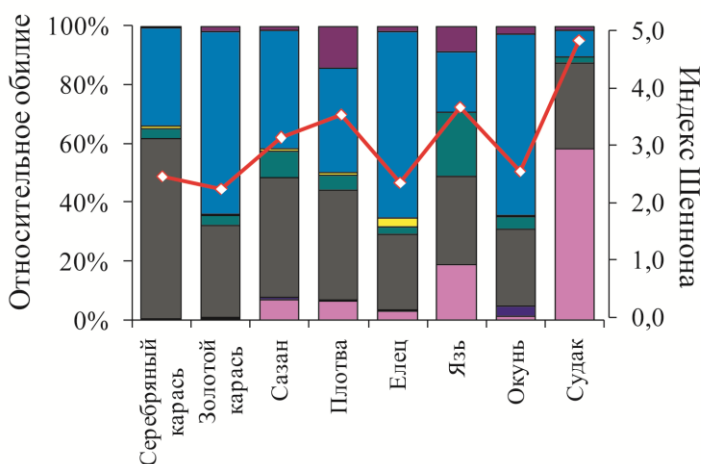
По результатам разных методов показано, что наибольшее разнообразие микробных сообществ получено с помощью метагеномного секвенирования. В кишечнике серебряного карася археи *Crenarchaeota* и эубактерии *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Chlamydiae*, *Deferribacteres*, *Deinococcus-Thermus*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Nitrospira*, класс *Epsilonproteobacteria*, и представители «фантомных» филумов (OD1, SR1, TM7, WS3) выявлены только с помощью метагеномного секвенирования. Филум *Tenericutes* идентифицирован в слизистой кишечника серебряного карася только с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Использование в комплексе всех методов позволяет получить более представительные данные о структуре микробных сообществ. Согласно результатам проведенных нами исследований при выборе метода секвенирования предпочтительнее всего использовать метагеномное секвенирование по сравнению с секвенированием по Сэнгеру и групп-специфичной ПЦР.

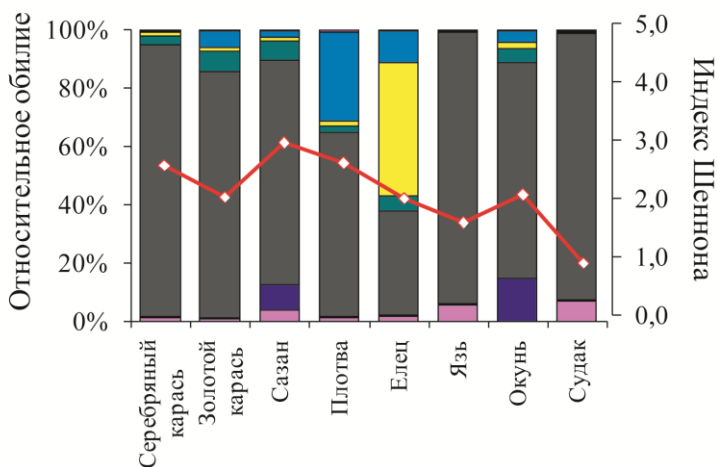
## ГЛАВА 5. РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБИОТЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ РАЗНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП ОЗ. ЧАНЫ

### 5.1. Разнообразие микробиоты слизистой и содержимого кишечника половозрелых особей рыб с разным типом питания

По результатам метагеномного секвенирования в слизистой и содержимом кишечника 8 видов рыб идентифицировано 5434 ОТЕ, которые относились к 16-ти известным филумам эубактерий, 2-м филумам архей и 1-ой «фантомной» группе бактерий. Среди идентифицированных ОТЕ доминирующее положение составили Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria и Cyanobacteria. Однако при разделении и сравнении микробиоты слизистой кишечника и микробиоты его содержимого относительное обилие этих доминантов сильно различалось (рис. 3 и 4). Так, в слизистой кишечника окуня, ельца и золотого карася доминировали Bacteroidetes (61.2, 63.3 и 62.0%, соответственно), а в содержимом кишечника всех видов рыб, напротив, доминировали Proteobacteria (от 62.8 до 93.6%), за исключением ельца, в содержимом кишечника которого 45.9% от общего разнообразия составили Cyanobacteria.



**Рисунок 3.** Доминирующие группы бактерий (на уровне филума) в составе микробного сообщества слизистой кишечника рыб оз. Чаны с разным типом питания. (■) Actinobacteria; (■) Bacteroidetes; (■) Cyanobacteria; (■) Firmicutes; (■) Proteobacteria; (■) Fusobacteria; (■) Tenericutes; (■) другие филумы. (—◇—) индекс разнообразия микробных сообществ по Шеннону.



**Рисунок 4.** Доминирующие группы бактерий (на уровне филума) в составе микробного сообщества содержимого кишечника рыб оз. Чаны с разным типом питания. (■) Actinobacteria; (■) Bacteroidetes; (■) Cyanobacteria; (■) Firmicutes; (■) Proteobacteria; (■) Fusobacteria; (■) другие филумы. (—◇—) индекс разнообразия микробных сообществ по Шеннону.

На более низком таксономическом уровне из числа 10-ти самых многочисленных ОТЕ в слизистой кишечника серебряного, золотого карасей,

сазана, ельца и окуня, наибольшее обилие составили п. Sphingobacteriales и сем. Flexibacteriaceae, в меньшей степени представлены р. *Sphingomonas* и *Caulobacter*. В содержимом кишечника тех же видов рыб, напротив, доминировали р. *Aeromonas*, *Vibrio* и сем. Chlorarachniophyceae. В слизистой и содержимом кишечника язя и судака доминировали р. *Terrimonas* и *Plesiomonas*. В кишечнике язя и судака выявлены уникальные таксоны бактерий (р. *Succinivibrio* и сем. Bifidobacteriaceae), не характерные для других видов рыб. По результатам дисперсионного анализа показано, что микробное сообщество слизистой кишечника,  $H=3.09\pm 0.27$ , всех видов рыб достоверно разнообразнее, чем содержимого,  $H=2.08\pm 0.27$  (однофакторный ANOVA,  $F=6.713$ ,  $p=0.021$ ). Среди исследуемых видов рыб наибольшее разнообразие микробного сообщества отмечено для слизистой кишечника судака ( $H=4.83$ ), в то время как для его содержимого, наоборот, получено наименьшее разнообразие ( $H=0.78$ ).

## 5.2. Степень сходства микробиоты слизистой и содержимого кишечника половозрелых особей рыб с разным типом питания

Результаты кластеризации и неметрическое многомерное шкалирование показали разделение кишечной микробиоты рыб на несколько групп: 1) микробиота слизистой кишечника рыб (за исключением плотвы, ельца, язя и судака); 2) микробиота содержимого кишечника рыб (за исключением плотвы, язя и судака); 3) микробиота слизистой и содержимого кишечника язя и судака (рис. 5 и 6). Статистическая достоверность различий выделенных групп подтверждена тестом ANOSIM (анализ сходства). При общем и попарном сходстве этих 3-х групп получено, что глобальная R-статистика равняется 0.744 (при  $p=0.001$ ), попарные значения составляют:  $R=0.4667$  ( $p=0.03$ ) при сравнении микробиоты слизистой и содержимого кишечника между собой;  $R=0.9643$  ( $p=0.02$ ) и  $R=0.996$  ( $p=0.02$ ) при сравнении третьей группы с первой и второй, соответственно. Наибольший вклад в различие микробиоты по тесту SIMPER и критерию Манна-Уитни при сравнении слизистой и содержимого кишечника между собой вносили ОТЕ Sphingobacteriales (12.56%,  $p=0.013$ ) и Flexibacteraceae (9.639%,  $p=0.008$ ); при попарном сравнении третьей группы с первой и второй – Sphingobacteriales и *Plesiomonas* (21.25%,  $p=0.014$  и 6.139%,  $p=0.014$ , соответственно).

Анализ сходства кишечной микробиоты рыб внутри каждой группы (слизистая и содержимое кишечника) по Брею-Кёртису показал, что рыбы группируются вне зависимости от типа питания. В слизистой кишечника рыб оз. Чаны наибольшее сходство по составу микробиоты выявлено для рыб разных экологических групп – всеядных сазана и золотого карася, планктофага-бентофага ельца и ихтиофага – факультативного бентофага окуня ( $0.31 < D_{B-C} < 0.58$ ), а в содержимом кишечника – только между всеядным золотым карасем и сазаном ( $D_{B-C} = 0.40$ ). Наименьшее сходство микробиоты установлено для слизистой и содержимого кишечника судака и язя по сравнению микробиотой других видов рыб ( $0.73 < D_{B-C} < 0.99$ ). Спектры питания этих рыб различались: в питании золотого карася и сазана в большом количестве присутствовал детрит

и зоопланктон; в питании ельца – битотрефесы; у окуня – в большом количестве молодь рыб и бентосные организмы. Спектр питания судака из оз. Чаны в большей степени состоял из молоди рыб (85.7%) и по типу питания он является типичным ихтиофагом; предпочитаемым видом корма для язя выступали битотрефесы (52.6 % от всего рациона). Есть сведения, что в желудках взрослого язя можно встретить молодь своего и других видов рыб (Попов и др., 2005). Однако наличие молоди рыб в пищевом комке язя из оз. Чаны не было зарегистрировано. Стоит отметить, что разнообразие потребляемых объектов питания для язя и судака не столь велико по сравнению с другими видами рыб. Как было показано ранее, для золотого карася, сазана, ельца и окуня в питании присутствовали самые разнообразные компоненты. На основании вышесказанного можно предположить, что предполагаемая зависимость разнообразия микробиоты от типа питания сильнее выражена у рыб, для которых характерно потребление небольшого количества кормов, с преобладанием излюбленного вида корма (составляющего 50% и более от всего рациона). Полученные нами данные о составе кишечных бактерий у рыб разных экологических групп оз. Чаны показывают, что зависимость разнообразия микробиоты от типа питания рыб увеличивается от эври- к стено- и монофагам.

### **5.3. Онтогенетические и сезонные изменения кишечной микробиоты серебряного карася и окуня**

Для качественной идентификации наиболее распространенных групп бактерий в слизи и содержимом кишечника серебряного карася и окуня на разных этапах онтогенеза выбрано 7 филумов бактерий и 1 филум архей. Для всех особей рыб определены этапы развития в соответствии с предложенными А.П. Петлиной и В.И. Романовым (2004). Выделены 5 размерно-возрастных групп: 0-10 мм (этапы A<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> – предличинки, ранние личинки), 10-30 (этапы D<sub>2</sub>, E, F – поздние личинки, ранние мальки), 30-60 мм (этап F – мальки), 60-80 мм (этап G – сеголетки), 80-100 мм (этап G – сеголетки).

В работе использованы 52 особи серебряного карася (размерная группа 0-10 мм – 21; 10-30 мм – 29; 80-100 мм – 2 особи) и 32 особи окуня (размерная группа 10-30 мм – 16; 30-60 мм – 6; 60-80 мм – 8 и 80-100 мм – 2 особи). С помощью групп-специфичной ПЦР представители класса Alphaproteobacteria в слизи и содержимом кишечника серебряного карася в размерной группе от 0 до 100 мм не обнаружены; бактерии филума Eucarchaeota обнаружены только начиная с этапа 10-30 мм. В кишечнике окуня представители класса Alphaproteobacteria и филум Verrucomicrobia зарегистрированы только с этапа 30-60 мм.

Изучение сезонного изменения микробиоты рыб, исследованное с помощью метагеномного секвенирования показало, что в содержимом кишечника окуня и карася, с апреля по июль относительное обилие Proteobacteria увеличивалось, а Bacteroidetes, наоборот, – снижалось. Сезонные изменения разнообразия кишечных бактерий серебряного карася и окуня в оз. Чаны, по-видимому, связаны с интенсивностью питания рыб. Так, наибольшее

разнообразии потребляемых объектов питания в пищевом комке исследованных видов рыб зарегистрировано в весенние и осенние месяцы.

## ГЛАВА 6. МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С КОМПОНЕНТАМИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ОБЪЕКТАМИ ПИТАНИЯ РЫБ

### 6.1. Микробиота природной воды, тростника, грунта и водных беспозвоночных

По результатам метагеномного секвенирования проанализировано 10451 ОТЕ, которые отнесены к 20-ти известным филумам эубактерий, 2-м филумам архей и 7-ми «фантомным» группам. Среди идентифицированных групп бактерий доминирующее положение для всех исследуемых образцов составляли филумы Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Actinobacteria и Firmicutes (рис. 7). Обилие остальных групп не превышало 5%. При этом, археи Crenarchaeota и эубактерии Chlorobi, Deferribacteres и Lentisphaerae обнаружены только в образцах грунта; Fibrobacteres и «фантомные» филумы OP10, OP11 и BCR1 – только в грунте и в образцах тростника; а WS3 – только в воде и грунте. Филумы Acidobacteria и Chlamydiae выявлены только у гребляка, Chloroflexi – только у личинок хирономид и гаммаруса, Fibrobacteres – только у дафний и Planctomycetes – только у гладыша.

На более низком таксономическом уровне из 10-ти самых многочисленных ОТЕ в микробиоте, ассоциированной с компонентами питания рыб, доминировали Flexibacteriaceae (Bacteroidetes), Sphingobacteriales (Bacteroidetes) и *Caulobacter* (Proteobacteria). В меньшей степени были представлены *Sphingomonas* (Proteobacteria) и *Alkalnindiges* (Proteobacteria). В ассоциированной микробиоте объектов питания рыб обнаружены уникальные таксоны бактерий, не встречающиеся в других образцах. Рр. *Wolbachia* (Proteobacteria) и *Leminorella* (Proteobacteria) обнаружены в ассоциированной микробиоте только у гребляка и гаммаруса. Сем. Chlorarachniophyceae (Cyanobacteria) выделено преимущественно у дафний (37.1%), для остальных образцов его доля не превышала 2%. В ассоциированной микробиоте воды, тростника и грунта доминировали пор. Sphingobacteriales (Bacteroidetes), р. *Bacillariophyta* (Cyanobacteria) и Flexibacteriaceae (Bacteroidetes).

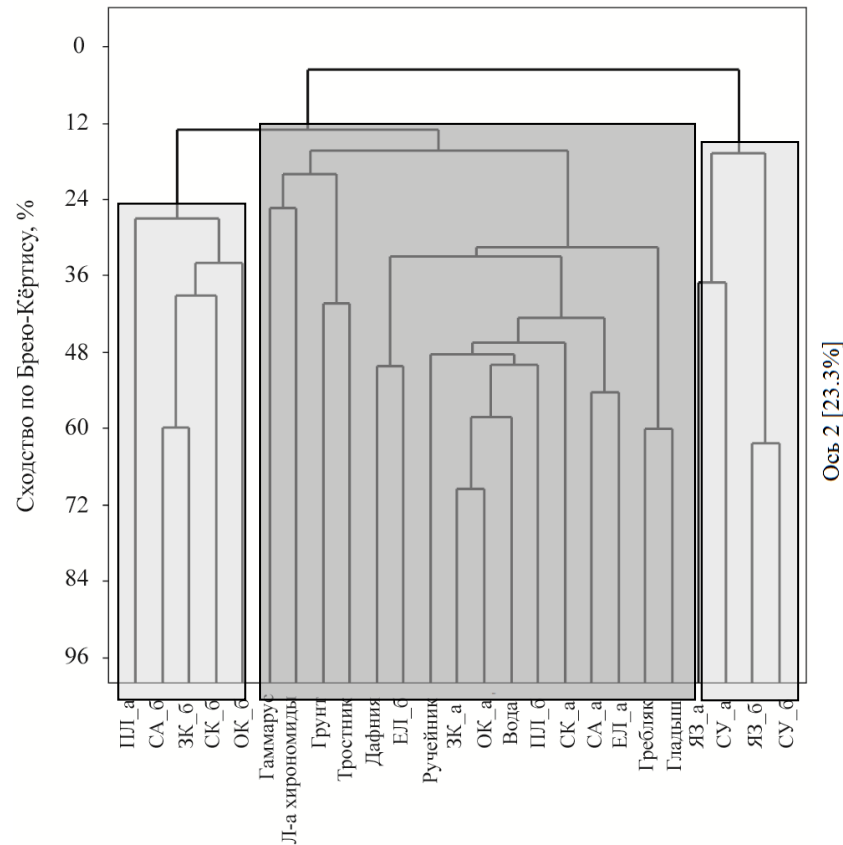
Для ассоциированной микробиоты воды, тростника и грунта установлены сезонные изменения разнообразия бактерий. Наибольшее разнообразие микробных сообществ, ассоциированных с водой, грунтом и тростником зарегистрировано в летние месяцы ( $3.9 < H < 5.9$ ). Микробное сообщество воды менее разнообразно, чем таковое тростника и грунта. Индекс разнообразия по Шеннону для воды варьировал от 2.5 до 3.9, с максимум разнообразия в августе ( $H=5.5$ ). Для микробиоты, ассоциированной с объектами питания, выявлено меньшее разнообразие бактерий по сравнению с компонентами окружающей среды ( $2.8 < H < 4.5$ ).

## **6.2. Степень сходства кишечного микробного сообщества и микробиоты, ассоциированной с компонентами окружающей среды**

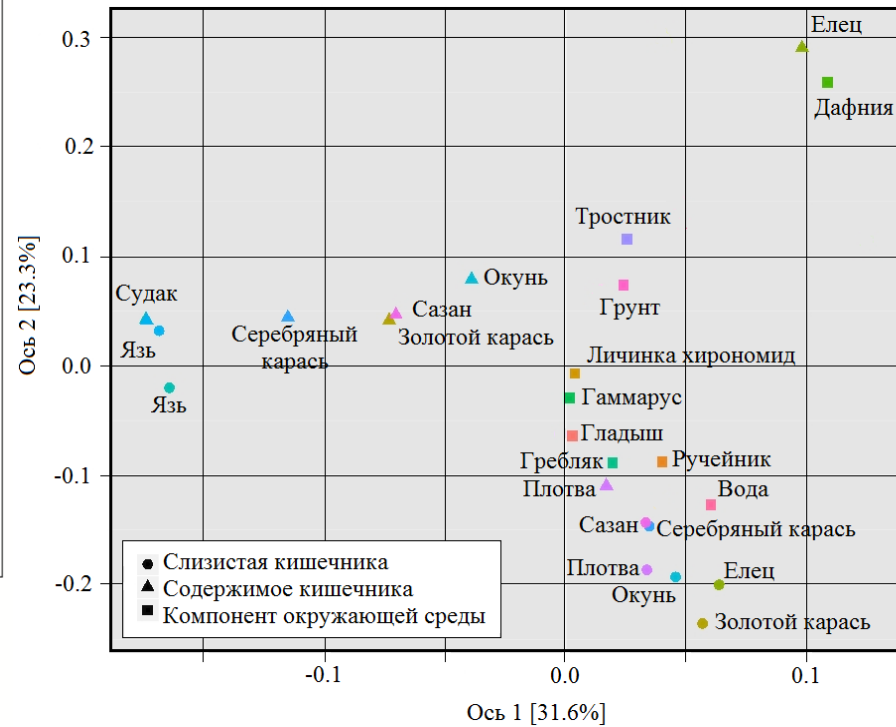
Результаты кластеризации показали, что на уровне сходства примерно 14 и 18% кишечная микробиота рыб разделяется на два кластера. Первый кластер включает микробиоту слизистой и содержимого кишечника рыб (кроме язя и судака), ассоциированную микробиоту объектов питания рыб и компонентов окружающей среды. Во второй кластер группируется микробиота слизистой и содержимого кишечника язя и судака. В свою очередь, на уровне сходства 28 и 18% первый кластер разбивается еще на 2 подкластера, тем самым разделяя микробиоту содержимого кишечника и микробиоту слизистой кишечника с ассоциированной микробиотой. (рис. 5).

Неметрическое многомерное шкалирование также показало разделение микробных сообществ на несколько групп: 1) микробиота слизистой кишечника (за исключением плотвы, ельца, язя и судака) и ассоциированная микробиота окружающей среды; 2) микробиота содержимого кишечника (за исключением плотвы, язя и судака); 3) микробиота слизистой и содержимого кишечника язя и судака (рис. 6).

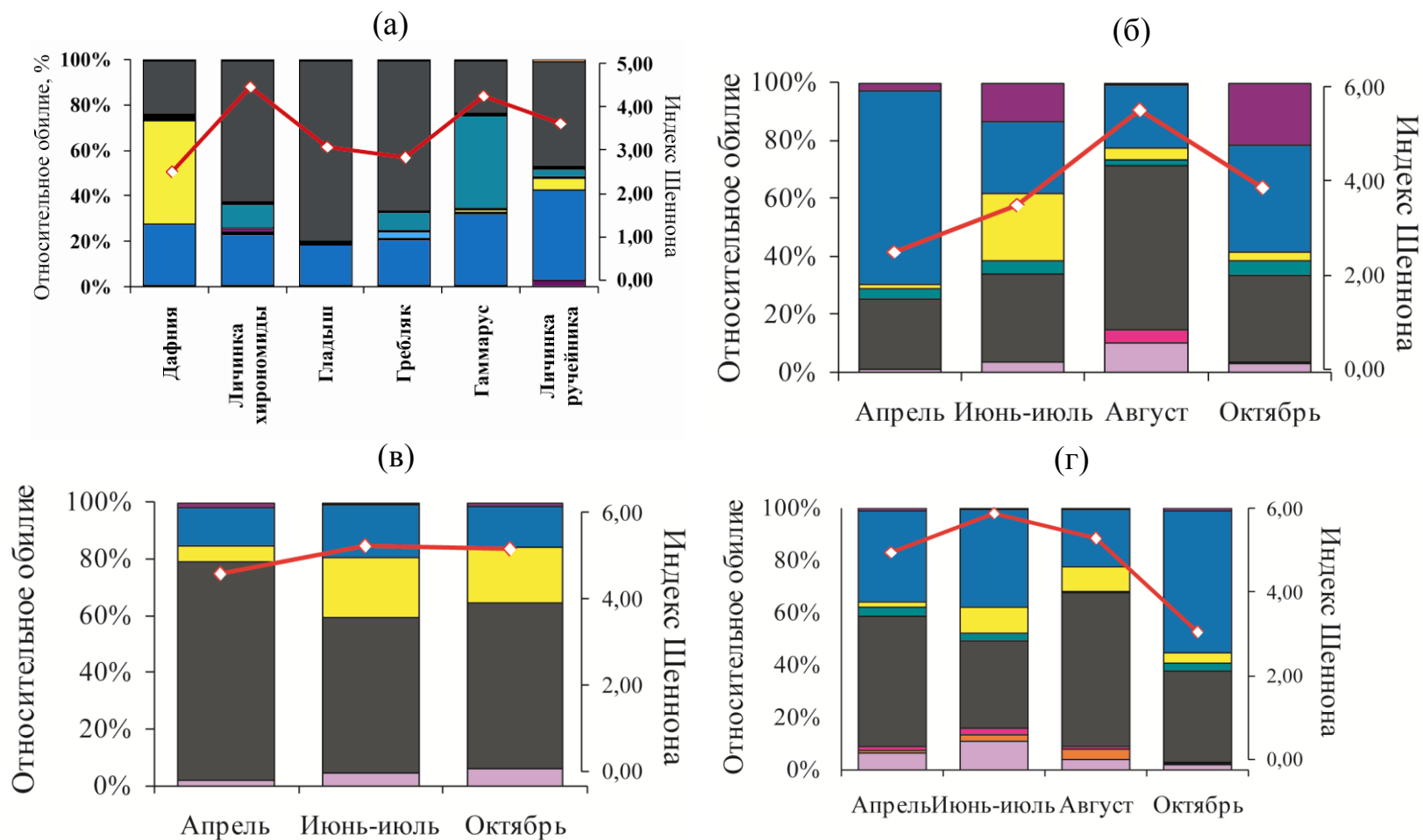
Для проверки степени сходства микробиоты слизистой и содержимого кишечника рыб с ассоциированной микробиотой окружающей среды и микробиотой язя и судака, а также выявления достоверных различий между ними использовали тест ANOSIM (анализ сходства). При общем анализе средних значений ранговых сходств получено, что глобальная R-статистика равняется 0.6384 (при  $p=0.001$ ). Однако при анализе попарных значений между группами, достоверное различие было получено при сравнении микробиоты содержимого кишечника с микробиотой объектов питания, а также микробиоты язя и судака с микробиотой объектов питания,  $R=0.7185$  ( $p=0.04995$ ) и  $R=0.9967$  ( $p=0.02997$ ), соответственно. Остальные группы достоверно не отличались. По результатам расчетов индекса Брея-Кёртиса показано, что микробиота слизистой кишечника наиболее сходна с микробиотой воды и личинок ручейников. Микробиота содержимого кишечника, напротив, менее всего сходна с ассоциированной микробиотой, только содержимое кишечника язя на 50% сходно с микробиотой дафний.



**Рисунок 5.** Дендрограмма сходства (по коэффициенту Брью-Кёртиса) микробных сообществ рыб с разным типом питания, объектов питания рыб и компонентов окружающей среды. ЯЗ – язь, СУ – судак, СК – серебряный карась, Пл – плотва, ЕЛ – елец, ЗК – золотой карась, ОК – окунь, СА – сазан; \_а – слизистая кишечника, \_б – содержимое кишечника.



**Рисунок 6.** Многомерное шкалирование микробных сообществ рыб с разным типом питания и микробных сообществ компонентов окружающей среды.



**Рисунок 7.** Доминирующие группы бактерий (на уровне филума) в составе микробного сообщества, ассоциированного с компонентами окружающей среды и объектами питания рыб. (а) объекты питания рыб; (б) вода; (в) тростник; (г) грунт. (■) Actinobacteria; (■) Bacteroidetes; (■) Cyanobacteria; (■) Firmicutes; (■) Proteobacteria; (■) Tenericutes; (■) Chloroflexi; (■) другие филумы. (—) индекс разнообразия микробных сообществ по Шеннону.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе было проведено изучение разнообразия микробных сообществ у рыб с различным типом питания в естественных условиях их обитания. Для корректной оценки разнообразия микроорганизмов в работе использовались различные молекулярно-генетические методы (групп-специфичная ПЦР, клонирование и высокопроизводительное секвенирование 16S rDNA). Применяемые подходы показали существенные различия по составу кишечной микробиоты рыб и компонентов окружающей среды. Полученные результаты демонстрируют, что комплексное использование различных молекулярно-генетических методов позволяет получить наибольшее разнообразие микробных сообществ. В составе кишечной микробиоты рыб оз. Чаны разных экологических групп доминировали филумы *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Cyanobacteria*.

По результатам метагеномного секвенирования показано, что в кишечнике половозрелых особей рыб оз. Чаны формируются две группы микроорганизмов: микробиота слизистой кишечника и микробиота его содержимого. Показано, что для каждой из изученных групп предполагаемая зависимость разнообразия бактерий от типа питания неоднозначна. С одной стороны, установлено, что в слизистой кишечника рыб оз. Чаны наибольшее сходство по составу микробиоты выявлено для рыб разных экологических групп – всеядных сазана и золотого карася, планктофага-бентофага ельца и ихтиофага-факультативного бентофага окуня, а в содержимом кишечника – только между всеядным золотым карасем и сазаном. Спектры питания этих рыб различались. С другой стороны, по нашим данным в слизистой и в содержимом кишечника для судака и язя выявлено наименьшее сходство в составе микробиоты по сравнению с другими видами рыб. Полученные нами данные о составе кишечных бактерий у рыб оз. Чаны показывают, что зависимость разнообразия микробиоты от типа питания увеличивается от эври- к стено- и монофагам.

На примере серебряного карася и окуня продемонстрировано, что возраст рыб также является важным фактором, определяющим состав микробиоты. С возрастом рыб численность и состав различных групп бактерий изменяется. Специфика формирования кишечной микробиоты окуня проявляется на более ранних этапах онтогенеза по сравнению с серебряным карасем. Колонизация кишечника серебряного карася бактериями филума *Euararchaeota* начинается на этапе размерной группы 10-30 мм, а в кишечнике окуня *Alphaproteobacteria* и *Verrucomicrobia* – на этапе 30-60 мм. Сезонные изменения разнообразия кишечных бактерий серебряного карася и окуня в оз. Чаны связаны с интенсивностью питания рыб.

Полученные нами данные об ассоциированной микробиоте объектов питания подтверждают сложившиеся представления о неразрывной связи гидробионтов со средой их обитания. В формировании кишечной микробиоты рыб разных экологических групп эустарной части оз. М. Чаны наибольшую роль составили личинки ручейников и микробиота воды. Тесная связь кишечных бактерий со средой обитания показана и для другого трофического

уровня. Нами установлено, что микробиота личинок ручейников наиболее сходна с микробиотой воды и тростника.

Таким образом, полученные данные о разнообразии кишечной микробиоты рыб с различным типом питания, а также микробиоты, ассоциированной с объектами питания и средой обитания, подтверждают и во многом дополняют сведения о мутуалистических взаимоотношениях между микроорганизмами и их хозяевами-гидробионтами. Кишечная микробиота гидробионтов неразрывно связана со средой их обитания. Бактерии, ассоциированные с пищевыми объектами и попавшие вместе с водой при питании, способны по пищевым цепям включаться в процессы пищеварения, а также способствовать формированию кишечного микробного сообщества этих гидробионтов.

## ВЫВОДЫ

1) Преобладающими компонентами пищи всеядных видов рыб оз. Чаны (серебряный и золотой караси, сазан) является детрит, личинки и куколки хирономид; для планкто-бентофагов (плотва, елец, язь) – битотрефесы, личинки и куколки хирономид и остатки взрослых насекомых; ихтиофага-факультативного бентофага (окунь) – молодь карповых видов рыб и личинки ручейников; типичного ихтиофага (судак) – молодь карповых видов рыб и битотрефесы.

2) Установлено, что использование в комплексе различных молекулярно-генетических методов позволяет выявить наибольшее разнообразие микробных сообществ в кишечнике рыб, объектах их питания и компонентах окружающей среды (вода, грунт, тростник). В слизи и содержимом кишечника филумы Cyanobacteria, Bacteroidetes и класс Betaproteobacteria обнаружены только методами групп-специфичной ПЦР и метагеномного секвенирования. Tenericutes детектируются в слизи кишечника только с помощью секвенирования по Сэнгеру, и в воде с помощью метагеномного секвенирования, Acidobacteria в кишечнике и грунте – только методом метагеномного секвенирования.

3) Показано, что доминирующая микробиота в кишечнике рыб с разным типом питания (всеядных, планкто-бентофагов, типичного ихтиофага и ихтиофага-факультативного бентофага) представлена филумами Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria и Cyanobacteria.

4) В кишечнике половозрелых особей рыб оз. Чаны формируются две группы микроорганизмов: микробиота слизи кишечника и микробиота его содержимого. Зависимость разнообразия микробиоты от типа питания рыб увеличивается от эври- к стено- и монофагам.

5) Выявлены онтогенетические особенности формирования состава кишечной микробиоты серебряного карася и окуня обыкновенного. На ранних этапах развития рыб детектируется широкий спектр микроорганизмов. Специфика формирования кишечной микробиоты окуня проявляется на более ранних этапах онтогенеза по сравнению с серебряным карасем.

б) Представители класса Alphaproteobacteria в слизистой и содержимом кишечника серебряного карася в размерной группе от 0 до 100 мм не обнаружены; бактерии филума Euarchaeta детектируются только с этапа размерной группы 10-30 мм. В кишечнике окуня представители класса Alphaproteobacteria и филум Verrucomicrobia зарегистрированы только с этапа размерной группы 30-60 мм.

7) В формирование микробиоты слизистой кишечника рыб разных экологических групп наибольший вклад вносит ассоциированная микробиота воды и личинок ручейников, в формирование микробиоты содержимого кишечника – ассоциированная микробиота водного биотопа.

#### **Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК:**

1) **Кашинская, Е.Н.** Разнообразие микробных сообществ слизистой и содержимого кишечника некоторых видов рыб оз. Чаны (Западная Сибирь, Россия) / Е. Н. Кашинская, Е.В. Суханова, М.М. Соловьев, Г.И. Извекова, В.В. Глупов // Биология внутренних вод. – 2014. – № 2. – С. 82–88.

2) **Kashinskaya, E.N.** A comparative study on microbiota from the intestine of Prussian carp (*Carassius gibelio*) and their aquatic environmental compartments, using different molecular methods / E.N. Kashinskaya, N.L. Belkova, G.I. Izvekova, E.P. Simonov, K.B. Andree, V.V. Glupov, O.A. Baturina, M.R. Kabilov, M.M. Solovyev // Journal of Applied Microbiology. – 2015. doi: 10.1111/jam.12904.

3) Solovyev, M.M. Feeding habits and ontogenic changes in digestive enzyme patterns in five freshwater teleosts / M.M. Solovyev, **E.N. Kashinskaya**, G.I. Izvekova, E. Gisbert, V.V. Glupov // Journal of Fish Biology. – 2014. – V. 85. – I. 5. – P. 1394–1412.

4) Izvekova, G.I. Variations in the activity of digestive enzymes along the intestine of the turbot *Lota lota* expressed by different methods / G.I. Izvekova, M.M. Solovyev, **E.N. Kashinskaya**, E.I. Izvekov // Fish Physiology and Biochemistry. – 2013. – V. 39. – I. 5. – P. 1181–1193.

5) Соловьев, М.М. Значения рН и активность пищеварительных ферментов в желудочно-кишечном тракте рыб озера Чаны (Западная Сибирь) / М.М. Соловьев, **Е.Н. Кашинская**, Г.И. Извекова, В.В. Глупов // Вопросы ихтиологии. – 2015. – Т. 55. – № 1. – С. 1–8.

6) Соловьев, М.М. Зараженность метацеркариями сем. Diplostomidae и активность пищеварительных ферментов молоди ельца сибирского *Leuciscus leuciscus baicalensis* (Dyb) в реке Каргат бассейна озера Чаны / М.М. Соловьев, **Е.Н. Кашинская**, В.В. Глупов // Сибирский экологический журнал. – Новосибирск. – 2010. – Том 17. – № 5. – С. 763–773.

#### **Статьи в других изданиях:**

7) **Кашинская, Е.Н.** Изменение активности пищеварительных ферментов молоди пресноводных костистых рыб в онтогенезе, в условиях озера Чаны / Е.Н. Кашинская, М.М. Соловьев // Материалы XL VIII Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». Россия, Новосибирск, 10-14 апреля. – Биология. – 2010. – С. 93.

8) **Кашинская, Е.Н.** Характеристика пищеварительных ферментов золотого и серебряного карасей в озере Чаны / Е.Н. Кашинская, М.М. Соловьев // Материалы XL IX Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». Россия, Новосибирск, 16-20 апреля. – Биология. – 2011. – С. 80.

9) **Кашинская, Е.Н.** Разнообразие симбионтной микрофлоры кишечника некоторых видов рыб оз. Чаны / Е.Н. Кашинская, Е.В. Суханова, М. М. Соловьев, Г.И. Извекова // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов». Россия, п. Борок, 22-27 сентября. – Издательство «Борок». – 2012. – С. 176.

10) **Кашинская, Е.Н.** Разнообразие кишечной микробиоты серебряного карася и степень ее сходства с компонентами окружающей водной среды / Е.Н. Кашинская, М.М. Соловьев // Материалы VI всероссийского с международным участием конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013». Россия, Иркутск, 19-23 августа. – Биоразнообразие и экология. – 2013. – С. 193.

11) **Кашинская, Е.Н.** Микробиота кишечника серебряного карася (*Carassius auratus gibelio*) и компонентов окружающей водной среды / Е. Н. Кашинская, Д.Д. Булгакова, М.М. Соловьев // Съезд Гидробиологического общества при Российской академии наук: тезисы докладов. Россия, Красноярск, 22–26 сентября. – 2014. – С. 79–80.

12) **Kashinskaya, E.N.** A comparative study on microbiota from the intestine of Prussian carp (*Carassius gibelio*) and their aquatic environmental compartments, using different molecular methods / E.N. Kashinskaya, N.L. Belkova, G.I. Izvekova, E.P. Simonov, K.B. Andree, V.V. Glupov, O.A. Baturina, M.R. Kabilov, M.M. Solovyev // World Aquaculture 2015: poster. Korea, Jeju, May 26-30. – 2015. – P. 264.

13) **Кашинская, Е.Н.** Разнообразие микробиоты желудочно-кишечного тракта некоторых видов рыб разных экологических групп оз. Чаны / Е.Н. Кашинская, Н.Л. Белькова, Г.И. Извекова, Е.П. Симонов, М.М. Соловьев // 4-й Байкальский Микробиологический Симпозиум с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах»: тезисы докладов. Россия, Иркутск, 7–12 сентября. – 2015. – С. 277-279.