



УДК 639.3:597:579.2

**А. Н. Ханайченко**, канд. биол. наук, с. н. с.

Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского Национальной академии наук Украины,  
Севастополь, Украина

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МОРСКИХ РЫБ НА РАННИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ (НА ПРИМЕРЕ КАМБАЛООБРАЗНЫХ) И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

Представлен обзор современных микробиологических исследований в области культивирования морских рыб на примере камбалообразных. Рассмотрена последовательность развития внутренней микрофлоры выращиваемых рыб на ранних стадиях их развития. Проанализировано происхождение микрофлоры рыб как одной из составляющих микрофлоры искусственной среды выращивания. Рассмотрены позитивное и негативное влияние антибиотиков на микрофлору рыб, альтернативные средства лечения и профилактики бактериальных заболеваний. Обсуждаются возможные воздействия используемых способов на состояние микрофлоры рыб и здоровье людей. Проанализировано состояние современных экологически безопасных путей решения описанных микробиологических проблем.

**Ключевые слова:** марикультура, рыбы, микрофлора, патоген, профилактика

**Микробиологические проблемы при выращивании рыб в искусственных условиях.** Среди черноморских рыб наиболее перспективным для выращивания объектом является камбала калкан, - ценный эндемик, естественные запасы которого катастрофически снизились в 80-е годы XX в. В связи с низкой эффективностью естественного воспроизводства этого вида для восстановления его численности, помимо снижения вылова, необходима организация промышленного выращивания. Опыт стран ЕС подтверждает, что продукция искусственно выращиваемых камбалообразных может превышать их промысел. Так, искусственное производство атлантической камбалы тюрбо, близкородственного черноморскому калкану вида, только в Испанской Галисии к 2004 г. составило 5 000 т, вдвое превысив максимальный годовой вылов калкана в северном черноморском регионе, наблюдавшийся в 1951 - 1952 гг.

Промышленные технологии выращивания морских рыб и, в частности, камбалообразных, совершенствуются уже более двух десятилетий, но, несмотря на это, выживаемость личинок именно на ранних стадиях развития невысока и чрезвычайно изменчива. Повышенную смертность камбалообразных от начала экзогенного питания до малькового периода часто связывают с бактериальными инфекциями в условиях интенсивных технологий выращивания. До настоящего времени проблема повышения устойчивости против патогенов остается основным нерешенным вопросом при искусственном выращивании камбалообразных [64].

Для успешного внедрения технологии выращивания жизнестойкой молоди камбалы калкан, запатентованной ИнБЮМ [1], на промышленных рыбоводных питомниках необходимо определить закономерности формирования индигенной микрофлоры молоди рыб и

вероятные пути проникновения бактериальных инфекций в процессе их культивирования, а также разработать меры защиты молоди рыб от патогенов и формирования их здоровой микробиоты. Предварительный мониторинг микрофлоры (численности общих гетеротрофов и группы вибрионов) в пилотной технологической цепи выращивания камбалы калкана показал возможные пути проникновения потенциальных патогенов и возможности манипуляции составом микрофлоры [7; 29]. Целью настоящей работы является обобщение литературных и собственных данных по микробиологическим проблемам, возникающим при культивировании камбалообразных, для выявления наиболее эффективных современных путей их решения.

**Микрофлора морских рыб: видовое разнообразие и численность.** Для микрофлоры поверхностных покровов морских рыб в норме характерно присутствие бактерий родов *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Moraxella* и *Pseudomonas*, и, в отличие от пресноводных рыб, высокой доли *Vibrio* spp. Типичная кишечная микрофлора здоровых морских рыб (включая камбалообразных) из естественной морской среды характеризуется как ферментативная, грамотрицательная и плеоморфная и имеет множественное происхождение [59]. Составляя в норме минимум  $10^7$  КОЕ (колоний образующих единиц) на г пищеварительного тракта [23], кишечная микрофлора улучшает процесс пищеварения, продуцируя ферменты и подавляя рост патогенов [51]. Характерные для естественной морской среды взаимоотношения между рыбой и ассоциированной с ней микрофлорой нарушаются при интенсивном культивировании, для которого характерна высокая плотность живых организмов, создающих насыщенную метаболитами среду, являющуюся субстратом для роста бактерий. На формирование состава кишечной микрофлоры личинок рыб в искусственных условиях влияют многие факторы, включая последовательную колони-

зацию личинок микрофлорой воды, икры, кормов и окружающей среды питомника. Особенно резкое повышение титра условных патогенов [39], или сдвиг бактериальных доминант, происходит при использовании искусственных смесей для повышения пищевой ценности живых кормовых организмов и использовании инертных кормов для культивируемых рыб [63]. Результатом этой колонизации могут быть как селективное формирование комменсальной индигенной микрофлоры рыб, так и процесс накопления патогенов, приводящий к вспышкам инфекционных заболеваний.

**Патогенная микрофлора морских рыб при искусственном выращивании.** К условно патогенной микрофлоре, вызывающей вспышки инфекционных заболеваний, приводящих к высокой смертности личинок морских рыб при искусственном выращивании, относят в основном микроорганизмы родов *Vibrio*, *Aeromonas* и *Pseudomonas* [20, 73]. Несмотря на то, что эти группы микроорганизмов являются типичной составляющей гетеротрофной микрофлоры естественных морских сообществ, отдельные виды признаны безусловными патогенами, вызывающими вспышки смертности молоди морских рыб. Основными бактериальными заболеваниями камбалообразных в питомниках являются вибриозис, стрептококкоз и флексибактериозис.

Микрофлора сем. *Vibrionaceae* - гетеротрофные, грамотрицательные, слабо галофильные бактерии, использующие для жизнедеятельности разнообразные растворенные углеводы и другие источники органического азота, благодаря широкому спектру ферментативных возможностей, наиболее часто ассоциируется с морскими организмами. Более 70 % изолятов кишечника здоровых личинок камбалы (*Scophthalmus maximus* L.) в норме представлены микроорганизмами рода *Vibrio*: *V. alginoliticus*, *V. pelagius*, *V. cambelii* [42]. Тем не менее, представители *Vibrio* потенциально опасны для водных животных и человека [2], и поэтому соотношение титра бактерий рода

*Vibrio* (определяемую как КОЕ на специфической для рода *Vibrio* среде TCBS) к титру общих гетеротрофов (определяемому как КОЕ на морском агаре) часто используется как индикатор патогенности среды. К патогенам относятся *V. anguillarum*, *V. carchariae*, *V. cholerae*, *V. damsela*, *V. ordalii*, *V. salmonicida*, *V. parahaemolyticus* и *V. vulnificus* и др. [8].

Наиболее опасным заболеванием, иногда приводящим к огромным потерям на питомниках камбалообразных, считается вибриозис, ассоциируемый с *Vibrio* (syn. *Listonella*) *anguillarum* (вирулентными считаются серотипы O1 и O2 *V. anguillarum*), реже с серотипами *V. splendidus* и *V. pelagius*, близкими фенотипически *V. anguillarum*. Косвенным доказательством этого является частое совпадение высокого титра *V. anguillarum* в среде и в организме личинок с ухудшением у них пищеварительных функций и с их высокой смертностью [24, 43, 73]. Особенно подвержена вибриозису молодь камбалообразных: в 1988 г. в норвежских питомниках только в результате этого заболевания погибло 40 % молоди *S. maximus*. Оптимумы развития этих микроорганизмов: pH – 7, температура – 25°C, соленость – 2 ‰ [32]. Типичными начальными симптомами вибриозиса являются прогрессирующая анорексия (значительное снижение потребления пищи) и даже полный отказ от пищи личинками [47]. В дальнейшем происходит изъязвление поверхностных покровов и мышечной ткани [14]. Развитие внешних признаков заболевания коррелирует с повышением титра вибрионов в кишечнике рыб и объясняется выделением в результате массового отмирания бактерий метаболитов (токсина) [39]. Инфицирование личинок камбалообразных происходит при высвобождении клеток *V. anguillarum* из зараженных живых кормов при их переваривании в верхнем отделе кишечника [25]. В процессе эндоцитоза *V. anguillarum* поглощаются кишечным эпителием, а затем выходят из клеток эпителия в собственно пластинку слизистой. Во время пика заболевания клетки патогена

инфицируют практически все внутренние органы организма рыб, внедряясь в ткани внутриклеточно, в околоядерное пространство [24]. Высокий титр *V. anguillarum* в крови и внутренних органах пораженного организма вызывает гемморрагическую септицемию, происходит изъязвление мышечной ткани и поверхностных покровов рыб [14].

Эрозия плавников и эпидермиса в головном отделе обычно связана с инфицированием рыб *Flexibacter maritimus*. Скопление прозрачной жидкости у глаз и основания плавников являются внешними признаками заражения *Enterococcus* sp., поражающих рыб в любом возрасте.

**Происхождение, динамика и видовой состав микрофлоры личинок рыб при искусственном выращивании.** Источниками бактериальных инфекций ранних стадий морских рыб при искусственном выращивании могут быть зараженная вода, используемая в выростной системе, инфицированная патогенами икра [7, 61] и живые корма [7, 47, 53]. Пути проникновения патогенов считают поверхность тела, жабры и, преимущественно, пищеварительный тракт личинок. Бактериальные антигены могут проникать в пищеварительный тракт личинок еще до начала питания, в процессе заглатывания ими воды [39]. На рыбоводных питомниках обычно наблюдаются большие сезонные различия уровня бактериального роста на нефилтрованной морской воде (в пределах двух порядков значений КОЕ), обычно повышенных весной и осенью, совпадающих с низкой выживаемостью личинок [68]. В воде выростных танков микрофлора представлена преимущественно *Vibrio alginolyticus* (20 %), *V. splendidus* - *V. pelagius* (20 %), *Vibrio* spp. (10 %), *Pseudomonas* spp. (15 %) [73]. Однако, основным источником патогенов, ассоциированных с интенсивной системой выращивания, чаще всего являются зараженные живые корма [43, 52, 53]. В используемых при интенсивном выращивании живых кормах – солоноватоводных коловратках

*Brachionus plicatilis* и ракообразных *Artemia salina* часто обнаруживается условно патогенная микрофлора, в составе которой на род *Vibrio* может приходиться до 65 %, *Aeromonas* – до 25 % и *Pseudomonas* – до 10 % [73].

Формирование микрофлоры личинок при выклеве. Эпидермис и внутренние органы личинок в норме остаются стерильными вплоть до выклева, и смертность икры не коррелирует с общей численностью бактерий [72]. Но на поверхности недезинфицированной икры обычно преобладает микрофлора, относящаяся к родам *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Aeromonas*, *Flavobacterium* и, реже, *Vibrio* [26]. В отсутствие стерилизации поверхности икры, непосредственно после выклева, когда личинки наиболее уязвимы к инфекциям при неразвитой собственной иммунной системе, происходит начальная колонизация сопутствующей микрофлорой стерильной пищеварительной системы. После открытия рта пищеварительный тракт личинок обычно колонизируется преимущественно неферментативными бактериями родов *Cytophaga* – *Flexibacter* – *Flavobacterium*, реже с включением молочнокислых бактерий и *Vibrio* spp. В первые сутки численность гетеротрофов не превышает  $10^2$  КОЕ на личинку [11]. Условные патогены, привнесенные с недезинфицированной икрой, могут начать доминировать в более поздний период, который часто совпадает со сменой метаболического субстрата в питании личинок [7]. Таким образом, первым уязвимым звеном в технологии выращивания камбалообразных является отсутствие стерилизации поверхности икры, через которую может происходить начальная колонизация личинок условно патогенной микрофлорой. Поэтому для получения качественного посадочного материала личинок камбалообразных необходимо применение эффективного метода стерилизации икры.

Формирование микрофлоры личинок при питании живыми кормами. После перехода к внешнему (экзогенному) питанию кишечник личинок стремительно колонизируется

микрофлорой, ассоциированной с живыми кормами. В течение первых 3 – 4 сут после начала питания бактериальное число обычно возрастает до  $10^5 - 5 \times 10^5$  КОЕ на личинку в зависимости от качества среды и вида пищи [7, 42, 47, 72]. В кишечнике здоровых личинок численность общих гетеротрофов в норме на один – два порядка превышает численность вибрионов [16].

В начале экзогенного питания в кишечной микрофлоре большинства искусственно выращиваемых видов морских рыб бактерии родов *Vibrio* (59.6 %) и *Pseudomonas* (18 %) доминируют над бактериями родов *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Cytophaga* и *Alcaligenes* [72]. У камбалообразных ферментативные бактерии родов *Vibrio* и *Aeromonas* преобладают над *Pseudomonas* / *Alcaligenes*, *Flavobacterium* / *Cytophaga*, *Acinetobacter*, *Photobacterium* и *Moraxella* [12, 42]. Среди микрофлоры пищеварительного тракта личинок обнаруживают аэробную, факультативно анаэробную и облигатно анаэробную микрофлору [70].

Микрофлора, ассоциируемая с коловратками. Начало экзогенного питания большинства личинок морских рыб при интенсивном выращивании связано, преимущественно, с солонатоводными коловратками *B. plicatilis*. Большая часть микрофлоры, выделяемой из культур коловраток, классифицируется как грамотрицательные ферментативные бактерии родов *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Acinetobacter* [42, 47, 56], чаще с преобладанием *Vibrio* spp. (до 60 %), *Pseudomonas* spp. и *Alteromonas* spp. (до 20 %) [73]. Из *Vibrio* у коловраток преобладают *V. splendidus*, *V. pelagicus*, *V. anguillarum*, *V. alginoliticus*, *V. fluvialis*, *V. nitriagens*, *V. nereis* [56]. Число КОЕ составляет в среднем от  $10^2$  до  $10^4$  на коловратку, а состав микрофлоры в коловратках изменяется в зависимости от способа культивирования, типа обогащающей смеси и возраста культуры. Со старением культуры и при снижении

концентрации микроводорослей пищевых частей коловратки могут изменять пищевое предпочтение от микроводорослей (наиболее крупной фракции) к бактериям (мелкой фракции) [5, 62], и КОЕ гетеротрофных бактерий в коловратках резко возрастает, одновременно с увеличением численности бактерий сем. *Vibrionaceae* [7, 46]. При высоком содержании бактерий в коловратках может происходить полная остановка питания, а нарушения в пищеварительном тракте умирающих личинок оказываются характерными для голодающих личинок [46, 47]. После обогащения искусственными смесями в коловратках обычно доминируют оппортунистические виды микрофлоры родов *Pseudomonas* / *Alcaligenes* [63].

Микрофлора, ассоциируемая с артемиями. Ракообразные рода *Artemia* – второй кормовой организм, применяемый при интенсивном культивировании личинок морских рыб перед переводом их на инертные корма. В естественной среде обитания состав микрофлоры артемий изменяется в зависимости от солености: при 159.5‰ встречаются как ферментативная микрофлора (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Providencia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Cedecea*), так и неферментативная (*Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio*), в то время как при 244.6‰ в артемиях обнаруживают только неферментативные *Vibrio* [69]. Науплий артемий получают в результате выклева их из цист (покоящихся яиц) при 18 – 20 ‰, и насыщают микроводорослями или искусственными смесями. При выклевке и последующих линьках артемий в среду выращивания выделяется большое количество органики, на которой происходит интенсивный рост *Vibrio alginoliticus* (40 %), *V. splendidus* – *V. pelagius* (20 %), *Vibrio* spp. (5 %), а также *Aeromonas* spp. (25 %) и *Pseudomonas* spp. (10 %) [73]. Поэтому перевод личинок на питание артемиями, особенно насыщенными искусственными смесями, часто коррелирует со вспышками смертности личинок, связанными с возрастанием

численности патогенов, например, *V. anguillarum* [24].

Микрофлора, ассоциируемая с копеподами. Естественным природным кормовым объектом личинок морских рыб, используемым также при экстенсивном методе выращивания, являются копеподы. Об избирательности определенной микрофлоры к образованию комплексов с копеподами свидетельствует гораздо более высокий индекс разнообразия микрофлоры в морской среде обитания копепод, по сравнению с микрофлорой самих копепод. Не найдено значительных различий между качественным составом комменсальной микрофлоры одного и того же вида копепод из естественной среды обитания и при их искусственном разведении, род *Vibrio* доминировал над *Pseudomonas* и *Cytophaga* (*Flavobacteria*) [66]. Некоторые различия между микрофлорой пелагических и эстуарных видов копепод относят за счет различного типа питания этих групп: всеядного или растительного. Наиболее высокий процент *Vibrio* spp. ассоциирован с эстуарными копеподами, по сравнению с пелагическими, в кишечной микрофлоре которых наблюдается большее количество *Pseudomonas* sp. Состав кишечной микрофлоры личинок тюрбо, питающихся копеподами, изменяется в зависимости от факторов среды их выращивания: в одних питомниках преобладают *Vibrio campbellii*, *V. phenon* 23, *V. phenon* 36, в других – *V. pelagius*, *V. splendidus*, *Flavobacterium*, *Moraxella* sp. [56]. Колонизация микрофлорой кишечника личинок рыб при питании копеподами происходит медленнее, чем при питании коловратками, а максимумы ее численности приблизительно одинаковы ( $10^5$  КОЕ/личинку). Возможно, именно поэтому высокая выживаемость рыб при питании копеподами наблюдается даже при высокой численности бактерий, например, при  $10^7$  КОЕ на мл – в среде выращивания копепод и  $4 \times 10^4$  КОЕ – у личинок камбал, питавшихся копеподами [42].

**Пути решения микробиологических проблем.** В основе решения большинства микробиологических проблем при выращивании морских рыб на ранних этапах развития лежат следующие основные элементы: неселективное снижение общей численности гетеротрофов (применение дезинфекции и антимикробных препаратов), повышение числа селективных позитивных бактерий («зеленая вода», пробиотики) и повышение резистентности личинок к бактериальным инфекциям (иммуностимуляция личинок и вакцинация мальков) [75].

**Применение дезинфекции.** Улучшение выживаемости и роста личинок в результате дезинфекции воды, икры, живых кормов и самих личинок [52] подтверждает бактериальную природу заболеваний культивируемых личинок [54]. Эффективно снижает численность бактерий, в особенности группы *Vibrio*, сочетание последовательной фильтрации морской воды через картриджные фильтры и последующей обработки ее ультрафиолетом [7]. Доза УФ 20.000  $\mu\text{W}/\text{сек}/\text{см}^2$  уничтожает до 99,9 % бактериальных клеток в среде, содержащей  $10^6 - 10^7$  КОЕ/мл. Наиболее эффективной превентивной мерой, повышающей процент выклева и выживаемость личинок, считается дезинфекция икры глютаральдегидом [64]. Значительное снижение общей численности гетеротрофов-галофилов на поверхности живых кормов – коловраток и артемий – обычно происходит после промывания их пресной водой [54].

Однако неселективное снижение численности бактерий с помощью мер дезинфекции нарушает исходное естественное сбалансированное сообщество морской микрофлоры, в результате среда интенсивного культивирования с повышенным содержанием разлагающейся органики может стимулировать селекцию и рост оппортунистических бактерий, присутствующих первоначально в незначительном количестве.

**Применение антибиотиков: «за» и «против».** В большой степени снижает общий

уровень гетеротрофов в целом, и патогенов в частности, применение химических препаратов и антибиотиков в качестве как терапевтических, так и профилактических мер. Поэтому в марикультурных коммерческих питомниках было широко распространено использование антибиотиков, химиотерапии и, на мальковых стадиях, вакцинации [46, 64]. К антимикробным препаратам, которые вносят как непосредственно в среду выращивания рыб, так и через живые и инертные корма, насыщенные ими, относятся ампициллин, амоксициллин, неомицин, канамицин, тетрациклин, эритромицин, хлорамфеникол, сульфаниламиды, нитрофураны, оксолиновая кислота и флуменкин [44]. Для контроля большинства микробиальных инфекций широко применяют хлорамфеникол и фуразолидон, тетрациклины (окситетрациклин - против вибриозиса) и хинолоны и, в меньшей степени, нитрофураны и сульфаниламиды [44, 73]. В коммерческих питомниках в 90-х годах было распространено использование антибиотиков широкого спектра для профилактики и терапии [47]: за год только Норвегия, производящая наибольшее количество аквакультурной продукции, расходовала около 50 т антибиотиков [30].

Однако ряд патогенов не контролируется *in vivo* никакими препаратами, антибиотиков тотального действия на весь спектр патогенной микрофлоры не существует, а результаты их воздействия обычно не долговременны. Резкое прекращение контроля антибиотиками роста микрофлоры в выростных личиночных танках часто сопровождается высокой смертностью личинок и (или) снижением их роста [53], являющихся следствием либо отрицательного воздействия антибиотиков на кишечную микрофлору личинок, изменением ее видового состава, либо с возрастанием у патогенной микрофлоры резистентности к антибиотикам. Известна устойчивость многих бактерий к стрептомицину и ампициллину, мультирезистентность видов рода *Pseudomonas*. Несмотря на то, что большинство *Vibrio* spp.

подавляется хинолинами и нитрофуранами, у 12.5 – 25 % видов этого рода определена резистентность к оксолиновой кислоте и нитрофуранам [73]. Резистентность бактерий к препаратам возникает либо в результате мутаций, либо является результатом функционирования в микроорганизмах дополнительного геномного материала с автореплицируемыми свойствами, так называемых плазмидов. Обнаруживаемые в микрофлоре рыб R-плазмиды [65] могут передавать кодируемую в них резистентность к лекарственным препаратам от одного вида бактерий к другому [30].

Несмотря на положительную роль в повышении выживаемости личинок в результате снижения численности патогенных бактерий, применение антибиотиков может вызвать серьезные изменения: снижение общей численности гетеротрофов и драматическое изменение состава и свойств кишечной микрофлоры. После стандартной обработки пенициллином и стрептомицином кишечная микрофлора личинок оказывалась стойкой к пенициллину, ампициллину, стрептомицину, хлорамфениколу и сульфаметоксазолу. У личинок, обработанных антибиотиками, доминировали *Flavobacterium*, а не прошедших обработки антибиотиками – *Pseudomonas* и *Alteromonas* [27]. В целом, микрофлора личинок после применения антибиотиков характеризуется преобладанием грамотрицательных, желтых, неферментативных, неподвижных палочек, а у личинок, выращенных в фильтрованной морской воде, не обработанной антибиотиками, она представлена грамотрицательными, подвижными, ферментативными, непигментированными палочками.

Таким образом, антибиотики подавляют рост не только патогенной, но и естественной кишечной микрофлоры, сокращают видовое разнообразие бактерий и снижают рост мутуалистической микрофлоры, способной обеспечивать личинок питательными веществами [36], или стимулировать иммунную систему личинок, продуцируя антигенные детер-

минанты [11, 60], подавляющие патогенные бактерии.

Расширенное использование антибиотиков на морских питомниках приводит к возникновению новых антибиотико-стойких клонов бактерий [65], и может привести к непредсказуемым изменениям естественной микрофлоры донных отложений и отрицательным воздействиям на здоровье людей, употребляющих в пищу рыбную продукцию, подверженную антибиотической обработке [34]. При загрязнении водной среды производными сульфаниламидов, хлорамфениколов, тетрациклинов, нитрофуранов у естественной морской микрофлоры (водной и осадочной) возникает множественная резистентность к антибиотикам. Возможная быстрая передача резистентности к антибиотикам через R-плазмиды патогенам (особенно, *Vibrio*) составляет серьезную угрозу здоровью рыб и человека [30, 65], что приводит к разработкам ограничительного законодательства их использования на рыбных фермах [26, 65].

Альтернативой антибиотикам считают как способ полного прерывания цикла производства питомников при возникновении любых патологических проблем [53], так и применение превентивных мер: пробиотиков, контролирующих рост оппортунистических бактерий; иммуностимулянтов, повышающих неспецифическую защиту; и вакцин, повышающих специфическую защиту рыб [12, 64, 67, 75]. Благодаря использованию этого комплекса профилактических мер, применение антибиотиков в аквакультуре в последние годы значительно снизилось [34].

Применение пробиотиков. Альтернативой антибиотикам можно считать использование пробиотических свойств микроорганизмов, которые могли бы контролировать рост оппортунистических бактерий [12, 67, 75]. Термин «пробиотик», сформулированный первоначально И. Мечниковым [38], официально был введен в обиход как антоним слову “антибиотик” [33], а позднее определен как “мик-

робиальное дополнение, которое полезно воздействует на хозяина, улучшая микробиологический баланс его кишечника” [18]. Объяснение путей, через которые пробиотики воздействуют на организм, до сих пор спекулятивно. Вероятными механизмами положительного воздействия пробиотиков предполагают [18]: 1) подавление жизнеспособного индекса патогенов в результате продуцирования ингибиторов и (или) конкуренции за питательные вещества, ограничивающее рост патогенов в кишечнике; участки возможной адгезии; 2) изменение метаболизма антагонистических микроорганизмов в результате возрастания или снижения активности энзимов; 3) стимуляцию иммунитета хозяина в результате возрастания уровня антител и (или) возрастания активности макрофагов.

Наиболее удачными пробиотиками для эндотермных организмов являются молочнокислые, или лактобактерии, которые характеризуются как грамположительные, обычно неподвижные, не образующие спор бактерии, палочки (лактобациллы и каринобактерии) и кокки, продуцирующие молочную кислоту как основной продукт ферментативного метаболизма. Среди естественной нормальной микробиоты желудочно-кишечного тракта эндотермных животных на ранних стадиях развития присутствует подобная микрофлора, ингибирующая *in vivo* развитие *Eisчерichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Clostridium* и *in vitro* – бактерии родов *Shigella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Vibrio*; синтезирующая витамины группы В, а также продуцирующая пищеварительные ферменты и детоксиканты, предотвращающие синтез аминов. Некоторые виды *Lactobacillus* создают среду, подавляющую рост аэробных бактерий, продуцируя метаболиты, уксусную, муравьиную и молочную кислоту, перекись водорода, снижая рН кишечника и окислительно-восстановительный потенциал. Клоны *Lactobacillus acidophilus* и *Streptococcus thermophilus* значительно улучшают фермента-

тивную и фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов и ускоряют фагоцитарную функцию ретикулярного эндотелия, а *L. casei* повышает иммунные свойства слизи кишечника против инфекций [40]. Действие пробиотиков – сложный видоспецифичный механизм, зависящий от факторов окружающей среды, физического состояния организма-хозяина и их взаимодействия.

Несмотря на то, что манипулирование мутуалистической микрофлорой не только для контроля бактериальных инфекций, но и для активизации пищеварения у личинок предлагалось еще в 1980 г., разработка пробиотиков в марикультуре рыб началась недавно. На начальном этапе для повышения выживаемости рыб использовали линии пробиотиков, используемых для наземных животных, – типичных молочнокислых бактерий (в виде живых бактерий или спор), *Streptococcus lactis* и *Lactobacillus bulgaricus* [19, 20, 21], проявляющих антибактериальную активность против грамположительных бактерий. Тем не менее, молочнокислые бактерии не типичны для морской среды и редко выделяются из желудочно-кишечного тракта личинок и молоди рыб. Характеристиками этой группы являются требования преимущественно высокой температуры, замедленные темпы роста, по сравнению с другими группами бактерий, и обязательное присутствие глюкозы в среде [57], в связи с чем для сдерживания роста патогенов требуется постоянное внесение их в среду. Реальные пробиотические микроорганизмы для того, чтобы выживать и размножаться в кишечнике, должны быть резистентными к условиям среды в пищеварительном тракте личинок (воздействию пищеварительных ферментов, рН, желчных солей) [75]. Предотвращая колонизацию пищеварительного тракта хозяев патогенами, пробиотики должны оказывать положительный эффект на потребляющий их организм, легко культивироваться *in vitro*, выживать при прохождении через кишечный тракт, обладать способностью занимать собственную



нишу в желудочно-кишечном тракте, быть адгезивными (прикрепляться к стенке кишечника) и проявлять конкурентоспособность к резидентной микрофлоре, а их производство должно быть непатогенным и нетоксичным.

Морская среда является естественным источником микробов-антагонистов, и существование морских бактерий с антипатогенными свойствами доказано [31]. Основной преградой инфекции считают отдельные компоненты автохтонной микрофлоры [51], ассоциированные со слизью кишечника здоровых рыб, предотвращающие колонизацию кишечника патогенами [50]. Изоляты кишечного тракта здоровых рыб обладают более сильными адгезивными свойствами, чем патогенные клоны, и могут конкурировать с патогенами за места адгезии в кишечном эпителии. Наиболее перспективные клоны морских пробиотикоподобных патоген-ингибирующих бактерий характеризуются как грамотрицательные палочки с оксидазной и каталазной ферментативной активностью, способные к кислотообразованию из широкого диапазона углеводов, фенотипически аналогичные сем. *Vibrionaceae* [10, 11].

Так как основными переносчиками патогенов считают живые кормовые организмы, то пробиотики либо добавляют непосредственно в среду выращивания личинок [48], либо предварительно насыщают ими живые кормовые организмы [21], не только обеспечивая защиту от патогенов в пищеварительном тракте, но и увеличивая активность несовершенной на ранних стадиях развития [41] энзиматической системы личинок [19]. Так, пробиотик *V. proteolyticus* способствует перевариванию белка молодью камбалообразных [15]. Некоторые виды родов *Pseudomonas*-*Alteromonas* являются антагонистами по отношению к патогенам родов *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Edwardsiella*, *Yersinia* [17]. При инокуляции *Pseudomonas* sp. в культуры коловраток наблюдается сокращение численности *Vibrio* spp. и *Aeromonas* spp. на 50 % [46]. Редкие клоны молочнокислых бактерий, выделенные из пи-

щеварительного тракта рыб, например, *L. plantarum* [3] и *Carnobacterium* sp. [49, 71], обнаруживают активность, подавляющую развитие *A. salmonicida* и патогенных клонов *Vibrio* spp. Инкубирование личинок в среде с добавлением пробиотических клонов *L. plantarum* и *V. salmonicida* значительно повышает выживаемость мальков палтуса [48]. Экспериментально инокулированный личинкам через посредство живых кормов пробиотик *V. alginoliticus* подавляет рост *in vitro* патогенных *A. salmonicida*, *V. anguillarum* и *V. ordalii*, повышая выживаемость не только культивируемых морских рыб, но и ракообразных и моллюсков [10, 19, 20, 35]. Клон *V. pelagicus*, изолированный из кишечника личинок тюрбо, питавшихся копеподами, повышает выживаемость личинок в присутствии патогена *A. caviae* [58]. Иногда клоны бактерий, близкие по характеристикам к вирулентным патогенам, успешно используются как пробиотики, ингибирующие пролиферацию других патогенов (отдельные клоны *V. anguillarum* против вирулентного клона *V. ordalii*).

Конкурентоспособность некоторых безвредных *Vibrio* spp., изолятов из кишечного тракта рыб, за железо, как лимитирующий фактор роста, с бактериальными патогенами (потребность которых в железе обычно очень высока), включая *V. anguillarum*, используется для создания из них пробиотических клонов. Подобные бактерии обладают способностью к образованию сидерофоров (низкомолекулярных, специфических для иона железа, хелатирующих веществ) и к утилизации преципитатного железа, делая его недоступным для патогенов [22].

Помимо подавления патогенной микрофлоры, пробиотики активизируют факторы развития иммунной системы - индукцию эндогенного интерферона, продукцию лизоцима, повышают фагоцитарную активность лейкоцитов крови [3].

Повышение неспецифического иммунитета. У личинок рыб отсутствует специфи-

ческая иммунная система, так как абсолютно не развиты основные лимфоидные органы, с которыми, в основном, связана фагоцитарная активность – жаберный аппарат, слизистая, кишечный эпителий и внешние покровы, чешуя, и поэтому стимуляция неспецифического иммунитета является единственно возможной мерой повышения резистентности организма рыб на ранних стадиях развития [74]. Неспецифическая иммунная система может быть активизирована в результате воздействия полисахаридов, стимулирующих макрофаги. Сильный иммуностимулирующий эффект обнаружен при применении альгината с высоким содержанием маннуроновой кислоты [64, 74]. Альгинат не только повышает выживаемость личинок камбалообразных на ранних стадиях развития, но и улучшает их белковый обмен [13]. Левамизол также вызывает повышение фагоцитарной активности у рыб в экспериментальных условиях, повышая численность иммуноактивных компонентов в тканях и сыворотке. С увеличением количества витаминов Е и С в пище усиливаются неспецифические иммунные ответы: витамин С стимулирует фагоцитарную активность и увеличивает связывающие способности комплементарной системы, позволяющие клеткам иммунной системы рыб с большей легкостью идентифицировать патогены, поэтому перед воздействием любых стрессовых ситуаций рекомендуется увеличивать содержание этих витаминов в пище. Полисахариды  $\beta$ -глюканы – основной структурный компонент клеточных стенок дрожжей и других грибов, состоящий из глюкозных единиц, связанных в цепочки с  $\beta$ -1,3 или  $\beta$ -1,6 гликозидными связями, вызывают также сильный неспецифический иммунный ответ, увеличивая сопротивляемость организма бактериям и вирусам, стимулируя деятельность фагоцитов, и улучшая их способности уничтожать чужеродные клетки.

Применение «зеленой воды». Внесение морских микроводорослей непосредственно в выростные марикультурные системы (так

называемая «зеленая вода») также повышает процент и синхронность перехода личинок рыб на внешнее питание живыми кормами, выживаемость, пигментацию и рост личинок [28, 44, 55]. Предполагают, что положительный эффект "зеленой воды", помимо улучшения биохимического состава кормовых организмов [55] и положительного влияния на липидный обмен личинок [6, 45], обусловлен антибактериальными и иммуностимулирующими характеристиками микроводорослей [67] и пробиотикоподобным воздействием ассоциированной с ними микрофлоры. Личинки рыб после открытия рта "пьют" воду для поддержания водного баланса. При заглатывании (активно или пассивно) микроводорослей [37, 55] происходит активная селекция в кишечнике личинок бактерий, ассоциированных с микроводорослями [63]. Эффект "зеленой воды" обусловлен видовой принадлежностью и фазой роста культуры микроводорослей [7, 28, 29, 68]. Систематическая принадлежность микроводорослей (продуцента органического вещества) влияет на состав ассоциированной микрофлоры (консумента органики), а возраст культуры – на ее численность [4, 29]. Таксоно- и видоспецифичный состав экстраклеточных метаболитов определяет состав гетеротрофной микрофлоры, ассоциированной с микроводорослями и характер симбиотических взаимодействий (отрицательных или положительных) [4]. При росте культур микроводорослей можно наблюдать разные варианты взаимодействия микроводорослей и ассоциированной микрофлоры: ингибирование роста бактерий в экспоненциальной фазе; параллельный рост численности микроводорослей и общих гетеротрофов в стационарной фазе; ускорение роста численности бактерий во время лаг-фазы и фазы торможения роста культур микроводорослей [5, 7].

Присутствие микроводорослей (во время экспоненциальной фазы роста) в среде выращивания снижает численность сапрофитной микрофлоры. Даже в массовых культурах мик-

поводорослей КОЕ не превышает величины  $10^2 - 10^3$  в мл (в среде выращивания личинок -  $10^4 - 10^6$  в мл), и среди них не обнаруживают патогенов рыб [16], так как метаболиты большинства морских микроводорослей во время экспоненциальной фазы роста культур подавляют их рост [47]. Экстракты *Chlorella* spp. ингибируют рост бактерий, а клетки *Platymonas* (= *Tetraselmis*) *suecica* (Prasinophyceae) – патогены рыб, продуцируя антибактериальные субстанции [9].

Под влиянием «зеленой воды» не только снижается численность, но изменяется состав и увеличивается разнообразие микрофлоры личинок. Доминирующими группами бактерий, ассоциированных с морскими микроводорослями считаются *Alteromonas* spp. (70 %), *Pseudomonas* spp. (25 %), *Flavobacterium* (5 %) [73]; *Nannochloropsis* – *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium* [42]. Видоспецифичные для микроводорослей ассоциации микрофлоры [29] определяют механизмы пробиотикоподобного воздействия микроводорослей. С зелеными микроводорослями *Platymonas* (= *Tetraselmis*) *suecica* обычно ассоциируются грамотрицательные, палочковидные или коккоидные, каталаза-положительные, слабо-ферментативные бактерии [46]. При добавлении этих микроводорослей в среду выращивания личинок наблюдается последовательная смена различных таксонов микрофлоры воды, в то время как в присутствии *Pavlova lutheri* (Prymnesiophyceae) состав микрофлоры остается более стабильным. Высокая выживаемость личинок тюрбо в присутствии *P. suecica*, очевидно, обусловлена тем, что колонизаторы, потребляющие *P. suecica*, содержат около 50 % окисляющих бактерий, что предполагает высокую эффективность лизиса бактерий в кишечнике рыб. Напротив, отказ от питания и высокая смертность личинок в присутствии *P. lutheri* совпадают с высоким процентом гемолитических бактерий (от 5 до 70 %). Самая высокая выживаемость и наиболее высокие темпы роста личинок камбалообразных получены в присутствии

разных получены в присутствии *Isochrysis galbana* [68]. В присутствии *I. galbana* в "зеленой воде" наблюдают самую низкую численность бактерий, представленных, преимущественно, пробиотикоподобными *V. alginolyticus*, повышающими выживаемость личинок [23].

Применение «биологически зрелой» воды. Одним из наиболее перспективных подходов к повышению выживаемости личинок морских рыб, в частности камбалообразных, при искусственном выращивании считается применение «биологически зрелой» (или так называемой «старой») морской воды, т. е. использование водоподготовки с биологическим фильтром, содержащим целенаправленно сформированное сбалансированное микробное сообщество [64]. Такой метод повышает выживаемость личинок камбал, способствуя формированию собственной мутуалистической микрофлоры, по сравнению с применением свежей фильтрованной водой [75], и позволяет полностью исключить применение антибиотиков [61]. Предварительная водоподготовка воды с внесением микроводорослей, т.е. сочетание техники «старой» воды с техникой «зеленой» воды, заметно улучшает выживаемость личинок не только морских рыб, но и ракообразных [35]. Положительный эффект подобной комбинированной техники связан, очевидно, с замедленной колонизацией кишечного тракта микрофлорой с большим видовым разнообразием, которое часто совпадает с более высокой выживаемостью личинок.

**Выводы.** В естественной среде обитания собственная (индигенная) микрофлора и иммунная система здоровых рыб обычно защищают их от воздействия внешних патогенов, но условия интенсивного культивирования способствуют формированию микрофлоры, нехарактерной для естественной морской среды. В искусственных условиях микробное сообщество личинок испытывает дефицит в микрофлоре, ответственной за защиту организма от болезнетворных бактерий. На формирование кишечной микрофлоры рыб на

ранних стадиях развития оказывают влияние микрофлора воды, икры и живых кормов. Для повышения выживаемости рыб на ранних стадиях развития при искусственном выращивании необходимо применение профилактических мер во всех звеньях пищевой цепи, создание условий для роста мутуалистической микрофлоры и повышение неспецифического иммунитета рыб. Росту мутуалистической микрофлоры в кишечном тракте личинок способствуют применение пробиотиков, выделенных из автохтонной кишечной микрофлоры здоровых рыб, проявляющие антагонизм по отношению к патогенам, стимулирующие пищеварение и неспецифическую иммунную защиту

личинок камбалообразных. Микроводоросли в среде выращивания могут влиять на формирование внутренней микрофлоры личинок до начала внешнего питания, на смену и разнообразие микрофлоры во время питания живыми кормами и проявлять антибиотический и иммуногенный эффекты. Наиболее оптимальным и экологически безопасным решением микробиологических проблем при выращивании личинок камбалообразных можно считать сочетание мер санитарной дезинфекции и применение техник "зрелой" и зеленой воды" в среде выращивания, стимулирующих рост мутуалистической микрофлоры и развитие неспецифической иммунной системы личинок

1. Битюкова Ю. Е., Ткаченко Н. К., Владимирцев В. Б. и др. Способ искусственного получения молоди черноморской камбалы калкана: Патент N 2017413. RU C15 AO1K/1/00.N5054176/13.- Бюл. N 15, Пр. 20.04.92. - Россия, 1992. - 10 с.
2. Бухарин О. В., Литвин В. Ю. Патогенные бактерии в природных экосистемах. - Екатеринбург: УрО РАН. - 1997. - 277 с.
3. Вовк Н. И. Использование бактериальных препаратов в рыбоводстве // Проблемы современной аквакультуры: тез. конф. - Днепрпетровск, 1998. - С.157.
4. Вольберг М. М. Взаимодействие популяций микроводорослей и бактерий в модельной экосистеме: Авт. дисс. ... канд. биол. наук. - М.: МГУ, биолог.фак-тет., 1988. - 24 с.
5. Ханайченко А. Н. Питание и продуцирование коловраток в экспериментальных популяциях при комбинированном воздействии температуры и трофических условий (на примере *Brachionus plicatilis* Muller, 1786): дисс... канд. биол. наук. - Минск – Севастополь, 1988. - 137 с
6. Ханайченко А. Н., Планас М. И., Карнеро Д. Г. Рост, выживаемость и химический состав личинок тюрбо (*Scophthalmus maximus* L.) при интенсивном выращивании в "чистой" и "зеленой" воде // Экология моря. - 2000. - Вып. 50. - С. 78 - 82.
7. Ханайченко А. Н., Битюкова Ю. Е., Найданова О. Г. и др. Мониторинг микрофлоры в системе выращивания личиночных стадий камбалы калкана *Psetta maeotica* Pallas.// Экология моря. - 2000. - Вып. 53. - С. 82 - 87.
8. Austin B., Austin D. A. Vibriosis // Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. - Ellis Horwood, Chichester, England, 1987. - P. 268 - 296.
9. Austin B., Billard E., Stobie M. S. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica* // J. Fish Dis. -1992. - 15. - P. 55 - 61
10. Austin B., Stuckey L. F., Robertson P. A. W. et al. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. // J.Fish Dis. - 1995. - 18. - P. 93 - 96.
11. Bergh O. Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp.// J. Fish Dis. - 1995. - 18. - P. 31 - 40.
12. Bergh O., Naas K.E., Harboe T. Shift in the intestinal microflora of Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae during first feeding // Can. J. Fish. Aquat. Sci. - 1994. - 15. - P. 1 - 4.
13. Conceicao, L. E. C., Skjermo, J., Skjåk-Bræk, G., Verreth, J. A. J. Effect of an immunostimulating alginate on protein turnover of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. // Fish Physiol. Biochem. - 2001. - 24. - P. 207 - 212.
14. Chowdhury M. J. U. Probiotic manipulation of the gut microflora in first-feeding larval turbot (*Scophthalmus maximus* L.). -1995. - MD Thesis. - Univ. Ghent, Fac. Agric. Applied biol.sci. - 72 p.
15. De Schrijver R., Ollevier F. Protein digestion in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus* // Aquaculture. - 2000. - 186. - P. 107 - 116.

16. *Dehasque M., Verdonec L., Sorgeloos P. et al.* Determination of bacterial contamination in the live food production systems in marine fish hatcheries in southern Europe // Larvi'91. Fish and Crustacean Larviculture Symposium. EAS Sp. Publ. N 15, Gent, Belgium, 1991 - P. 399 - 402.
17. *Dopazo C. P., Lemos M. L., Lodeiros C.* Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogen // J.Appl. Bacteriol. - 1988. - **65**. - P. 91 -101.
18. *Fuller R.* Probiotics in agriculture // Agbiotech.News & Information. - 1990. - **2**, n 2. - P. 217 - 220.
19. *Garcia de la Banda I., Chereguini O., Rasines I.* Improvement of turbot larvae development by lactic bacterial addition // ICES 92/F. - 1992. - **8**. - P. 23 - 27.
20. *Gatesoupe F.-J.* The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers // Aquaculture. - 1990. - **89**. - P. 139 - 148.
21. *Gatesoupe F.-J.* Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio* // Aquat. Living Resour. -1994. - **7**. - P. 277 - 282.
22. *Gatesoupe F.-J.* Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus* //Aquat. Liv. Res. - 1997. - **10**. - P.239-246.
23. *Gatesoupe F.-J., Lesel R.* Flore digestive des poissons: approche environnementale // Dossier: Flore bacterienne. Cahiers Agricultures. -1998. - **7**. - P. 29-35.
24. *Grisez L., Ollevier F.* *Vibrio (Listonella) anguillarum* infections in marine fish larviculture. // Larvi'95 Symposium. Gent, Belgium. Eds.P.Lavens, E.Jaspers, I.Roelants. - EAS Spec.Publ. - 1995. - **24**. - P. 497.
25. *Grisez L., Chair M., Sorgeloos P. et al.* Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed // Dis. aquat. Org. - 1996. - **26**. - P. 181-187.
26. *Hansen G. H., Olafsen J. A.* Bacterial colonization of cod (*Gadhus morhua*) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture // Appl. Env. Microbiology. - 1989. - **55**. - P. 1435 - 1446.
27. *Hansen G. H., Strom E., Olafsen J. A.* Effect of different holding regimens on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae // Appl. Env.Microbiology. - 1992. - **58**, 2. - P. 461 - 470.
28. *Howell B. R.* Experiments on the rearing of larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) // Aquaculture - 1979. - **18**. - P. 215 - 225.
29. *Khanaichenko A. N., Buivolova O. G.* Effect of microalgae type on composition of associated microflora ("green water" benefits - anti- or probiotic?) // Trondheim (Norway). 1997 - EAS Sp. Publ. **26**. - P. 48 - 49.
30. *Kinkelin P. D., Michel C.* The use of drugs in aquaculture // INFOFISH International. -1992. - **4**. - P. 45 - 49.
31. *Lamos M. L., Toranzo A. E., Barja J. L.* Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds // Microbiol. Ecol. - 1985. - **11**. - P. 146 -163.
32. *Larsen J. L.* *Vibrio anguillarum* - influence of temperature, pH, NaCl concentration and incubation time on growth // J. Appl. Bacteriol. - 1983. - **57**. - P. 237 - 246.
33. *Lilley D. M., Stillwell R. J.* Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms // Science. - 1965. - **147**. - P. 747 -748.
34. *Lunestad B. T.* Impact of farmed fish on the environment, presentation by representatives of Norway // Notes of the Workshop Aquaculture / Environment Interactions: Impacts on Microbial Ecology. Canad. Aquacult. Soc., Halifax, Nova Scotia, Canada. - 1998. - P. 53 -78.
35. *Maeda M., Liao I C.* Microbial process in Aquaculture Environment and their importance for Increasing Crustacean Production // JARQ. - 1994. - **28**. - No 4. - P. 283 - 288.
36. *McDonald N. L., Stark J. R., Austin B.* Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Dover sole (*Solea solea* L.), with emphasis on the possible role of bacteria in the nutrition of the host // FEMS Microbiol. Lett - 1986. - **35**. - P. 107 - 111.
37. *Meeren van der T.* Algae as first food for cod larvae, *Gadus morhua* L., filter feeding or ingestion by accident? // J.Fish Physiol. - 1991. - **39**. - P. 225 - 237.
38. *Metchnikoff E.* Prolongation of Life. - G.P. Putnam's Sons: New York, 1908.
39. *Minkoff G., Broadhurst A.P.* Intensive production of turbot, *Scophthalmus maximus* fry // Turbot Culture: Problems and Prospects, Lavens P., R.A.M. Remmerswaal (Eds.), Gent, Belgium. - EAS Sp. Publ. - 1994. - N 22. - P. 14 - 31.
40. *Montes A. J., Pugh D. G.* The use of probiotics in food-animal practice // Vet. Med. - 1993. - P. 282.

41. *Munilla-Moran R., Stark J. R., Barbour A.* The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae // *Aquaculture*. - 1990. - **88**. - P. 337 - 350.
  42. *Munro P. D., Barbour A., Birkbeck T. H.* Comparison of the gut flora of start feeding larval turbot reared under different conditions // *J. Appl. Bacteriology*. - 1994. - **77**. - P. 560 - 566.
  43. *Muroga K., Yasunobu H., Okada N.* et al. Bacterial enteritis of cultured flounder *Paralichthys olivaceus* larvae // *Dis. aquat. Org.* - 1990. - **9**. - P. 121 - 125.
  44. *Naas K. E., Naes T., Harboe T.* Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water // *Aquaculture*. - 1992. - **105**. - P. 143 - 156.
  45. *Nematipour G. R., Nakagawa H., Nanba K.* et al. Effect of *Chlorella*-extract Supplement to diet on lipid accumulation of ayu // *Nipp. Suisan Gakkaishi*. - 1987. - **53**. - No 9. - 1687 -1692.
  46. *Nicolas J. L., Robic E., Ansquer D.* Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larvae survival // *Aquaculture*. - 1989. - **83**. - P. 237 - 248.
  47. *Nicolas J. L., Joubert N. N.* Bacteries associees aux productions de *Brachionus plicatilis* // *IFREMER. Actes de Coloques*. - 1986. - **3**. - P. 451-457.
  48. *Ottesen O. H., Olafsen J.A.* Effects on survival and mucous cell proliferation of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., larvae following microflora manipulation // *Aquaculture*. - 2000. - **187**. - P. 225 - 238.
  49. *Olsson C.* Bacteria with inhibitory activity and *Vibrio anguillarum* in the fish intestinal tract. - These, Goteborg University; 1995. - 141 p.
  50. *Olsson J. C., Westerdahl A., Conway P. L.* et al. Intestinal colonization of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum* // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1992. - **58**, 2. - P. 551 - 556.
  51. *Oranheim A. M., Raa J.* Characteristics and possible biological significance of an autochthonous flora in the intestinal mucosa of seawater fish // *Microbiology in Poecilotherms*. / Lesel R. (Ed.). - Elsevier Sci. Pub. (Biochem. Div.) (Amsterdam), 1990. - P. 197 - 201.
  52. *Perez-Benavente G., Gatesoupe F. J.* Bacteria associated with cultured rotifers and *Artemia* are detrimental to larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. // *Aquac. Eng.* - 1988. - **7**. - P. 289 - 293.
  53. *Person-Le Ruyet J.* Sole and turbot culture // *Aquaculture / Barnabé G.* (ed.). - Ellis Horwood (Sussex, England), 1990. - Vol. 2. - P. 687-734.
  54. *Planas M.* R & D production systems // *Turbot Culture: Problems and Prospects*. / Lavens P. and R.A.M. Remmerswaal (Eds.). - Gent, Belgium, 1994. - EAS Sp. Publ. N 22. - P. 57 - 73.
  55. *Reitan K. I., Bolla S., Olsen Y.* Ingestion and assimilation of microalgae in yolk-sac larvae of halibut *Hippoglossus hippoglossus* (L.) // *Larvi'91. Fish and Crust. Larvicult. Symp.*, Gent, Belgium, Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier (Eds.), 1991. - EAS Sp. Publ. N 15. - P. 332 - 334.
  56. *Ringo E., Sinclair P. L., Birkbeck H.* et al. Production of eicosopentaenoic acid (20:5n-3) by *Vibrio pelagius* isolated from turbot (*Scophthalmus maximus* (L.) larvae // *Appl. Env. Microbiol.* - 1992. - **58**, 11. - P. 3777 - 3778.
  57. *Ringo E., Gatesoupe F.-J.* Lactic acid bacteria in fish: a review // *Aquaculture*. - 1998. - **160**. - P. 177 - 203.
  58. *Ringo E., Vadstein O.* Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae // *J. Appl. Microbiol.* - 1998. - **84**. - P. 227-233.
  59. *Ringo, E., Birkbeck T. H.* Intestinal microflora of fish larvae and fry // *Aquaculture Research*. - 1999. - **30**. - P. 73 - 93.
  60. *Rombough, J. H., Van den Berg W. M.* Uptake and transport of ferritin in the epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implications // *Cell Biol. Int. Rep.* - 1985. - **9**. - P. 516 -523.
  61. *Salvesen I., Skjermo J., Vadstein O.* Application of microbially matured water during first feeding of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) // *Larvi'95 Fish & shellfish larviculture symposium*. Gent, Belgium. Eds. P. Lavens, E. Jaspers, I. Roelants. - EAS Spec. Publ. - 1995. - N 24. - P. 484 - 487.
  62. *Shiri Harzeveli A. R., Duffel H. van, Defort T.* et al. The influence of selected bacterial strain *Vibrio anguillarum* TR27 on the growth rate of the rotifer, *Brachionus plicatilis* in two culture conditions // *Larvi'95 Fish & shellfish larviculture symposium*. Gent, Belgium. Eds. P. Lavens, E. Jaspers, I. Roelants. EAS Spec. Publ. - 1995. - N 24. - P. 480-283.
- Skjermo J., Vadstein O.* Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis* // *Hydrobiologia*. - 1993. - **255/256**. - P. 185 - 191.

63. Skjermo J., Vadstein O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae // Aquaculture. - 1999. - 177. - P. 333 - 343.
64. Smith P., Hiney M. P., Samuelsen O. B. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: critical evaluation of method and meaning // Ann. Rev. Fish Dis - 1994. - 4. - P. 273 - 313.
65. Sochard M. R., Wilson D. F., Austin B. et al. Bacteria associated with the surface and gut of marine copepods // Appl. Environ. Microbiol. - 1979. - 37 (4). - P. 751 - 759.
66. Sorgeloos P., Dehasque M., Dhert P. et al. Review of some aspects of marine fish larviculture // V.Culture. ICES mar. Sci. Symp., 1995. - 201. - P. 138 - 142.
67. Stottrup J. G., Gravingen K., Norsker N. H. The role of different algae in the growth and survival of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) in intensive rearing systems // ICES mar.Sci.Symp. 1995. - 201. - P. 173 - 186.
68. Straub D. V., Dixon B. A. Bacteriological flora of the brine shrimp (*Artemia franciscana*) from a hypersaline pond in San Francisco Bay, California. // Larvi'95 Fish & shellfish larviculture symposium. Gent, Belgium. Eds.P.Lavens, E.Jaspers, I.Roelants EAS Spec. Publ. 1995. - No 24. - P. 493 - 496.
69. Strom E., Olafsen J. A. The indigenous microflora of wild-captured juvenile cod in net-pen rearing // Lesel R. (Ed.). Microbiology in Poikilotherms. - Elsevier. Amsterdam, 1990. - P. 181 - 185.
70. Strom E., Ringo E. Changes in bacterial composition of early developing cod, *Gadus morhua* (L.) larvae following inoculation of *Lactobacillus plantarum* into the water // Physiol. and Biochem. Aspects of Fish Development. - B.T.Walther and H.J.Fyhn (Eds.). - Univ.Bergen, Norway: 1993. - P. 226 - 228.
71. Tanasomwang V., Muroga K. Intestinal microflora of marine fishes at their larval and juvenile stages // The Sec.Asian Fish.Forum, Asian Fish Soc., Manila, Phillipines, 1990. - P. 647 - 649.
72. Toranzo A. E. Barja J. L., Devesa S. An overview of the main infectious problems in cultured turbot: present status and future necessities // Turbot Culture: Problems and Prospects. - Lavens P. and R.A.M. Remmerswaal (Eds.). - EAS Sp. Publ. N 22, Gent, Belgium, 1994. - P. 106 - 126.
73. Vadstein O. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges // Aquaculture - 1997. - 155. - P. 401-417.
74. Vadstein O., Oie G., Olsen V. et al. A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish // Fishfarming Technology, Reinertsen, Dahle, Jorgensen, Tvinnereim (Eds.), Balkema, Rotterdam, 1993. - P. 69 - 75.

Поступила 25 октября 2004 г.

**Мікробіологічні проблеми культивування морських риб на ранніх стадіях розвитку (на прикладі камбалоподібних) і шляхи їх рішення.** А. М. Ханайченко. Наданий огляд сучасних мікробіологічних досліджень в області культивування морських риб на прикладі камбалоподібних. Розглянута послідовність розвитку внутрішньої мікрофлори риб, що вирощуються, на ранніх стадіях їхнього розвитку. Проаналізовано походження мікрофлори риб як однієї з складових мікрофлори штучного середовища вирощування. Розглянуті позитивний і негативний вплив антибіотиків на мікрофлору риб, альтернативні засоби лікування і профілактики бактерійних захворювань. Обговорюються можливі впливи засобів, які застосовуються, на стан мікрофлори риб і здоров'я людей. Проаналізовано стан сучасних екологічно безпечних шляхів рішення мікробіологічних проблем, що описані.

**Ключові слова:** марікультура, риби, мікрофлора, патоген, профілактика

**Microbiological problems in the larviculture of marine fish (on example of the flatfish) and the ways to solve them.** A. N. Khanaychenko. Microbiological problems in the larviculture of marine fish, particularly flatfish, are reviewed.. The origin of microflora, its diversity and succession in cultivated marine fish on the early stages of development and its interactions with artificial environment and natural marine ecosystem are examined. Positive and negative effects of antibiotics on fish microflora, development of alternative remedies and prophylaxis, possible effects of the remedies on aquatic systems and human health are discussed. Modern state of alternative, ecologically safe ways to solve the microbiological problems is analyzed.

**Key words:** mariculture, fish, microflora, pathogen, prophylaxis