

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ СИСТЕМАТИКИ И ЭКОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

На правах рукописи

КАШИНСКАЯ ЕЛЕНА НИКОЛАЕВНА

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

03.02.08 - экология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель –
Доктор биологических наук, профессор
В.В. Глупов

Научный консультант –
Доктор биологических наук
Г.И. Извекова

Иркутск – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Микробиота пищеварительного тракта рыб	11
1.1.1. Разнообразие кишечной микробиоты рыб.....	13
1.1.2. Абиотические и биотические факторы, влияющие на структуру кишечной микробиоты рыб.....	27
1.1.3. Изменение кишечной микробиоты в онтогенезе рыб.....	28
1.1.4. Роль микробиоты, ассоциированной с желудочно-кишечным трактом рыб.....	31
1.2. Особенности экологии и биологии рыб оз. Чаны	37
1.3. Физико-географическая характеристика района исследования.....	43
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	46
2.1. Характеристика объектов исследования и отбор образцов	46
2.2. Методы исследования кишечной микробиоты рыб.....	49
2.2.1. Выделение ДНК.....	49
2.2.2. Групп-специфичная ПЦР.....	50
2.2.3. Секвенирование по Сэнгеру.....	53
2.2.4. Метагеномное секвенирование.....	54
2.3. Биоинформационный анализ данных.....	55
2.4. Определение спектра питания рыб разных экологических групп.....	57
ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ ПИТАНИЯ РЫБ ОЗ. ЧАНЫ	58
3.1. Анализ питания рыб оз. Чаны.....	59
3.2. Сезонные изменения спектра питания некоторых видов рыб оз. Чаны (на примере серебряного карася и окуня).....	60
ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА (НА ПРИМЕРЕ	64

СЕРЕБРЯНОГО КАРАСЯ <i>CARASSIUS AURATUS</i> И КОМПОНЕНТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ).....	
4.1. Групп-специфичная ПЦР.....	65
4.2. Секвенирование по Сэнгеру.....	66
4.3. Метагеномное секвенирование.....	72
4.4. Разнообразиие микробных сообществ, исследованное с помощью различных молекулярно-генетических методов.....	73
ГЛАВА 5. РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБИОТЫ ЖЕЛУДОЧНО- КИШЕЧНОГО ТРАКТА НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ РАЗНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП ОЗ. ЧАНЫ	79
5.1. Разнообразиие микробиоты слизистой и содержимого кишечника половозрелых особей рыб с разным типом питания	79
5.2. Степень сходства микробиоты слизистой и содержимого кишечника половозрелых особей рыб с разным типом питания.....	84
5.3. Онтогенетические и сезонные изменения кишечной микробиоты серебряного карася и окуня	94
5.3.1. Изменение кишечной микробиоты на разных этапах онтогенеза (групп-специфичная ПЦР).....	94
5.3.2. Изменение кишечной микробиоты в зависимости от сезона года (метагеномное секвенирование).....	98
ГЛАВА 6. МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С КОМПОНЕНТАМИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ОБЪЕКТАМИ ПИТАНИЯ РЫБ.....	103
6.1. Микробиота природной воды, тростника, грунта и водных беспозвоночных.....	104
6.2. Степень сходства кишечного микробного сообщества и микробиоты, ассоциированной с компонентами окружающей среды.....	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	118
ВЫВОДЫ.....	120

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	146
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	147

ВВЕДЕНИЕ

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). Кишечная микробиота играет важную роль в регуляции общего метаболизма, обеспечении защитных функций организма и процессах пищеварения (Ringo et al., 2002; Austin, 2002). Деятельность микроорганизмов находится в прямой зависимости 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., 1996; Ringo et al., 2006; Uchii et al., 2006; Yang et al., 2007; Wu et al., 2010; Sullam et al., 2012; Bolnick et al., 2014).

В настоящее время, при изучении разнообразия кишечной микробиоты рыб основное внимание 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. По разнообразию потребляемой пищи рыб принято делить на эврифагов, стенофагов и монофагов. По характеру потребляемого корма рыб разделяют на животнойдных, растительноядных и хищных (Никольский, 1963). Предполагается, что разнообразие кишечной микробиоты рыб будет зависеть от разнообразия потребляемых объектов питания (Laraaga, Sanz, 2010). Однако 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, Navarrete, 2006; Han et al., 2010). Согласно другим данным, кишечная микробиота рыб отлична от микробиоты, ассоциированной с компонентами окружающей среды (Cahill, 1990; Ringo, Olsen, 1999; Olafsen, 2001; Romero, Navarrete, 2006). Таким образом, данный вопрос остается дискуссионным.

На территории России исследования разнообразия кишечной микробиоты рыб ведутся спорадически. Хорошо исследованы микробные сообщества, ассоциированные с лососевидными рыбами озера Байкал и некоторых водоемов Восточной Сибири (Суханова, 2012). Изучение микробных сообществ, ассоциированных с кишечником рыб разных экологических групп, онтогенетические и сезонные изменения в составе кишечной микробиоты рыб, а также связь с компонентами окружающей среды на территории Западной Сибири с помощью молекулярной идентификации не проводилось.

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 гена 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. Объем проанализированного материала составляет 527 образцов, из которых была выделена тотальная ДНК, проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР), проведена подготовка образцов для клонирования, секвенирования по Сэнгеру и метагеномного секвенирования. В работе проанализировано 227 особей 8-ми видов рыб, 25 экземпляров беспозвоночных и их личинок, 23 образца ассоциированной микробиоты (вода, грунт, тростник). При анализе материала использовались 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 научной студенческой конференции 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 обсуждении 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

Микробное сообщество представляет собой совокупность взаимодействующих между собой функционально различимых микроорганизмов, которые связаны единством времени и пространства. Подчиняясь системным закономерностям, микробное сообщество стремится обеспечить наибольшую устойчивость, которая определяется адаптивными особенностями микроорганизмов, замене одних видов другими в зависимости от топических условий среды. Сопrotивляемость и способность к выживанию способствуют формированию специфичных функциональных групп микроорганизмов, входящих в состав микробного сообщества (Заварзин, 2003). Генетическая изменчивость и метаболическая пластичность позволяют бактериям адаптироваться к новым местообитаниям и занимать разнообразные экологические ниши. Бактерии колонизировали различные места обитания (Hugenholtz et al., 1998; Fakruddin, Mannan, 2013), где могут присутствовать в высокой плотности (Suau et al., 1999), и проявляют себя не только как сообщества микроорганизмов, функционирующих в природных экосистемах, но, также выступают в качестве симбионтов, ассоциированных с внешними покровами и внутренними органами живых организмов. Отмечено, что кишечное микробное сообщество играет важную роль в процессах пищеварения, гомеостазе, регуляции иммунного ответа и защите против патогенных организмов (Hooper et al., 1998; Han et al., 2010; Xing et al., 2013).

1.1. Микробиота пищеварительного тракта рыб

Кишечник является сложным многофункциональным органом, выполняющим ряд физиологических и защитных функций, и вовлечен в процессы переваривания и всасывания пищи, поддержания электролитического баланса, иммунитета и регуляции метаболизма (Ringo et al., 2003; Han et al., 2010; Kessel et al., 2011). Для рыб описана схема, включающая 5 взаимосвязанных типов

пищеварения, обеспечивающих процессы переваривания и всасывания пищи. Начальная деградация биополимеров осуществляется за счет внеклеточного (полостного) пищеварения, реализующегося главным образом в желудке, кишечнике и пилорических придатках, куда поступают пищеварительные ферменты (протеазы, амилазы, липазы), выделяемые секреторными клетками. Следующий этап расщепления пищи – мембранное пищеварение, осуществляемое ферментами, локализованными на структурах клеточной мембраны. Заключительные этапы пищеварения осуществляются за счет внутриклеточного пищеварения, – при котором частично расщепленные пищевые субстраты проникают внутрь клетки, где подвергаются гидролизу ферментами цитоплазмы, не выделяющимися за ее пределы.

Помимо основных типов пищеварения, у рыб существуют специализированные механизмы гидролиза пищи, такие как индуцированный аутолиз, осуществляемый ферментами самих объектов питания, и симбионтное пищеварение, реализуемое за счет ферментов бактериального происхождения (Кузьмина, 2005). При этом последнее имеет принципиальное значение для процессов пищеварения многих позвоночных животных. Показано, что участие ферментов микробиоты снижает энергетические затраты организма на синтез собственных ферментов (Уголев, 1985). Также отмечено, что микробиота способна гидролизировать трудноразлагаемые компоненты пищи ввиду отсутствия собственных гидролаз у организма-хозяина (Кузьмина, 1999).

Пищеварительный тракт позвоночных животных, в том числе рыб, населен различными микроорганизмами, при этом, наибольшее разнообразие и высокая плотность приходится на долю бактерий (Denev et al., 2009). По приблизительным подсчетам в кишечнике рыб насчитывают 10^7 - 10^8 КОЕ/г эпителиальной ткани кишечника (Xing et al., 2013). Кишечная микробиота рыб представлена аэробными, факультативно и облигатно анаэробными бактериями (Cahill, 1990; Clements, 1997).

Гидробионты по сравнению с наземными животными имеют более тесные связи с внешней окружающей средой. По результатам многочисленных

исследований было установлено, что микроорганизмы, поступающие из окружающей среды, могут ассоциироваться на поверхности внешних покровов и слизистой пищеварительного тракта рыб, и при благоприятных условиях колонизировать их. При этом организмы внешних покровов могут вступать в конкурентные взаимоотношения с микробиотой, поступающей из окружающей среды, в результате чего могут ингибировать их рост и развитие (Austin, 2002; Ringo et al., 2003; Denev et al., 2009). В пищеварительном тракте рыб различают временно присутствующую аллохтонную микробиоту, поступающую с водой и пищей, и автохтонную микробиоту, постоянно населяющую его слизистую поверхность (Ringo et al., 2006).

1.1.1. Разнообразие кишечной микробиоты рыб

Согласно многочисленным исследованиям, в зависимости от таксономического статуса, экологии и физиологии рыб, разнообразие бактерий может сильно варьировать. С помощью микробиологических методов о микробиоте рыб накоплен достаточно большой материал (Aiso et al., 1968; Trust, 1975; Sugita, 1988; Mac Cormack, Fraile, 1990; Sugita et al., 1996; Ringo, Olsen, 1999; Al-Harbi, Uddin, 2005). Выявлена и охарактеризована значительная часть гетеротрофных бактерий (Kirk et al., 2004). По результатам культивирования на селективных питательных средах в пищеварительном тракте пресноводных рыб преобладают бактерии родов *Enterobacter*, *Aeromonas* и *Acinetobacter*, у морских – *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium* и *Micrococcus* (Cahill, 1990). В кишечнике пресноводных видов рыб также зарегистрированы *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Aeromonas* (*A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. sobria*, *A. veronii*), *Alcaligenes*, *Eikenella*, *Bacteroides*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Cytophaga/Flexibacter*, *Bacillus*, *Listeria*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas* (Austin, 2002). В кишечнике морских видов встречаются *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Carnobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*,

Photobacterium, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Vibrio* (*V. iliopiscarius*) (Austin, 2002). Тем не менее, показано, что с помощью методов культивирования более 70% кишечной микробиоты не удается вывести в культуру и идентифицировать (Trust, Sparrow, 1974; Sugita et al., 1983; Sugita, 1988; Mac Cormack, Fraile 1990; Mickeniene, Syvokiene, 1999; Ringo, Olsen, 1999; Cani, 2013).

Наряду с микробиологическими подходами для анализа кишечной микробиоты рыб, широкое распространение получили молекулярно-генетические методы (Rawls et al., 2004; Moran et al., 2005; Skrodenyte-Arbaciauskiene, 2006; Romero, Navarrete, 2006; Uchii et al., 2006; Kim et al., 2007; McIntosh et al., 2008; Ward et al., 2009; Han et al., 2010; Rudresh et al., 2010; Smriga et al., 2010; Wu et al., 2010; Kessel et al., 2011; Lan, Love, 2011; Roeselers et al., 2011; Silva et al., 2011; McDonald et al., 2012; Navarrete et al., 2012; Wu et al., 2012; Li et al., 2013; Wu et al., 2013; Xing et al., 2013; Xia et al., 2014). Они позволили наиболее полно определить структуру и разнообразие бактерий. Молекулярная идентификация отдельных бактериальных таксонов основана на амплификации фрагмента гена 16S рРНК с использованием консервативных праймеров на домены Eubacteria и Archaea с последующим секвенированием, или использованием специфических праймеров на филогенетические группы разного таксономического уровня.

По результатам молекулярно-генетических исследований доминирующей микробиотой рыб выступают представители филумов Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes и Actinobacteria (табл. 1). Согласно другим данным, в кишечнике рыб в составе доминантов могут выступать другие филумы, так в кишечнике сазана доминировал филум Fusobacteria (Kessel et al., 2011), а в кишечнике серебряного драмера (*Kyphosus sydneyanus*) – *Clostridium* sp. (Moran et al., 2005).

Несмотря на имеющиеся данные о разнообразии бактерий в кишечнике рыб, существуют определенные сложности в интерпретации результатов. Проводить прямое сравнение кишечной микробиоты разных видов рыб, полученное разными авторами, в настоящее время затруднительно. Некоторые авторы в качестве материала для исследования используют только содержимое кишечника (Moran et al., 2005; Uchii et al., 2006; Skrodenyte-Arbaciauskiene, 2006; Han et al., 2010; Smriga

et al., 2010; Silva et al., 2011; Navarrete et al., 2012; Wu et al., 2013), или желудочно-кишечный тракт целиком (Aiso et al., 1968; Mac Cormack, Fraile 1990; Al-Harbi, Uddin, 2005; Romero, Navarrete, 2006; Rudresh et al., 2010; Lan, Love, 2011; McDonald et al., 2012; Li et al., 2013; Xia et al., 2014), другие разделяют микробиоту содержимого кишечного тракта и микробиоту, ассоциированную с его слизистой (Kim et al., 2007; Wu et al., 2010; Xing et al., 2013). Также, большинство исследований о кишечной микробиоте касаются рыб, разводимых в рыбоводных хозяйствах, и с учетом их адаптации в лабораторных условиях (He et al., 2010; Zhou et al., 2008; Wu et al., 2013). Исследования, проводимые на рыбах из естественных условий обитания, не многочисленны (Skrodenyte-Arbaciauskiene, 2006; Uchii et al., 2006; Суханова, 2012; Rudresh et al., 2010; Bacanu et al., 2012).

Микробиота желудочно-кишечного тракта пресноводных и морских видов рыб

Объект исследования	Доминирующая микробиота	Метод исследования	Образец	Отношение к солености	Условия выращивания	Источник
Японская ставрида (<i>Trachurus japonicus</i>)	<i>Vibrio</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Achromobacter</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Sarcina</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.	Культивирование	Желудочно-кишечный тракт целиком	М	А	Aiso et al., 1968
Кета (<i>Oncorhynchus keta</i>)	<i>Aeromonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp.	Культивирование	Содержимое желудочно-кишечного тракта	П/М	А	Trust, 1975
Серебряный карась (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>A. punctata</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., Bacteroidaceae, <i>Clostridium</i> sp.	Культивирование	Содержимое кишечника	П	А	Sugita, 1988
Антарктическая гололобая нототения (<i>Notothenia neglecta</i>)	<i>Vibrio</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp.	Культивирование	Желудочно-кишечный тракт целиком	М	Еу	Mac Cormack, Fraile, 1990
Аю (<i>Plecoglossus</i>)	Enterobacteriaceae,	Культивирование	Содержимое	П	А	Sugita et al.,

<i>altivelis</i>)	<i>Aeromonas</i> sp., Bacteroides тип В, <i>Bacillus</i> sp.		кишечника			1996
Серебряный карась (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Aeromonas</i> sp., Enterobacteriaceae, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Coryneformis</i> *, <i>Plesiomonas</i>	Культивирование	Содержимое кишечника	П	А	Sugita et al., 1996
Сазан (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>Aeromonas</i> sp., <i>Moraxella</i> spp., Enterobacteriaceae, <i>Pseudomonas</i> spp., Bacteroides тип В, <i>Clostridium</i> spp.	Культивирование	Содержимое кишечника	П	А	Sugita et al., 1996
Японский речной угорь (<i>Anguilla japonica</i>)	Enterobacteriaceae, <i>Streptococcus</i> spp., <i>Plesiomonas</i> , Bacteroides тип В, <i>Clostridium</i> spp.	Культивирование	Содержимое кишечника	П	А	Sugita et al., 1996
Радужная форель (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Aeromonas</i> sp., <i>Coruneformis</i> *, <i>Moraxella</i> spp., Bacteroides тип В, <i>Pseudomonas</i> spp.	Культивирование	Содержимое кишечника	П	А	Sugita et al., 1996
Тиляпия (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Bacteroides тип В, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp.	Культивирование	Содержимое кишечника	П	А	Sugita et al., 1996
Канальный сомик (<i>Ictalurus punctatus</i>)	<i>Aeromonas</i> sp., Bacteroides тип В, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Clostridium</i> spp.	Культивирование	Содержимое кишечника	П	А	Sugita et al., 1996

Радужная форель (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Gamma-proteobacteria, <i>Citrobacter</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Carnobacterium</i> sp.	Культивирование, DAPI окрашивание, RAPD анализ	Содержимое кишечника и желудка	П	А	Spanggarrrd et al., 2000
Радужная форель (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria	FISH, культивирование, секвенирование по Сэнгеру	Содержимое кишечника	П	А	Huber et al., 2004
Данио рерио (<i>Danio rerio</i>)	<i>Aeromonas</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Vibrio</i> sp., <i>Lactococcus</i> sp.	Трансмиссионная электронная микроскопия, ПЦР в реальном времени	Содержимое кишечника	П	А	Rawls et al., 2004
Гибридная форма тиляпии (<i>Oreochromis niloticus</i> × <i>Oreochromis aureus</i>)	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Corynebacterium urealyticum</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio cholerae</i>	Культивирование	Желудочно- кишечный тракт целиком	П	А	Al-Harbi, Uddin, 2005
Серебряный драмер (<i>Kyphosus sydneyanus</i>)	<i>Clostridium</i> sp.	T-RFLP, секвенирование по Сэнгеру	Содержимое кишечника	М	Еу	Moran et al., 2005
Кумжа (<i>Salmo trutta</i>)	<i>Citrobacter</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	Культивирование, секвенирование по Сэнгеру	Содержимое кишечника	П	Еу	Skrodenyte- Arbaciauskie ne, 2006
Белоточечный иглобрюх (<i>Takifugu niphobles</i>)	Actinobacteria, Bacilli, Clostridia, Gamma-proteobacteria, Mollicutes, Spirochaetes	Секвенирование по Сэнгеру, DAPI	Содержимое кишечника	М	Еу	Shiina et al., 2006
Синежаберный	<i>Escherichia coli</i> ;	ТГГЭ	Содержимое	П	Еу	Uchii et al.,

солнечник (<i>Lepomis macrochir</i>)	<i>Aeromonas hydrophila</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Proteus vulgaris</i> ; <i>Listeria monocytogenes</i> ; <i>Brevundimonas vesicularis</i> *; <i>Enterobacter gergoviae</i> ; <i>Bacillus licheniformis</i> ; <i>Vibrio logei</i> *; <i>Vibrio fischeri</i> *; <i>Flexibacter aurantiacus</i> *		кишечника			2006
Кижуч (<i>Oncorhynchus kisutch</i>), молодь	<i>Aeromonas</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	Культивирование, ДГГЭ	Желудочно-кишечный тракт целиком	П	А	Romero, Navarrete, 2006
Радужная форель (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria	Культивирование, ДГГЭ, секвенирование по Сэнгеру	Слизистая и содержимое кишечника	П	А	Kim et al., 2007
Атлантическая треска (<i>Gadus morhua</i>)	<i>Vibrio logei</i> , <i>V. fischeri</i> , <i>Listonella anguillarum</i> , <i>Flexibacter aurantiacus</i> , <i>Sulfitobacter</i> sp., <i>Mycoplasma</i> sp.	ДГГЭ	Икра, личинки рыб	М	А	McIntosh et al., 2008
Атлантический лосось (<i>Salmo salar</i>), молодь	Gamma-proteobacteria, Firmicutes	Культивирование, секвенирование по Сэнгеру	Содержимое кишечника	П	Еу	Skrodenyte-Arbaciauskiene, 2008
Кумжа (<i>Salmo trutta</i>)	Gamma-proteobacteria	Культивирование, секвенирование по	Содержимое кишечника	П	Еу	Skrodenyte-Arbaciauskiene

		Сэнгеру				ne, 2008
Атлантический лосось (<i>Salmo salar</i>), молодь	Proteobacteria	ITS/ ТГГЭ, секвенирование по Сэнгеру	Слизистая и содержимое кишечника	П	А	Navarrete et al., 2009
Групер (<i>Epinephelus coioides</i>), молодь, 75 дней после начала питания	Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria, Firmicutes	Культивирование, секвенирование по Сэнгеру	Содержимое кишечника	М	А	Sun et al., 2009
Крокодиловая белокровка (<i>Chaenocephalus aceratus</i>)	Proteobacteria	Секвенирование по Сэнгеру	Содержимое кишечника	М	Еу	Ward et al., 2009
Гарра (<i>Garra mullya</i>)	Eubacteriales	Культивирование	Желудочно-кишечный тракт целиком	П	Еу	Rudresh et al., 2010
Белый амур (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	Proteobacteria, Firmicutes	Секвенирование по Сэнгеру	Содержимое кишечника	П	А	Han et al., 2010
Длиннорылый морской конёк (<i>Hippocampus guttulatus</i>)	Alpha-proteobacteria	RFLP, FISH, секвенирование по Сэнгеру	Содержимое кишечника	М	А	Balcázar et al., 2006
Белый амур (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	Proteobacteria, Firmicutes	Секвенирование по Сэнгеру	Содержимое кишечника	П	А	Han et al., 2010
Атлантический лосось (<i>Salmo salar</i>)	Gamma-proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes	RFLP, секвенирование по Сэнгеру	Слизистая и содержимое кишечника	М	А	Navarrete et al., 2010
Бохар (<i>Lutjanus</i>)	Proteobacteria	ДГГЭ,	Содержимое	М	Еу	Smriga et al.,

<i>bohar</i>)		секвенирование по Сэнгеру	кишечника			2010
Рыба-хирург (<i>Acanthurus nigricans</i>)	Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes	ДГГЭ, секвенирование по Сэнгеру	Содержимое кишечника	М	Еу	Smriga et al., 2010
Рыба-попугай (<i>Chlorurus Sordidus</i>)	Proteobacteria	ДГГЭ, секвенирование по Сэнгеру	Фекалии	М	Еу	Smriga et al., 2010
Солея (<i>Solea senegalensis</i>)	Gamma-proteobacteria	ДГГЭ, секвенирование по Сэнгеру	Содержимое кишечника	М	А	Tapia-Paniagua et al., 2010
Косатка-скрипун (<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>)	Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes	Культивирование, секвенирование по Сэнгеру	Слизистая и содержимое кишечника	П	А	Wu et al., 2010
Атлантический лосось (<i>Salmo salar</i>), молодь	Gamma-proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria	Культивирование, секвенирование по Сэнгеру	Слизистая и содержимое кишечника	П	А	Cantas et al., 2011
Сазан (<i>Cyprinus carpio</i>)	Fusobacteria	Пиросеквенирование	Содержимое кишечника	П	А	Kessel et al., 2011
Данио рерио (<i>Danio rerio</i>)	Proteobacteria, Firmicutes	Рестрикционный анализ (ARDRA), секвенирование по Сэнгеру	Желудочно-кишечный тракт целиком	П	А	Lan, Love, 2011
Дорада (<i>Sparus aurata</i>)	Proteobacteria	Культивирование, ДГГЭ	Фекалии, содержимое кишечника	М	Еу	Silva et al., 2011
Данио рерио (<i>Danio rerio</i>)	Proteobacteria, Cyanobacteria, Fusobacteria	Секвенирование по Сэнгеру	Содержимое кишечника	П	Еу	Roeselers et al., 2011

Данио рерио (<i>Danio rerio</i>)	Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes, Actinobacteria	Пиросеквенирование, секвенирование по Сэнгеру, TRFLP	Слизистая и содержимое кишечника	П	A/Ey	Roeselers et al., 2011
Дорада (<i>Sparus aurata</i>)	Bacillales, Flavobacteriaceae	Культивирование, ДГГЭ	Содержимое желудка	М	Ey	Silva et al., 2011
Серебряный карась (<i>Carassius auratus</i>)	Proteobacteria	Культивирование, ДГГЭ	Содержимое кишечника	П	Ey	Silva et al., 2011
Данио рерио (<i>Danio rerio</i>)	Gamma-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Alpha-proteobacteria, Firmicutes	Культивирование, секвенирование по Сэнгеру	Содержимое кишечника	П	A	Cantas et al., 2012
Радужная форель (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes	Пиросеквенирование, секвенирование по Сэнгеру, ДГГЭ	Содержимое кишечника	П	A	Desai et al., 2012
Королевский панак (<i>Panaque nigrolineatus</i>)	Alphaproteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes	Секвенирование по Сэнгеру	Желудочно-кишечный тракт целиком	П	A	McDonald et al., 2012
Радужная форель (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria	ТГГЭ	Содержимое кишечника	П	A	Navarrete et al., 2012
Белый амур (<i>Stenopharyngodon idellus</i>)	Fusobacteria, Proteobacteria, Firmicutes	ДГГЭ, секвенирование по Сэнгеру	Слизистая и содержимое кишечника	П	Aa/Ey	Ni et al., 2012
Морская минога (<i>Petromyzon marinus</i>)	Proteobacteria	ДГГЭ, секвенирование по Сэнгеру	Содержимое кишечника	П	A	Tetlock et al., 2012
Белый амур (<i>Stenopharyngodon</i>)	Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria,	ДГГЭ, секвенирование по	Слизистая и содержимое	П	A	Li et al., 2012

<i>idellus</i>)	Gamma-proteobacteria, Actinobacteria	Сэнгеру	кишечника			
Белый толстолобик (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	Actinobacteria, Firmicutes, Alpha- proteobacteria, Gamma- proteobacteria	ДГГЭ, секвенирование по Сэнгеру	Слизистая и содержимое кишечника	П	А	Li et al., 2012
Пёстрый толстолобик (<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria, Actinobacteria	ДГГЭ, секвенирование по Сэнгеру	Слизистая и содержимое кишечника	П	А	Li et al., 2012
Амурский черный лещ (<i>Megalobrama amblycephala</i>)	Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria	ДГГЭ, секвенирование по Сэнгеру	Слизистая и содержимое кишечника	П	А	Li et al., 2012
Белый амур (<i>Stenopharyngodon idella</i>)	Proteobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria, Actinobacteria	Пиросеквенирование	Слизистая и содержимое кишечника	П	А	Wu et al., 2012
Атлантическая треска (<i>Gadus morhua</i>)	Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus	ДГГЭ, секвенирование по Сэнгеру	Слизистая и содержимое кишечника	М	А	Zhou et al., 2012
Лаврак (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	<i>Dysgonomonas</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Weissella</i> – образцы без замораживания, <i>Methylobacterium</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Bradyrhizobium</i> образцы после -80°C.	Пиросеквенирование	Слизистая и содержимое кишечника	М	А	Carda- Dieguez et al., 2013
Радужная форель (<i>Oncorhynchus</i>)	Личинка до начала питания –	Метагеномное секвенирование	Кишечник целиком	П	А	Ingerslev et al., 2013

<i>mykiss</i>)	<i>Sediminibacterium</i> ; после начала питания - <i>Streptococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> и <i>Weissella</i>					
Атлантический лосось (<i>Salmo salar</i>)	Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Verrucomicrobia	Секвенирование по Сэнгеру	Содержимое кишечника	М	А	Green et al., 2013
Сазан (<i>Cyprinus carpio</i>)	Proteobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes	Пиросеквенирование, ДГГЭ	Слизистая и содержимое кишечника	П	А	Li et al., 2013
Атлантическая треска (<i>Gadus morhua</i>)	Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes	Секвенирование по Сэнгеру, пиросеквенирование	Содержимое кишечника	М	Еу	Star et al., 2013
Серебряный карась (<i>Carassius auratus gibelio</i>)	Proteobacteria, Firmicutes	Пиросеквенирование	Содержимое кишечника	П	А	Wu et al., 2013
Белый морской окунь (<i>Lates calcarifer</i>)	Proteobacteria, Firmicutes	Пиросеквенирование	Желудочно-кишечный тракт целиком	П/М	А	Xia et al., 2014
Зобная пузанка (<i>Dorosoma cepedianum</i>)	Суанобактерия, Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria, Planctomycetes, Chloroflexi, Crenarchaeota	Секвенирование по Сэнгеру, пиросеквенирование	Слизистая и содержимое кишечника	П	Еу	Ye et al., 2014
Белый толстолобик	Суанобактерия,	Секвенирование по	Слизистая и	П	Еу	Ye et al.,

<i>(Hypophthalmichthys molitrix)</i>	Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria, Planctomycetes, Chloroflexi, Crenarchaeota	Сэнгеру, пиросеквенирование	содержимое кишечника			2014
Белый амур <i>(Ctenopharyngodon idellus)</i>	Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria	Пиросеквенирование	Содержимое желудочно-кишечного тракта	П	Eu	Li et al., 2014
Амурский черный лещ <i>(Megalobrama amblycephala)</i>	Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria	Пиросеквенирование	Содержимое желудочно-кишечного тракта	П	Eu	Li et al., 2014
Золотой карась <i>(Carassius auratus)</i>	Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria	Пиросеквенирование	Содержимое желудочно-кишечного тракта	П	Eu	Li et al., 2014
Сазан <i>(Cyprinus carpio)</i>	Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria	Пиросеквенирование	Содержимое желудочно-кишечного тракта	П	Eu	Li et al., 2014
Белый толстолобик <i>(Hypophthalmichthys molitrix)</i>	Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria	Пиросеквенирование	Содержимое желудочно-кишечного тракта	П	Eu	Li et al., 2014
Пёстрый толстолобик	Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes,	Пиросеквенирование	Содержимое желудочно-	П	Eu	Li et al., 2014

<i>(Hypophthalmichthys nobilis)</i>	Actinobacteria		кишечного тракта			
Окунь-ауха, китайский окунь (<i>Siniperca chuatsi</i>)	Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria	Пиросеквенирование	Содержимое желудочно-кишечного тракта	П	Еу	Li et al., 2014
Косатка-скрипун (<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>)	Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria	Пиросеквенирование	Содержимое желудочно-кишечного тракта	П	Еу	Li et al., 2014
Канальный сомик (<i>Ictalurus punctatus</i>)	Fusobacteria (<i>Cetobacterium somerae</i>)	Пиросеквенирование	Кишечник со стенкой без содержимого	Пр	А	Larsen et al., 2015
Большеротый окунь (<i>Micropterus salmoides</i>)	Fusobacteria (<i>Cetobacterium somerae</i>)	Пиросеквенирование	Кишечник со стенкой без содержимого	М	А	Larsen et al., 2015
Синежаберный солнечник (<i>Lepomis macrochirus</i>)	Fusobacteria, specifically the species <i>Cetobacterium somerae</i>	Пиросеквенирование	Кишечник со стенкой без содержимого	П	А	Larsen et al., 2015

Примечание: * названия бактерий вышли из употребления; П – пресноводный; М – морской; П/М – проходной; А – аквакультура; Еу – естественные условия.

1.1.2. Абиотические и биотические факторы, влияющие на структуру кишечной микробиоты рыб

Одним из самых главных свойств кишечной микробиоты является ее изменчивость (Denev et al., 2009). Благодаря многочисленным исследованиям продемонстрировано, что изменчивость кишечной микробиоты рыб зависит от влияния различных факторов окружающей среды, которые можно разделить на две группы: абиотические и биотические. Абиотическими факторами являются температура, концентрация кислорода, соленость, рН, химическое загрязнение, пестициды, тяжелые металлы и другие (Fakruddin, Mannan, 2013). К биотическим факторам можно отнести возраст рыб, особенности строения пищеварительного тракта, тип питания (Шивокене, 1989; Кузьмина, 2005). Плазмиды, фаги, транспозоны, по мнению ряда авторов также можно отнести к биотическим факторам среды (Fakruddin, Mannan, 2013).

Микроорганизмы могут развиваться при определенных диапазонах температур. Бактерии, способные расти при низкой температуре, называют психротрофами, при средней – мезофилами, при высокой – термофилами. К психротрофным или психротолерантным микроорганизмам относят, как правило, бактерий, обитающих в почве, морских и пресных водоемах, сточных водах, диапазон роста которых от -5 до 35°C . Мезофилы, температурный диапазон роста которых колеблется от 10 до 47°C , включают группу патогенных и условно-патогенных бактерий. К термофильным бактериям относят микроорганизмы, развивающиеся при более высоких температурах (от 45 до 90°C), в основном это обитатели горячих источников (Глик, Пастернак, 2002; Воробьев и др., 2003). Показано, что более высокая температура воды предпочтительна для роста *E. coli* и некоторых видов рода *Vibrio*, обитающих в кишечнике рыб семейства лососевых (*Salmonidae*), в то время как более холодная температура воды предпочтительнее для роста *Pseudomonas* sp. (Кузьмина, 2005). Кишечная микробиота скумбрии (*Scomber scomber*) и желтохвоста (*Seriola aureovittata*) также растет в определенном диапазоне температур, почти все штаммы бактерий

не развиваются при температуре 5°C, хорошо развиваются при 25–37°C и прекращают свое развитие при 42°C (Извекова, 2006).

Видовой и количественный состав микробиоты кишечника рыб зависит также от солености воды. В кишечнике пресноводной тиляпии с повышением солености воды уменьшается количество облигатных анаэробов и возрастает содержание аэробных и факультативно анаэробных грамотрицательных палочек (Кузьмина, 2005).

Среди биотических факторов окружающей среды показано, что тип питания оказывает наиболее существенное влияние на таксономический состав кишечной микробиоты рыб (Шивокене, 1989; Tanaka et al., 2004; Ringo et al., 2006; Uchii et al., 2006; Yang et al., 2007). Качественное и количественное соотношение микроорганизмов в значительной мере зависят от интенсивности и спектра питания организма. Установлено, что наибольшая численность бактерий зарегистрирована в летние месяцы в период интенсивного питания рыб, и резко снижается в зимние. На примере белого амура и карпа показано, что голодание и зимовка приводят к значительному снижению количества видов бактерий в кишечнике рыб (Шивокене, 1989; Кузьмина, 2005). Сравнение рыб разных экологических групп по спектру питания также демонстрирует высокое разнообразие микробиоты. Некоторыми авторами отмечено наибольшее разнообразие таксонов бактерий в кишечнике у эврифагов, планктофагов и бентофагов по сравнению с хищными видами рыб (Извекова и др., 2007). Сравнение микробиоты сазана и судака, различающихся по характеру питания (сазан – бентофаг, судак – ихтиофаг) показало, что разнообразие микроорганизмов у первого вида значительно богаче, чем у второго (Извекова и др., 2007).

1.1.3. Изменение кишечной микробиоты в онтогенезе рыб

Процессы микробной колонизации кишечника начинаются со стадии развития яйца или личинки и продолжаются с развитием рыбы при питании, и,

как правило, приводят к установлению симбиотических взаимоотношений между организмом-хозяином и микробиотой (Шивокене, 1989). Через несколько часов после оплодотворения, бактерии из окружающей среды интенсивно начинают заселять поверхность икры рыб. При этом состав микробиоты, развивающейся на поверхности икры, отражает состав микробного сообщества воды (Olafsen, 2001). Взаимоотношения, устанавливающиеся между бактериями и организмом-хозяином, могут носить как положительный, так и отрицательный характер. Большинство бактерий, присутствующих в эвтрофных водоемах, являются условно-патогенными микроорганизмами, и при неблагоприятных условиях среды могут быть причиной развития различных заболеваний у рыб. Изменение температуры, солености, концентрации кислорода, увеличение концентрации загрязняющих веществ могут ослабить защитные функции организма, и способствовать заселению патогенной микробиотой кишечника гидробионтов (Hansen, Olafsen, 1999). Согласно многочисленным исследованиям, защитные механизмы, предотвращающие заселение потенциально вредных бактерий и развитие бактериальных инвазий, связывают с видо-специфичной адгезией. Подобные механизмы защиты могут повлиять на состав эпифитной микробиоты, начиная уже с этапа бактериальной колонизации икры рыб (Olafsen, 2001). Согласно литературным данным, бактерии способны ассоциировать с поверхностью кишечника при помощи формирования специфичных полимерных мостиков или плотного полисахаридного слоя. Предполагается, что прикрепление микроорганизмов к поверхности – результат взаимодействия лектинов либо с гликопротеинами, либо с гликолипидами, источником которых могут быть сами бактерии, клетки эпителия кишечника или пищевые вещества. Различные микроорганизмы колонизируют кишечное пространство без прикрепления к клеткам эпителия. Эти бактерии способны выживать в слизи на поверхности эпителия, конкурируя с аллохтонной микробиотой, которая в норме не может колонизировать кишечную поверхность (Hansen, Olafsen, 1999). Также, бактерии способны прикрепляться к микроворсинкам кишечника рыб и располагаться между ними. Считается, что слой гликокаликса, толщина которого сравнима с

длиной микроворсинок, по-видимому, может служить препятствием для колонизации щеточной каймы микроорганизмами (Извекова, 2006). Прикрепление бактерий к слизистой кишечника показано для многих видов рыб (Cahill, 1990; Hansen, Olafsen, 1999; Ringo et al., 2003). Известно, что процессы ассоциации бактерий к слизистой кишечника условно можно разделить на несколько стадий:

1. проникновение и распространение бактерий внутри слизистой оболочки;
2. хемотаксическое притяжение бактерий к поверхности слизистой;
3. прикрепление к рецепторам слизистой оболочки или эпителиальной поверхности.

Эти взаимодействия могут быть изменены действием ингибиторов адгезии, ферментов, и лектинов (Hansen, Olafsen, 1999).

В момент рождения организма его пищеварительный тракт в течение короткого промежутка времени свободен от бактерий (Шивокене, 1989). Значительная часть бактерий попадает в организм рыб с водой и пищей в период начала питания рыб (Кузьмина, 2005). Личинки рыб в не зависимости от таксономического положения и характера питания на более поздних этапах онтогенеза питаются мелкими формами зоопланктона и бентоса, поэтому видовой состав бактерий, заселяющих кишечник рыб разных видов, но обитающих в одном и том же биотопе, по-видимому, близок. В дальнейшем возможны изменения состава энтеральной микробиоты, обусловленные сменой спектра питания, а также анатомическими и физиологическими особенностями пищеварительной системы (Кузьмина, 2005). На примере серебряного карася показано, что бактериальное сообщество можно разделить на три типа в соответствии с его динамикой развития: 1) транзитная флора – малочисленная и непродолжительно присутствующая; 2) перманентная индигенная микрофлора, встречающаяся на всех стадиях развития карася; 3) «взрослая» флора, или прочно установленная, определяемая через некоторый промежуток времени после начала питания (для серебряного карася примерно через 2 месяца после выклева из икры) (Sugita, 1988). Согласно другим данным, «взрослая» микробиота в кишечнике

тиляпии (*Tilapia mossambica*) устанавливается между 20-м и 60-м днем после начала интенсивного питания (Sugita et al., 1982).

1.1.4. Роль микробиоты, ассоциированной с желудочно-кишечным трактом рыб

Кишечная микробиота рыб играет важную роль в обеспечении защитных функций организма, процессах пищеварения и регуляции процессов общего метаболизма (табл. 2). Показано, что бактерии, продуцируя различные антибактериальные вещества, препятствуют колонизации кишечника патогенными микроорганизмами (Ringo et al., 2002). Показана важная роль микробных популяций пищеварительного тракта не только в трансформации и деградации веществ экзогенной и эндогенной природы, но и в формировании защитно-адаптационных систем организма. Установлено, что при отсутствии микроорганизмов наблюдаются патологические изменения поверхности кишечника, в частности структуры и слизистой оболочки, времени обновления энтероцитов, а также активности гидролитических ферментов (Шивокене, 1989; Кузьмина, 2005). Кишечная микробиота вырабатывает набор ферментов, обеспечивающих гидролиз белков, жиров и углеводов, входящих в состав объектов питания рыб; участвует в деградации таких сложных молекул как целлюлоза, хитин и коллаген, как правило, недоступных для ферментов хозяина (Austin, 2002). Также, кишечная микробиота синтезирует ряд витаминов, в частности, витамин В₁₂, необходимый для роста и развития рыб (Sugita et al., 1992). Важнейшая роль кишечной микробиоты – ферментативная деятельность. Микроорганизмы отдельных физиологических групп обладают специфичностью в расщеплении пищевых субстратов (белки, жиры и углеводы), а также сложных соединений, таких как крахмал, целлюлоза, фосфолипиды, хитин, коллаген. В зависимости от характера питания макроорганизма функциональная деятельность кишечных бактерий должна быть разнообразной (Шивокене, 1989). В кишечнике 9 пресноводных видов рыб обнаружена протеолитическая, амилолитическая,

целлюлолитическая и липолитическая активность ферментов бактерий. Отмечено, что высокая амилолитическая и целлюлолитическая активность установлена для бактерий, изолированных из кишечника белого амура, сазана и тиляпии. При этом у клариса лягушкового и муррели не были обнаружены целлюлолитические бактерии. Липолитические и протеолитические бактерии были обнаружены у всех исследуемых видов рыб, тем не менее, высокая липолитическая активность была зарегистрирована для роху, белого толстолобика, белого амура, сазана, клариса лягушкового и муррели. Наиболее высокая протеолитическая активность ферментов отмечена для белого толстолобика, сазана и тиляпии (Bairagi et al., 2002).

Другой аспект деятельности кишечных бактерий – выработка различных жизненно важных для хозяина веществ, таких как жирные кислоты и витамины. (Уголев, 1985). При изучении секреции свободных аминокислот микробиотой (в основном бактериями рода *Pseudomonas*) в кишечнике карпа (*Cyprinus carpio*), белого амура (*Ctenopharyngodon idella*) и линя (*Tinca tinca*) установлено, что она способна синтезировать до 13 свободных аминокислот: лизин, аргинин, гистидин, аспарагиновую кислоту, треонин, аланин, метионин, валин, фенилаланин, лейцин, серин и глютаминовую кислоту (Уголев, Кузьмина, 1993).

Установлена важная роль микрофлоры в фиксации молекулярного азота. В условиях интенсивного питания рыб самая высокая нитрогеназная активность во всем кишечнике установлена у толстолобика (*Hypophthalmichthys harmandi*) – до 3,648 нмоль C_2H_4 /(мг белка×ч). У карпа, леща и плотвы при интенсивном питании в природных условиях в пищеварительном тракте азотфиксация происходит слабее, чем у растительоядного толстолобика, но сильнее, чем у хищника щуки (Уголев, Кузьмина, 1993).

Занимаемые ниши и функциональное значение отдельных таксономических групп микроорганизмов

Таксон	Распространение	Функции	Источник
Proteobacteria	морские и пресные водоемы, почва, заболоченные территории, щелочные болота, часть нормальной микробиоты живых организмов	показана их роль в секреции ферментов (амилаза, протеазы и целлюлаза), обсуждается их возможное участие в пищеварении рыб; некоторые представители известны как патогены рыб (<i>Aeromonas</i> , <i>Aeromonadales</i> , <i>Vibrio</i>), некоторые представители способны к восстановлению серы в анаэробных условиях	Kessel et al., 2011; Lv et al., 2014
Firmicutes	водно-болотные территории, местообитания с низкой соленостью, часть нормальной микробиоты живых организмов, некоторые представители – патогенны	способны к гидролизу различных источников углерода и утилизации растительного материала, обладают антибактериальной активностью, некоторые известны как патогены рыб	Hugenholtz et al., 1998; Kessel et al., 2011; Lv et al., 2014
Bacteroidetes	почва, донные отложения, морские и пресные воды, сточные воды очистных сооружений, часть	осуществляют ферментативный гидролиз олигосахаридов, поступающих из растительных материалов, обсуждается их	Kessel et al., 2011; Thomas et al., 2011

	нормальной микробиоты живых организмов	возможная роль в гидролизе пищевых субстратов растительных видов рыб	
Actinobacteria	почва, морские и пресные воды, загрязненные местообитания	вовлечены в регуляцию сложных соединений, таких как интерлейкины, синтезируемые лейкоцитами и являющиеся частью иммунной системы хозяина	Hughenoltz et al., 1998; Sanchez et al., 2012
Fusobacteria	патогены человека и животных, часть нормальной микробиоты рыб	участвуют в синтезе витамина B ₁₂ , сбраживании углеводов и некоторых аминокислот, некоторые представители являются патогенами, вызывая некроз и сепсис	Sugita et al., 1992; Bennett, Eley, 1993; Kessel et al., 2011;
Acidobacteria	почва, торфяные болота, горячие источники, кислые дренажные воды, пресные озера	известны как ацидофильные анаэробные гетеротрофы, гидролизующие ароматические соединения и ацетаты	Hughenoltz et al., 1998; Lv et al., 2014
Verrucomicrobia	почва, водные экосистемы, морские донные отложения, горячие источники, желудочно-кишечный тракт человека, некоторые представители могут выступать в	некоторые из этих бактерий способны окислять метан и использовать его в качестве единственного источника энергии	Wagner, Horn, 2006; Lee et al., 2009; Kessel et al., 2011; Lv et

	качестве симбионтов живых организмов		al., 2014
Planctomycetes	морские и пресные водоемы, почва, торфяные сфагновые болота, анаэробные источники, богатые соединениями серы, часть нормальной микробиоты живых организмов	живут за счет продуктов метаболизма других бактерий, вовлечены в метаболизм сложных соединений, участвуют в цикле азота	Wagner, Horn, 2006; Kessel et al., 2011; Sanchez et al., 2012; Lv et al., 2014
Deinococcus- Thermus	вулканические, высокотемпературные местообитания, также встречаются в почве, водных экосистемах	показано антиоксидантное действие бактерий <i>Deinococcus radiophilus</i> против перекисного окисления липидов низкой плотности, обладают устойчивостью к ионизирующему излучению, высоким температурам, известны своей термостабильной Taq-полимеразой	Hugenholtz et al., 1998; Barton et al., 2007
Thermotogae	вулканические, высокотемпературные среды местообитания низкой солености, прибрежные или глубоководные морские экосистемы,	способны использовать органические молекулы в качестве единственного источника энергии, а также усваивать углерод путем бродильного метаболизма	Hugenholtz et al., 1998; Barton et al., 2007

	континентальные системы нефтяных месторождений, часть нормальной микробиоты живых организмов		
--	---	--	--

1.2. Особенности экологии и биологии рыб оз. Чаны

В оз. М. Чаны и впадающих в него реках Каргат и Чулым обитают 15 видов рыб.

Класс Osteichthyes – Костные рыбы

Отряд Cypriniformes - Карпообразные

Семейство Cyprinidae – Карповые

Род *Carassius Jarocki, 1822 – Караси*

Серебряный карась *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) – типично озерная рыба, только иногда ее можно встретить в заливных старицах рек, курьях (Попов и др., 2005). Тело короткое, высокое, покрытое серебристой чешуей. Окраска спины темная, бока и брюхо – серебристые. Имеет длинный спинной плавник (14-19 лучей), крупную чешую, малое число лучей в анальном плавнике (5-6). Рот конечный, без усиков. Брюшина черная. Вид с огромным современным ареалом, охватывающим Евразию и Америку. Ареал простирается от Испании и Франции до Дальнего Востока, охватывая большую часть Европы и Азии (Атлас..., 2002). Питается планктоном, детритом, водорослями, личинками насекомых, червями и другими беспозвоночными. Половозрелым становится в возрасте 2-4 лет. Начало нереста приходится на последнюю декаду мая – первую декаду июля, когда температура воды достигает 14-18°C. Нерест порционный. Последующее икрометание происходит в июне-июле, возможно и в августе. В течение летнего сезона нерестует от одного до трех раз. Местами нереста служат прибрежные заросли тростника, камыша, осоки, гречихи земноводной, рдестов и другой растительности, а также свежее залитая луговая растительность до глубин 1,5-2 м, в зависимости от степени прогревания водоемов (Попов и др., 2005). Популяция этого вида часто состоит из одних самок, которые участвуют в нересте с самцами других видов карповых (сазан, золотой карась, линь). Сперматозоид проникает в яйцеклетку, не оплодотворяет ее, а лишь стимулирует ее развитие. В потомстве получаются одни самки (гиногенез) (Атлас..., 2002). Вид с высокой устойчивостью к минерализации воды и зимнему дефициту кислорода, является

эврифагом, и составляет серьезную конкуренцию на почве питания для многих видов местных рыб (Попов и др., 2005).

Класс Osteichthyes – Костные рыбы

Отряд Cypriniformes - Карпообразные

Семейство Cyprinidae – Карповые

Род Carassius Jarocki, 1822 - Караси

Золотой карась *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758). Имеет короткое тело, высокое, сжатое с боков, покрытое золотистого оттенка чешуей. Рот конечный, без усиков. Брюхо обычно не пигментировано. Число лучей в спинном плавнике – 14-21, чаще 15-19; в анальном – 5-8. Последние неветвистые лучи спинного и анального плавников в виде колючки, по заднему краю с мелкими зазубринами. Вид имеет широкий ареал в Европе и Сибири. Населяет озера, старицы, пруды. Более неприхотлив к дефициту кислорода, чем серебряный карась. Хорошо переносит промерзание и временное пересыхание водоемов, зарываясь глубоко в ил. Питается личинками хирономид (мотыль) и других насекомых, мелкими моллюсками, червями, водорослями, детритом. Половозрелость наступает на 4-5-м году жизни. Нерест порционный, в мае-июне при температуре воды не ниже 17-18°C, икрометание в 3-4 приема с перерывами в 10 дней. Типичный фитофил (Атлас..., 2002). В пределах озера Чаны немногочисленен. В оз. Малые Чаны его численность выше, встречается только на устьевых участках рек Чулым и Каргат (Попов и др., 2005).

Класс Osteichthyes – Костные рыбы

Отряд Cypriniformes - Карпообразные

Семейство Cyprinidae – Карповые

Род Cyprinus Linnaeus, 1758 – Карпы

Сазан, обыкновенный карп *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1759). Тело покрыто крупной плотно сидящей темно-желто-золотистой чешуей. У основания каждой чешуйки темное пятнышко, край чешуи окаймлен черной точечной полоской. Рот нижний, сильно выдвигной, с образованием хоботка. Рыло длинное, несколько притуплённое. Число лучей в спинном плавнике – 15-22; в

анальном – 5-6. В углах рта две пары коротких усиков. Современный ареал сазана и карпа в Евразии находится между 35 и 50° с.ш. и 30 и 135° в.д. Естественный ареал вида состоит из двух частей: 1) водоемы Понто-Каспийско-Аральского региона и 2) бассейн дальневосточных рек и рек Юго-Восточной Азии, от Амура на севере до Юньнаня (Китай) и Бирмы на юге. Молодь потребляет сначала зоопланктон, потом переходит на бентос. Взрослые рыбы питаются моллюсками, растительностью, личинками насекомых и др. Нерест порционный, с конца апреля по август (в зависимости от широты) при температуре воды 16-20°C и выше. Ценная крупная промысловая рыба и объект разведения в прудах (Атлас..., 2002). В оз. Чаны встречается по всей акватории (Попов и др., 2005).

Класс Osteichthyes – Костные рыбы

Отряд Cypriniformes - Карпообразные

Семейство Cyprinidae – Карповые

Род *Leuciscus* Cuvier (ex Klein), 1816 – Ельцы

Язь *Leuciscus idus* (Linnaeus, 1758). Тело умеренно удлинненное, голова небольшая, лоб выпуклый, рот косой, конечный. Окраска тела серебристо-желтоватая. Чешуя мелкая. Все плавники красноватого оттенка, особенно ярко окрашены брюшные и анальный. Анальный плавник выемчатый. Число лучей в спинном плавнике – 7-9, в анальном 9-12. Поедает падающих в воду насекомых, дождевых червей, личинок насекомых, мелких моллюсков и некрупных рыб (Атлас..., 2002). Распространен по всей акватории оз. Чаны, его биология в этом озере изучена хорошо. Считается фитофилом, откладывает икру на прошлогоднюю растительность на глубине 50-80 см в реках Чулым и Каргат и на мелководных прибрежных участках оз. Малые Чаны. По типу питания является бентофагом, также в рационе питания может встречаться молодь плотвы и окуня (Попов и др., 2005).

Класс Osteichthyes – Костные рыбы

Отряд Cypriniformes - Карпообразные

Семейство Cyprinidae – Карповые

Род *Leuciscus* Cuvier (ex Klein), 1816 – Ельцы

Елец *Leuciscus leuciscus* (Linnaeus, 1758) одна из обычных туводных рыб рек Сибири от Оби до Калымы (Никольский, 1954). Тело удлиненное, прогонистое, почти цилиндрическое. Имеет нижний рот, тупое и массивное рыло, которое меньше ширины лба. Спина темная, от серой до зеленоватой, бока и брюхо серебристые. Спинной и хвостовой плавники серые, а парные и анальный – желтоватые, во время нереста становятся ярче (оранжевые или красные). Число лучей в спинном плавнике – 7-8; в анальном – 7-9. Радужина глаза желтая (Атлас..., 2002). Продолжительность жизни не более 8-10 лет (Петлина, Романов, 2004). Питается в основном беспозвоночными – личинками комаров, ручейников, поденок. Летом поедает нитчатые водоросли и падающих в воду насекомых. Созревает в 2-3-летнем возрасте при длине тела 11-14 см. Нерестится во второй половине апреля при температуре воды 6-8°C. Икрометание на камни и гальку на перекатах. Нерест единовременный (Атлас..., 2002). В составе ихтиофауны в бассейне озера Чаны впервые отмечен 1995 году. Елец, являясь типичным реофилом, обитает в Каргате и Чулыме и в озеро заходит лишь изредка в прилегающие к устьям этих рек участки (Попов и др., 2005).

Класс Osteichthyes – Костные рыбы

Отряд Cypriniformes - Карпообразные

Семейство Cyprinidae – Карповые

Род *Rutilus* Rafmesque, 1820 – Плотвы

Плотва *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) населяет пресные и солоноватые воды Европы к востоку от Пиренеев и к северу от Альп, Сибири, бассейна Аральского моря. Тело удлиненное, умеренно сжатое с боков. Вид образует жилые (плотва) и полупроходные (вобла) формы. Рот конечный. Чешуя серебристо-белая, крупная, плотно сидящая. Радужина глаз – оранжево-красная. Все плавники, кроме спинного и хвостового, имеют оранжево-красноватый оттенок. В период нереста окраска становится интенсивнее, у самцов и крупных самок на теле появляются эпителиальные бугорки. Живет плотва в озерах и медленно текущих реках среди зарослей растительности. Стайная рыба. По

характеру питания – эврифаг. Взрослые особи питаются разнообразными беспозвоночными и их личинками, моллюсками, летом потребляют много нитчатых водорослей, а при обилии мальков крупная плотва питается личинками и мальками рыб. Половой зрелости плотва достигает в возрасте 3-5 лет. Типичный фитофил, икра приклеивается к растениям (Атлас..., 2002). Нерест во второй половине мая, особенно в его последней декаде (отмечены единичные случаи даже в начале июля) при температуре воды 8-12°C. Икринки слабо клейкие. Икрометание единовременное, нереститься большими стаями, в озерах нерест проходит шумно. Плотва имеет местное значение как объект промысла (Никольский, 1954). Плотва в озере Чаны обитает повсеместно. Нереститься плотва в разливах рек Чулым и Каргат, в многоводные годы – и на прибрежных участках Чиняихинского плеса. Питается плотва в озере как растительной, так и животной пищей (Попов и др., 2005).

Класс Osteichthyes

Отряд Perciformes – Окунеобразные

Семейство Percidae – Окуневые

Род Stizostedion Rafinesque, 1820 – Судаки

Обыкновенный судак, судак *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758). Тело удлиненное, сжатое с боков. Спина и верх головы зеленовато-серые, брюхо белое. На боках 8-12 буро-черных поперечных полос. На спинных и хвостовом плавниках ряды темных пятнышек, расположенных на перепонках между лучами. Парные и анальный плавники бледно-желтые. Рот большой, верхняя челюсть заходит за вертикаль заднего края глаза. Судак населяет как пресные, так и солоноватые воды. Образует полупроходные формы. Пелагический хищник, обитающий в открытой зоне озер и водохранилищ. Молодь в первые месяцы жизни питается зоопланктоном, который вскоре заменяется нектобентическими ракообразными (мизидами, гаммаридами, изоподами) и молодью других рыб. Пищу взрослого судака составляют мелкие массовые виды рыб (Атлас..., 2003). Половозрелым судак становится в возрасте 3+, 4+ (Никольский, 1954). Нерест судака происходит в мае при температуре воды 10-14°C. Икра откладывается в

специальные гнезда, которые имеют вид ямки в поперечнике около полуметра и глубиной 4-5 см (Никольский, 1954). В первый месяц судак питается зоопланктоном, но уже на втором месяце переходит на питание молодью рыб (Никольский, 1954). Судак впервые вселен в оз. Чаны в 1962– 964 гг., главным образом с целью борьбы тугорослой плотвой и мелким окунем (Попов и др., 2005).

Класс Osteichthyes

Отряд Perciformes – Окунеобразные

Семейство Percidae – Окуневые

Род *Perca* Linnaeus, 1758 - Пресноводные окуни

Речной окунь, окунь *Perca fluviatilis* (Linnaeus, 1758). Тело сжато с боков, покрыто мелкой ктеноидной чешуей, щеки целиком в чешуе. Тело зеленовато-желтое, на боках 5–9 поперечных черных полос. Первый спинной плавник серый, на его конце черное пятно; второй спинной – зеленовато-желтый, грудные плавники – желтые, иногда красные. В оз. Чаны окунь распространен повсеместно, хотя и неравномерно. Половой зрелости достигает в возрасте 3–4 года. Активный нерест продолжается 3–5 суток при температуре воды 12–15°C (Попов и др., 2005). Окунь питается зоопланктоном, бентосными организмами, молодью разных видов рыб. В связи с определенным составом кормовой базы водоема характер питания окуня сильно различается. В некоторых водоемах окунь в течение всей жизни потребляет зоопланктон, в других – остается бентофагом, или ведет преимущественно хищный образ жизни (Атлас..., 2003).

Класс Osteichthyes – Костные рыбы

Отряд Salmoniformes - Лососеобразные

Семейство Esocidae – Щуковые

Род *Esox* Linnaeus, 1758 – Щуки

Обыкновенная щука *Esox lucius* (Linnaeus, 1758). Имеет удлиненное, торпедообразное, несколько сжатое с боков тело. Голова большая, с сильно вытянутым и слегка сплюснутым рылом. Окраска тела бурая с поперечными серо-зелеными или белыми полосами, иногда разбитые на отдельные пятна. В

реках обитает в прибрежной зарослевой зоне, в крупных озерах – после достижения половой зрелости. Ведет исключительно хищный образ жизни. Молодь в первые месяцы жизни питается зоопланктоном, в дальнейшем переходит на питание молодью рыб, преимущественно карповых и окуневых. Нерест бывает рано весной при температуре воды 3-6°C сразу же за распадением льда в прибрежной мелководной зоне на глубине 10-30 см (Атлас..., 2002). Встречается повсеместно в оз. Чаны, однако в связи с падением уровня воды, популяция снизилась. Основные места обитания – реки Чулым и Каргат, в которых она нереститься, а также слабоминерализованные в период открытой воды участки озера, прилегающие к устьям этих рек (Попов и др., 2005).

1.3. Физико-географическая характеристика района исследования

Озеро Чаны расположено на Барабинской равнине и является самым крупным озером на юге Сибири (Пульсирующее..., 1982; Васильев и др., 2005). Чановская озерная система включает озера Большие и Малые Чаны и расположенные поблизости водоемы, а также впадающие в них реки Каргат и Чулым (рис. 1) (Булатов и др., 2005).

Площадь водосборного бассейна равна 29930 км², величина акватории (2004 г.) составляет около 1500 км², глубины на разных участках колеблются от 1.4 – 1.9 м (юго-восточная часть озера) до 4.8 – 8.5 м (южная часть озера) (Васильев и др., 2005). Озеро расположено в лесостепной и степной зонах Западно-Сибирской равнины. В гидрологическом отношении эти зоны характеризуются малым поверхностным стоком и слабо разветвленной речной сетью, представленной большей частью временными водотоками с малым уклоном (обычно менее 0.1 %) и исключительно слабым течением (Пульсирующее..., 1982).

Питание рек происходит за счет таяния снега, поэтому весеннее половодье высокое и короткое. В летний период многие реки пересыхают. Колебания общей увлажненности территории особенно ярко выражаются на границе степной и лесостепной зоны, где расположено оз. Чаны. Это находит отражение в

колебаниях его уровня и внутриводных процессах. Основное питание оз. Чаны получает за счет стока рек Каргат и Чулым, впадающих в озеро с юго-востока, но дренирующих мощные заболоченные территории к северо-востоку от озера (Экология..., 1986). Озеро Чаны имеет сложную плановую конфигурацию и разделяется на несколько относительно самостоятельных лимносистем, которые получили название «песов». В его состав в настоящее время входят Ярковский, Тагано-Казанценский, Чиняихинский плесы, оз. Яркуль, соединяющееся с Чанами двумя каналами длиной около 1 км, выходящими в Чиняихинский плес, а также озеро Малые Чаны, соединяющееся с Чиняихинским плесом протокой Кожурла протяженностью около 7 км. Все плесы находятся в тесном гидрологическом взаимодействии (Савкин и др., 2005).

Воды озера Чаны по классификации О.А. Алекина относятся к солоноватым хлоридного класса натриевой группы третьего типа (Алекин, 1953). Химический состав воды озера сформировался в условиях засушливого полуаридного климата. Вследствие превышения испарения над осадками в бессточном оз. Чаны аккумулируются соли, вносимые в него реками Чулым и Каргат. Одной из особенностей гидрохимического режима озера является неоднородность минерализации и ионного состава воды по акватории, что объясняется морфологией его котловины, бессточностью, низким водообменом между частями озера и распресняющим действием рек Чулым и Каргат. Самая низкая минерализация вод свойственна оз. Малые Чаны – 0.8–5.3 г/дм³. Воды озера имеют щелочную реакцию. Особенно часто наблюдаемые значения рН 8.8-9.0. Величины рН изменяются в очень узком диапазоне, что можно объяснить высокой буферной емкостью воды. Основной вклад в минерализацию воды оз. Чаны вносят ионы натрия и хлора (Савкин и др., 2005). Неравномерность по пространству и непостоянство солевого приноса, резкие колебания климата и обводненности способствует специфическим особенностям почвообразования. Они выражены в контрастности (резкой смене на уровне типов почв на коротких отрезках), комплексности (частой смене почвенных выделов, их мелкоконтурности) и интенсивных эволюционно динамических проявлениях,

вплоть до смены типа почв во времени и пространстве (например, превращение луговых почв в солончаки со значительными вариациями по площади распространения год от года) (Васильев и др., 2005).

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Характеристика объектов исследования и отбор образцов

Сбор материала проводили на территории эстуарной части озера Малые Чаны – нижнее течение р. Каргат (Новосибирская область, Россия, 54°37' N, 78°09' E), в июне 2011 г. в точке А; с апреля по октябрь 2012 г. в точках А и Б (рис. 1).

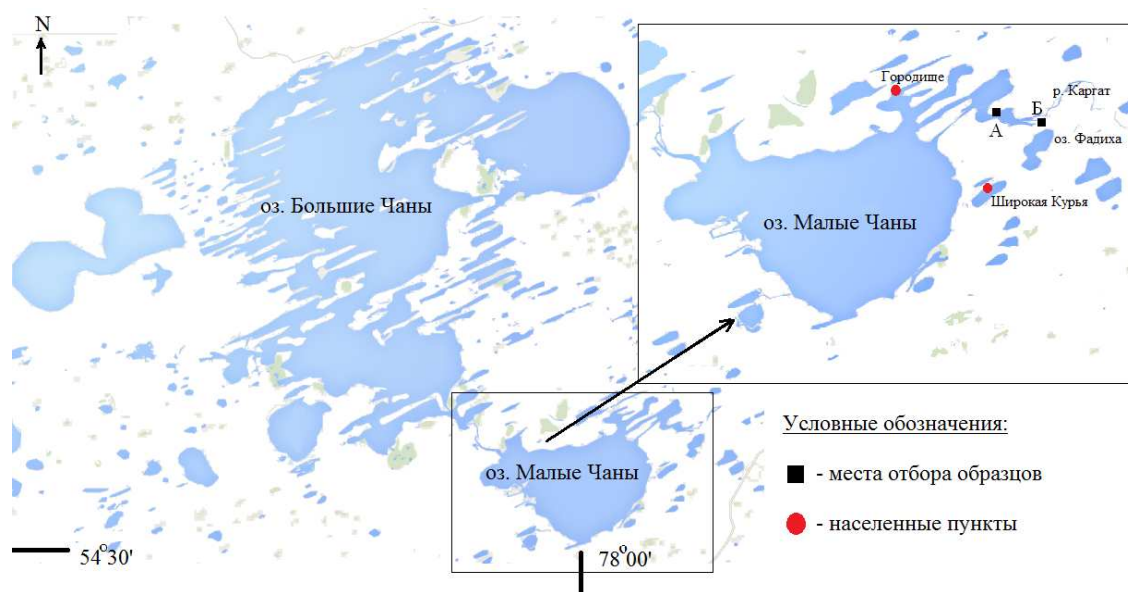


Рисунок 1. Места отбора образцов.

Для сравнения состава микробиоты в работе использовали 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) и щука *Esox lucius* (Linnaeus, 1758). Кишечная микробиота исследована у 227-и особей рыб (см. приложение, список 1).

Молодь рыб отлавливали мальковым бреднем (размер ячеи 6 мм); половозрелых особей – жаберными сетями (№45, 55, 65). Личинок рыб отлавливали сачком из мельничного газа. Живых рыб в пластиковых контейнерах доставляли в лабораторию, умерщвляли, перерезая позвоночник позади головы, и

измеряли стандартную длину и массу тела. Перед вскрытием кожные покровы рыб освобождали от слизи ватным тампоном, дезинфицировали спиртом и с помощью стерильных инструментов разрезали брюшную полость, извлекали кишечный тракт. Отдельно проводили анализ слизистой и содержимого кишечника. Для этого кишечник с внешней стороны обрабатывали спиртом, в стерильных условиях разрезали вдоль, освобождали от пищевого комка и шпателем снимали верхний слой слизистой. Аналогичные процедуры проводили при взятии образцов желудка. Препарирование личинок рыб проводили в асептических условиях под бинокуляром.

Отбор воды, грунта и тростника проводили в месте отлова рыб в 3-х повторностях с последующим их объединением. Воду отбирали из поверхностного слоя в стерильный стеклянный сосуд, который предварительно ополаскивали три раза природной водой, заполняли полностью под крышку. Затем воду фильтровали (от 30 до 100 мл в зависимости от прозрачности и мутности воды) через бактериальный фильтр, с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore, EXPRESS PLUS™ полиэфирсульфон) с помощью стеклянной фильтровальной установки. Грунт (5 г) собран на мелководье с помощью дночерпателя, соскобы с подводных частей тростника – в стерильные колбы с завинчивающейся крышкой. Выбор компонентов питания для сравнительного анализа основывали на анализе спектра питания рыб. Беспозвоночные и их личинки собраны согласно общепринятым методикам (Руководство..., 1992) в месте отлова рыб.

Для выделения тотальной ДНК образцы слизистой и содержимого разных органов, воды, грунта и тростника фиксировали в лизирующем растворе коммерческого набора на сорбенте – ДНК-сорб В (МФГУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия). Объекты питания 3 раза промывали в стерильной дистиллированной воде, и один раз промачивали в 75% спирте для исключения поверхностной микробиоты и далее фиксировали целиком в том же лизирующем растворе. Все образцы механически растирали гомогенизатором в пробирке эппендорф и далее проводили процедуру выделения ДНК. Выделение ДНК

проводили согласно протоколу, с небольшими модификациями. Количество образцов и используемые методы исследования представлены в таблице 3. Размерные характеристики используемых в работе рыб представлены в приложении (список 2).

Таблица 3.

Характеристика объектов исследования

Место и дата сбора образцов	Объект исследования	Количество (экз.)	Методы исследования
Рыбы			
Точка А. р. Каргат, 2011, 2012 гг.	Серебряный карась	52	групп-специфичная ПЦР
	Окунь	32	
Точка А. р. Каргат; точка Б. оз. Малые Чаны, 2011, 2012 гг.	Серебряный карась	58	групп-специфичная ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, метагеномное секвенирование
Точка А. р. Каргат; точка Б. оз. Малые Чаны, апрель-октябрь 2012 г.	Окунь	47	метагеномное секвенирование
Точка Б. оз. Малые Чаны, июнь-июль 2012 г.	Плотва	5	
	Язь	7	
	Судак	4	
	Золотой карась	4	
	Елец	5	

	Сазан	13	
Компоненты окружающей среды			
Точка А. р. Каргат; точка Б. Оз. Малые Чаны, апрель-октябрь 2012 г.	Вода	9	групп-специфичная ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, метагеномное секвенирование
	Грунт	8	
	Тростник обыкновенный (<i>Phragmites australis</i>)	6	
Компоненты питания рыб			
Точка Б. оз. Малые Чаны, июнь-июль 2012 г.	Личинка хирономиды (<i>Chironomidae</i>)	8	групп-специфичная ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, метагеномное секвенирование
	Дафния (<i>Daphniidae</i>)	9	
	Гребляк (<i>Corixidae</i>)	3	
	Гладыш (<i>Notonectidae</i>)	2	
	Гаммарус (<i>Gammaridae</i>)	1	
	Личинка ручейника (<i>Trichoptera</i>)	2	
			метагеномное секвенирование

2.2. Методы исследования кишечной микробиоты рыб

2.2.1. Выделение ДНК

Выделение ДНК на сорбентах. В пробирку с лизирующим раствором (300 мкл) помещали образец ткани, тщательно перемешивали на вортексе, прогревали 5 мин при температуре 65°C. Пробы гомогенизировали механическим

гомогенизатором и далее центрифугировали в течение 5 мин при 10000-12000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку. К надосадочной жидкости добавляли 25 мкл сорбента, суспендировали на вортексе, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 30 сек. Далее проводили серию отмывок сорбента с ДНК от белков, солей и других ингибиторов ПЦР согласно протоколу. Отмытый сорбент подсушивали 10 мин при 65°C, для элюирования ДНК добавляли 25 мкл ТЕ-буфера (10 mM трис-HCl, pH=7.5; 1 mM ЭДТА) и освобождали ДНК от силикагеля центрифугированием (12000 об/мин в течение 1 мин).

2.2.2. Групп-специфичная ПЦР

Для групп-специфичной ПЦР использовали праймеры, комплиментарные фрагменту гена 16S рРНК на основные филогенетические группы бактерий (табл. 4). В состав реакционной смеси (объем 10 мкл) для проведения полимеразной цепной реакции входили следующие компоненты: 1×ПЦР буфер (pH=8.8), 2.5 mM MgCl₂, 1 mM дНТФ, два праймера (по 10 пмоль каждого), *Taq* ДНК-полимераза (1 ед. акт.) и от 10 до 50 нг ДНК. Режим амплификации был следующим: предварительная денатурация матрицы (ДНК) 94°C – 3 мин; денатурация матрицы 94°C – 45 сек, отжиг праймеров при специфичной температуре (табл. 4) – 45 сек, элонгация 72°C – 1 мин (35 циклов); постэлонгация 72°C – 3 мин. Продукты амплификации детектировали с помощью электрофореза в 1.5 % агарозном геле в 1×ТАЕ с добавлением этидиум бромид (до конечной концентрации 2 мкг/мл). Ампликоны визуализировали в ультрафиолетовом свете на трансэлюминаторе (ЕСХ-26.МХ).

Консервативные и групп-специфичные праймеры, используемые для ПЦР

Таксон	Праймер (5'-3')	Длина ампликона (пн)	T _A , °C	Источник
Eubacteria	500F: CGTGCCAGCAGCCGCGGТАА	850	52	Денисова и др.,1999; Белькова, 2008;
	1350R: GACGGGCGGTGTGTACAAG			
Euryarchaeota	109F: ACKGCTCAGТАACACGT	849	52	Grosskopf et al., 1998; DeLong, 1992
	958R: YCCGGCGTTGAMТССАATT			
Firmicutes	500F: CGTGCCAGCAGCCGCGGТАА	540	58	Денисова и др.,1999; Белькова, 2008; Bacchetti De Gregoris et al., 2011
	1040R: ACCATGCACCACCTGTC			
Alphaproteobacteria	35F: CTGGCTCAGAYCGAACG	650	58	Manz et al., 1992; Wagner et al., 1993; Lane, 1991; Fierer et al., 2005
	685R: TCTACGRATTTCACCYCTAC			
Betaproteobacteria	359F: GGGGAATTTTGGACAATGGG	323	58	Ashelford et al., 2002; Muhling et al., 2008
	682R: ACGCATTTCACTGCTACACG			
Gammaproteobacteria	395F: CMATGCCGCGTGTGTGAA	476	58	Ashelford et al., 2002; Muhling et al.,2008
	871R: ACTCCCCAGGCGGTCDACTTA			
Planctomycetes	352F: GGCTGCAGTCGAGRATCT	568	58	Ashelford et al., 2002; Muhling et al., 2008
	920R: TGTGTGAGCCCCCGTCAA			

Verrucomicrobia	540F: ATCACTGGGCGTAAAGGGAG	810	58	Денисова и др.,1999; Белькова, 2008; Nesbø et al., 2010;
	1350R: GACGGGCGGTGTGTACAAG			
Cyanobacteria	106F: CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	679	58	Nubel et al. 1997; Muhling et al., 2008
	785R: GACTACWGGGGTATCTAATCC			
Bacteroidetes	CF319F: GТАCTGAGACACGGACCA	1031	58	Денисова и др.,1999; Белькова, 2008; Manz et al., 1996;
	1350R: GACGGGCGGTGTGTACAAG			
Actinobacteria	500F: CGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	700	58	Денисова и др.,1999; Белькова, 2008; Vacchetti De Gregoris et al., 2011
	1200 R: TCRTCCCCACCTTCCTCCG			

2.2.3. Секвенирование по Сэнгеру

Ампликоны для клонирования фрагмента рибосомного гена малой субъединицы (16S рРНК) получали на паре консервативных бактериальных праймеров 500F-1350R (табл. 4). Режим амплификации проводили по описанным выше методикам. Продукты реакции вырезали из геля и элюировали замораживанием-оттаиванием, элюент использовали для дальнейшего анализа. Для реакции затупления концов к ампликону (3.5 мкл) добавляли 5 мкл 2× реакционного буфера и 0.5 мкл фермента DNA Blunting из набора CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania), смесь инкубировали при 70°C 5 минут, и затем охлаждали. Сразу после этого, для реакции лигирования к реакционной смеси добавляли по 0.5 мкл вектора pJET1/blunt и фермента T4 ДНК-лигазы, лигазную смесь инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Полученную смесь использовали для трансформации клеток *Escherichia coli*. Компетентные клетки *E. coli* (штамм DH-5a) получали по методике трансформации CaCl₂-зависимых клеток (Sambrook et al., 1989). Клетки *E. coli* поддерживали на чашках с минимальной средой M9 (на 100 мл воды: 0.6 г Na₂HPO₄; 0.3 г KH₂PO₄; 0.05 г NaCl; 0.1 г NH₄Cl; 1.5 г агара; 0.2 мл 1 М MgSO₄; 0.01 мл 10% CaCl₂; 0.75 мл 40% глюкозы) при температуре +4°C. Для получения ночной культуры делали посев 3-5 мм штриха бактерий *E. coli* в жидкую среду LB (на 100 мл воды: 0.5 г дрожжевого экстракта, 1 г триптона, 1 г NaCl) и инкубировали в термостате при 37°C. После этого, 100 мкл свежей ночной культуры бактерий инкубировали в среде LB, в термостате при 37°C и постоянной аэрации (225 об/мин) до оптической плотности 0.3-0.4 (длина волны 590 нм, кювета 1 см). После достижения требуемой оптической плотности 1 мл клеточной суспензии охлаждали в течение 15 мин в ледяной бане и центрифугировали при 4°C, 7000 об/мин, 5 мин. После центрифугирования супернатант сливали, клетки промывали 1 мл охлажденного 0.1М CaCl₂, мягко перемешивали покачиванием вверх-вниз и выдерживали 20 мин во льду. Клеточную суспензию центрифугировали при аналогичных условиях. После центрифугирования

надосадочную жидкость удаляли и к осадку добавляли 100 мкл охлажденного 0.1M CaCl₂, процедуру инкубирования и центрифугирования повторяли. Для трансформации к полученной смеси добавляли 1 мкл лигазной смеси, выдерживали 20 мин во льду. Далее проводили тепловой шок при 42°C в течение 90 с, после чего выдерживали в ледяной бане 2 мин. К суспензии добавляли 500 мкл среды SOC, прогретой при 37°C (на 100 мкл воды: 0,5 г дрожжевого экстракта, 2 г триптона, 500 мкл 2M NaCl, 125 мкл 2M KCl, 0.48 мл 1M MgSO₄, 1 мл 1M MgCl₂, 0.75 мл 40% глюкозы), мягко перемешивали покачиванием вверх-вниз и инкубировали при 37°C, 250 об/мин, 60 мин.

Поверхностный посев трансформированных клеток (100 мкл) производили на твердую среду LB с ампициллином (на 100 мл воды: 0.5 г дрожжевого экстракта; 1 г триптона; 1 г NaCl; 1.5 г агара; 50 мкг/мл ампициллина) и инкубировали 10–12 часов при 37°C. Анализ рекомбинантных клонов на наличие вставки проводили амплификацией колоний (лизат прокипяченных клеток) с плазмидными праймерами pJet 1.2 F и pJet 1.2 R, поставляемыми с набором в следующем режиме: 94°C – 2 мин (1 цикл); 92°C – 45 сек, 55°C – 45 сек, 72°C – 60 сек (30 циклов); 72°C – 5 мин (1 цикл). Далее полученные ампликоны анализировали электрофорезом в 1,5% агарозном геле. Для секвенирования по Сэнгеру целевые ампликоны вырезали из геля и элюировали. Нуклеотидную последовательность рекомбинантных клонов определяли с использованием набора для термоциклического секвенирования Big DyeTM Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem, США). Продукты реакции анализировали с использованием автоматического секвенатора ABI Prism Genetic Analyzer 3730XL (Applied Biosystem, США, Hitachi, Япония).

2.2.4. Метагеномное секвенирование

Выделение ДНК для метагеномного секвенирования проводили по выше описанной методике. Для всех образцов слизистой, содержимого различных органов, объектов питания, воды и грунта готовили суммарные образцы. Общее

количество образцов смотри в приложении 2. Для приготовления суммарных образцов использовали эквимолярные концентрации ДНК каждого образца.

Вариабельные участки V3 и V4 гена 16S рРНК амплифицировали с универсальными праймерами 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al., 2012). Для амплификации в состав реакционной смеси (50 мкл) входили следующие компоненты: 0.7 ед. акт. ДНК-полимеразы Phusion Hot Start II High-Fidelity, 1× буфер Phusion GC buffer (Thermo Fisher Scientific), 0.2 мкМ прямого и обратного праймера, 10 нг ДНК, 2.3 мМ MgCl₂ (Sigma-Aldrich) и 0.2 мМ каждого дНТФ (Life Technologies). Температурный режим амплификации следующий: изначальная денатурация матрицы при 98°C 1 мин – 1 цикл, 98°C – 15 сек, 62°C – 15 сек, 72 °C – 15 сек (30 циклов), и постэлонгация при 72°C 10 мин. Далее 200 нг ПЦР-продукта из каждого образца объединены вместе и очищены с использованием коммерческого набора MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen). Библиотеку образцов готовили согласно протоколу MiSeq Protocol (Illumina) (Caporaso et al., 2011; Caporaso et al., 2012).

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).

2.3. Биоинформационный анализ данных

Секвенирование по Сэнгеру. 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/>).

Метагеномное секвенирование. Прочтения с обоих концов, полученных после метагеномного секвенирования в формате необработанных файлов Illumina fastaq, были собраны и отфильтрованы с использованием программного

обеспечения Mothur 1.31.2 (Schloss et al., 2009). Для исключения химер, ОТЕ кластеризации и установления таксономии использовали пакет программного обеспечения QIIME 1.8.0 (Caporaso et al., 2010). Кластеризацию прочтений в ОТЕ группы проводили с использованием пакета QIIME UCLUST (с пороговым значением 97%). Таксономическую принадлежность репрезентативной последовательности каждой операционной таксономической единицы проводили с помощью пакета RDP classifier (с пороговым значением 0.80).

Полученные ОТЕ после фильтрации и присвоения таксономической принадлежности использовали для подсчета альфа- и бета-разнообразия. Расчет коэффициентов разнообразия (Шеннон (H) и Симпсон) проводили с помощью программного обеспечения QIIME 1.8.0. по ранее описанным методам (Caporaso et al., 2010). Для подсчета индекса Брея-Кёртиса (D_{B-C}) и критерия суммы рангов Уилкоксона (Манна-Уитни) для двух независимых выборок использовали программу Explicitet 2.9.4 (Robertson et al., 2013).

Для выявления естественной структуры группировки метагеномных данных проводили кластерный анализ с использованием алгоритма невзвешенного попарного среднего (UPGMA) в программе PAST, версия 1.93 (Hammer et al. 2001). В той же программе проводили однофакторный ANOSIM (анализ сходства), анализ относительного (процентного) вклада отдельных операционных таксонообразующих единиц в различие между группами (SIMPER), а также построение кривых разрежения сообщества и подсчет индекса Мористы-Хорна (D_{M-H}). Неметрическое многомерное шкалирование (nMDS) проводили с использованием пакета программного обеспечения phyloseq (McMurdie, Holmes, 2013). С помощью программы STATISTICA проводили дисперсионный анализ (однофакторный ANOVA).

Частоту встречаемости пищевых компонентов рассчитывали по формуле:

$$p = \frac{n_i}{n}$$

где, p – частота встречаемости компонентов; n_i – число особей с i -ым видом корма; n – общее число особей данной группы (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.

2.4. Определение спектра питания рыб разных экологических групп

Для определения спектра питания рыб, содержимое кишечника фиксировали в 70% спирте. Определение проводили до максимально возможного распознаваемого таксономического уровня при увеличении бинокля от 40× до 400×. Для определения таксономической принадлежности пресноводных беспозвоночных использовали стандартные определители (Определитель..., 1977; Определитель..., 1995). Всего в работе 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, 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, Bulnidae, 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

Известно, что рыбы сильно различаются по характеру потребляемой пищи. Каждый вид рыб приспособлен к питанию определенным кормом. По типу потребляемой пищи рыб принято делить на растительноядных, животнойядных и хищных (Никольский, 1954). По предпочитаемым кормовым объектам рыб разделяют на эврифагов, планктофагов, бентофагов, ихтиофагов и других (Кузьмина, 2005; Rust, 2002). Потребление рыбами разнообразных пищевых компонентов отражается на морфо-физиологических характеристиках их желудочно-кишечного тракта, развитии приспособлений для поиска пищи, а также поведении. Известно, что тип питания в аспектах микробной экологии, обуславливает различное соотношение тех или иных групп микроорганизмов в пищеварительном тракте рыб (Шивокене, 1989; Кузьмина, 2005). Для изучения разнообразия микробиоты пищеварительного тракта рыб разных экологических групп, а также сравнения и интерпретации полученных результатов, необходимы сведения об их пищевых предпочтениях.

Озеро М. Чаны – эвтрофное озеро Западной Сибири (Aladin, Plotnikov, 1993), характеризующееся постоянством обилия и разнообразия зообентосных и зоопланктонных сообществ, подверженных небольшим флуктуациям в связи с изменениями уровня воды и солености водоема (Безматерных, 2005; Ермолаева, Бурмистрова, 2005).

В составе зоопланктонного сообщества оз. Чаны доминируют клadoцеры (*Daphnia longispina*, *Daphnia cucullata*, *Daphnia magna*, *Chydorus sphaericus*, *Diaphanosoma brachyurum*, *Leptodora kindtii*, *Bythotrephes longimanus*), копеподы (*Mesocyclops leuckarti*, *Cyclops strenuous*, *Acanthocyclops viridis*), а также коловратки (*Asplanchna priodonta*, *Notholca acuminata*, *Filinia terminalis*, *Keratella quadrata*). В составе зообентосного сообщества – двукрылые, личинки амфибиотических насекомых (в основном *Ephemeroptera*, *Odonata* и *Trichoptera*), гаммариды (*Gammarus lacustris*), моллюски и олигохеты (Мисейко, Михалина, 2003; Безматерных, 2005; Kanaya et al., 2009).

3.1. Анализ питания рыб оз. Чаны

Для анализа питания рыб разных экологических групп в оз. Чаны исследовано восемь видов рыб (серебряный карась, золотой карась, плотва, елец, судак, язь, сазан, окунь). Спектр питания рыб разных экологических групп в оз. Чаны на период исследования (апрель–май 2012 г.) представлен следующими компонентами: личинки и куколки поденок, личинки и остатки взрослых насекомых, личинки стрекоз, гаммарусы, детрит, личинки и куколки хирономид, ручейники, нематоды, моллюски, яйца дафний, ракушковые рачки, хидорусы, макрофиты, битотрефесы, пиявки, рыбы и их икра (рис. 2). 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). 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. Для анализа степени сходства спектра питания разных видов рыб рассчитан индекс Мористы-Хорна (табл. 5). На основании расчетов выявлены 3 группы рыб. В первую группу объединяются серебряный карась, золотой карась и сазан ($0.7 < D_{M-H} < 0.85$), во вторую – плотва, елец и язь ($0.66 < D_{M-H} < 0.89$), в третью – окунь и судак ($D_{M-H} = 0.75$). По нашим данным серебряный карась по типу питания относится к всеядным видам рыб, в рацион питания которого входят как растительный, так и животный материал, а также детрит (Penttinen, Holopainen, 1992). Схожие спектры питания золотого карася и сазана, их рацион в основном представлен детритом и личинками хирономид. Елец, плотва и язь в оз. Чаны больше тяготеют к рациону планктофагов-бентофагов, в питании этих видов рыб в большом количестве присутствовали зоопланктонные и бентосные организмы. Полученные данные о характере питания окуня и судака также подтверждают пищевые предпочтения

этих рыб, которые были получены для других водоемов (Popova, Sytina, 1977; Guma'a, 1978; Whiteside et al., 1985; Sutela, Nyvarinen, 2002; Ginter et al., 2012a, b).

Таблица 5.

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

3.2. Сезонные изменения спектра питания некоторых видов рыб оз. Чаны (на примере серебряного карася и окуня)

На примере серебряного карася и окуня проанализировано изменение спектра питания в течение сезона (рис. 3). В весенний период (апрель-май) серебряный карась питается разнообразной пищей (личинки и остатки взрослых насекомых, личинки стрекоз, гаммарус, детрит, личинки и куколки хирономид, ручейники, нематоды, моллюски, яйца дафний, ракушковые рачки, хидорусы, фитопланктон и макрофиты). Основу рациона серебряного карася в этот период составили детрит и личинки и куколки хирономид (21.9 и 12.0%, соответственно), в меньшей степени представлены моллюски (9.9%), яйца дафний (10.0%) и ракушковые рачки (10.0%). Доля остальных компонентов питания не превышала 10%.

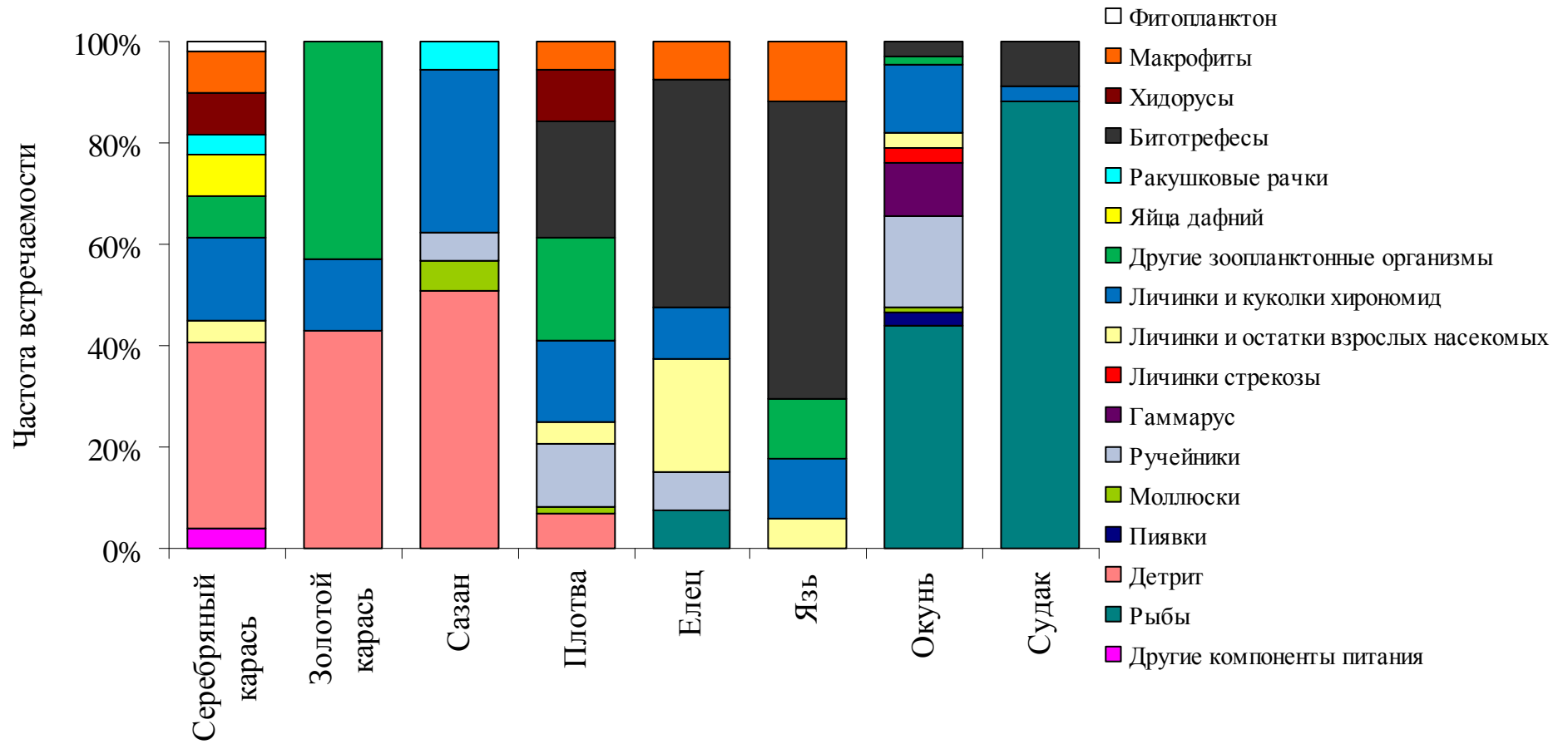


Рисунок 2. Спектр питания рыб разных экологических групп в оз. Чаны в летний период (июнь-июль).

В летний период (с июня по июль) в рационе серебряного карася увеличивается доля детрита (36.0%), личинок и куколок хирономид (24.0%), появляются макрофиты (7.9%), но отсутствуют личинки стрекоз, гаммарус, ручейники, нематоды и моллюски по сравнению с весенним периодом. В августе в питании серебряного карася встречались только три компонента питания – детрит, зоопланктон и фитопланктон (44.4, 27.8 и 27.8%, соответственно). В осенний период (октябрь) из компонентов питания в основном встречаются эфиппидальные яйца дафний (26.6%), детрит (26.6%), хидорусы (22.2%) и хирономиды (11.1%). В меньшей степени – ракушковые рачки (4.4%) и фитопланктон (4.4%). Рацион питания окуня в весенний период также разнообразен и включал следующие компоненты: личинки и куколки поденок, личинки и остатки взрослых насекомых, личинки стрекоз, гаммарус, детрит, личинки и куколки хирономид, ручейники, нематоды, макрофиты, пиявки, рыбы и их икра. В этот период в питании доминировали личинки и куколки поденок, а также ручейники (15.4 и 14.2%, соответственно). На втором месте по степени встречаемости – гаммарусы (11.8%), личинки и куколки хирономид (11.8%) и детрит (9.8%). В летний и осенний периоды рацион не так разнообразен. В июне-июле 42.9% рациона составляла молодь рыб (преимущественно представители семейства карповых), в меньшей степени ручейники (17.7%), личинки и куколки хирономид (13.0%) и гаммарусы (11%). На протяжении всего сезона в питании окуня постоянно встречались рыбы, личинки и остатки взрослых насекомых, личинки и куколки хирономид. 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 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).

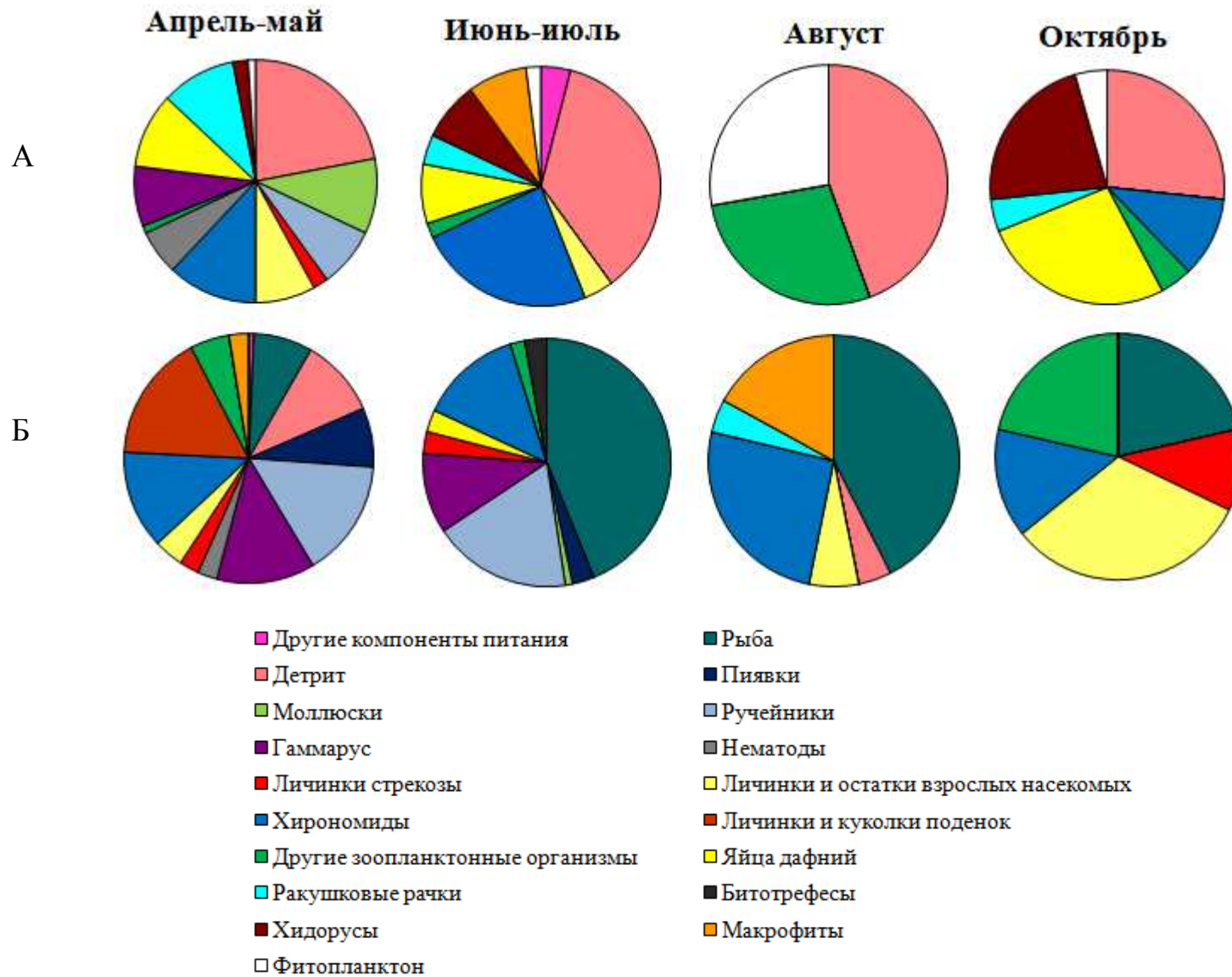


Рисунок 3.Сезонные изменения в спектре питания серебряного карася (а) и окуня (б) в оз. Чаны.

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

Кишечную микробиоту изучают с помощью различных подходов, к которым относятся молекулярно-генетические методы, а также приемы культивирования бактерий с использованием физиолого-биохимических маркеров для их идентификации. Традиционные методы исследования кишечной микробиоты рыб заключаются в культивировании бактерий на селективных средах. Однако показано, что с помощью этих методов более 70% кишечной микробиоты не удается культивировать и идентифицировать (Trust, 1975; Sugita, 1988; Mac Cormack, Fraile, 1990; Ringo, Olsen, 1999; Cani, 2013). Для решения проблемы идентификации некультивируемых таксонов в настоящее время широко используются молекулярно-генетические методы. Подобные подходы основаны на анализе генов 16S рибосомной РНК (rRNA), и позволяют идентифицировать, в том числе, и некультивируемые бактерии. Варибельные участки 16S rDNA уникальны для некоторых видов и штаммов и широко используются для их идентификации (Chakravorty et al., 2007; Vilo et al., 2012; Cani, 2013).

Для изучения разнообразия микробиоты используют денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE) (Romero, Navarrete, 2006; McIntosh et al., 2008; Montet et al., 2008; Mouchet et al., 2011; Silva et al., 2011), температурный градиентный гель-электрофорез (TGGE) (Uchii et al., 2006; Navarrete et al., 2009; Navarrete et al., 2012) флуоресцентную гибридизацию *in situ*, или метод FISH (Huber et al., 2004), секвенирование по Сэнгеру (Kim et al., 2007; Navarrete et al., 2009; Ward et al., 2009; Han et al., 2010; Roeselers et al., 2011; Xing et al., 2013), 16S PCR-TRFLP (Liu et al., 1997; Blackwood et al., 2005; Navarrete et al., 2010; Roeselers et al., 2011).

Секвенирование нового поколения на различных технологических платформах для анализа микробного сообщества в настоящее время приобретает все большую популярность в связи с доступностью и легкостью его использования. Не смотря на большой прогресс в области секвенирования, на сегодняшний день существующие представления о составе и численности кишечной микробиоты многих позвоночных животных, в том числе и рыб, не отражают их реального разнообразия (Kirk et al., 2004; Han et al., 2010; Wu et al., 2012; Fakruddin, Mannan, 2013).

На примере микробных сообществ, ассоциированных с кишечником серебряного карася (*Carassius auratus*) и компонентами окружающей среды в данной главе рассматривается анализ репрезентативности данных, получаемых с использованием различных молекулярно-генетических методов (ПЦР-скрининга, клонирования и высокопроизводительного секвенирования 16S рДНК).

4.1. Групп-специфичная ПЦР

Один из наиболее доступных подходов в молекулярной диагностике является групп-специфичная ПЦР, с использованием специфичных праймеров, комплиментарных фрагменту гена 16S рРНК на основные домены, такие как Bacteria и Archaea (Blackwood et al., 2005; Marchesi et al., 2008; Muhling et al., 2008). Групп-специфичная ПЦР – эффективный подход, позволяющий провести быстрый скрининг изменений в составе доминирующих видов бактериальных сообществ воды, почвы, а также нормальной и патогенной микробиоты рыб (Fierer et al., 2005; Smith et al., 2012; Piterina, Pembroke, 2013).

Для качественного анализа микробного сообщества серебряного карася и компонентов окружающей среды было протестировано 9 филумов бактерий с использованием специфичных праймеров, комплиментарных фрагменту гена 16S рРНК, на такие таксоны как Proteobacteria (классы Alpha- , Beta- , Gammaproteobacteria), Firmicutes, Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Bacteroidetes, Spirochaetes, Planctomycetes и Euryarchaeota.

По результатам групп-специфичной ПЦР общими филумами бактерий для слизистой и содержимого кишечника серебряного карася, воды, грунта и личинок хирономид выступали *Gamma*proteobacteria, *Firmicutes*, *Cyanobacteria* и *Verrucomicrobia* (табл. 6). Состав микробиоты содержимого кишечника отличается от такового слизистой оболочки. Филумы *Euryarchaeota*, *Planctomycetes*, *Spirochaetes* и *Verrucomicrobia* отмечены только в содержимом кишечника. Бактерии филумов *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* и *Bacteroidetes* зарегистрированы как в слизистой, так и содержимом кишечника.

4.2. Секвенирование по Сэнгеру

В отличие от групп специфичной ПЦР, секвенирование по Сэнгеру позволяет получить количественные характеристики микробных сообществ, ассоциированных с гидробионтами. С использованием секвенирования по Сэнгеру для многих морских и пресноводных видов рыб проведено изучение их кишечной микробиоты (Moran et al., 2005; Kim et al., 2007; Romero, Navarrete, 2006; McIntosh et al., 2008; Navarrete et al., 2009; Han, 2010; Wu et al., 2010).

С помощью секвенирования по Сэнгеру для всех образцов (слизистая кишечника, содержимое кишечника, личинки хирономид, вода, грунт) идентифицировано 154 операционных таксонообразующих единиц (ОТЕ), которые отнесены к 10-ти филумам эубактерий и 1-у филуму архей. Количество идентифицируемых филумов для каждого образца варьировало (табл. 7).

В слизистой оболочке и содержимом кишечника доминировали представители класса *Gamma*proteobacteria (68.1 и 88.0%, соответственно), субдоминантами в равной степени выступали представители филума *Firmicutes* и класса *Alphaproteobacteria* (4.2%). Филумы *Tenericutes* (2.8%) и *Actinobacteria* (2.8%) зарегистрированы только в слизистой оболочке кишечника (рис. 4).

Общим классом бактерий для всех исследованных компонентов окружающей среды составили *Gamma*proteobacteria и филум *Bacteroidetes*. В микробиоте хирономид доминировали *Proteobacteria* и *Firmicutes* (45.8 и 37.5%,

соответственно), в воде – Proteobacteria и Actinobacteria (38.1 и 23.8%, соответственно), в грунте – Proteobacteria (38.9%). Филумы Euryarchaeota и Actinobacteria были отмечены только в воде, Gemmatimonadetes – только в грунте, Firmicutes – только в личинках хирономид. Доля остальных групп бактерий варьировала в пределах от 2.1 до 16.7%. Отмечена высокая доля некультивируемых групп бактерий (до 23.0%).

На более низком таксономическом уровне, в слизистой и содержимом кишечника доминировал порядок Vibrionales (55.6 и 75.5%, соответственно), в микробиоте личинок хирономид – Clostridiales (48.0%), также значительную долю составляли порядки Bacteroidales (14.6%) и Burkholderiales (14.6%). В воде наибольшая доля представлена порядками Sphingobacteriales (12.0%) и Burkholderiales (12.0%), в грунте – Burkholderiales (16.7%). Порядок Vibrionales и Aeromonadales зарегистрированы только в слизистой и содержимом кишечника, Burkholderiales, – только в микробном сообществе личинок хирономид, воды и грунта. Порядок Synecococcales зарегистрирован только в воде и грунте; Oscillatoriales – только в грунте.

По составу семейств микробиота содержимого и слизистой кишечника различалась. В содержимом кишечника зарегистрировано 4 семейства, в слизистой – 3 (рис. 5). Семейство Vibrionaceae доминировало как в слизистой, так и содержимом кишечника (81.6 и 84.1%, соответственно). В качестве субдоминантов выступали Shewanellaceae, Aeromonadaceae и Enterobacteriaceae. Семейство Enterobacteriaceae выявлено только в содержимом кишечника.

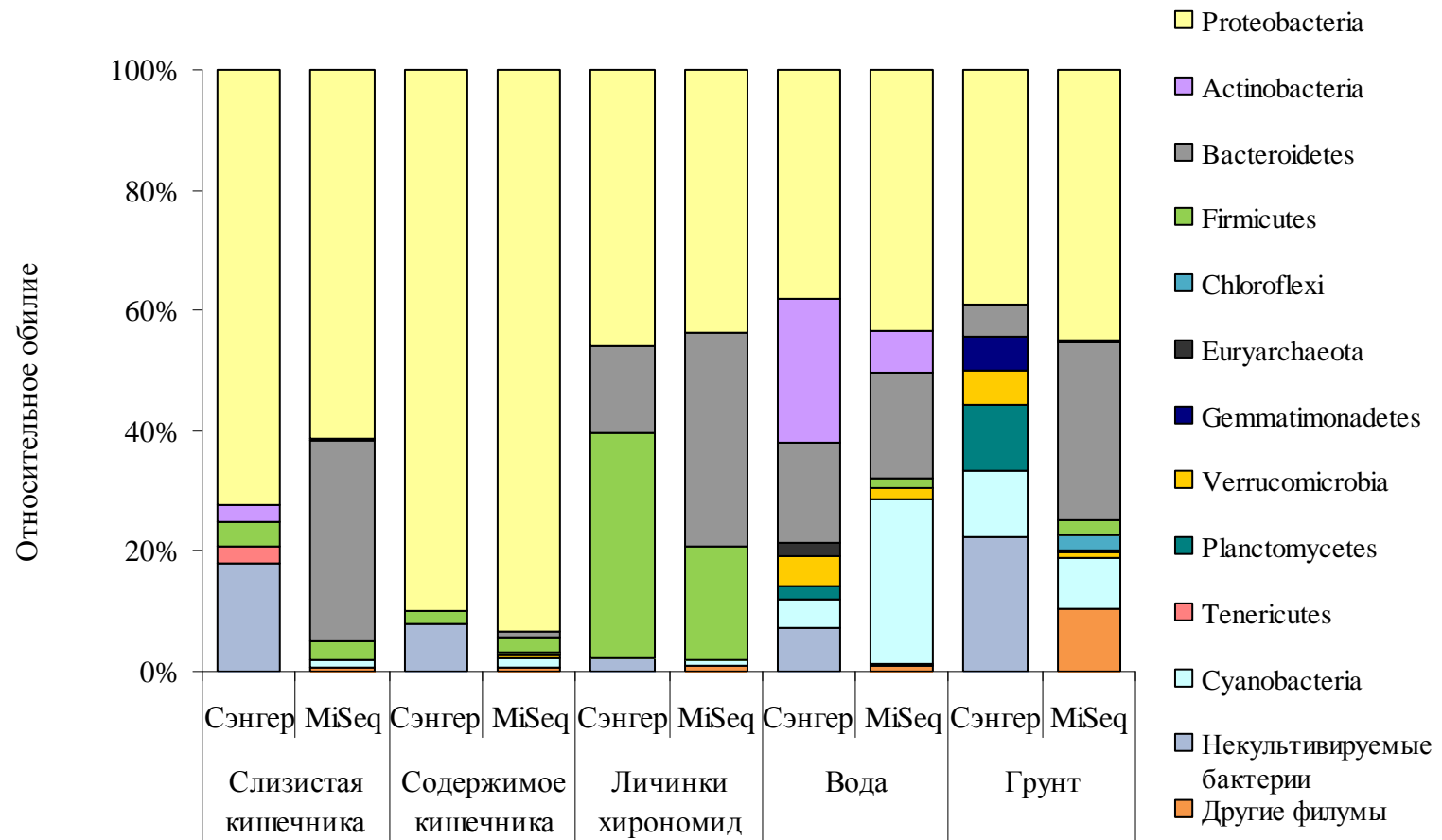


Рисунок 4. Состав кишечного микробного сообщества серебряного карася и компонентов окружающей среды (секвенирование по Сэнгеру и метагеномное секвенирование).

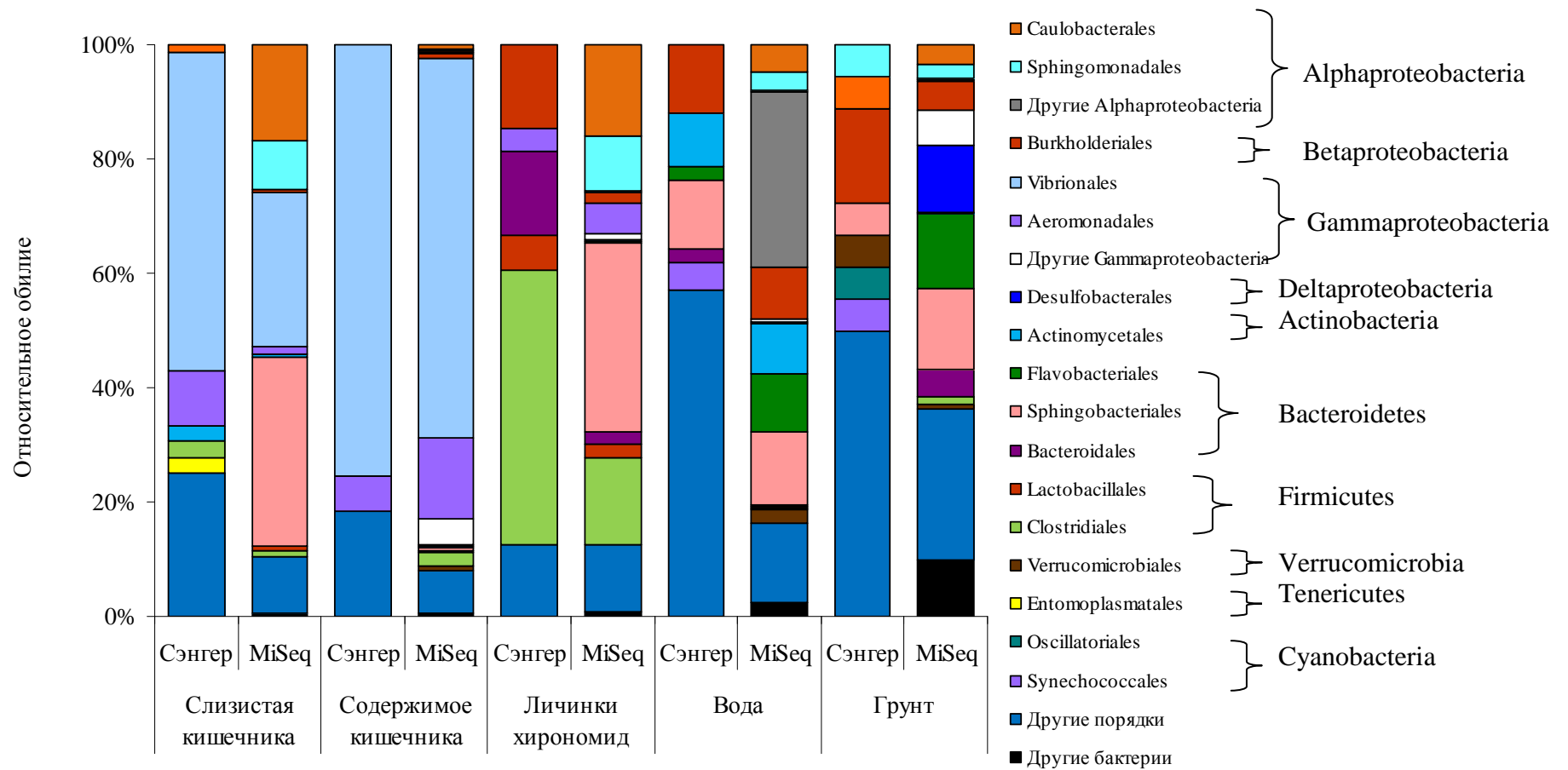


Рисунок 5. Соотношение порядков в слизистой и содержимом кишечника серебряного карася и компонентов окружающей среды (секвенирование по Сэнгеру и метагеномное секвенирование).

Таблица 6.

Разнообразие микробного сообщества слизистой оболочки и содержимого кишечника серебряного карася и компонентов окружающей среды, определенное разными молекулярно-генетическими методами

Таксон	Слизистая кишечника			Содержимое кишечника			Личинки хирономид			Вода			Грунт		
	ПЦР	Сэнгер	MiSeq	ПЦР	Сэнгер	MiSeq	ПЦР	Сэнгер	MiSeq	ПЦР	Сэнгер	MiSeq	ПЦР	Сэнгер	MiSeq
Домен Eubacteria, филумы:															
Actinobacteria	+	+	+	+	-	+	НД	-	+	+	+	+	-	-	+
Bacteroidetes	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Cyanobacteria	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Firmicutes	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Tenericutes	НД	+	-	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	+	НД	-	-
Planctomycetes	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Verrucomicrobia	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Gemmatimonadetes	НД	-	-	НД	-	+	НД	-	-	НД	-	-	НД	+	+
Chloroflexi	НД	-	-	НД	-	+	НД	-	-	НД	-	+	НД	-	+
Acidobacteria	НД	-	+	НД	-	+	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	+
Chlamydiae	НД	-	-	НД	-	+	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	-
Spirochaetes	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
Deferribacteres	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	+
Deinococcus-Thermus	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	+	НД	-	-	НД	-	+
Fibrobacteres	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	+	НД	-	+
Fusobacteria	НД	-	-	НД	-	+	НД	-	-	НД	-	+	НД	-	+

Nitrospira	НД	-	-	НД	-	+	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	+
OD1	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	+	НД	-	-
SR1	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	+	НД	-	+
TM7	НД	-	+	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	+
WS3	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	+
Домен Archaea, филумы:															
Euryarchaeota	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Crenarchaeota	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	-	НД	-	+
Домен Eubacteria, филум Proteobacteria, классы:															
Alphaproteobacteria	+	+	+	+	+	+	НД	-	+	+	+	+	+	+	+
Betaproteobacteria	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Gammaproteobacteria	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Deltaproteobacteria	НД	-	+	НД	-	+	НД	+	+	НД	-	+	НД	+	+
Epsilonproteobacteria	НД	-	-	НД	-	+	НД	-	-	НД	-	+	НД	-	+

Примечание: + - положительная детекция; - - отрицательная детекция; НД – нет данных.

4.3. Метагеномное секвенирование

Секвенирование нового поколения на таких технологических платформах как 454 (Roche), SOLEXA (Illumina), SOLiD (Applied Biosystems) и Helicos (Heliscope) позволяет миновать длительную процедуру клонирования в клетках *E.coli* и получить несколько тысяч прочтений для одного образца за один рабочий цикл. Общий принцип работы этих технологий базируется на секвенировании ДНК-чипов, и создании библиотеки одноцепочечных молекул ДНК и твердофазной или эмульсионной амплификации этих фрагментов (Cani, 2013). С помощью секвенирования нового поколения для микробиоты рыб накоплен достаточно большой материал (Kessel et al., 2011; Smith et al., 2012; Sullam et al., 2012; Li et al., 2013; Wu et al., 2012, 2013; Ye et al., 2014). Однако работы по сравнительному изучению кишечной микробиоты рыб с использованием различных молекулярно-генетических подходов не многочисленны (Moran et al., 2005; Skrodenyte-Arbaciauskiene et al., 2008; Ward et al., 2009; Smriga et al., 2010; Roeselers et al., 2011).

С помощью метагеномного секвенирования для всех образцов (слизистая кишечника, содержимое кишечника, личинки хирономид, вода, грунт) идентифицировано 2933 ОТЕ, которые отнесены к 18-ти филумам эубактерий, 2-м филумам архей и 4-м «фантомным» группам бактерий. Количество идентифицируемых филумов для каждого образца варьировало (табл. 7).

В слизистой кишечника серебряного карася доминировали Proteobacteria и Bacteroidetes (61.2 и 33.2%, соответственно) (рис. 4). В содержимом кишечника доминировали Proteobacteria (93.4%). Минорными в слизистой и в содержимом кишечника зарегистрированы филумы Firmicutes (3.18 и 2.6%, соответственно) и Cyanobacteria (1.1 и 1.7%, соответственно). Доля остальных филумов не превышала 0.8%, среди них в слизистой кишечника отмечено меньшее разнообразие бактерий, по сравнению с содержимым кишечника.

По результатам метагеномного секвенирования в грунте отмечено наибольшее разнообразие бактерий, по сравнению с таковым в воде и личинках

хирономид (табл. 7). Bacteroidetes (35.5 и 29.5%, соответственно) доминировали в составе микробиоты, ассоциированной с личинками хирономид и микробиоте грунта, а в воде – Alphaproteobacteria (31.5%). Филумы Crenarchaeota, Euryarchaeota, Acidobacteria, Chlamydiae, Deferribacteres, Deinococcus-Thermus, Fibrobacteres, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Planctomycetes, Spirochaetes, Tenericutes, Verrucomicrobia, а также «фантомные» группы OD1, SR1, TM7 и WS3 отмечены только в грунте. «Фантомная» группа OD1 и филум Tenericutes – только в воде (рис. 4).

На более низком таксономическом уровне в слизистой кишке доминировали порядки Sphingobacteriales (33.0%) и Vibrionales (27.0%); в содержимом кишечника – Vibrionales (66.0%) и Aeromonadales (14.0%); в микробиоте личинок хирономид – Sphingobacteriales (33.1%), Clostridiales (15.1%) и Caulobacterales (15.9%); в грунте – Sphingobacteriales (13.0%), Flavobacteriales (12.2%) и Desulfobacterales (10.6%). Порядок Vibrionales зарегистрирован только в слизистой и содержимом кишечника (рис. 5).

В составе класса Gammaproteobacteria в кишечнике серебряного карася отмечено 14 семейств. В слизистой и содержимом кишечника доминирует семейство Vibrionaceae (83.7 и 76.2%, соответственно). Семейство Pasteurellaceae отмечено только в слизистой кишечника, а семейства Ferrimonidaceae, Legionellaceae, Methylococcaceae, Ectothiorhodospiraceae – только в содержимом.

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

По результатам двух методов (секвенирования по Сэнгеру и метагеномному секвенированию) в кишечнике серебряного карася и компонентах окружающей среды доминируют представители Proteobacteria, что согласуется с полученными ранее данными по составу кишечной микробиоты пресноводных видов рыб (Huber et al., 2004; Han et al., 2010; Wu et al., 2010). Однако при использовании разных методов нами установлены различия в составе исследованных микробных

сообществ. Так, в кишечнике серебряного карася филумы архей Crenarchaeota и эубактерий 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. В слизистой и содержимом кишечника филумы Cyanobacteria, Bacteroidetes и класс Betaproteobacteria обнаружены только методами групп-специфичной ПЦР и метагеномного секвенирования. Tenericutes детектируются в слизистой кишечника с помощью секвенирования по Сэнгеру, и в воде с помощью метагеномного секвенирования. Acidobacteria – только методом метагеномного секвенирования (табл. 6). Кроме того, с помощью метагеномного секвенирования только в грунте определяются Crenarchaeota, Deferribacteres и WS3, в воде – OD1, в содержимом кишечника – Chlamydiae, а в слизистой кишечника и грунте – TM7. Различия в применяемых подходах получено и на более низком таксономическом уровне. Только методом метагеномного секвенирования для всех образцов отмечены порядки Lactobacillales, Desulfobacterales и Caulobacterales, в то время как в воде и грунте только методом секвенирования по Сэнгеру зарегистрирован Oscillatoriales (филум Cyanobacteria).

Следует отметить, что сравнение двух методов затруднительно из-за существенных различий в количестве полученных данных. Для метагеномного секвенирования было проанализировано 34926 последовательностей, а для секвенирования по Сэнгеру – всего 236 (табл. 7). Таким образом, существенные различия в количестве бактериальных таксонов могут быть следствием того, что при секвенировании по Сэнгеру большое количество видов с низким обилием не учитываются.

Для всех сообществ отмечен высокий индекс разнообразия Шеннона, величина которого варьировала: 2.94–3.54 (секвенирование по Сэнгеру) и 2.43–6.11 (метагеномное секвенирование). Индекс Симпсона для разных образцов также варьировал: 0.94–0.97 при секвенировании по Сэнгеру и 0.75–0.99 при метагеномном секвенировании (табл. 7).

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

Кривые разрежения сообществ демонстрируют, что разнообразие кишечного микробного сообщества серебряного карася и компонентов окружающей среды гораздо больше, чем представлено по результатам секвенирования по Сэнгеру (рис. 6). В случае метагеномного секвенирования получены схожие закономерности, за исключением микробиоты слизистой кишечника и личинок хирономид, для которых получен практически полный спектр видового разнообразия.

По мнению некоторых авторов, методы, основанные на секвенировании гена 16S рРНК, не отражают в полной мере всего разнообразия, представленного в кишечнике рыб (Han et al., 2010; Wu et al., 2012; Fakruddin, Mannan, 2013). Ранее было продемонстрировано, что неодинаковая эффективность лизиса клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий (Kirk et al., 2004), а также различные условия амплификации и приемы клонирования (концентрация образца, содержание GC пар праймера, длина ампликона, количество циклов и эффективность реакции лигирования) (Kirk et al., 2004; McDonald et al., 2012) могут повлиять на качественный и количественный результат в анализе бактериальных сообществ.

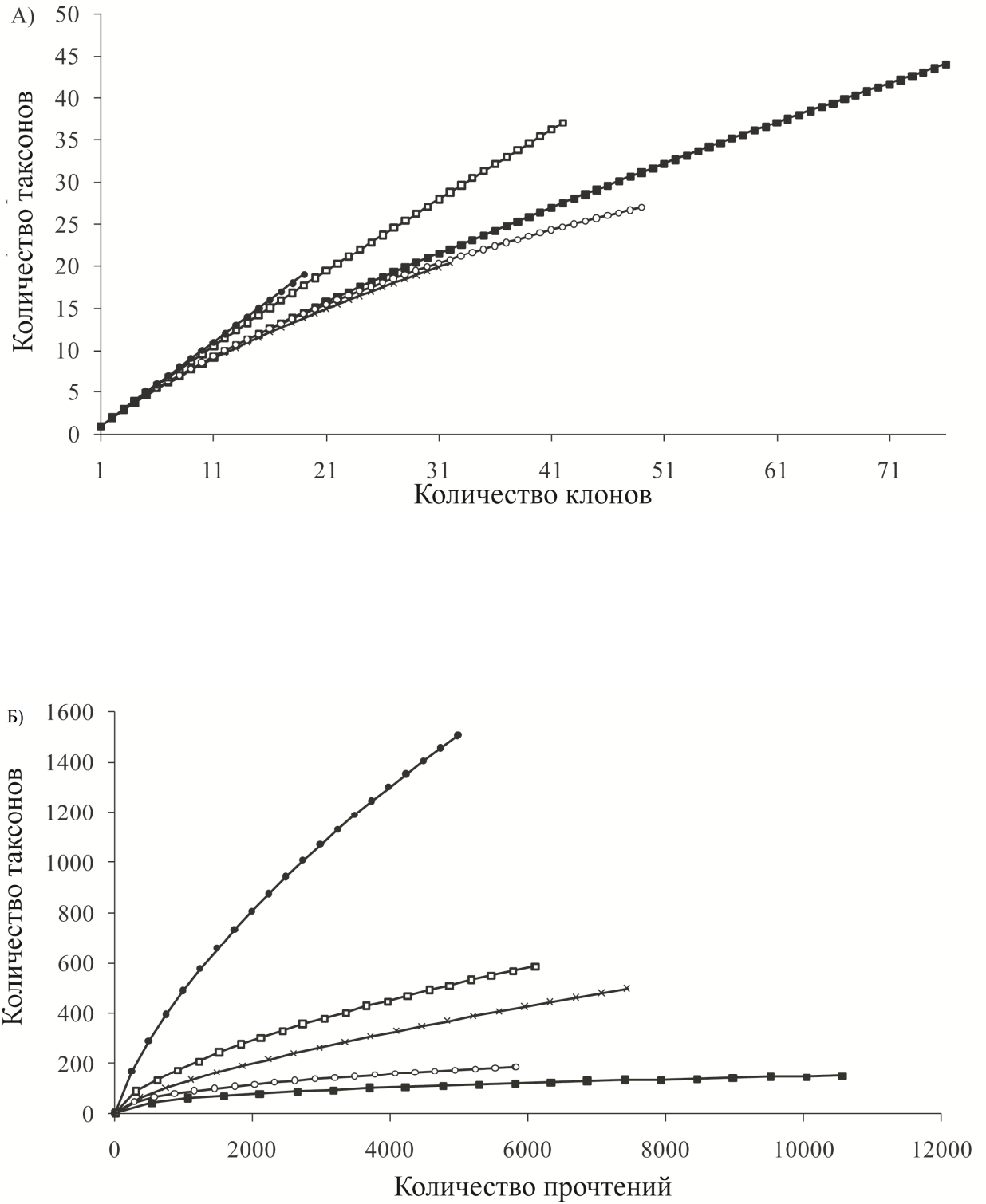


Рисунок 6. Кривые разрежения, построенные для кишечного микробного сообщества серебряного карася и компонентов окружающей среды. А) секвенирование по Сэнгеру; Б) метагеномное секвенирование.

Более того, секвенирование по Сэнгеру связано не только с длительной процедурой клонирования в клетках *E. coli*, но также и с получением химерных структур при ПЦР (Kopczynski et al., 1994; Acinas et al., 2005; Ashelford et al., 2005; DeSantis et al., 2006; Haas et al., 2011).

Полученные нами различия в составе кишечной микробиоты рыб при использовании различных молекулярно-генетических методов согласуются с имеющимися в литературе данными. Так, для кишечной микробиоты тюрбо (*Scophthalmus maximus*) при секвенировании по Сэнгеру, в отличие от метагеномного анализа, не зарегистрированы филумы Ascomycota и Fusobacteria (Xing et al., 2013). Для кишечной микробиоты данио рерио (*Danio rerio*), с использованием методов пиросеквенирования, в отличие от секвенирования по Сэнгеру, не выявлены филумы Verrucomicrobia, TM7, Nitrospira, Tenericutes и Acidobacteria (Lan, Love, 2011). Сравнительное изучение пресной аквариумной воды с помощью клонирования и секвенирования по Сэнгеру выявило только 5 филумов эубактерий (Proteobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes, Nitrospirae и Spirochaetes) по сравнению с методом высокопроизводительного секвенирования, которым было получено 30 филумов (Sugita et al., 2005; Raja et al., 2006; Smith et al., 2012).

Таким образом, существующие представления о кишечной микробиоте рыб, в виду сложности ее изучения, не отражают реального разнообразия этих сообществ. Трудности культивирования многих микроорганизмов ограничивают возможность изучения кишечной микробиоты рыб. Применение молекулярных методов позволяет решить эти проблемы и работать как с культивируемыми, так и некультивируемыми бактериями. Использование преимуществ различных молекулярных подходов, позволяет подойти к решению проблемы получения адекватных представлений о структуре и составе бактериального сообщества рыб, пониманию функциональной роли этого разнообразия и влияния на него абиотических и биотических факторов.

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 кишечника 8-и видов рыб разных экологических групп идентифицировано 2933 операционных таксонообразующих единиц, в содержимом кишечника – 2501. Идентифицированные ОТЕ были отнесены к 16-ти известным филумам эубактерий, 2-м филумам архей и 1-й «фантомной» группе бактерий. Количество филумов для каждого вида рыб варьировало (табл. 8).

Таблица 8.

Разнообразие микробных сообществ в кишечнике рыб разных экологических групп

Вид рыб	Количество прочтений		Количество ОТЕ		Количество филумов	
	1	2	1	2	1	2
Серебряный карась	10565	7435	173	558	7	13
Золотой карась	16300	11878	201	270	6	10
Сазан	25706	10342	727	573	11	15
Плотва	3154	18367	503	308	10	16
Елец	34937	19994	524	287	10	9
Язь	653	4193	166	199	6	6
Окунь	12343	10483	139	143	10	9
Судак	1074	2007	500	163	6	6
Всего	104732	84699	2933	2501		

Примечание: 1 – слизистая кишечника; 2 – содержимое кишечника.

В составе кишечной микробиоты всех видов рыб доминировали филумы Proteobacteria и Bacteroidetes. Однако при разделении и сравнении микробиоты слизистой кишечника и микробиоты содержимого кишечника относительное

обилие этих доминантов сильно различалось. Так, в слизистой кишечника окуня, ельца и золотого карася доминировали Bacteroidetes (61.2, 63.3 и 62.0%, соответственно), субдоминантами выступали Proteobacteria (26.0, 25.6 и 31.5% соответственно). Для сазана и плотвы в равной степени выявлены Bacteroidetes (40.5 и 40.9%, соответственно) и Proteobacteria (35.3 и 37.1%, соответственно). В микробиоте слизистой кишечника судака идентифицированы в большом количестве (45.0%) бактерии с неустановленным таксономическим статусом (рис. 7).

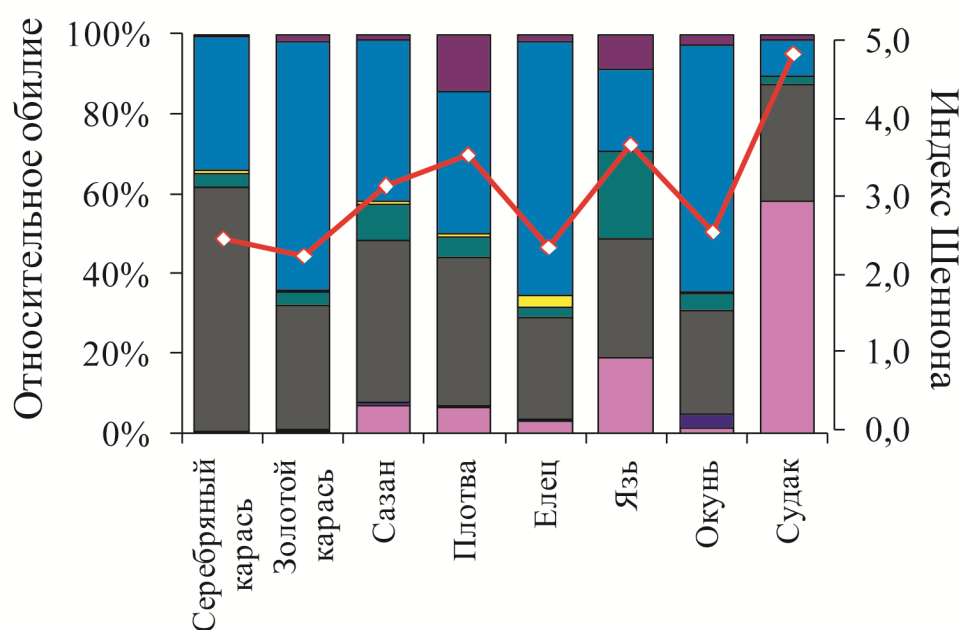


Рисунок 7. Доминирующие группы бактерий (на уровне филума) в составе микробного сообщества слизистой кишечника рыб оз. Чаны с разным типом питания. (■) Actinobacteria; (■) Bacteroidetes; (■) Cyanobacteria; (■) Firmicutes; (■) Proteobacteria; (■) Fusobacteria; (■) Tenericutes; (■) другие филумы. (—) индекс разнообразия микробных сообществ по Шеннону.

Среди малочисленных таксонов в слизистой кишечника Tenericutes обнаружены только у окуня; представители филума TM7 – только у серебряного карася; Spirochaetes и Verrucomicrobia – только у сазана и плотвы. У окуня, ельца, золотого и серебряного карасей группа архей не выявлена.

При анализе доминирующей микробиоты содержимого кишечника рыб получены другие закономерности. 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*. Субдоминантами в содержимом кишечника окуня и сазана выступали *Fusobacteria* (14.0 и 8.9%, соответственно).

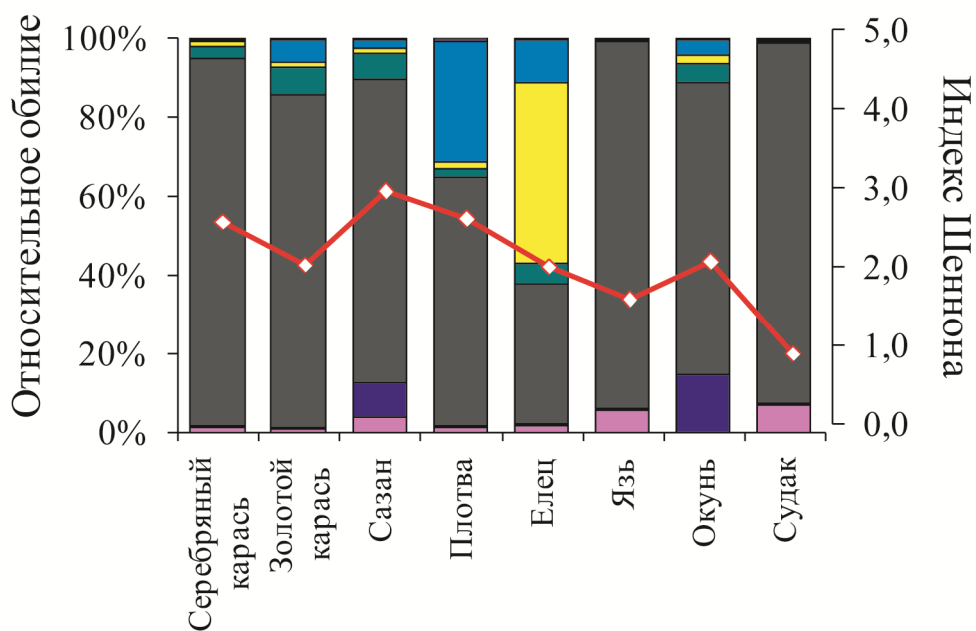


Рисунок 8. Доминирующие группы бактерий (на уровне филума) в составе микробного сообщества содержимого кишечника рыб оз. Чаны с разным типом питания. (■) Actinobacteria; (■) Bacteroidetes; (■) Cyanobacteria; (■) Firmicutes; (■) Proteobacteria; (■) Fusobacteria; (■) другие филумы. (—◇—) индекс разнообразия микробных сообществ по Шеннону.

По составу минорных групп бактерий в содержимом кишечника также выявлены свои особенности: *Tenericutes* обнаружены только у окуня; *Spirochaetes* – только у сазана и плотвы; *Planctomycetes* – только у сазана и серебряного карася; *Deinococcus-Thermus* – только у ельца и плотвы. У окуня, сазана, золотого и серебряного карасей группа архей не зарегистрирована (рис. 8).

Полученные результаты по составу кишечной микробиоты рыб оз. Чаны согласуются с имеющимися в литературе данными. По результатам экспериментальных работ с использованием приемов культивирования и молекулярно-генетических методов, показано, что *Proteobacteria* – доминирующий филум в составе кишечной микробиоты пресноводных видов рыб разных экологических групп (*Ctenopharyngodon idella*, *Cyprinus carpio*, *Pelteobagrus fulvidraco*, *Oncorhynchus mykiss*). В кишечнике рыб также в большом количестве присутствуют *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* и *Fusobacteria* (Zhou et al., 1998; Luo et al., 2001; Huber et al., 2004; Huang et al., 2009; Han et al., 2010; Wu et al., 2010; Kessel et al., 2011). В кишечнике рыб разных экологических групп оз. Чаны также наибольшее обилие составили филумы *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Cyanobacteria*. По мнению ряда авторов, именно эти филумы составляют 90% всех кишечных бактерий (Hugenholtz et al., 1998). Среди доминантов согласно другим данным в кишечнике рыб могут встречаться *Fusobacteria* (Kessel et al., 2011). Приведенные исследования также сопоставимы с нашими данными, согласно которым в кишечнике сазана и окуня *Fusobacteria* также были выявлены в достаточно большом количестве. Стоит отметить, что специфичность состава доминантов на уровне филумов для рыб разных экологических групп как по литературным, так и по собственным данным, не выявлена. Для сравнения рыб с разным типом питания целесообразно также учитывать разнообразие кишечных бактерий внутри отдельного филума, при анализе которого возможно выявить уникальные и/или малочисленные виды, специфично встречающиеся в кишечнике того или иного вида рыб.

На более низком таксономическом уровне из числа 10-ти самых многочисленных операционных таксонообразующих единиц в слизистой кишечника серебряного, золотого карасей, сазана, ельца и окуня, наибольшее обилие составили ОТЕ *Sphingobacteriales* и *Flexibacteriaceae*, в меньшей степени представлены *Sphingomonas* и *Caulobacter* (рис. 9 (а)). В содержимом кишечника тех же видов рыб, напротив, доминировали *Aeromonas*, *Vibrio* и

Chlorarachniophyceae (рис. 9 (б)). В слизистой и содержимом кишечника язя и судака доминировали *Terrimonas* и *Plesiomonas*. Такие ОТЕ как Sphingobacteriales, Flexibacteraceae, *Sphingomonas*, *Caulobacter*, *Vibrio*, *Phyllobacterium* и *Aeromonas* в слизистой кишечника язя и судака не обнаружены. По составу доминантов из 10-ти самых многочисленных ОТЕ в кишечнике язя и судака выявлены уникальные таксоны бактерий (р. *Succinivibrio* и сем. Bifidobacteriaceae), не характерные для других видов рыб.

Для оценки разнообразия микробных сообществ в кишечнике рыб с разным типом питания был рассчитан индекс Шеннона. Результаты расчетов индекса показали, что в слизистой и содержимом кишечника рыб разнообразие микробных сообществ невелико (рис. 7 и 8). 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 ($H=0.78$). 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, $F=6.713$, $p=0.021$).

Согласно литературным данным, при сравнении разнообразия кишечной микробиоты между рыбами разных экологических групп показано, что наибольшее разнообразие бактерий получено для растительноядных и всеядных видов рыб по сравнению с хищными (Ley et al., 2008). Сравнение микробиоты сазана и судака, различающихся по характеру питания (сазан – бентофаг, судак – ихтиофаг) показало, что разнообразие микроорганизмов у первого вида значительно богаче, чем у второго (Кузьмина, 2005). С помощью секвенирования для всеядной гололобой нототении (*Notothenia coriiceps*) также отмечено наибольшее разнообразие бактерий по сравнению с плотоядной крокодиловой белокровкой (*Chaenocephalus aceratus*) (Ward et al., 2009). Полученные данные о разнообразии кишечной микробиоты рыб оз. Чаны также сопоставимы с ранее проведенными исследованиями. Для содержимого кишечника ихтиофага (судак)

из оз. Чаны разнообразие бактерий было ниже, чем для всеядных видов рыб и планктофагов-бентофагов.

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

Для подсчета бета-разнообразия микробных сообществ в кишечнике рыб с разным типом питания и выявления естественной структуры группировки метагеномных данных проводили кластерный анализ с использованием алгоритма невзвешенного попарного среднего, UPGMA (рис.10). Результаты кластеризации микробных сообществ кишечника рыб показали, что на уровне сходства 17% выделяются два кластера – две группы рыб (рис. 10). Первую группу составляет микробиота слизистой и содержимого кишечника язя и судака; во вторую группу выделяется микробиота слизистой и содержимого кишечника остальных видов рыб. В свою очередь, каждая из выделенных групп разбивается еще на 2 подкластера, тем самым выделяя микробиоту слизистой кишечника рыб в одну группу, и микробиоту его содержимого – в другую. Стоит отметить, что на уровне сходства 30% и 32% в отдельные подкластеры группируется микробиота слизистой и содержимого кишечника рыб разных экологических групп.

Результаты неметрического многомерного шкалирования также выявили на ординационной плоскости 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. 11).

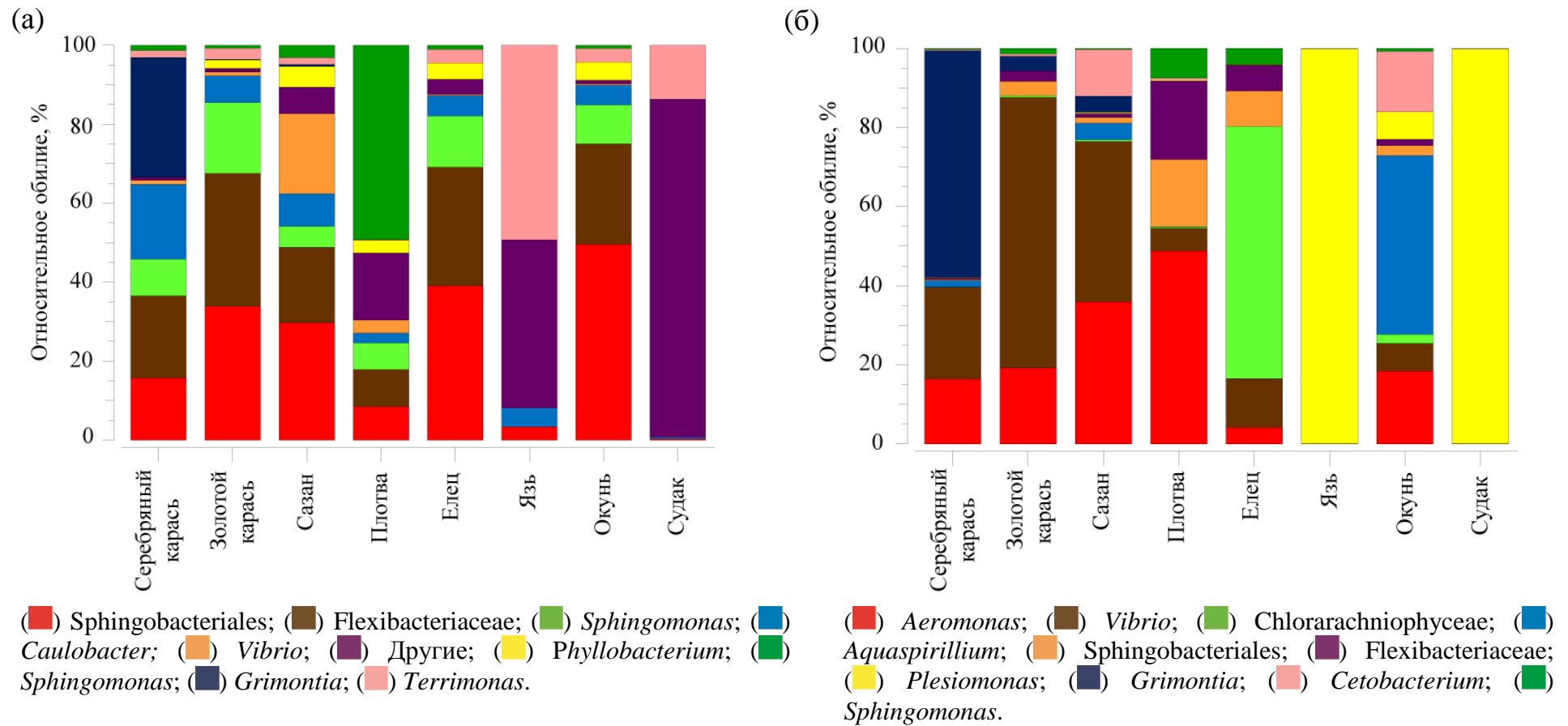


Рисунок 9 . Относительное обилие 10-ти самых многочисленных ОТЕ в слизи (а) и содержимом кишечника (б) рыб разных экологических групп оз. Чаны.

Статистическая достоверность различий выделенных групп подтверждена тестом ANOSIM (анализ сходства). При общем и попарном анализе средних значений ранговых сходств при сравнении 3-х групп микробных сообществ кишечника рыб 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 (табл. 9). Более того, согласно проведенным расчетам по тесту SIMPER и критерию суммы рангов Уилкоксона (Манна-Уитни) были определены наиболее значимые ОТЕ, вносящие достоверный вклад в различие между этими тремя группами рыб (табл. 10). Наибольший вклад в различие микробиоты 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) показал, что рыбы группируются вне зависимости от типа питания (таб. 11). По результатам расчетов индекса Брея-Кёртиса микробиота слизистой кишечника сазана, ельца, золотого карася и окуня имеет высокую степень сходства ($0.31 < D_{B-C} < 0.58$). В содержимом кишечника наибольшее сходство установлено только для сазана и золотого карася ($D_{B-C} = 0.40$), для остальных видов рыб индекс Брея-Кёртиса был достаточно высоким ($0.57 < D_{B-C} < 0.98$), что свидетельствует о различии их кишечной микробиоты. Наименьшее сходство микробиоты установлено для слизистой и содержимого кишечника судака и язя по сравнению с микробиотой других видов рыб ($0.73 < D_{B-C} < 0.99$).

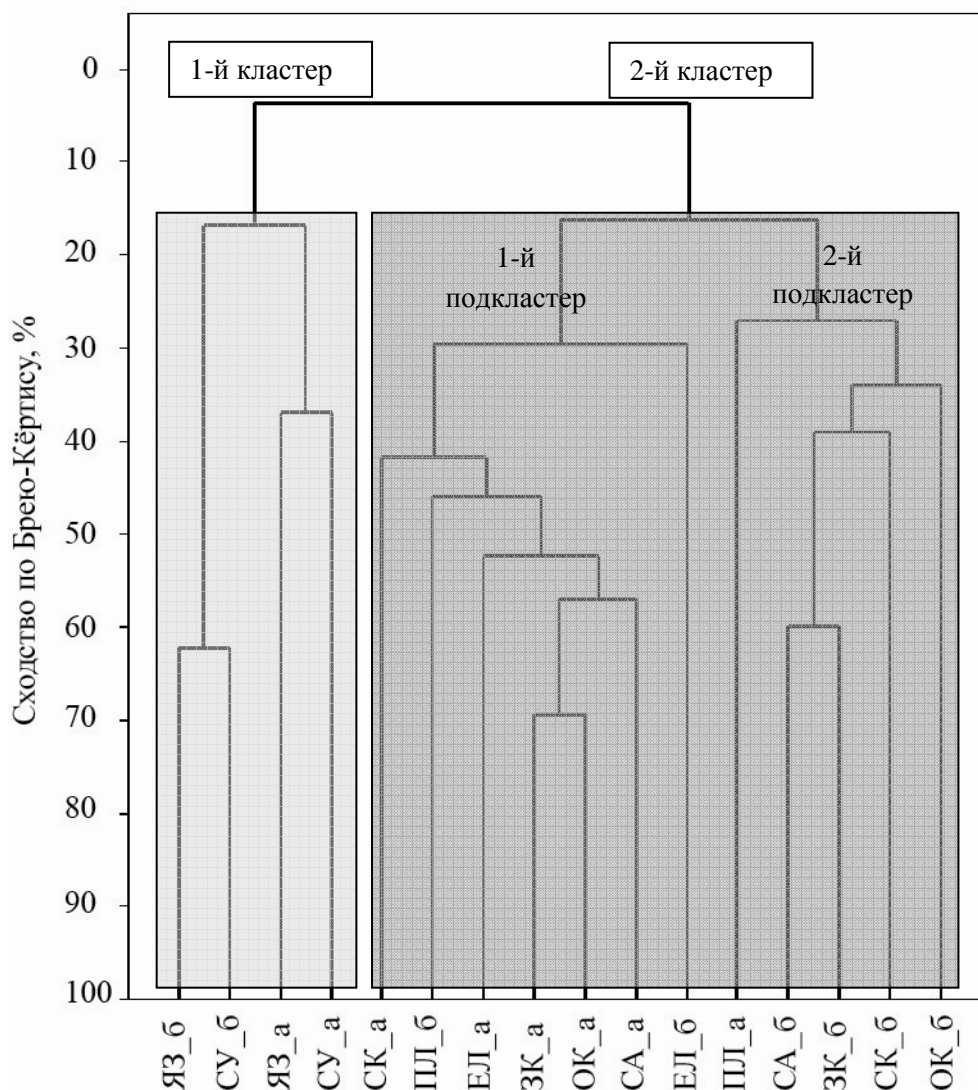


Рисунок 10. Дендрограмма сходства (по коэффициенту Брэя-Кёртиса) микробных сообществ рыб с разным типом питания. ЯЗ – язь, СУ – судак, СК – серебряный карась, ПЛ – плотва, ЕЛ – елец, ЗК – золотой карась, ОК – окунь, СА – сазан; _а – слизистая кишечника, _б – содержимое кишечника.

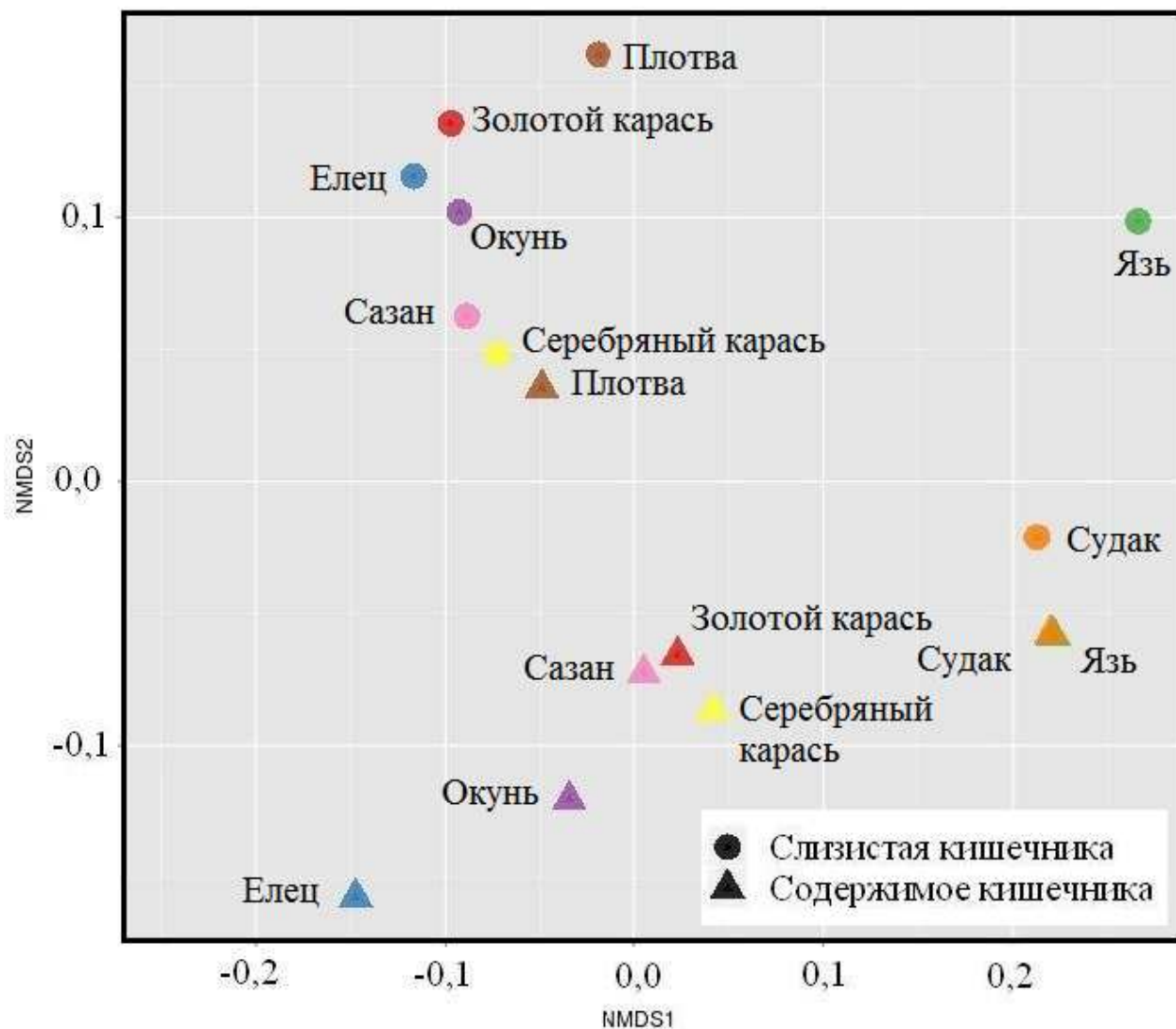


Рисунок 11. Неметрическое многомерное шкалирование (NMDS) микробных сообществ, ассоциированных со слизистой и содержимым кишечника рыб разных экологических групп.

Таблица 9.

Попарный анализ средних значений ранговых сходств кишечной микробиоты рыб после однофакторной ANOSIM (R-статистика)

Микробиота	Слизистая кишечника	Язь и судак	Содержимое кишечника
Слизистая кишечника	0	0.9643*	0.4667*
Язь и судак	0.9643*	0	0.996*
Содержимое кишечника	0.4667*	0.996*	0

Примечание: * различия достоверны при уровне значимости <0.05.

Установленные нами различия состава микробиоты слизистой и содержимого кишечника согласуются с имеющими в литературе данными. У желтого сома (*Pelteobagrus fulvidraco*) в слизистой и содержимом кишечника доминировали Proteobacteria (52.6 и 55.0%, соответственно). В содержимом его кишечника зарегистрированы *Yersinia* и *Enterobacter*, в слизистой – *Vibrio* и *Myroides*. В то же время, Actinobacteria и представители «фантомного» филума OP10 были обнаружены только в содержимом кишечника (Wu et al., 2010). В слизистой кишечника радужной форели в отличие от его содержимого не обнаружены микроорганизмы филумов Bacteroidetes и Fusobacteria (Kim et al., 2007). С помощью метагеномного секвенирования в слизистой кишечника рыб разных экологических групп оз. Чаны филумы Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Nitrospira и Planctomycetes не зарегистрированы в отличие от их содержимого.

Согласно сложившимся представлениям, для всех видов гидробионтов, в том числе и рыб, потребляемая пища является одним из важнейших факторов, влияющих на микробиоценоз кишечника. В связи с разнообразным типом питания, в пищеварительном тракте некоторых видов рыб отмечена специфичность населяющих его бактерий (Шивокене, 1989). 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: 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. Сходные закономерности были получены и другими авторами. Так, в

работе Ли с соавторами было продемонстрировано, что сравнительный анализ кишечной микробиоты восьми видов рыб с разным типом питания не показал достоверного различия среди последовательностей, полученных после секвенирования на платформе 454. С другой стороны, по нашим данным в слизи и в содержимом кишечника для судака и язя выявлено наименьшее сходство в составе микробиоты по сравнению с другими видами рыб. Спектр питания судака из оз. Чаны в большей степени состоял из молоди рыб (85.7%), 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, и по разнообразию потребляемых объектов питания они являются эврифагами или близки к таковым.

На основании вышесказанного следует, что предполагаемая зависимость разнообразия микробиоты от типа питания сильнее выражена у рыб, для которых характерно потребление небольшого количества кормов, с преобладанием излюбленного вида корма (вид корма, составляющий 50% и более от всего рациона). Таким образом, полученные нами данные о составе кишечных бактерий у рыб разных экологических групп оз. Чаны показывают, что зависимость разнообразия микробиоты от типа питания увеличивается от эври- к стено- и монофагам.

Достоверный вклад отдельных таксонов бактерий в среднее различие между микробиотой слизистой и содержимого кишечника и кишечной микробиотой язя и судака по критерию суммы рангов Уилкоксона (Манна-Уитни)

Филум	Класс	Порядок	Семейство	Род	W	p-vol	S,%
<i>Различие между слизистой кишечника и содержимым кишечника</i>							
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales			2,482	0,013	12,56
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Flexibacteraceae		2,642	0,008	9,639
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	2,322	0,020	9,31
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	2,482	0,013	4,072
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	<i>Caulobacter</i>	2,162	0,031	3,09
Другие бактерии					2,322	0,020	1,444
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	<i>Phyllobacterium</i>	2,002	0,045	1,327
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Crenotrichaceae	<i>Terrimonas</i>	2,002	0,045	1,035
Proteobacteria	Gammaproteobacteria				2,322	0,020	0,5419
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	<i>Shewanella</i>	2,177	0,029	0,5396
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	2,802	0,005	0,2733
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridiaceae 1</i>	2,322	0,020	0,2245
Сyanobacteria	Cyanobacteria	Family II	GpIIa		2,500	0,012	0,1842
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales			2,016	0,044	0,1381
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	2,038	0,042	0,1341
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Rhodobacter</i>	2,853	0,004	0,115
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae		2,166	0,030	0,09218
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Incertae Sedis XI	<i>Finegoldia</i>	2,482	0,013	0,07559
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae		2,853	0,004	0,07091
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Allomonas</i>	2,201	0,028	0,02314
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcineae		2,075	0,038	0,01069

Различие между слизистой кишечника и микробиотой язя и судака

Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales			2,452	0,014	21,25
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Plesiomonas</i>	2,452	0,014	6,425
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	<i>Caulobacter</i>	2,452	0,014	5,616
Другие бактерии					2,482	0,013	2,363
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae		2,459	0,014	0,809
Proteobacteria					2,452	0,014	0,105
Bacteroidetes					2,452	0,014	0,065
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingosinicella</i>	2,530	0,011	0,059

Различие между содержимым кишечника микробиотой язя и судака

Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Plesiomonas</i>	2,452	0,014	6,139
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales			2,239	0,025	3,988
Fusobacteria	Fusobacteria	Fusobacteriales	Incertae sedis 11	<i>Cetobacterium</i>	2,245	0,025	3,405
Другие бактерии					2,452	0,014	1,296
Proteobacteria	Gammaproteobacteria				2,025	0,043	1,134
Другие					2,452	0,014	0,391
Суанобактерия	Суанобактерия	Chloroplast	Bacillariophyta		2,245	0,025	0,376
Proteobacteria					2,452	0,014	0,062
Bacteroidetes					2,452	0,014	0,059
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingosinicella</i>	2,530	0,011	0,053

Примечание: W – значения критерия Уилкоксона (Манна-Уитни); p-vol – уровень значимости; S, % – вклад отдельных таксонов бактерий в средние различия между кишечной микробиотой на основе теста относительного сходства SIMPER.

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

Другим фактором, влияющим на разнообразие микробных сообществ рыб, является возраст. Как было сказано ранее, с возрастом происходит усложнение желудочно-кишечного тракта рыб, его удлинение и увеличение числа петель (Шивокене, 1989). Со структурными изменениями пищеварительного тракта создаются условия для более продолжительного пребывания пищи, и контакта кишечных бактерий с пищевыми субстратами, тем самым способствуя развитию благоприятных условий для размножения бактерий (Шивокене, 1989). Более того, с характером питания рыб тесно связаны анатомо-физиологические особенности строения пищеварительной системы, что в свою очередь отражается на разнообразии кишечных бактерий желудочных и безжелудочных рыб. В данной главе рассматриваются онтогенетические и сезонные изменения кишечной микробиоты на примере серебряного карася и окуня, которые по типу питания относятся к разным экологическим группам.

5.3.1. Изменение кишечной микробиоты рыб на разных этапах онтогенеза (групп-специфичная ПЦР)

Для качественной идентификации наиболее распространенных групп бактерий в слизистой 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 А₁, С₁, D₁ – предличинки, ранние личинки), 10-30 (этапы D₂, 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).

Серебряный карась. Групп-специфичная ПЦР в слизистой и содержимом кишечника серебряного карася на всех исследуемых этапах развития показала положительную детекцию 4 филумов: Cyanobacteria, Planctomycetes, Firmicutes и Actinobacteria, и отрицательную – для класса Alphaproteobacteria (табл. 12).

На этапе развития 0-10 и 10-30 мм филум Euarchoeota в слизистой кишечника не зарегистрирован. По мере роста и развития серебряного карася, Euarchoeota зарегистрирован в составе микробиоты слизистой кишечника начиная с этапа 80 мм и далее, а в содержимом кишечника зарегистрирован только на этапе 10-30 мм. Также, на этапе 10-30 мм, филумы Bacteroidetes и Verrucosomicrobia в слизистой кишечника с помощью групп-специфичной ПЦР не выявлены.

Окунь. В составе микробиоты окуня на всех исследуемых этапах развития зарегистрированы филумы Bacteroidetes, Planctomycetes, Firmicutes и Euarchoeota. В слизистой кишечника класс Alphaproteobacteria и филум Verrucosomicrobia на этапе 10-30 и 30-60 мм не выявлены. В содержимом кишечника окуня, напротив, филумы Cyanobacteria и Actinobacteria выявлены на этапе 10-30 и 30-60 мм, с 60 мм и далее не зарегистрированы.

Онтогенетические изменения кишечной микробиоты показаны для других видов рыб. Изучение микробиоты атлантического палтуса на разных стадиях онтогенеза, а также компонентов его питания показало, что микробиота икры представлена бактериями рода *Pseudoalteromonas*, микробиота личинок – *Pseudoalteromonas* и *Vibrio*, в кишечнике сеголеток преобладали виды *V. splendidus*, *V. alginolyticus* рода *Vibrio*. У трехлеток рыб с разным типом питанием также наблюдали различия в составе кишечной микробиоты – у одних преобладали бактерии рода *Pseudoalteromonas*, у других *Vibrio* и *Photobacterium* (Verner-Jeffreys, 2003). Изменение кишечной

микробиоты показано на примере кижуча (*Oncorhynchus kisutch*), на поверхности икры которого были выявлены Betaproteobacteria (*Janthinobacterium* и *Rhodoferrax*), у личинок – Gammaproteobacteria (*Shewanella* и *Aeromonas*), и микробиота молоди была представлена *Pseudomonas* и *Aeromonas* (Romero, Navarrete, 2006).

Результаты групп-специфичной ПЦР для серебряного карася и окуня на разных этапах онтогенеза

Таксон	Размерная группа, мм									
	0-10		10-30		30-60		60-80		80-100	
	Серебряный карась	Окунь	Серебряный карась	Окунь	Серебряный карась	Окунь	Серебряный карась	Окунь	Серебряный карась	Окунь
	Слизистая кишечника									
Alphaproteobacteria	-	нд	-	+	нд	+	нд	+	-	+
Bacteroidetes	+	нд	-	+	нд	+	нд	+	+	+
Суанобacteria	+	нд	+	+	нд	+	нд	-	+	-
Planctomycetes	+	нд	+	+	нд	+	нд	+	+	+
Firmicutes	+	нд	+	+	нд	+	нд	+	+	+
Verrucomicrobia	+	нд	-	-	нд	+	нд	+	+	+
Actinobacteria	+	нд	+	+	нд	+	нд	-	+	-
Euryarchaeota	-	нд	-	+	нд	+	нд	+	+	+
	Содержимое кишечника									
Alphaproteobacteria	-	нд	-	-	нд	+	нд	+	-	+
Bacteroidetes	+	нд	+	+	нд	+	нд	+	+	+
Суанобacteria	+	нд	+	+	нд	+	нд	-	+	-
Planctomycetes	+	нд	+	+	нд	+	нд	+	+	+
Firmicutes	+	нд	+	+	нд	+	нд	+	+	+
Verrucomicrobia	+	нд	+	+	нд	+	нд	+	+	+
Actinobacteria	+	нд	+	+	нд	+	нд	-	+	-
Euryarchaeota	-	нд	+	+	нд	+	нд	+	-	+

5.3.2. Изменение кишечной микробиоты рыб в зависимости от сезона года (метагеномное секвенирование)

По результатам метагеномного секвенирования в кишечнике серебряного карася идентифицировано 3181 ОТЕ, в желудочно-кишечном тракте окуня – 1750. Идентифицированные ОТЕ относились к 15 известным филумам эубактерий, 1 филуму архей и 1 «фантомной» группе (табл. 13).

Серебряный карась. В кишечнике серебряного карася на протяжении всего сезона преобладали Proteobacteria, Bacteridetes и Fimicutes (рис. 12). В период с апреля по июль относительное обилие Proteobacteria как в слизистой, так и в содержимом кишечника увеличивалось (с 24.6 до 61.2% и с 68.4 до 93.4%, соответственно), а Bacteridetes, наоборот, - снижалось (с 42.4 до 33.2 и 13.4 до 0.8%, соответственно). В августе в составе микробного сообщества слизистой и содержимого кишечника появляется новая группа бактерий – Fusobacteria, относительное обилие которых составляло $45.2 \pm 0.4\%$. При этом следует отметить, что в остальные месяцы обилие этой группы бактерий было достаточно низким (не более 2%). В октябре в слизистой кишечника доминирующее положение занимают Bacteridetes (51.3%), а в содержимом кишечника – Proteobacteria (76.8%). Для Fimicutes, за исследуемый период, можно выделить два максимума обилия: первый – в апреле ($22.00 \pm 4.6\%$), второй – в октябре ($7.67 \pm 0.14\%$). В составе остальных групп бактерий значительные вариации не наблюдали, на протяжении всего сезона их обилие было на относительно постоянном уровне, и не превышало 5%. Небольшие вариации наблюдали в слизистой кишечника для Chloroflexi, которые были зарегистрированы только в августе, и для Spirochaetes, зарегистрированные только в апреле. В содержимом кишечника Deferribacteres и представители «фантомной» группы TM7 отмечены только в апреле.

Окунь. Окунь по строению пищеварительной системы и по химизму протекающих процессов пищеварения несколько отличается от серебряного карася. В желудочно-кишечном тракте окуня наибольшее обилие составляли филумы Proteobacteria, Bacteridetes, Fimicutes, Tenericutes, Fusobacteria и

Actinobacteria (рис. 12). Остальные группы бактерий представлены в небольшом количестве, и на протяжении всего сезона их обилие практически не изменялось.

Таблица 13.

Характеристика разнообразия микробных сообществ желудочно-кишечного тракта серебряного карася и окуня обыкновенного

Объект исследования	Образец	Сроки отбора проб	Количество прочтений	Количество ОТЕ
Серебряный карась	Слизистая кишечника	Апрель	21348	173
	Слизистая кишечника	Июнь-Июль	10565	173
	Слизистая кишечника	Август	5854	458
	Слизистая кишечника	Октябрь	27624	252
	Содержимое кишечника	Апрель	15267	507
	Содержимое кишечника	Июнь-Июль	7435	558
	Содержимое кишечника	Август	13707	375
	Содержимое кишечника	Октябрь	17487	685
Окунь	Слизистая желудка	Апрель	9500	106
	Слизистая желудка	Июнь-Июль	9719	169
	Слизистая желудка	Август	10483	144
	Слизистая желудка	Октябрь	1453	227
	Содержимое желудка	Апрель	15762	382
	Содержимое желудка	Июнь-Июль	12769	264
	Содержимое желудка	Август	24784	448
	Содержимое желудка	Октябрь	41141	192
	Пилорические придатки	Апрель	17532	191
	Пилорические придатки	Июнь-Июль	10148	169
	Пилорические придатки	Август	10368	154
	Пилорические придатки	Октябрь	12610	214
	Слизистая кишечника	Апрель	2480	315
	Слизистая кишечника	Июнь-Июль	12343	139
	Слизистая кишечника	Август	13865	274
	Слизистая кишечника	Октябрь	18640	191
	Содержимое кишечника	Апрель	13015	278
	Содержимое кишечника	Июнь-Июль	10483	143
	Содержимое кишечника	Август	8791	160
	Содержимое кишечника	Октябрь	427	250

В желудке в период с апреля по октябрь относительное обилие Proteobacteria увеличивалось (с 34.4 до 72.0%), а Bacteroidetes, наоборот, -

снижалось (с 54.4 до 12.8%, соответственно). Обилие Fimicutes и Actinobacteria на протяжении всего сезона было на относительно постоянном уровне (3.4 ± 1.78 и $6.05 \pm 1.08\%$, соответственно). В слизистой желудка во все сезоны (за исключением весеннего периода) доминировали Proteobacteria $94.9 \pm 4.1\%$. В составе микробного сообщества слизистой желудка в весенний период в значительной мере были представлены Bacteroidetes (46.9%), относительное обилие Proteobacteria также было высоким (40.8%). Микробное сообщество пилорических придатков представлено Bacteroidetes ($53.2 \pm 5.4\%$), Proteobacteria ($32.2 \pm 1.8\%$), Fimicutes ($6.2 \pm 1.6\%$), и Actinobacteria ($3.9 \pm 2.1\%$) и в течение всего сезона не изменялось.

В слизистой кишечника в апреле наибольшее обилие составляли Tenericutes (59.9%), в меньшей степени представлены Bacteroidetes (11.1%) и Proteobacteria (8.1%). Обилие остальных групп бактерий с июня по октябрь практически не изменялось. При этом в слизистой кишечника окуня наибольшее обилие в этот период составили Bacteroidetes ($57.5 \pm 6.7\%$), Proteobacteria ($30.8 \pm 4.2\%$), Fimicutes ($4.3 \pm 1.9\%$), и Actinobacteria ($2.2 \pm 0.8\%$). В содержимом кишечника с апреля по июль также доля Bacteroidetes снижалась (с 39.5 до 4.0%), а Proteobacteria – увеличивалась (с 31.0 до 74.2%). В летний период, с июня по август, в содержимом кишечника разнообразие Fusobacteria увеличивалось с 14.0 до 52.0%. В осенний период отмечено доминирование Proteobacteria.

Разнообразие микробных сообществ содержимого кишечника как карася, так и окуня выше такового слизистой кишечника. Для слизистой кишечника величина индекса Шеннона составила $H=2.59 \pm 0.05$; а для содержимого – $H=3.0 \pm 0.17$ (рис. 12). Для желудка, – наоборот, в слизистой разнообразие больше ($H=2.82 \pm 0.24$), чем в его содержимом ($H=1.69 \pm 1.57$). Наибольшее разнообразие микробных сообществ содержимого желудка и кишечника окуня выявлено в весенний (апрель) и осенний (октябрь) периоды, Для их слизистой и пилорических придатков – в летний период (июнь-июль). Для содержимого кишечника серебряного карася получены аналогичные закономерности; в слизистой кишечника серебряного карася отмечено два пика разнообразия – в апреле и августе.

Полученные нами результаты по сезонному изменению состава микробиоты серебряного карася и окуня согласуются с имеющимися в литературе данными. На примере трехлеток карповых видов рыб, питавшихся натуральной пищей, установлено, что численность, биомасса и состав кишечных бактерий изменяется с возрастом рыб. Максимальная численность бактерий отмечена в летний период, и к осени их численность резко снижалась. Подобные закономерности авторы связывают с интенсивностью питания рыб и изменением состава рациона в течение сезона (Шивокене, 1989). Аналогично, для гибридной формы тиляпии установлены сезонные изменения кишечной микробиоты, максимум численности кишечных бактерий для которого установлено в августе, и снижение таковой в зимние месяцы (Al-Harbi, Uddin, 2005). Сезонные изменения разнообразия кишечных бактерий серебряного карася и окуня в оз. Чаны также, по-видимому, связаны с интенсивностью питания рыб. Так, наибольшее разнообразие потребляемых объектов питания в пищевом комке исследуемых видов рыб зарегистрировано в весенние и осенние месяцы.

Таким образом, с возрастом рыб численность и состав различных групп бактерий изменяется. Включение в рацион новых компонентов пищи способствует заселению пищеварительного тракта бактериями. Наибольшее разнообразие бактерий выявлено в весенний и осенний периоды.

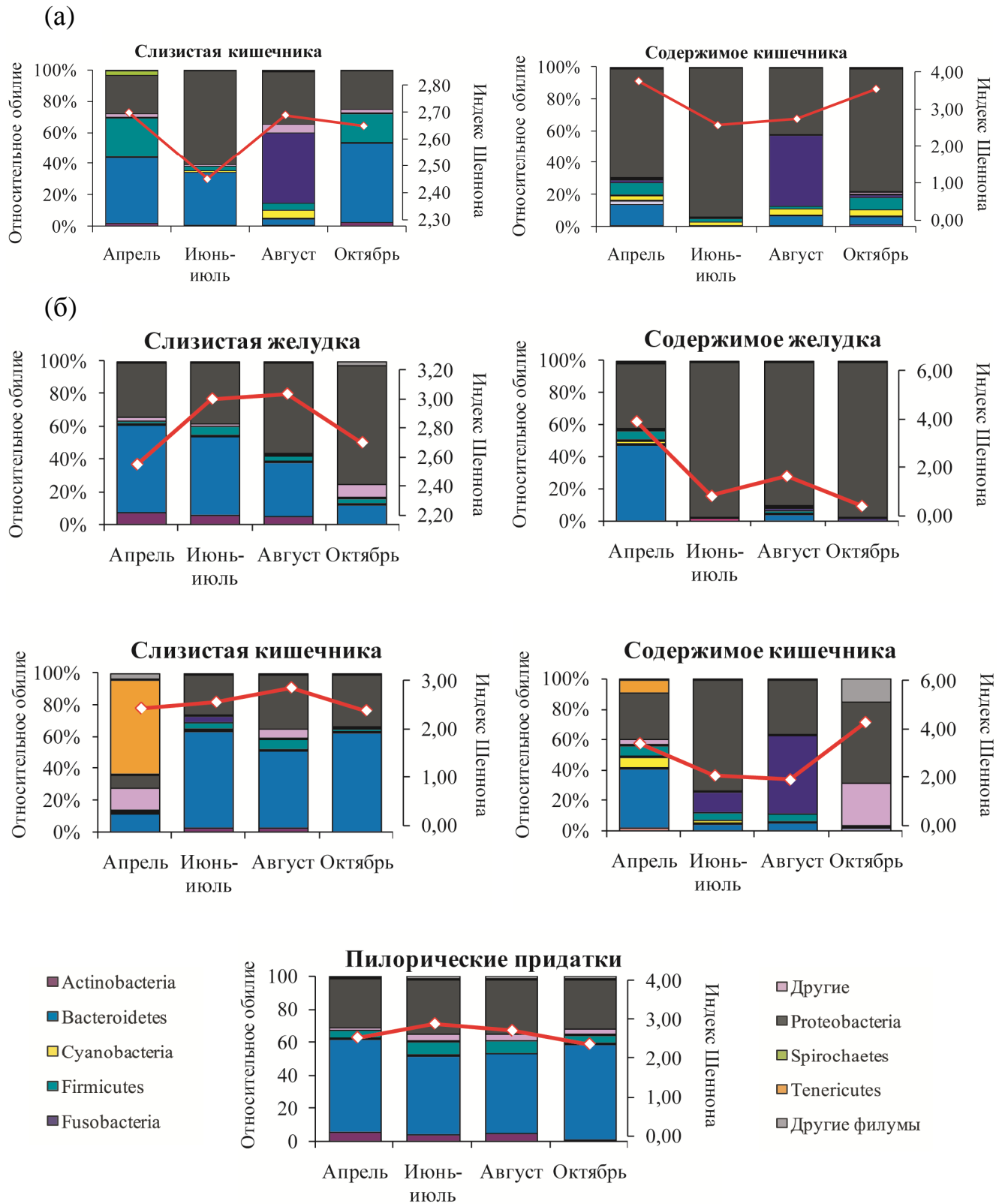


Рисунок 12. Разнообразие кишечных микробных сообществ серебряного карася (а) и окуня (б) в различные сезоны года.

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

При формировании микробиоценоза, в кишечнике организма-хозяина можно выделить две группы микроорганизмов: временно присутствующую аллохтонную микробиоту, и автохтонную микробиоту, постоянно населяющую его слизистую поверхность. Как правило, аллохтонная и автохтонная микробиота проникает в кишечник из окружающей среды с водой и пищей (Ringo et al., 2006). Для пищеварительного тракта всех видов бионта, и в частности, гидробионтов, отмечена специфичность населяющих его бактерий. Подобная специфичность связана с влиянием внешних факторов на формирование кишечного микробного сообщества макроорганизма. Как было сказано ранее, одним из важнейших факторов, влияющих на разнообразие кишечных бактерий, является пища (Шивокене, 1989; Tietjen, 2014). Пищей гидробионтов служат живые организмы и органические вещества, растворенные в воде, находящиеся во взвеси, на поверхности грунта и в его толще (Константинов, 1986).

Среда обитания гидробионтов – вода. Водная толща служит местообитанием микроорганизмов, тесно связанных своей жизнедеятельностью с другими гидробионтами. В водных экосистемах все гидробионты, от бактерий до рыб, являются частью сложных пищевых сетей (Sabo et al., 2009). Трофические связи, складывающиеся в водоемах в результате различных пищевых взаимоотношений между организмами, являются основой существования сообществ (Ильмаст, 2005). При этом бактерии, по мнению ряда авторов, стоят у основания пирамиды питания и являются мощным источником пищи, с одной стороны, и с другой – принимают участие в гидролизе органических соединений, принося свою роль в пищеварение организма-хозяина (Уголев, 1985). В связи с этим, изучение факторов, ответственных за формирование микробного сообщества, неразрывно связано с изучением микробиоты объектов питания и среды их обитания.

В данной главе рассматриваются микробные сообщества воды, грунта и объектов питания рыб разных экологических групп, специфичность формирования микробных сообществ в кишечнике рыб и степень их сходства с микроорганизмами водного биотопа.

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

Для изучения разнообразия микробных сообществ водных беспозвоночных и водного биотопа исследовано 48 образцов (табл. 14). По результатам метагеномного секвенирования проанализировано 10451 таксонообразующих единиц, которые отнесены к 20-ти известным филумам эубактерий, 2-м филумам архей и 7-и «фантомным» группам. Среди идентифицированных групп бактерий доминирующее положение для всех исследуемых образцов составили филумы Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Actinobacteria и Firmicutes. Обилие остальных групп не превышало 5% (рис. 13). 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 образцах грунта и тростника; а WS3 – только в воде и грунте.

Соотношение представленных выше доминирующих групп в течение сезона изменялось. Так, в воде в период с апреля по август доля Bacteroidetes снижалась (с 66.8 до 21.5%), а Proteobacteria, напротив, увеличивалась (с 24.3 до 56.3%). В соотношении других групп бактерий выявлена относительная стабильность, невысокое обилие в течение исследуемого сезона отмечено для таких групп бактерий как Firmicutes ($3.7 \pm 1.3\%$), Verrucomicrobia ($1.7 \pm 0.8\%$) и Cyanobacteria ($2.9 \pm 1.6\%$), с максимум обилия в летние месяцы (июнь-июль) для последнего (23.0%).

Характеристика разнообразия микробных сообществ, ассоциированных с компонентами окружающей среды

Образец	Сроки отбора проб	Количество прочтений	Количество ОТЕ
<i>Компоненты окружающей среды</i>			
Вода	Апрель	14728	270
	Июнь	14538	331
	Август	7944	1044
	Октябрь	10502	282
Тростник	Апрель	10583	914
	Июнь	6571	902
	Октябрь	12851	928
Грунт	Апрель	11877	814
	Июнь	10554	1450
	Август	10065	1107
	Октябрь	22042	377
<i>Компоненты питания</i>			
Гребляк	Июнь	17175	314
Гаммарус	Июнь	7066	239
Дафния	Июнь	9799	125
Личинка хирономиды	Июнь	9173	619
Гладыш	Июнь	14427	294
Личинка ручейника	Июнь	11385	240

Ассоциированная микробиота объектов питания исследовалась только в летние месяцы (с июня по июль). Общими филами бактерий для всех объектов питания выступали Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes и Actinobacteria. Филумы Acidobacteria и Chlamydiae выявлены только у гребляка, Chloroflexi – только у личинок хирономид и гаммаруса, Fibrobacteres – только у дафний и Planctomycetes – только у гладыша. Археи Crenarchaeota, Euryarchaeota и эубактерии Chlorobi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Spirochaetes, Nitrospira, а также «фантомные» филумы OP10, OP11, BCR1, OD1, WS3 и SR1 в объектах питания отсутствовали по сравнению с водой, грунтом и тростником.

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 *Alkalindiges* (Proteobacteria). В ассоциированной микробиоте объектов питания рыб обнаружены уникальные таксоны бактерий, не встречающиеся в других образцах. Род *Wolbachia* (Proteobacteria) и *Leminorella* (Proteobacteria) обнаружены в ассоциированной микробиоте только у гребляка и гаммаруса (рис. 14). Семейство Chlorarachniophyceae (Cyanobacteria) выявлено преимущественно у дафний (37.1%), для остальных образцов относительное обилие данного таксона не превышало 2%. В ассоциированной микробиоте воды, тростника и грунта доминировали Sphingobacteriales (Bacteroidetes), Bacillariophyta (Cyanobacteria) и Flexibacteriaceae (Bacteroidetes).

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 (рис. 13), с максимум разнообразия в августе ($H=5.5$).

Для микробиоты, ассоциированной с объектами питания, выявлено меньшее разнообразие по сравнению с компонентами окружающей среды ($2.8 < H < 4.5$). При этом микробное сообщество гаммаруса и личинок хирономид разнообразнее по сравнению с другими водными беспозвоночными (рис. 13).

В литературе имеются обширные сведения о микробиоте беспозвоночных. Из них большое внимание уделено симбионтной микробиоте термитов (Liu et al., 2013), малярийного комара (Kaufman et al., 1999; Wang et al., 2011; Duguma et al., 2013; Minard et al., 2013), моллюсков (Syvokiene, 2008), губок, бриозой, мшанок, кораллов (Haygood et al., 1999; Sabdono, 2008; Sipkema et al., 2011; Enomoto et al., 2012), а также креветок и устриц (Lau et al., 2002; Oxley et al., 2002; King et al., 2012; Rungrasamee et al., 2013; Tzuc et al., 2014). Имеющиеся литературные данные о микробиоте пресноводных беспозвоночных немногочисленны (Шивокене, 1989; Peter, Sommaruga, 2008; Syvokiene, 2008; Senderovich, Halpern, 2013) и представлены в таблице 15. Отсутствуют сведения, касающиеся ассоциированной микробиоты гребляка, гладыша и личинок ручейников.

Таким образом, по результатам метагеномного секвенирования нами установлено, что в микробиоте, ассоциированной с исследуемыми водными беспозвоночными оз. М. Чаны (личинки хирономид, гладыш, гребляк, гаммарус, личинки ручейников), а также компонентами окружающей среды наибольшее обилие составляли *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Actinobacteria*. В составе ассоциированной микробиоты дафний и воды отмечена высокая доля *Cyanobacteria* по сравнению с другими исследуемыми объектами. Для ассоциированной микробиоты объектов питания рыб выявлены уникальные таксоны бактерий, не встречающиеся ни в кишечной микробиоте рыб, ни в компонентах окружающей среды.

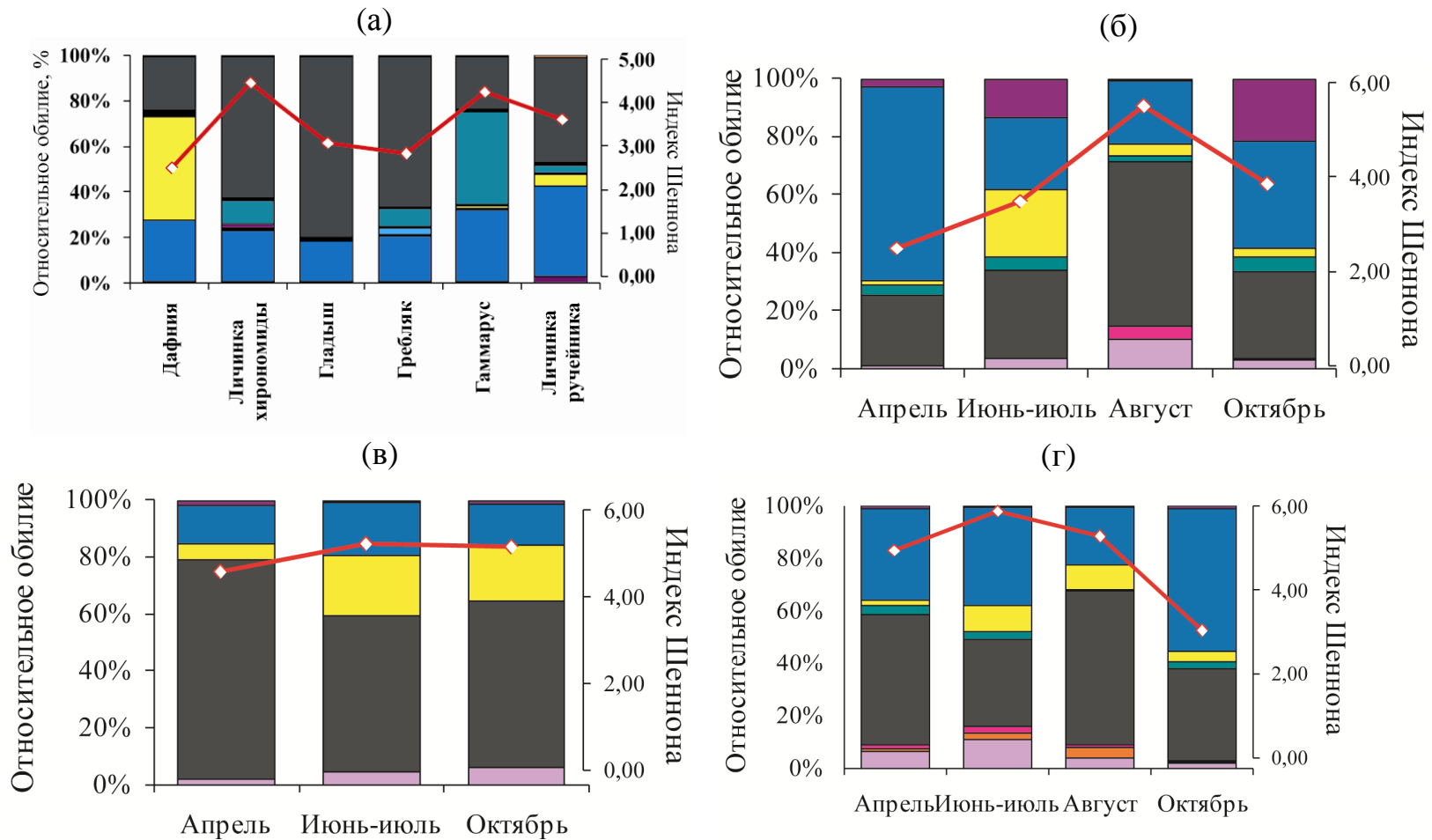


Рисунок 13. Доминирующие группы бактерий (на уровне филума) в составе микробного сообщества, ассоциированного с компонентами окружающей среды и объектами питания рыб. (а) объекты питания рыб; (б) вода; (в) тростник; (г) грунт. (■) Actinobacteria; (■) Bacteroidetes; (■) Cyanobacteria; (■) Firmicutes; (■) Proteobacteria; (■) Tendericutes; (■) Chloroflexi; (■) другие филумы. (—) индекс разнообразия микробных сообществ по Шеннону.

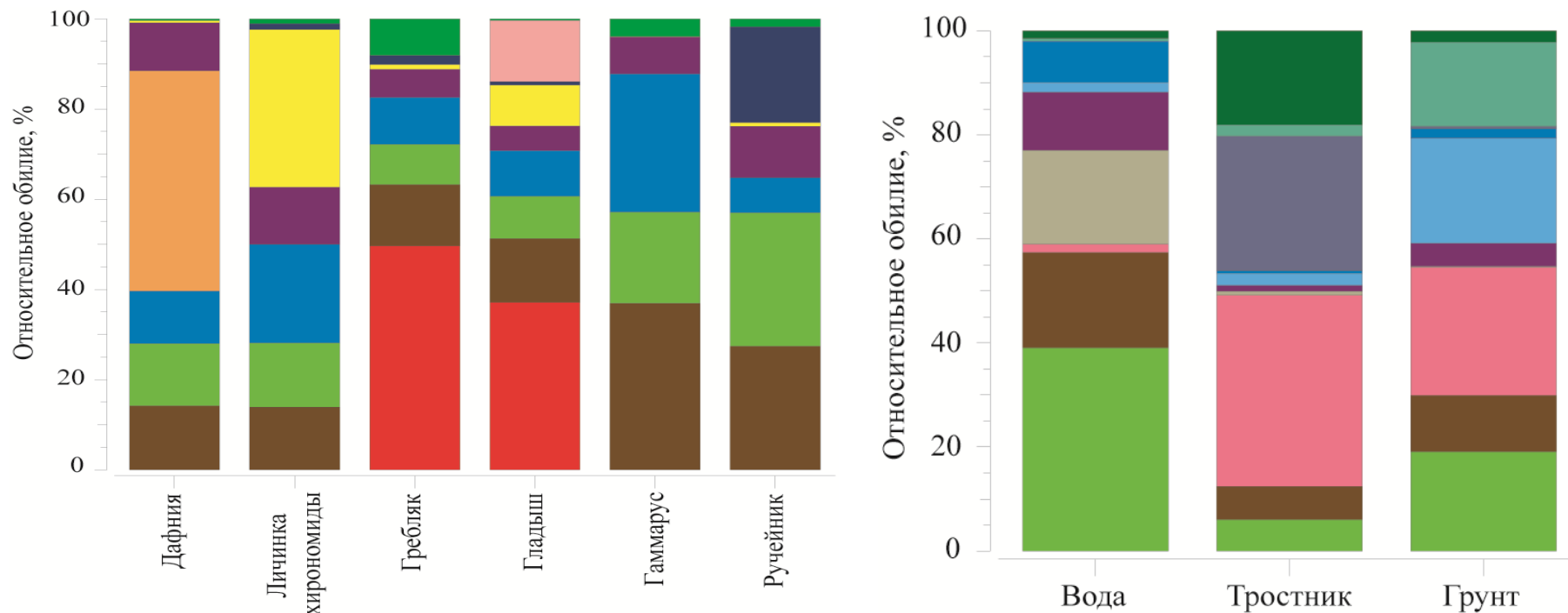


Рисунок 14. Относительное обилие 10-ти самых многочисленных ОТЕ, ассоциированных с компонентами питания рыб и компонентами водного биотопа. (■) *Wolbachia*; (■) Flexibacteriaceae; (■) Sphingobacteriales; (■) *Caulobacter*; (■) Chlorarachniophyceae; (■) *Sphingomonas*; (■) *Alkalnindiges*; (■) Enterobacteriaceae; (■) *Leminorella*; (■) *Staphylococcus*; (■) *Bacillariophyta*; (■) Alphaproteobacteria; (■) другие бактерии; (■) *Aquabacterium*; (■) другие Bacteroidetes; (■) *Rhodobacter*.

Микробиота водных беспозвоночных (литературные данные)

Беспозвоночные	Тип питания	Доминирующая микробиота	Метод исследования	Источник
Дафния <i>Daphnia longispina</i> , <i>D. pulex</i> , <i>D. rosca</i>	Фильтраторы (Константинов, 1986)	Bacteroidetes, Proteobacteria	Культивирование и гибридизация CARD-FISH	(Peter, Sommaruga, 2008)
Личинка хирономиды (<i>Chironomidae</i>)	Детрит, иловые частицы, водоросли, иногда минируют высшие водные растения (Нарчук, 2003; Определитель, 2001).	Firmicutes, Proteobacteria	Пиросеквенирование	(Senderovich, Halpern, 2013)
Гаммарус (<i>Baeckosimus affinis</i>)	Детрит, останки рыб, мелкие черви, прочая животная пища (Константинов, 1986)	<i>Vibrio</i> , <i>Oceanospirillum</i> и <i>Alteromonas</i>	Культивирование	(Harris, 1993)
Гладыш (<i>Notonectidae</i>)	Зоопланктон, мальки рыб, головастики лягушек (Бей-Биенко, 1980)		Нет данных	
Гребляк (<i>Corixidae</i>)	Клеточный сок растений, водоросли, животная пища (Определитель..., 1977; Бей- Биенко, 1980)		Нет данных	
Личинка ручейника (<i>Trichoptera</i>)	Растительные остатки, подземные части растений, водоросли, зоопланктон, бентос (Определитель..., 1977; Бей-Биенко, 1980)		Нет данных	

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

На рисунке 15 представлена дендрограмма сходства микробных сообществ кишечника рыб, объектов их питания и компонентов окружающей среды, построенная на основе матрицы сходства по Брею-Кёртису. 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.

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. 16).

Для проверки степени сходства микробиоты слизистой и содержимого кишечника рыб с ассоциированной микробиотой 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 (табл. 15).

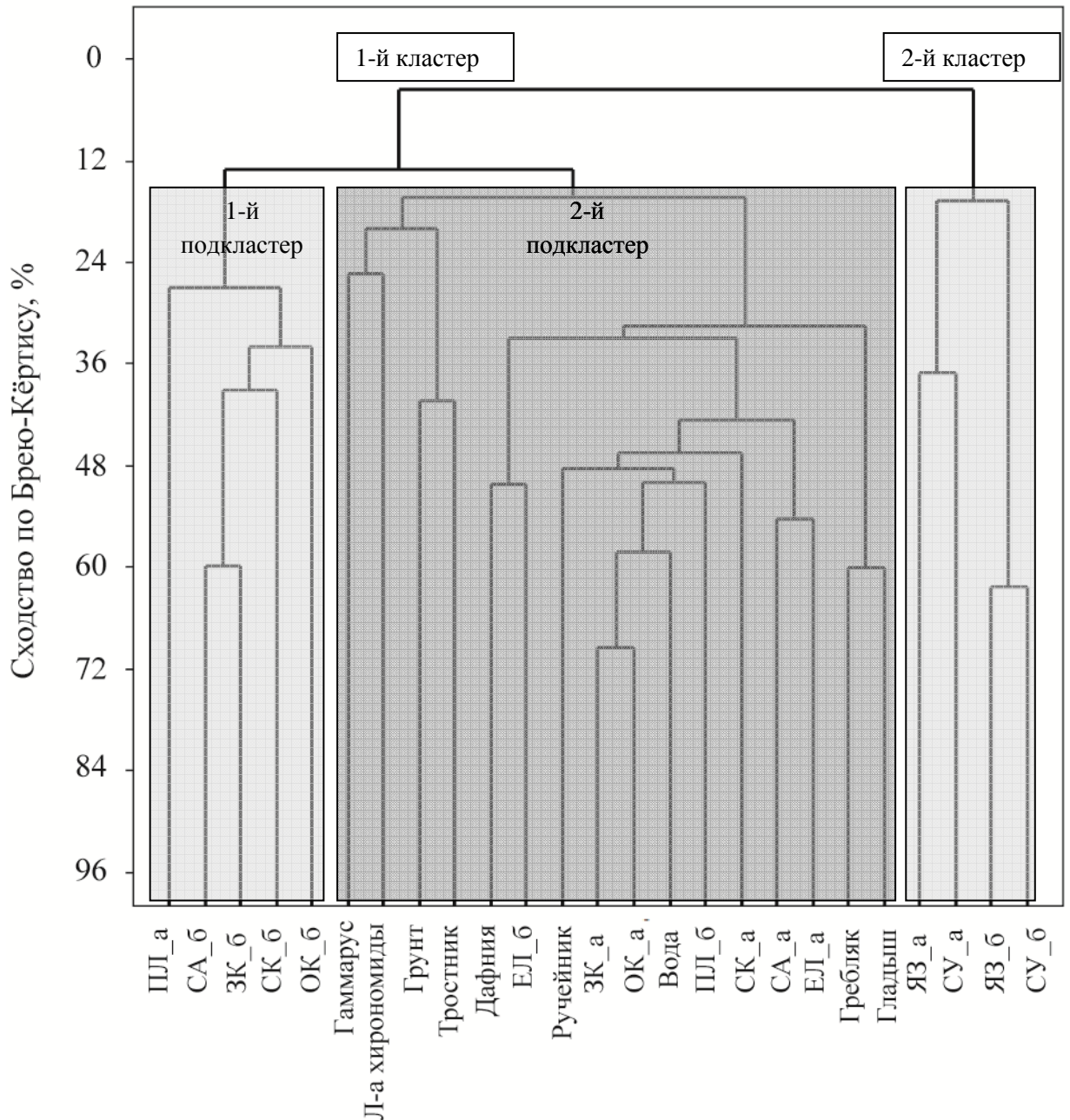


Рисунок 15. Дендрограмма сходства (по коэффициенту Брэя-Кёртиса) микробных сообществ рыб с разным типом питания, объектов питания рыб и компонентов окружающей среды. ЯЗ – язь, СУ – судак, СК – серебряный карась, ПЛ – плотва, ЕЛ – елец, ЗК – золотой карась, ОК – окунь, СА – сазан; _а – слизистая кишечника, _б – содержимое кишечника.

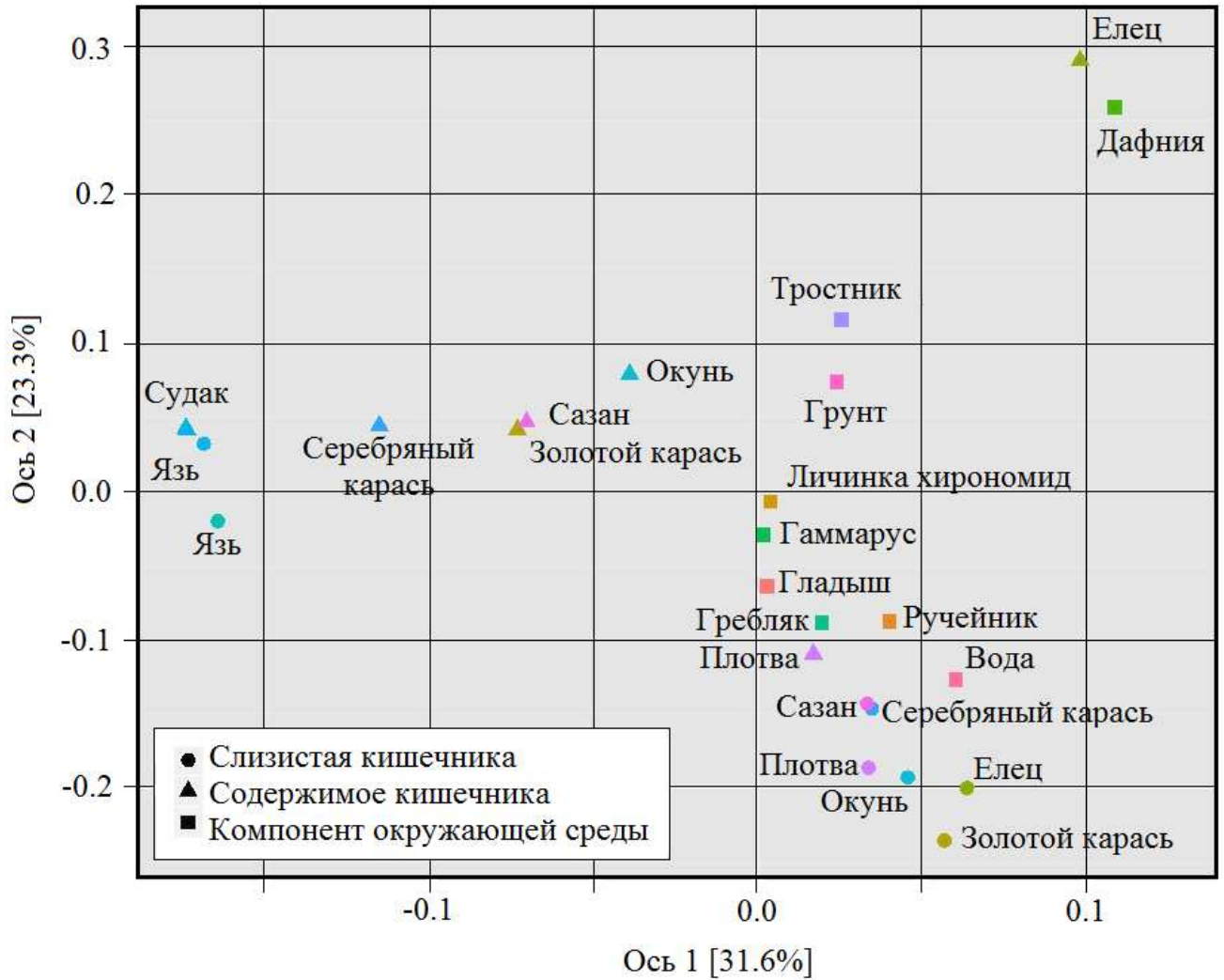


Рисунок 16. Многомерное шкалирование микробного сообщества рыб с разным типом питания и микробных сообществ компонентов окружающей среды, оцененное.

По результатам расчетов индекса Брея-Кёртиса (рис. 17) показано, что микробиота слизистой кишечника наиболее сходна с микробиотой воды и личинками ручейников. Микробиота содержимого кишечника, напротив, менее всего сходна с ассоциированной микробиотой, только содержимое кишечника язя на 50% сходно с микробиотой дафний (рис. 18).

Таблица 15.

Попарный анализ средних значений ранговых сходств кишечной микробиоты рыб и микробиоты, ассоциированной с компонентами питания рыб и окружающей среды после однофакторной ANOSIM (R-статистика)

	Слизистая кишечника	Содержимое кишечника	Язь и судак	Объекты питания	Компоненты окружающей среды
Слизистая кишечника	0	0,4667	0,9643*	0,2537	0,4506
Содержимое кишечника		0	0,996*	0,7185*	0,8272
Язь и судак			0	0,996*	0,9815
Объекты питания				0	0,3642
Компоненты окружающей среды					0

Примечание: * различия достоверны при уровне значимости <0.05 .

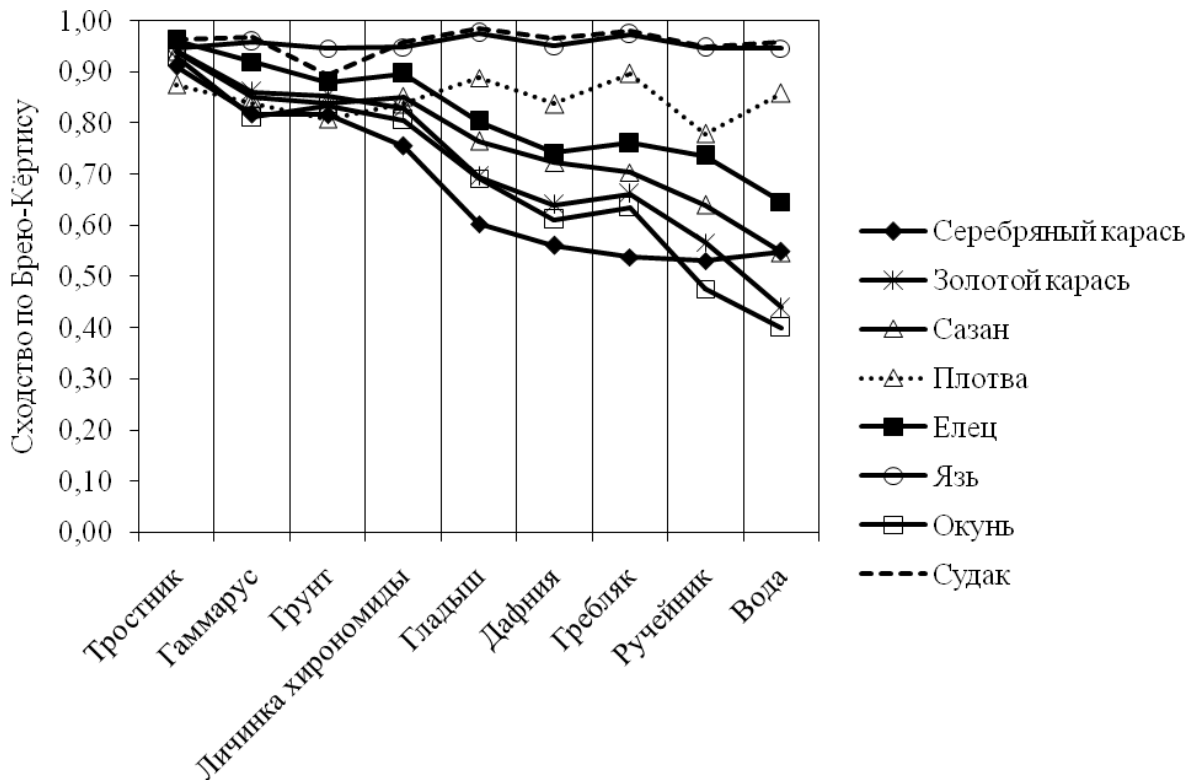


Рисунок 17. Значения коэффициентов сходства по Брью-Кёртису для микробиоты слизистой кишечника разных экологических групп с ассоциированной микробиотой окружающей среды.

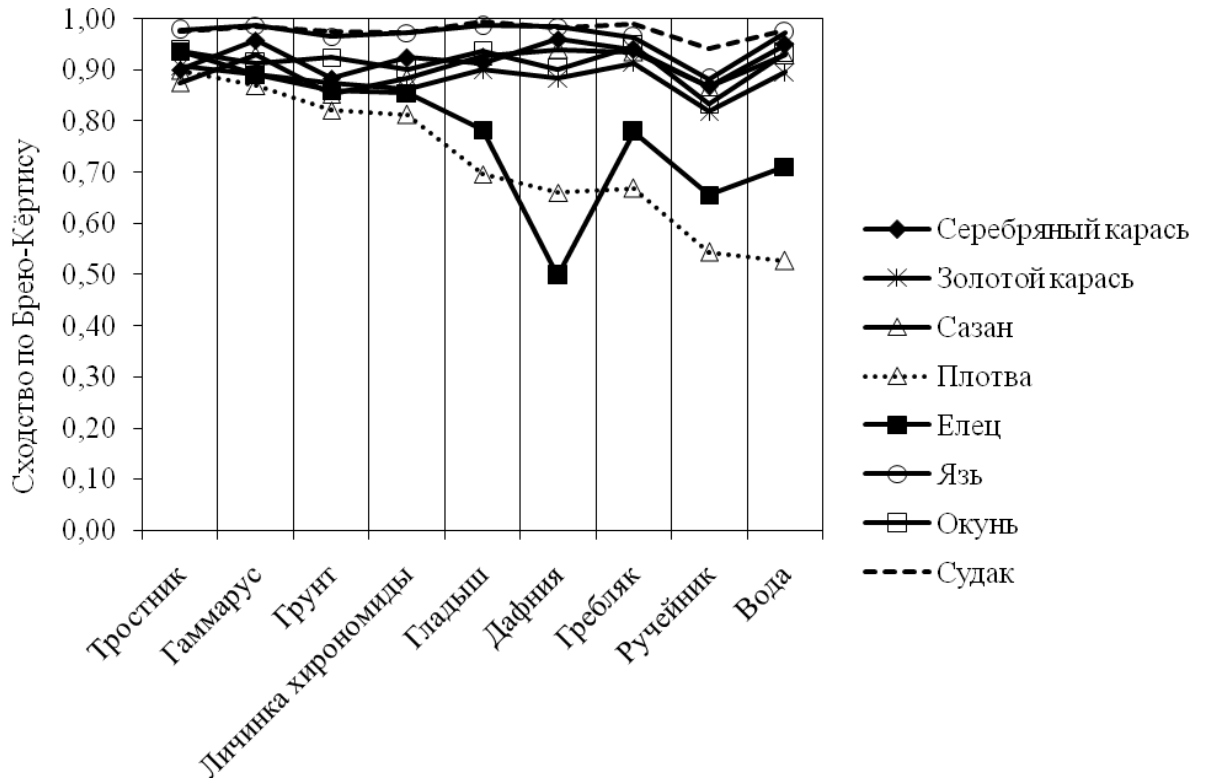


Рисунок 18. Значения коэффициентов сходства по Брью-Кёртису для микробиоты содержимого кишечника разных экологических групп с ассоциированной микробиотой окружающей среды.

В литературе существуют противоречивые представления о формировании кишечной микробиоты рыб. С одной стороны, кишечная микробиота рыб отлична от таковой объектов питания, воды и грунта (Romero, Navarrete, 2006; Han et al., 2010). С другой стороны, некоторыми авторами предполагается, что микробиота пищеварительного тракта рыб сходна с микробиотой воды и пищевых объектов (Cahill, 1990; Ringo, Olsen, 1999; Olafsen, 2001; Romero, Navarrete, 2006). Подтверждение выше указанных предположений показано на примере ряда рыб, разводимых в аквакультуре. Так, микробиота содержимого кишечника белого амура (*Stenopharyngodon idellus*) более сходна с микробиотой воды и грунта (Wu et al., 2012). Сходные результаты были получены теми же авторами и для серебряного карася (*Carassius auratus gibelio*), содержимое его кишечника более тесно связано с микробным сообществом грунта (Wu et al., 2013). Согласно другим данным, микробиота содержимого кишечника белого амура более сходна

с микробиотой, ассоциированной с пищей, нежели с таковой воды и грунта (Nap et al., 2010). Результаты проведенных нами исследований показывают, что микробиота слизистой кишечника наиболее сходна с ассоциированной микробиотой объектов питания рыб и воды; а микробиота содержимого кишечника наиболее сходна с ассоциированной микробиотой объектов питания.

При анализе сходства ассоциированной микробиоты между собой установлено, что микробиота личинок ручейников наиболее сходна с микробиотой воды и тростника. Наши результаты сопоставимы с имеющимися в литературе данными. Личинки ручейников обитают главным образом в прибрежной части водоема, встречаются среди водной растительности на различных грунтах (песчаных, илистых, каменистых, а также среди детрита) (Определитель..., 1977). Большинство видов являются растительноядными, основу их рациона составляют различные растительные остатки, подземные части растений, водоросли; некоторые представители проявляют себя в качестве хищников, они питаются мелкими животными – планктоном и бентосом (Определитель..., 1977; Бей-Биенко, 1980).

На примере микробных сообществ содержимого кишечника ельца и дафний также показана специфичность бактерий, населяющих пищеварительный тракт рыб, в зависимости от состава пищи. В питании ельца в большом количестве присутствовали зоопланктонные организмы, в частности битотрефесы. Известно, что пищу битотрефесов также составляют зоопланктонные организмы, преимущественно дафнии (Определитель..., 1995). По результатам метагеномного секвенирования показано, что для кишечной микробиоты ельца и дафний получено наибольшее сходство, по сравнению с другими исследованными объектами питания. В кишечнике этих видов в большом количестве присутствовали *Cyanobacteria* (45.9 и 45.5%, соответственно). При этом дафнии являются активными фильтраторами, и питаются микроводорослями, а также бактериями и детритом (Константинов, 1986; Определитель..., 1995). Следует отметить, что образцы кишечников отбирались в середине июня, в период максимальной продуктивности фитопланктона, при котором было

зарегистрировано «цветение» водоема, и в воде, по результатам метагеномного секвенирования, в большом количестве были обнаружены *Cyanobacteria* (23.0%). Можно предположить, что выявленные закономерности в соотношении бактерий кишечной микробиоты ельца и ассоциированной микробиоты дафний, по-видимому, связаны с особенностями их питания. Более того, бактерии, ассоциированные с пищевыми объектами (дафнии) и попадающие вместе с водой при питании, по-видимому, способны по пищевым цепям включаться в процессы пищеварения, а также способствовать формированию кишечного микробного сообщества этих гидробионтов. В защиту данного предположения могут быть приведены результаты анализа изотопной подписи карповых видов рыб эустарной части оз. М. Чаны. По данным Каная с соавт. (Kanaya et al., 2009) установлено, что зоопланктонные и бентосные организмы, входящие в состав пищи карповых рыб оз. М. Чаны, главным образом функционируют за счет микроводорослей, амфиподы *Gammarus lacustris* – от детрита макрофитов. Лещ, золотой и серебряный караси утилизируют углерод из детрита микроводорослей через зоопланктон. В то время как сазан, плотва и елец зависят от макрофитов и /или прибрежной растительности, чем от продукции водорослей.

Таким образом, 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. Состав доминантных групп бактерий, выделенных из слизистой кишечника рыб, личинок ручейников, и воды, был достаточно близким.

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 *Euarchaeota* 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 хозяинами-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 слизистой и содержимом кишечника филумы *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes* и класс *Betaproteobacteria* обнаружены только методами групп-специфичной ПЦР и метагеномного секвенирования. *Tenericutes* детектируются в слизистой 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 представлена филумами *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Cyanobacteria*.

4) В кишечнике половозрелых особей рыб оз. Чаны формируются две группы микроорганизмов: микробиота слизистой кишечника и микробиота его содержимого. Зависимость разнообразия микробиоты от типа питания 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.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алёкин О. А. Основы гидрохимии / О.А. Алекин. – Л., 1953. – 356 с.
2. Атлас пресноводных рыб России: в 2 т. / под ред. Ю.С. Решетникова. – М.: Наука, 2002. – 1 т. – 379 с.
3. Атлас пресноводных рыб России: в 2 т. / под ред. Ю.С. Решетникова. – М.: Наука, 2003. – 2 т. – 253 с.
4. Безматерных, Д.М. Состав, структура и количественная характеристика зообентоса оз. Чаны в 2001 году / Д.М. Безматерных // Сибирский экологический журнал. – 2005. – Т. 2. – С. 249 – 254.
5. Белькова, Н.Л. Методики для практических работ по большому практикуму: введение в молекулярную экологию микроорганизмов / Н.Л. Белькова. – Иркутск: ИГУ, 2008. – 42 с.
6. Бей-Биенко, Г.Я. Общая энтомология: Учебник для университетов и сельхозвузов. – 3-е изд., доп. – М.: Высш. школа, 1980. – 416 с.
7. Булатов, В.И. Ландшафтно-экологический и картографический анализ озерно-бассейновых систем юга Западной Сибири (озера Чаны и Кулундинское) / В.И. Булатов, И.Н. Ротанова, Д.В. Черных // Сибирский экологический журнал. – 2005. – № 2. – С. 175 – 182.
8. Васильев, О.Ф. Общая природная характеристика и экологические проблемы Чановской и Кулундинской озерных систем и их бассейнов / О.Ф. Васильев, В.А. Казанцев, П.А. Попов, В.В. Кириллов // Сибирский экологический журнал. – 2005. – № 2. – С. 167 – 173.
9. Воробьев, А.Б. Микробиология / А.Б. Воробьев, А.С. Быков, Е.П. Пашков, А.М. Рыбакова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2003. – 336 с.
10. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Д. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
11. Денисова, Л.Я. Биоразнообразие бактерий на различных глубинах южной котловины озера Байкал, выявленное по последовательностям 16S рРНК /

- Л.Я. Денисова, Н.Л. Белькова, И.И. Тулохонов, Е.Ф. Зайчиков // Микробиология. – 1999. – Т. 68. – №4. – С. 475 – 483.
12. Ермолаева, Н.И. Влияние минерализации на зоопланктон оз. Чаны в 2005 / Н.И. Ермолаева, О.С. Бурмистрова // Сибирский экологический журнал. – 2005. – № 2. – С. 235 – 247.
13. Заварзин, Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии / Г.А. Заварзин; отв. ред. Н.Н. Колотилова; Ин-т микробиологии. – М.: Наука, 2003. – 348 с.
14. Извекова, Г.И. Симбионтная микрофлора рыб разных экологических групп / Г.И. Извекова, Е.И. Извеков, А.О. Плотников // Известия РАН. Серия биологическая. – 2007. – № 6. – С. 1 – 10.
15. Извекова, Г.И. Трофические отношения в системе хозяин-паразит – симбионтная микрофлора: на примере пресноводных костистых рыб и цестод: дис. ... док. биол. наук: 03.00.19 / Извекова Галина Игоревна. – Борок, 2006. – 342 с.
16. Ильмаст, И.В. Введение в ихтиологию (учебное пособие) / Ильмаст И.В. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2005. – 148 с.
17. Коган, А.В. О суточном рационе и интенсивности наполнения кишечника у рыб / А.В. Коган // Вопросы ихтиологии. – 1969. – Т. 9. – Вып. 5. – С. 596 – 602.
18. Константинов, А.С. Общая гидробиология: Учебник для студентов биологических специальностей вузов / А.С. Константинов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1986. – 472 с.
19. Кузьмина, В.В. Трофическая, защитная и трансформационная функции пищеварительной системы рыб / В.В. Кузьмина // Вопросы ихтиологии. – 1999. – Т. 39. – № 1. – С. 69 – 77.
20. Кузьмина, В.В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб / В.В. Кузьмина. – М.: Наука, 2005. – 300 с.

21. Мисейко, Г.Н. Зообентос озера Чаны (лето 2002) / Г.Н. Мисейко, В.В. Михалина // Известия Алтайского государственного университета. – 2004. – № 3. – С. 90 – 93.
22. Нарчук, Э.П. Определитель семейств двукрылых насекомых фауны России и сопредельных стран (с кратким обзором семейств мировой фауны) / Э.П. Нарчук. – СПб: Зоологический институт РАН, 2003. – 253 с.
23. Никольский, Г.В. Частная ихтиология / Г.В. Никольский. – М.: Советская наука, 1954. – 458 с.
24. Никольский, Г.В. Экология рыб / Г.В. Никольский. – М.: Высшая школа, 1963. – 368 с.
25. Определитель пресноводных беспозвоночных европейской части СССР (планктон и бентос) / под. ред. Л.А. Кутикова, Я.И. Старобогатова. – Л.: Гидрометеиздат, 1977. – 511 с.
26. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. Ракообразные / под. общ. ред. С.Я. Цалолихина. – СПб: Наука, 1995. – 2 т. – 632 с.
27. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. Высшие насекомые / под. общ. ред. С.Я. Цалолихина. – СПб: Наука, 2001. – 5 т. – 825 с.
28. Петлина, А.П. Изучение молоди пресноводных рыб Сибири: Учебное пособие / А.П. Петлина, В.И. Романов. – Томск: Издательство Томского университета, 2004. – 203 с.
29. Попов, П.А. Рыбы озера Чаны / П.А. Попов, В.А. Воскобойников, В.А. Щенев // Сибирский экологический журнал. – 2005. – № 2. – С. 279 – 293.
30. Пульсирующее озеро Чаны / отв. ред. Н.П. Смирнова, А.В. Шнитников. – Л.: Наука, 1982. – 304 с.
31. Руководство по гидробиологическому мониторингу поверхностных экосистем / под ред. В.А. Абакумова. – СПб: Гидрометеиздат, 1992. – 318 с.

32. Савкин, В.М. Основные гидролого-морфологические и гидрохимические характеристики озера Чаны / В.М. Савкин, С.Я. Двуреченская, Я.В. Сапрыкина, К.В. Марусин // Сибирский экологический журнал. – 2005. – № 2. – С. 183 – 192.
33. Суханова, Е.В. Сообщества микроорганизмов, ассоциированных с лососевидными рыбами озера Байкал: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Суханова Елена Викторовна. – Иркутск, 2012. – 20 с.
34. Уголев, А.М. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб / А.М. Уголев, В.В. Кузьмина. – СПб: Гидрометеиздат, 1993. – 239 с.
35. Уголев, А.М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций: Элементы современного функционализма / А.М. Уголев. – Л.: Наука, 1985. – 544 с.
36. Шивокене, Я. Симбионтное пищеварение у гидробионтов и насекомых / Я. Шивокене. – Вильнюс: Мокслас, 1989. – 223 с.
37. Экология озера Чаны / под ред. Б.Г. Иоганзена, Г.М. Кривошекова. – Новосибирск: Наука, 1986. – 270 с.
38. Acinas, S.G. PCR-induced sequence artifacts and bias: clone libraries constructed from the same insights from comparison of two 16S rRNA sample / S.G. Acinas, R. Sarma-Rupavtarm, V. Klepac-Ceraj, M.F. Polz // Applied and Environmental Microbiology – 2005. – V. 71. – № 12. – P. 8966 – 8969.
39. Aiso, K. Microflora in the digestive tract of onshore fish in Japan / K. Aiso, U. Simido, K. Hasuo // Journal of General Microbiology – 1968. – № 52. – P. 361 – 364.
40. Aladin, N. Large saline lakes of former USSR: a summary review / N. Aladin, I. Plotnikov // Hydrobiologia. – 1993. – № 267. – P. 1 – 12.
41. Al-Harbi, A.H. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia / A.H. Al-Harbi, M.N. Uddin // Aquaculture. – 2005. – № 229. – P. 37 – 44.

42. Ashelford, K.E. 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies / K.E. Ashelford, N.A. Chuzhanova, J.C. Fry, A.J. Jones, A.J. Weightman // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 71. – P. 7724 – 7736.
43. Ashelford, K.E. PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database / K.E. Ashelford, A.J. Weightman, J.C. Fry // *Nucleic Acids Research*. – 2002. – V. 30. – № 15. – P. 3481 – 3489.
44. Austin, B. The bacterial microflora of fish / B. Austin // *The Scientific World Journal*. – 2002. – № 2. – P. 558 – 572.
45. Bacanu, M.G. Aspects regarding the profile of intestinal microbiota on wild population of starlet (*Acipenser ruthenus*, L., 1758) / M.G. Bacanu, L. Oprea, G.C. Sandu, R. Dinica, M. Maereanu, D. Maereanu, *et al.* // *The Annals of the University «Dunarea de Jos of Galati» – Fascicle VI: Food Technology*. – 2012. – V. 36. – № 2. – P. 58 – 63.
46. Bacchetti De Gregoris, T. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa / T. Bacchetti De Gregoris, N. Aldred, A.S. Clare, J.G. Burgess // *Journal of Microbiological Methods*. – 2011. – V. 86. – № 3. – P. 351 – 356.
47. Bairagi, A. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts / A. Bairagi, K.S. Ghosh, S.K. Sen, A.K. Ray // *Aquaculture International*. – 2002. – V. 10. – I. 2. – P. 109 – 121.
48. Balcazar, J. The role of probiotics in aquaculture. / J. Balcazar, I. Blas, I. Ruizarruela, D. Cunningham, D. Vendrell, Muzquiz J. // *Vet. Microbiol.* – 2006. – № 114. – P. 173 – 186.
49. Barton, N.H. *Evolution*. Third Edition / N.H. Barton, D.E.G. Briggs, J.A. Eisen, D.B. Goldstein, N.H. Patel. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. – 833 p.
50. Bennett, K.W. Fusobacteria: new taxonomy and related diseases / K.W. Bennett, A. Eley // *Journal of Medical Microbiology*. – 1993– V. 39. – P. 246 – 254.

51. Blackwood, C.B. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis / C.B. Blackwood, A. Oaks, J.S. Buyer // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 71. – P. 6193 – 6198.
52. Bolnick, D.I. Individuals' diet diversity influences gut microbial diversity in two freshwater fish (threespine stickleback and Eurasian perch) / D.I. Bolnick, L.K. Snowberg, P.E. Hirsch, C.L. Lauber, R. Knight, J.G. Caporaso, *et al.* // *Ecology Letters*. – 2014. – V. 17. – I. 8. – P. 979 – 987.
53. Cahill, M.M. Bacterial flora of fishes: a review / M.M. Cahill // *Microbial Ecology*. – 1990. – V. 19. – № 1. – P. 21 – 41.
54. Cani, P.D. Gut microbiota and obesity: lessons from the microbiome / P.D. Cani // *Briefings in functional genomics*. – 2013. – V. 12. – № 4. – P. 381 – 387.
55. Cantas, L. Culturable gut microbiota diversity in zebrafish / L. Cantas, J.R. Sorby, P. Alestrom, H. Sorum // *Zebrafish*. – 2012. – № 9. – P. 26 – 37.
56. Caporaso, J.G. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample / J.G. Caporaso, C.L. Lauber, W.A. Walters, D. Berg-Lyons, C.A. Lozuponea, P.J. Turnbaughd, *et al.* // *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011. – № 108. – P. 4516 – 4522.
57. Caporaso, J.G. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data / J.G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F.D. Bushman, E.K. Costello, *et al.* // *Nature Methods*. – 2010. – V. 7. – I. 5. – P. 335 – 336.
58. Caporaso, J.G. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and Metagenomic sequencing platforms / J.G. Caporaso, C.L. Lauber, W.A. Walters, D. Berg-Lyons, J. Huntley, N. Fierer, *et al.* // *ISME Journal*. – 2012. – № 6. – P. 1621 – 1624.
59. Carda-Diéguez, M. Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. / M. Carda-Diéguez, A. Mira, B. Fouz // *FEMS Microbiol Ecol*. – 2014. – V. 87. – P. 451 – 459.

60. Chakravorty, S. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria / S. Chakravorty, D. Helb, M. Burday, N. Connell, D. Alland // *Journal of Microbiological Methods*. – 2007. – V. 69. – № 2. – P. 330 – 339.
61. Clements, K.D. Fermentation and gastrointestinal microorganism in fishes / K.D. Clements // *Gastrointestinal ecosystems and fermentation*. – 1997. – Ch. 6. – P. 156 – 198.
62. DeLong, E. Archaea in coastal marine environments / E. DeLong // *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1992. – V. 89. – № 12. – P. 5685 – 5689.
63. Denev, S. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture / S. Denev, Y. Staykov, R. Moutafchieva, G. Beev // *International aquatic research*. – 2009. – № 1. – P. 1 – 29.
64. Desai, A.R. Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / A.R. Desai, M.G. Links, S.A. Collins, G.S. Mansfield, M.D. Drew, A.G. Van Kessel, *et al.* // *Aquaculture*. – 2012. – V. 350 – 353. – P. 134 – 142.
65. DeSantis, T.Z. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB / T.Z. DeSantis, P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E.L. Brodie, K. Keller, T. Huber, *et al.* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 72. – № 7. – P. 5069 – 5072.
66. Duguma, D. Bacterial communities associated with *Culex* mosquito larvae and two emergent aquatic plants of bioremediation importance / D. Duguma, P. Rugman-Jones, M.G. Kaufman, M.W. Hall, J.D. Neufeld, *et al.* // *PLoS ONE*. 2013. – V. 8. – I. 8. – P. 1 – 11.
67. Enomoto, M. Microbial communities associated with holothurians: presence of unique bacteria in the coelomic fluid / M. Enomoto, S. Nakagawa, T. Sawabe // *Microbes and Environments*. – 2012. – V. 27. – № 3. – P. 300 – 305.

68. Fakruddin, M. Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments / M. Fakruddin, K. Mannan // *Ceylon Journal of Science (Bio. Sci.)*. – 2013. – V. 42. – № 1. – P. 19 – 33.
69. Fierer, N. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays / N. Fierer, J.A. Jackson, R. Vilgalys, R.B. Jackson // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 71. – № 7. – P. 4117 – 4120.
70. Ginter, K. Diet niche relationships among predator and prey fish species in their early life stages in Lake Võrtsjärv (Estonia) / K. Ginter, K. Kangur, A. Kangur, P. Kangur, M. Haldna // *Journal of Applied Ichthyology*. – 2012b. – № 28. – P. 713 – 720.
71. Ginter, K. Shifts in prey selection and growth of juvenile pikeperch (*Sander lucioperca*) over half a century in a changing Lake Võrtsjärv / K. Ginter, K. Kangur, A. Kangur, P. Kangur, M. Haldna // *Open Journal of Applied Sciences*. – 2012a. – № 2. – P. 168 – 176.
72. Green, T.J. Dietary soybean protein concentrate-induced intestinal disorder in marine farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* is associated with alterations in gut microbiota / T.J. Green, R. Smullen, A.C. Barnes // *Vet. Microbiol.* – 2013. – № 166. – P. 286 – 292.
73. Grosskopf, R. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval / R. Grosskopf, P.H. Janssen, W. Liesack // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1998. – V. 64. – № 3. – P. 960 – 969.
74. Guma'a, S.A. The food and feeding habits of young perch, *Perca fluviatilis*, in Windermere / S.A. Guma'a // *Freshwater Biology*. – 1978. – № 8. – P. 177 – 187.
75. Haas, B.J. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons / B.J. Haas, D. Gevers, A.M. Earl, M. Feldgarden, D.V. Ward, G. Giannoukos, *et al.* // *Genome Research*. – 2011. – V. 21. – № 3. – P. 494 – 504.

76. Hammer, Ø. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis / Ø. Hammer, D.A.T. Harper, P.D. Ryan // *Palaeontologia Electronica*. – 4(1). – P. 9.
77. Han, S. Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S rDNA gene sequences / S. Han, Y. Liu, Z. Zhou, S. He, Y. Cao, P. Shi, *et al.* // *Aquaculture Research*. – 2010. – № 42. – P. 47–56.
78. Hansen, G.H. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish / G.H. Hansen, J.A. Olafsen // *Microbial Ecology*. – 1999. – V. 38. – P. 1–26.
79. Harris, J.M. The Presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis / J.M. Harris // *Microbial Ecology*. – 1993. – V. 25. – P. 195–231.
80. Haygood, M.G. Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology / M.G. Haygood, E.W. Schmidt, S.K. Davidson, D.J. Faulkner // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. – 1999. – V. 1. – № 1. – P. 33–43.
81. He, S. Effects of the antibiotic growth promoters flavomycin and florfenicol on the autochthonous intestinal microbiota of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) / S. He, Z. Zhou, Y. Liu, Y. Cao, K. Meng, P. Shi, *et al.* // *Archives of Microbiology*. – 2010. – № 192. – P. 985–994.
82. Hooper, L. Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: Exploring an internal ecosystem / L. Hooper, Bry L., Falk P., J.I. Gordon // *BioEssays*. – 1998. – V. 20. – № 4. – P. 336–343.
83. Huang, H. Diversity of beta-propeller phytase gene in the intestinal contents of grass carp insight into the major phosphorus release from phytate in nature / H. Huang, P. Shi, Y. Wang, H. Luo, N. Shao, G. Wang, *et al.* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2009. – V. 75. – № 6. – P. 1508–1516.
84. Huber, I. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) / I.

- Huber, B. Spanggaard, K. Appel, L. Rossen, T. Nielsen, L. Gram // *Journal of Applied Microbiology*. – 2004. – V. 96. – I. 1. – P. 117 – 132.
85. Hugenholtz, P. Impact of Culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity / P. Hugenholtz, B.M. Goebel, N.R. Pace // *Journal of Bacteriology*. – 1998. – V. 180. – № 18. – P. 4765 – 4774.
86. Ingerslev, H.-C. The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type / H.-C. Ingerslev, L. von Gersdorff Jørgensen, M. Lenz Strube, N. Larsen, I. Dalsgaard, M. Boye, L. Madsen // *Aquaculture*. – 2014. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.12.032.
87. Kanaya, G. Contribution of organic matter sources to cyprinid fishes in the Chany Lake-Kargat River estuary, western Siberia / G. Kanaya, E.N. Yadrenkina, E.I. Zuykova, E. Kikuchi, H. Doi, S. Shikano, *et al.* // *Marine and Freshwater Research*. – 2009. – № 60. – P. 510 – 518.
88. Kaufman, M.G. Effects of larval mosquitoes (*Aedes triseriatus*) and stemflow on microbial community dynamics in container habitats / M.G. Kaufman, E.D. Walker, T.W. Smith, R.W. Merritt, M.J. Klug // *Applied and Environment Microbiology*. – 1999. – V. 65. – № 6. – P. 2661 – 2673.
89. Kessel, M. Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.) / M. Kessel, B.E. Dutilh, K. Neveling, M.P Kwint, J.A Veltman, G. Flik *et al.* // *AMB Express*. – 2011. – V. 1. – № 41. – P. 1 – 9.
90. Kim, D.-H. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / D.-H. Kim, J. Brunt, B. Austin // *Journal of Applied Microbiology*. – 2007. – № 102. – P. 1654 – 1664.
91. King, G.M. Analysis of stomach and gut microbiomes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) from coastal Louisiana, USA / G.M. King, C. Judd, C.R. Kuske, C. Smith // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – I. 12. – P. 1 – 11.
92. Kirk, J.L. Methods of studying soil microbial diversity / J.L. Kirk, L.A. Beaudette, M. Hart, P. Moutoglis, J.N. Klironomos, H. Lee, *et al.* // *Journal of Microbiological Methods*. – 2004. – № 58. – P. 169 – 188.

93. Kopczynski, E.D. Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms / E.D. Kopczynski, M.M. Bateson, D.M. Ward // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1994. – V. 60. – № 2. – P. 746 – 748.
94. Korsnes, K. Bacteria in the gut of juvenile cod *Gadus morhua* fed live feed enriched with four different commercial diets / K. Korsnes, O. Nicolaisen, C.K. Ska'r, A.H. Nerland, Ø. Bergh // *ICES Journal of Marine Science*. – 2006. – V. 63. – P. 296 – 301.
95. Lan, C. Molecular characterisation of bacterial community structure along the intestinal tract of zebrafish (*Danio rerio*): A Pilot Study / C. Lan, D. Love // *ISRN Microbiology*. – 2011. – V. 2012. – P. 1 – 10.
96. Lau, W.W.Y. Genetic diversity of attached bacteria in the hindgut of the deposit-feeding shrimp *Neotrypaea* (formerly *Callinassa*) *californiensis* (Decapoda: Thalassinidae) / W.W.Y. Lau, P.A. Jumars, E.V. Armbrust // *Microbial ecology*. – 2002. – V. 43. – I. 4. – P. 455 – 466.
97. Lane, D. 16s/23s rRNA sequencing / D. Lane; In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*. – John Wiley and Sons, West Sussex, United Kingdom. – 1991. – p. 115 – 175.
98. Laparra, J.M. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals / Laparra, J.M., Sanz, Y. // *Pharmacological Research*. – 2010. – V. 61. – P. 219 – 225.
99. Larsen, A.M. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species / A.M. Larsen, H.H. Mohammed, C.R. Arias // *J. of applied Microbiology*. – 2015. – № 116. – P. 1396 – 1404.
100. Lee, K.-C. Phylum Verrucomicrobia representatives share a compartmentalized cell plan with members of bacterial phylum Planctomycetes / K.-C. Lee, R.I Webb, P.H Janssen, P. Sangwan, T. Romeo, J.T Staley, J.A Fuerst // *BMC Microbiology*. – 2009. – V. 9. – № 5. – P. 1 – 10.

101. Ley, R.E. Gordon Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota / R.E. Ley, C.A. Lozupone, M. Hamady, R. Knight, J.I. // *Nat Rev Microbiol.* – 2008. – V. 6. – I. 10. – P. 776–788.
102. Li, J. Comparative study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different feeding habits / J. Li, J. Ni, J. Li, C. Wang, X. Li, S. Wu, T. Zhang, Y. Yu, Q. Yan // *J Appl Microbiol.* – 2014. – V. 117. – I. 6. – P. 750 – 760.
103. Li, X. Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae / X. Li, Y. Yu, W. Feng, Q. Yan, Y. Gong // *J. Microbiol.* – 2012. – V. 50. – P. 29 – 37.
104. Li, X. Gut microbiota contributes to the growth of fast-growing transgenic Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) / X. Li, Q. Yan, S. Xie, W. Hu, Y. Yu, Z. Hu // *PLoS ONE.* – 2013. – V.8. – I. 5. – P. 1 – 11.
105. Liu, W.T. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA / W.T. Liu, T.L. Marsh, H. Cheng, L.J. Forney // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1997. – V. 63. – P. 4516 – 4522.
106. Liu, N. Metagenomic insights into metabolic capacities of the gut microbiota in a fungus-cultivating termite (*Odontotermes yunnanensis*) / N. Liu, L. Zhang, H. Zhou, M. Zhang, X. Yan, Q. Wang, *et al.* // *PLoS ONE.* – 2013. – V. 8. – I. 7. – P. 1 – 12.
107. Luo, L. Effects of *Andrographis paniculata* on the variation of intestinal microflora of *Ctenopharyngodon idellus* / L. Luo, X. Chen, X. Cai // *Journal of Fishery Sciences of China.* – 2001. – V. 25. – P. 232 – 237.
108. Lv, X. A meta-analysis of the Bacterial and Archaeal diversity observed in wetland soil / X. Lv, J. Yu, Y. Fu, B. Ma, F. Qu, K. Ning, H. Wu // *The Scientific World Journal.* – 2014. – V. 2014. – P. 1 – 12.
109. Mac Cormack, W.P. Bacterial flora of newly caught antarctic fish *Notothenia neglecta* / W.P. Mac Cormack, E.R. Fraile // *Polar Biology.* – 1990. – № 10. – P. 413 – 417.

110. Manz, W. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides in the natural environment / W. Manz, R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt, K.H. Schleifer // *Microbiology*. – 1996. – V. 142. – № 5. – P. 1097 – 1106.
111. Manz, W. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions / W. Manz, R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, K.-H. Schleifer // *Systematic and Applied Microbiology*. – 1992. – V. 15. – P. 593 – 600.
112. Marchesi, J.R. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA / Marchesi J.R., Sato T., Weightman A.J., Martin T.A., Fry J.C., Hiom S.J., Wade W.G. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1998. – V. 64. – № 2. – P. 795 – 799.
113. McDonald, R. Phylogenetic analysis of microbial communities in different regions of the gastrointestinal tract in *Panaque nigrolineatus*, a Wood-Eating fish / R. McDonald, H.J. Schreier, J.E.M. Watts // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – I. 10. – P. 1 – 9.
114. McIntosh, D. Culture-independent characterization of the bacterial populations associated with cod (*Gadus morhua* L.) and live feed at an experimental hatchery facility using denaturing gradient gel electrophoresis / D. McIntosh, B. Ji, B.S. Forward, V. Puvanendran, D. Boyce, R. Ritchie // *Aquaculture*. – 2008. – V. 275. – P. 42 – 50.
115. McMurdie, P.J. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. / P.J. McMurdie, S. Holmes // *PLoS ONE*. – 2013. – V. 8. – I. 4. – P. 1 – 11.
116. Michel, P. Feeding habits of fourteen European freshwater fish species / P. Michel, T. Oberdorff // *Cybium*. – 1995. – V. 19. – I. 1. – P. 5 – 46.
117. Mickeniene, L. Changes of the diversity of the bacteriocenosis in the digestive tract of fish under the impact of heavy metals / L. Mickeniene, J. Syvokiene // *Ekologija*. – 2001. – № 4. – P. 11 – 15.

118. Minard, G. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont / G. Minard, P. Mavingui, C.V. Moro // *Parasites & Vectors*. – 2013. – V. 6. – № 146. – P. 1 – 12.
119. Montet, D. Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of microbial communities by PCR-DGGE: An application on fish from different tropical origins / D. Montet, D.D.L. Nguyen, A.C. Kouakou // *Aquaculture*. – 2008. – V. 19. – I. 5. – P. 454 – 460.
120. Moran, D. Ontogenetic development of the gastrointestinal microbiota in the marine herbivorous fish *Kyphosus sydneyanus* / D. Moran, S.J. Turner, K.D. Clements // *Microbial Ecology*. – 2005. – V. 49. – P. 590 – 597.
121. Mouchet, M.A. Genetic difference but functional similarity among fish gut bacterial communities through molecular and biochemical fingerprints / M.A. Mouchet, C. Bouvier, T. Bouvier, M. Troussellier, A. Escalas, D. Mouillot // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2011. – V. 79. – I. 3. – P. 568 – 580.
122. Muhling, M. Improved group-specific PCR primers for denaturing gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities / M. Muhling, A. Woolven, J.C. Murrel, I. Joint // *The ISME Journal*. – 2008. – V. 2. – I. 4 – P. 379 – 392.
123. Navarrete, P. Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile atlantic salmon (*Salmo salar* L.) / P. Navarrete, R.T. Espejo, J. Romero // *Microbial Ecology*. – 2009. – № 57. – P. 550 – 561.
124. Navarrete, P. Molecular analysis of intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / P. Navarrete, F. Magne, P. Mardones, M. Riveros, R. Opazo, A. Suau *et al.* // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2010. – V. 71. – P. 148–156.
125. Navarrete, P. PCR-TTGE analysis of 16S rRNA from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria / P. Navarrete, F. Magne, C. Araneda, P. Fuentes, L. Barros, R. Opazo, *et al.* // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – I. 2. – P. 1 – 10.

126. Nesbo, C.L. Searching for mesophilic Thermotogales bacteria: «mesotogas» in the wild / C.L. Nesbo, R. Kumaraswamy, M. Dlutek, W.F. Doolittle, J. Foght // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2010. – V. 76. – I. 14. – P. 4896 – 4900.
127. Ni, J. Comparison of intestinal bacterial communities in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, from two different habitats / J. Ni, Y. Yu, T. Zhang, L. Gao // *Chin. J. Oceanol. Limnol.* – 2012. – № 30. – P. 757 – 765.
128. Nubel, U. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from Cyanobacteria / U. Nubel, F. Garcia-Pichel, G. Muyzer // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1997. – V. 63. – № 8. – P. 3327 – 3332.
129. Olafsen, J. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture / J. Olafsen // *Aquaculture*. – 2001. – V. 200. – P. 223 – 247.
130. Oxley, A.P.A. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis* / A.P.A. Oxley, W. Shipton, L. Owens, D. McKay // *Journal of Applied Microbiology*. – 2002. – V. 93. – P. 214 – 223.
131. Parks, B.W. Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice / B.W. Parks, E. Nam, E. Org, E. Kostem, F. Norheim, S.T. Hui, *et al.* // *Cell Metabolism*. – 2013. – V. 17. – P. 141 – 152.
132. Penttinen, O.P. Seasonal feeding activity and ontogenetic dietary shifts in crucian carp, *Carassius carassius* / O.P. Penttinen, I.J. Holopainen // *Environmental Biology of Fishes*. – 1992. – № 33. – P. 215 – 221.
133. Peter, H. An evaluation of methods to study the gut bacterial community composition of freshwater zooplankton / H. Peter, R. Sommaruga // *Journal of plankton research*. – 2008. – V. 30. – № 9. – P. 997 – 1006.
134. Piterina, A.V. Use of PCR-DGGE based molecular methods to analyse microbial community diversity and stability during the thermophilic stages of an ATAD wastewater sludge treatment process as an aid to performance monitoring / A.V. Piterina, J.T. Pembroke // *ISRN Biotechnology*. – 2013. – V. 2013. – P. 1 – 13.

135. Popova, O.A. Food and feeding relations of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and pikeperch (*Stizostedion lucioperca*) in various waters of the USSR / O.A. Popova, L.A. Sytina // Journal of the Fisheries Research Board of Canada. – 1977. – № 34. – P. 1559 – 1570.
136. Raja, K. Diversity of bacterial populations in recirculating marine aquarium with different marine ornamental fishes / K. Raja, O. Fernando, R. Thavasi, S. Jayalaksmi, T. Balasubramanian // Research Journal of Microbiology. – 2006. – № 5. – P. 448 – 452.
137. Rawls, J.F. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota / J.F. Rawls, B.S. Samuel, J.I. Gordon // PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – V. 101. – P. 4596 – 4601.
138. Ringo E. Characterization of *Carnobacterium divergens* strain 6251 isolated from intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) / E. Ringo, M. Seppola, A. Berg, R.E. Olsen, U. Schillinger, W. Holzapfel // Systematic and Applied Microbiology. – 2002. – V. 25. – P. 120 – 129.
139. Ringo, E. Characterization of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal / E. Ringo, S. Sperstad, R. Myklebust, S. Refstie, A. Kroghdahl // Aquaculture. – 2006. – V. 261. – I. 3. – P. 829 – 841.
140. Ringo, E. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish / E. Ringo, R.E. Olsen, T.M. Mayhew, R. Myklebust // Aquaculture. – 2003. – № 227. – P. 395 – 415.
141. Ringo E. The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) / E. Ringo, R.E. Olsen // Journal of Applied Microbiology. – 1999. – V. 86. – I. 1. – P. 22 – 28.
142. Robertson, C.E. Explicit: graphical user interface software for metadata-driven management, analysis and visualization of microbiome data / C.E. Robertson, J.K. Harris, B.D. Wagner, D. Granger, K. Browne, B. Tatem // BIOINFORMATICS. – 2013. – V. 29. – № 23. – P. 3100 – 3101.

143. Roeselers, G. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish / G. Roeselers, E.K. Mittge, W.Z. Stephens, D.M. Parichy, C.M. Cavanaugh, K. Guillemin, *et al.* // ISME Journal. – 2011. – V. 5. – № 10. – P. 1595 – 1608.
144. Romero, J. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) / J. Romero, P. Navarrete // Microbial Ecology. – 2006. – V. 51. – P. 422 – 430.
145. Rudresh, B.S. Microbial gut of a freshwater fish *Garra Mullya* (Sykes) from Mutha river, Northern Western Ghats, India / B.S. Rudresh, N. Dahanukar, G.M. Watve, N.S. Renukaswamy // Ecoprint: An International Journal of Ecology. – 2010. – V. 17. – P. 53 – 57.
146. Rungrassamee, W. Bacterial population in intestines of the Black Tiger Shrimp (*Penaeu monodon*) under different growth stages / W. Rungrassamee, A. Klanchui, S. Chaiyapechara, S. Maibunkaew, S. Tangphatsornruang, P. Jiravanichpaisal, *et al.* // PLoS ONE. – 2013. – V. 8. – I. 4. – P. 1 – 11.
147. Rust, M. Nutritional physiology. In: Fish nutrition. Third edition / M. Rust; eds. J.E. Halver, R.W. Hardy. – Academic Press: London. – 2002. – P. 367 – 452.
148. Sabdono, A. Bacterial symbionts of reef's invertebrates: a marine natural drug's factory / A. Sabdono // Journal of coastal development. – 2008. – V. 12. – № 1. – P. 13 – 19.
149. Sabo, J.L. Food chains in freshwaters / J.L. Sabo, J.C. Finlay, D.M. Post. – Annals of the New York Academy of Sciences. – 2009. – V. 1162. – P. 187 – 220.
150. Sambrook, J. Molecular cloning. A laboratory Manual. V. 2 / J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis. – Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1989. – 345 p.
151. Sanchez, L.M. Examining the fish microbiome: Vertebrate-derived bacteria as an environmental niche for the discovery of unique marine natural products / L.M. Sanchez, W.R. Wong, R.M. Riener, C.J. Schulze, R.G. Linington // PLoS ONE. – 2012. – V. 7. – I. 5. – P. 1 – 10.

152. Schloss, P.D. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities / P.D. Schloss, S.L. Westcott, T. Ryabin, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, *et al.* // *Applied and Environmental Microbiology*– 2009. – V. 75. – № 23. – P. 7537 – 41.
153. Senderovich, Y. The protective role of endogenous bacterial communities in chironomid egg masses and larvae / Y. Senderovich, M. Halpern // *The ISME Journal*. – 2013. – № 7. – P. 2147 – 2158.
154. Silva, F.C.P. Influence of the diet on microbial diversity of faecal and gastrointestinal contents in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*) / F.C.P. Silva, J.R. Nicoli, J.L. Zambonino-Infante, S. Kaushik, F.-J. Gatesoupe // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2011. – V. 78. – I. 2. – P. 285 – 296.
155. Sipkema, D. Multiple approaches to enhance the cultivability of bacteria associated with the marine sponge *Haliclona (gellius)* sp. / D. Sipkema, K. Schippers, W.J. Maalcke, Y. Yang, S. Salim, H.W. Blanch // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2011. – V. 77. – № 6. – P. 2130 – 2140.
156. Skrodenyte-Arbaciauskiene, V. Assessment of microbial diversity in the river trout *Salmo trutta fario* L. intestinal tract identified by partial 16S rRNA gene sequence analysis / V. Skrodenyte-Arbaciauskiene, A. Sruoga, D. Butkauskas // *Fisheries Science*. – 2006. – № 72. – P. 597 – 602.
157. Skrodenyte-Arbaciauskiene, V. Phylogenetic analysis of intestinal bacteria of freshwater salmon *Salmo salar* and sea trout *Salmo trutta trutta* and diet / V. Skrodenyte-Arbaciauskiene, A. Sruoga, D. Butkauskas, K. Skrupskelis // *Fisheries Science*. – 2008. – V. 74. – I. 6. – P. 1307 – 1314.
158. Smith, K.F. Microbial diversity and potential pathogens in ornamental fish aquarium water / K.F. Smith, V. Schmidt, G.E. Rosen, L. Amaral-Zettler // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – I. 9. – P. 1 – 11

159. Smriga, S. Abundance, diversity, and activity of microbial assemblages associated with coral reef fish guts and feces / S. Smriga, S.A. Sandin, F. Azam // FEMS Microbiology Ecology. – 2010. – № 73. – P. 31 – 42.
160. 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. – № 5. – P. 1 – 18.
161. Spanggaard, B. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification / B. Spanggaard, I. Huber, J. Nielsen, T. Nielsen, K.F. Appel, L. Gram // Aquaculture. – 2000. – № 182. – P. 1 – 15.
162. Sreeja, S.J. Analysis of gut microflora of fish, *Ophiocephalus striatus* in the selected ponds at Kanyakumari District, Tamilnadu / S.J. Sreeja, A. Palavesam, R.R.J. Sekar // International Journal of Applied Bioresearch. – 2012. – № 5. – P. 8 – 13.
163. Star, B. Next generation sequencing shows high variation of the intestinal microbial species composition in Atlantic cod caught at a single location / B. Star, T.H. Haverkamp, S. Jentoft, K.S Jakobsen // BMC Microbiol. – 2013. – V. 13. – № 248. doi:10.1186/1471-2180-13-248.
164. Suau, A. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut / A. Suau, R.G. Bonnet, M.N. Sutren, J.J. Godon, G.R. Gibson, M.D. Collins, *et al.* // Applied and environmental micbiology. – 1999. – V. 65. – № 11. – P. 4799 – 4807.
165. Sugita, H. Aerobic microflora attached to the wall surface in the gastrointestinal of *Tilapia nilotica* / H. Sugita, Y. Ishida, Y. Deguchi, H. Kadota // Bulletin of the College of Agriculture and Veterinary Medicine Nihon University. – 1982. – V. 39. – P. 302 – 306.
166. Sugita, H. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish / H. Sugita, K. Shibuya, H. Shimooka, Y. Deguchi // Aquaculture. – 1996b. – V. 145. – P. 195 – 203.

167. Sugita, H. Bacterial flora in the gastrointestinal of freshwater fishes in the river / H. Sugita, K. Oshima, M. Famura, Y. Deguchi // *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish.* – 1983. – V. 49. – P. 987 – 991.
168. Sugita, H. Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish / H. Sugita, H. Nakamura, T. Shimada // *Aquaculture.* – 2005. – V. 242. – P. 403 – 409.
169. Sugita, H. The establishment of an intestinal microflora in developing Goldfish (*Carassius auratus*) of culture ponds / H. Sugita // *Microbial ecology.* – 1988. – V. 15. – P. 333 – 344.
170. Sugita, H. The vitamin-B12-producing ability of the intestinal microflora of fresh-water fish / H. Sugita, C. Miyajima, Y. Deguchi // *Aquaculture.* – 1992. – V. 10. – P. 267 – 276.
171. Sun, Y. Gut microbiota of fast and slow growing grouper *Epinephelus coioides* / Y. Sun, H. Yang, Z. Ling, J. Chang, J. Ye // *Afr. J. Microbiol. Res.* – 2009. – № 3. – P. 637 – 640.
172. Sullam, K. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis / K. Sullam, S.D. Essinger, C.A. Lozupone, M.P. O'Connor, G.L. Rosen, R. Knight, *et al.* // *Molecular Ecology.* – 2012. – № 21. – P. 3363 – 3378.
173. Sutela, T. Diet and growth of stocked and wild 0+ pikeperch, *Stizostedion lucioperca* (L.) / T. Sutela, P. Hyvarinen // *Fisheries Management and Ecology.* – 2002. – № 9. – P. 57 – 63.
174. Syvokiene, J. Bacteria in the digestive system of mollusks from Lithuanian lakes / J. Syvokiene // *Ekologija.* – 2008. – V. 54. – №. 4. – P. 271 – 277.
175. Syvokiene, J. Characteristics of microflora of the digestive tract of commercial fish depending on fish feeding / J. Syvokiene, L. Mickeniene, A. Bubinas // *Ekologija.* – 1999. – № 4. – P. 46 – 54.
176. Tanaka M. Development of the digestive organ system in *Japanese flounder* in relation to metamorphosis and settlement / M. Tanaka, S. Kawai, T.

- Seikai, J.S. Burke // *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. – 1996. – V. 28. – P. 19 – 31.
177. Tapia-Paniagua, S. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration / S. Tapia-Paniagua, M. Chabrilón, P. Díaz-Rosales, I. Banda, C. Lobo, M.C. Balebona, *et al.* // *Microb. Ecol.* – 2010. – № 60. – P. 310 – 319.
178. Tetlock, A. Changes in the gut microbiome of the sea lamprey during metamorphosis / A.Tetlock, C.K. Yost, J. Stavrínides, R.G. Manzon // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – № 78. – P. 7638 – 7644.
179. Thomas, F. Environmental and gut Bacteroidetes: the food connection / F. Thomas, J.-H. Hehemann, E. Rebuffet, M. Czjzek, G. Michel // *Frontiers in Microbiology. Cellular and Infection Microbiology*. – 2011. – V. 2. – A. 93. – P. 1 – 16.
180. Tietjen, M. “You are what you eat”: How diet can influence the gut microbiota of marine invertebrates / M. Tietjen // *The Plymouth Student Scientist*. – 2014. – V. 7(2). – P. 203 – 211.
181. Trust, T.J. Facultative anaerobic bacteria in the digestive tract of chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) maintained in fresh water under defined culture conditions / T.J. Trust // *Journal of Applied Microbiology*. – 1975. – V. 29. – № 5. – P. 663 – 668.
182. Trust, T.J. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes / T.J. Trust, R.A.H. Sparrow // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1974. – V. 20. – P. 1219 – 1228.
183. Tzuc, J.T. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) / J.T. Tzuc, D.R. Escalante, R.R. Herrera, G.G. Cortes, M.L.A. Ortiz // *SpringerPlus*. – 2014. – V. 3. N. 280. – P. 2 – 10.
184. Uchii, K. Genetic and physiological characterization of the intestinal bacterial microbiota of Bluegill (*Lepomis macrochirus*) with three different

- feeding habits / K. Uchii, K. Matsui, R. Yonekura, K. Tani, T. Kenzaka, M. Nasu, *et al.* // *Microbial Ecology*. 2006. – V. 51. – P. 277 – 283.
185. Verner-Jeffreys, D.W. Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*) larvae in three British hatcheries./ D.W. Verner-Jeffreys, R.J. Shields, I.R. Bricknell, T.H. Birkbeck // *Aquaculture*. – 2003. – № 219. – P. 21 – 42.
186. Vilo, C. Evaluation of the RDP classifier accuracy using 16S rRNA gene variable regions / C.Vilo, Q. Dong // *Metagenomics*. – 2012. – V. 1. – P. 1 – 5.
187. Wagner, M. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure / M. Wagner, R. Amann, H. Lemmer, K.H. Schleifer // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1993. – V. 59. – № 5. – P. 1520 – 1525.
188. Wagner, M. The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance / M. Wagner, M. Horn // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2006. – V. 17 – № 3. – P. 241 – 249.
189. Wang, Y. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya / Y. Wang, T.M. Gilbreath III, P. Kukutla, G. Yan, J. Xu // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6. – I. 9. – P. 1 – 9.
190. Ward, N. Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species / N. Ward, B. Steven, K. Penn, B. Methe, W. Detrich // *Extremophiles*. – 2009. – № 13. – P. 679 – 685.
191. Whiteside, M.C. Factors affecting the early life history of yellow perch, *Perca flavescens* / M.C. Whiteside, M. Swindoll, W.L. Doolittle // *Environmental Biology of Fishes*. – 1985. – № 12. – P. 47 – 56.
192. Wolda, H. Similarity Indices, sample size and diversity / H. Wolda // *Oecologia*. – 1981. – V. 50. – P. 296 – 302.

193. Wu, S. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in Grass Carp intestine / S. Wu, G. Wang, E.R. Angert, W. Wang, W. Li, H. Zou // PLoS ONE. – 2012. – V. 7. – I. 2. – P. 1 – 11.
194. Wu, S.-G. Intestinal microbiota of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and its origin as revealed by 454 pyrosequencing / S.-G. Wu, J.-Y. Tian, F.-J. Gatesoupe, W.-X. Li, H. Zou, B.-J. Yang, *et al.* // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2013. – V. 29. – P. 1585 – 1595.
195. Wu, S. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) / S. Wu, G. Wang, E. Angert, W. Wang, Y. Cheng, G. Wang // Aquaculture. – 2010. – V. 303. – P. 1 – 7.
196. Xia, J.H. The intestinal microbiome of fish under starvation / J.H. Xia, G. Lin, G.H. Fu, Z.Y. Wan, M. Lee, L. Wang, *et al.* // BMC Genomics. – 2014. – V. 15. – № 266. – P. 1 – 11.
197. Xing, M. Taxonomic and functional metagenomic profiling of gastrointestinal tract microbiome of the farmed adult turbot (*Scophthalmus maximus*) / M. Xing, Z. Hou, J. Yuan, Y. Liu, Y. Qu, B. Liu // FEMS Microbiology Ecology. – 2013. – V. 15. – I. 266. – P. 1 – 13.
198. Yang, G. Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish *Takifugu obscurus* / G. Yang, B. Bao, E. Peatman, H. Li, L. Huang, D. Ren // Aquaculture. – 2007. – V. 262. – P. 183 – 191.
199. Ye, L. Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish / L. Ye, J. Amberg, D. Chapman, M. Gaikowski, W.T. Liu // The ISME Journal – 2014. – V. 8. – P. 541 – 551.
200. Zhou, W. A preliminary study on the influence of different feeding stuff on intestinal microflora of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) / W. Zhou, X. Chen, D. Zhang // Journal of Huazhong Agricultural University. – 1998. – V. 17. – I. 3. – P. 252 – 256.

201. Zhou, Z. The effect of dietary chitin on the autochthonous gut bacteria of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) / Z. Zhou, Ø. Karlsen, S. He, R.E. Olsen, B. Yao, E. Ringø // Aquac. Res. – 2012. – № 44. – P. 1889 – 1900.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рДНК – рибосомная дезоксирибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

TE-буфер – буфер трис-ЭДТА

трис – трис-оксиметиламинометана гидрохлорид

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ТАЕ – трис-ацетатный буфер

ОТЕ – операционная таксонообразующая единица

ДГГЭ (DGGE) – денатурирующий градиентный гель-электрофорез

ТГГЭ (TGGE) – температурный градиентный гель-электрофорез

RAPD – ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК

FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*

ITS – нетранскрибируемый межгенный спейсер рРНК

экз. – экземпляр

сем. – семейство

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Характеристика и сроки отбора образцов

Тип образца	Год	Сроки отбора проб	Тип ткани	Количество проб для приготовления суммарного образца	Количество (экз.)
1	2	3	4	5	6
Серебряный карась	2011	Июнь-июль	Слизистая и Содержимое	52	52
Окунь	2011	Июнь-июль	Слизистая и содержимое кишечника	33	32
Серебряный карась	2012	Апрель	Слизистая кишечника	19	19
Серебряный карась	2012	Апрель	Содержимое кишечника	19	
Серебряный карась	2012	Июнь-июль	Слизистая кишечника	5	5
Серебряный карась	2012	Июнь-июль	Содержимое кишечника	5	
Серебряный карась	2012	Август	Слизистая кишечника	14	14
Серебряный карась	2012	Август	Содержимое кишечника	13	
Серебряный карась	2012	Октябрь	Слизистая кишечника	20	20
Серебряный карась	2012	Октябрь	Содержимое кишечника	19	
Золотой карась	2012	Июнь-июль	Слизистая кишечника	4	4
Золотой карась	2012	Июнь-июль	Содержимое кишечника	4	
Сазан	2012	Июнь-июль	Слизистая кишечника	13	13
Сазан	2012	Июнь-июль	Содержимое кишечника	13	
Плотва	2012	Июнь-июль	Слизистая кишечника	5	5
Плотва	2012	Июнь-июль	Содержимое кишечника	5	

Продолжение таблицы					
1	2	3	4	5	6
Елец	2012	Июнь-июль	Слизистая кишечника	5	5
Елец	2012	Июнь-июль	Содержимое кишечника	5	
Язь	2012	Июнь-июль	Слизистая кишечника	7	7
Язь	2012	Июнь-июль	Содержимое кишечника	7	
Окунь	2012	Апрель	Слизистая желудка	13	14
Окунь	2012	Апрель	Содержимое желудка	13	
Окунь	2012	Апрель	Пилорические придатки	13	
Окунь	2012	Апрель	Слизистая кишечника	14	
Окунь	2012	Апрель	Содержимое кишечника	13	
Окунь	2012	Июнь-июль	Слизистая желудка	12	
Окунь	2012	Июнь-июль	Содержимое желудка	12	12
Окунь	2012	Июнь-июль	Пилорические придатки	12	
Окунь	2012	Июнь-июль	Слизистая кишечника	12	
Окунь	2012	Июнь-июль	Содержимое кишечника	12	
Окунь	2012	Август	Слизистая желудка	9	
Окунь	2012	Август	Содержимое желудка	9	9
Окунь	2012	Август	Пилорические придатки	9	
Окунь	2012	Август	Слизистая кишечника	9	
Окунь	2012	Август	Содержимое кишечника	9	
Окунь	2012	Октябрь	Слизистая кишечника	12	
Окунь	2012	Октябрь	Содержимое кишечника	12	

Продолжение таблицы					
1	2	3	4	5	6
Окунь	2012	Октябрь	Слизистая желудка	12	12
Окунь	2012	Октябрь	Содержимое желудка	12	
Окунь	2012	Октябрь	Пилорические придатки	12	
Судак	2012	Июнь-июль	Слизистая кишечника	4	4
Судак	2012	Июнь-июль	Содержимое кишечника	4	
Вода	2012	Апрель		4	9
Вода	2012	Июнь-июль	-	2	
Вода	2012	Август	-	1	
Вода	2012	Октябрь	-	2	
Грунт	2012	Апрель	-	3	8
Грунт	2012	Июнь-июль	-	2	
Грунт	2012	Август	-	1	
Грунт	2012	Октябрь		2	
Тростник	2012	Апрель	-	3	6
Тростник	2012	Июнь-июль	-	1	
Тростник	2012	Октябрь	-	2	
Daphniidae	2012	Июнь-июль	Кишечник	9	9
Chironomidae	2012	Июнь-июль	Кишечник	8	8
Corixidae	2012	Июнь-июль	Кишечник	3	3
Notonectidae	2012	Июнь-июль	Кишечник	2	2
Gammaridea	2012	Июнь-июль	Кишечник	1	1
Trichoptera	2012	Июнь-июль	Кишечник	2	2
Всего				527	275

Таблица 2. Размерные характеристики половозрелых особей рыб и используемые методы анализа

№	Сроки отбора образцов	Вид рыбы	L, мм	l, мм	Метод исследования
1	2	3	4	5	6
1	Апрель	Серебряный карась	305.53	248.3	Метагеномное секвенирование
2	Апрель	Серебряный карась	159.6	131.0	Метагеномное секвенирование
3	Апрель	Серебряный карась	141.4	114.8	Метагеномное секвенирование
4	Апрель	Серебряный карась	-	135.7	Метагеномное секвенирование
5	Апрель	Серебряный карась	165.8	136.65	Метагеномное секвенирование
6	Апрель	Серебряный карась	162.9	133.0	Метагеномное секвенирование
7	Апрель	Серебряный карась	298.05	246.5	Метагеномное секвенирование
8	Апрель	Серебряный карась	248.6	201.2	Метагеномное секвенирование
9	Апрель	Серебряный карась	295.5	239.0	Метагеномное секвенирование
10	Апрель	Серебряный карась	299.9	243.9	Метагеномное секвенирование
11	Апрель	Серебряный карась	252.45	213.05	Метагеномное секвенирование
12	Апрель	Серебряный карась	295.4	238.3	Метагеномное секвенирование
13	Апрель	Серебряный карась	273.6	227.8	Метагеномное секвенирование
14	Апрель	Серебряный карась	256.4	211.2	Метагеномное секвенирование
15	Апрель	Серебряный карась	230.5	192.9	Метагеномное секвенирование
16	Апрель	Серебряный карась	221.6	182.9	Метагеномное секвенирование
17	Апрель	Серебряный карась	223.2	179.5	Метагеномное секвенирование
18	Апрель	Серебряный карась	225.0	184.4	Метагеномное секвенирование

Продолжение таблицы					
1	2	3	4	5	6
19	Апрель	Серебряный карась	224.6	182.5	Метагеномное секвенирование
20	Июнь-июль	Серебряный карась	227.4	178.6	Групп-специфичная ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, метагеномное секвенирование
21	Июнь-июль	Серебряный карась	229.4	185.2	Групп-специфичная ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, метагеномное секвенирование
22	Июнь-июль	Серебряный карась	227.4	183.3	Групп-специфичная ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, метагеномное секвенирование
23	Июнь-июль	Серебряный карась	210.3	174.4	Групп-специфичная ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, метагеномное секвенирование
24	Июнь-июль	Серебряный карась	216.0	176.6	Групп-специфичная ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, метагеномное секвенирование
25	Август	Серебряный карась	92.5	75.5	Метагеномное секвенирование
26	Август	Серебряный карась	101.3	83.0	Метагеномное секвенирование
27	Август	Серебряный карась	95.5	78.1	Метагеномное секвенирование
28	Август	Серебряный карась	85.2	69.6	Метагеномное секвенирование
29	Август	Серебряный карась	92.6	74.2	Метагеномное секвенирование

Продолжение таблицы					
1	2	3	4	5	6
30	Август	Серебряный карась	212.7	166.4	Метагеномное секвенирование
31	Август	Серебряный карась	231.0	185.0	Метагеномное секвенирование
32	Август	Серебряный карась	239.1	196.4	Метагеномное секвенирование
33	Август	Серебряный карась	219.8	179.7	Метагеномное секвенирование
34	Август	Серебряный карась	262.0	213.5	Метагеномное секвенирование
35	Август	Серебряный карась	259.6	217.0	Метагеномное секвенирование
36	Август	Серебряный карась	272.0	223.3	Метагеномное секвенирование
37	Август	Серебряный карась	284.4	235.1	Метагеномное секвенирование
38	Август	Серебряный карась	283.4	238.3	Метагеномное секвенирование
39	Октябрь	Серебряный карась	89.0	72.2	Метагеномное секвенирование
40	Октябрь	Серебряный карась	98.8	82.0	Метагеномное секвенирование
41	Октябрь	Серебряный карась	97.4	79.0	Метагеномное секвенирование
42	Октябрь	Серебряный карась	99.8	80.3	Метагеномное секвенирование
43	Октябрь	Серебряный карась	100.2	81.3	Метагеномное секвенирование
44	Октябрь	Серебряный карась	215.0	182.8	Метагеномное секвенирование
45	Октябрь	Серебряный карась	223.0	183.5	Метагеномное секвенирование
46	Октябрь	Серебряный карась	210.5	169.3	Метагеномное секвенирование
47	Октябрь	Серебряный карась	223.6	186.2	Метагеномное секвенирование
48	Октябрь	Серебряный карась	220.5	179.3	Метагеномное секвенирование
49	Октябрь	Серебряный карась	266.7	215.6	Метагеномное секвенирование
50	Октябрь	Серебряный карась	284.1	227.8	Метагеномное секвенирование

Продолжение таблицы					
1	2	3	4	5	6
51	Октябрь	Серебряный карась	263.4	213.4	Метагеномное секвенирование
52	Октябрь	Серебряный карась	249.2	201.0	Метагеномное секвенирование
53	Октябрь	Серебряный карась	261.0	217.3	Метагеномное секвенирование
54	Октябрь	Серебряный карась	351.0	280.6	Метагеномное секвенирование
55	Октябрь	Серебряный карась	320.0	255.0	Метагеномное секвенирование
56	Октябрь	Серебряный карась	308.0	254.0	Метагеномное секвенирование
57	Октябрь	Серебряный карась	340.0	280.0	Метагеномное секвенирование
58	Октябрь	Серебряный карась	325.0	274.0	Метагеномное секвенирование
59	Июнь-июль	Золотой карась	228.0	175.4	Метагеномное секвенирование
60	Июнь-июль	Золотой карась	174.3	142.6	Метагеномное секвенирование
61	Июнь-июль	Золотой карась	202.4	173.0	Метагеномное секвенирование
62	Июнь-июль	Золотой карась	170.65	145.0	Метагеномное секвенирование
63	Июнь-июль	Сазан	331.1	265.5	Метагеномное секвенирование
64	Июнь-июль	Сазан	326.5	276.6	Метагеномное секвенирование
65	Июнь-июль	Сазан	226.5	183.1	Метагеномное секвенирование
66	Июнь-июль	Сазан	354.8	297.0	Метагеномное секвенирование
67	Июнь-июль	Сазан	267.4	224.3	Метагеномное секвенирование
68	Июнь-июль	Сазан	265.2	222.0	Метагеномное секвенирование
69	Июнь-июль	Сазан	290.25	243.8	Метагеномное секвенирование
70	Июнь-июль	Сазан	280.0	213.2	Метагеномное секвенирование
71	Июнь-июль	Сазан	340.0	285.0	Метагеномное секвенирование

Продолжение таблицы					
1	2	3	4	5	6
72	Июнь-июль	Сазан	370.0	310.0	Метагеномное секвенирование
73	Июнь-июль	Сазан	470.0	400.0	Метагеномное секвенирование
74	Июнь-июль	Сазан	505.0	410.0	Метагеномное секвенирование
75	Июнь-июль	Сазан	410.5	360.0	Метагеномное секвенирование
76	Июнь-июль	Плотва	192.5	158.4	Метагеномное секвенирование
77	Июнь-июль	Плотва	177.1	149.0	Метагеномное секвенирование
78	Июнь-июль	Плотва	174.6	146.8	Метагеномное секвенирование
79	Июнь-июль	Плотва	169.1	139.0	Метагеномное секвенирование
80	Июнь-июль	Плотва	176.7	146.6	Метагеномное секвенирование
81	Июнь-июль	Елец	168.4	143.1	Метагеномное секвенирование
82	Июнь-июль	Елец	160.0	132.0	Метагеномное секвенирование
83	Июнь-июль	Елец	183.6	152.7	Метагеномное секвенирование
84	Июнь-июль	Елец	187.0	155.0	Метагеномное секвенирование
85	Июнь-июль	Елец	173.8	147.6	Метагеномное секвенирование
86	Июнь-июль	Язь	253.2	214.0	Метагеномное секвенирование
87	Июнь-июль	Язь	253.0	210.2	Метагеномное секвенирование
88	Июнь-июль	Язь	257.2	214.5	Метагеномное секвенирование
89	Июнь-июль	Язь	257.0	215.0	Метагеномное секвенирование
90	Июнь-июль	Язь	241.7	204.0	Метагеномное секвенирование
91	Июнь-июль	Язь	380.0	318.0	Метагеномное секвенирование
92	Июнь-июль	Язь	337.0	283.0	Метагеномное секвенирование

Продолжение таблицы					
1	2	3	4	5	6
93	Июнь-июль	Судак	317.5	266.7	Метагеномное секвенирование
94	Июнь-июль	Судак	235.2	196.45	Метагеномное секвенирование
95	Июнь-июль	Судак	257.5	215.5	Метагеномное секвенирование
96	Июнь-июль	Судак	300.2	248.7	Метагеномное секвенирование
97	Апрель	Окунь	258.7	217.2	Метагеномное секвенирование
98	Апрель	Окунь	250.8	212.7	Метагеномное секвенирование
99	Апрель	Окунь	176.5	148.3	Метагеномное секвенирование
100	Апрель	Окунь	258.0	220.5	Метагеномное секвенирование
101	Апрель	Окунь	158.4	133.2	Метагеномное секвенирование
102	Апрель	Окунь	172.8	147.2	Метагеномное секвенирование
103	Апрель	Окунь	177.85	148.5	Метагеномное секвенирование
104	Апрель	Окунь	237.2	201.3	Метагеномное секвенирование
105	Апрель	Окунь	131.3	111.1	Метагеномное секвенирование
106	Апрель	Окунь	136.2	114.8	Метагеномное секвенирование
107	Апрель	Окунь	127.0	105.1	Метагеномное секвенирование
108	Апрель	Окунь	123.6	104.0	Метагеномное секвенирование
109	Апрель	Окунь	140.5	118.4	Метагеномное секвенирование
110	Апрель	Окунь	156.3	131.5	Метагеномное секвенирование
111	Июнь-июль	Окунь	168.4	141.8	Метагеномное секвенирование
112	Июнь-июль	Окунь	187.9	147.6	Метагеномное секвенирование
113	Июнь-июль	Окунь	120.0	101.5	Метагеномное секвенирование

Продолжение таблицы					
1	2	3	4	5	6
114	Июнь-июль	Окунь	162.4	138.3	Метагеномное секвенирование
115	Июнь-июль	Окунь	191.2	161.0	Метагеномное секвенирование
116	Июнь-июль	Окунь	221.0	100.0	Метагеномное секвенирование
117	Июнь-июль	Окунь	102.7	87.0	Метагеномное секвенирование
118	Июнь-июль	Окунь	135.5	115.4	Метагеномное секвенирование
119	Июнь-июль	Окунь	130.9	110.5	Метагеномное секвенирование
120	Июнь-июль	Окунь	197.8	164.6	Метагеномное секвенирование
121	Июнь-июль	Окунь	227.0	185.8	Метагеномное секвенирование
122	Июнь-июль	Окунь	232.7	198.8	Метагеномное секвенирование
123	Август	Окунь	143.4	119.0	Метагеномное секвенирование
124	Август	Окунь	149.8	125.8	Метагеномное секвенирование
125	Август	Окунь	168.3	140.8	Метагеномное секвенирование
126	Август	Окунь	189.3	159.0	Метагеномное секвенирование
127	Август	Окунь	189.0	166.5	Метагеномное секвенирование
128	Август	Окунь	206.7	174.8	Метагеномное секвенирование
129	Август	Окунь	206.6	179.7	Метагеномное секвенирование
130	Август	Окунь	225.5	190.6	Метагеномное секвенирование
131	Август	Окунь	215.7	182.4	Метагеномное секвенирование
132	Октябрь	Окунь	80.8	66.4	Метагеномное секвенирование
133	Октябрь	Окунь	98.2	83.3	Метагеномное секвенирование
134	Октябрь	Окунь	92.0	76.3	Метагеномное секвенирование

Продолжение таблицы					
1	2	3	4	5	6
135	Октябрь	Окунь	90.7	76.2	Метагеномное секвенирование
136	Октябрь	Окунь	135.2	113.3	Метагеномное секвенирование
137	Октябрь	Окунь	138.6	115.7	Метагеномное секвенирование
138	Октябрь	Окунь	135.0	113.0	Метагеномное секвенирование
139	Октябрь	Окунь	129.5	107.8	Метагеномное секвенирование
140	Октябрь	Окунь	129.5	109.0	Метагеномное секвенирование
141	Октябрь	Окунь	178.3	149.7	Метагеномное секвенирование
142	Октябрь	Окунь	186.3	154.5	Метагеномное секвенирование
143	Октябрь	Окунь	86.7	78.3	Метагеномное секвенирование