

актериальная флора креветки *Neocaridina heteropoda* (Liang, 2002)

¹Шорохова А.П., ¹Никулин Н.А., ¹Присяжная Н.В., ^{1,2} Зимин А. А.

¹ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;
zimin@ibpm.pushchino.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования, Пушкинский государственный естественно - научный институт

Введение. Креветки широко распространены в природе, занимая 78% рынка морепродуктов [1]. Этой отрасли удалось вырасти благодаря значительному увеличению производства продукции аквакультуры. За счёт искусственного выращивания креветок, в 2018 году объёмы мировых предложений этого продукта увеличились на 55% [2]. То есть аквакультура способна обеспечить потребителей стабильной и надёжной поставкой продукта [3]. Разведение креветок продемонстрировало высокую продуктивность этого процесса при весьма низких его затратах. В искусственной среде обитания креветки размножались существенно быстрее, чем многие другие животные. Это указывает на большой потенциал производства этой аквакультуры. [4]. Основной проблемой коммерческого выращивания креветок являются заболевания животных, связанные с периодическими вспышками бактериальных и вирусных инфекций креветок, что ведёт к уменьшению выхода морепродукта. Здоровье животных стало серьёзной проблемой для потенциальных инвесторов, а, следовательно, и для будущего аквакультуры. Чтобы уменьшить потери в производстве из-за болезней, ряд производителей стал прибегать к более раннему сбору урожая креветок. Стали собирать раньше, чем могут произойти значительные потери от заболеваний. Это позволило производить большее количество продукта, но значительно меньшего размера. [1]. Рынок креветок продолжает расти во всем мире, индустрии аквакультуры необходимо продолжать разрабатывать новые инновационные стратегии, позволяющие использовать возможности роста рынка. В этих условиях преодоление бактериальных инфекций у креветок становится одной из основных задач новых технологий выращивания этого полезного продукта. Ракообразные представляют собой второй по величине субфилум многоклеточных животных на земле, которые обитают в различных водных средах, многие используются человеком в пищу с древнейших времен. Исследование микробиома и вириома этой группы животных выглядит весьма актуальным как с фундаментальной, так и практической точки зрения.

Задача исследования. Для характеристики бактериальной компоненты ЖКТ популяции неокаридин, выращиваемых в России, выявления основных мажорных симбионтов их кишечника и создания задела для последующих метагеномных исследований микрофлоры, а также проведения различных экспериментов с этим лабораторным животными необходимо было выявить максимальное бактериальное разнообразие этой среды обитания.

Материалы и методы. Объектом исследования являлась креветка *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904), синоним *N. heteropoda* (Liang, 2002), реже синоним *N. denticulata sinensis* (Kemp, 1918) [2]. Приводим полную систематику: тип – *Animalia*, подтип – *Crustacea*, класс – *Malacostraca*, отряд – *Decapoda*, подотряд – *Caridea*, семейство – *Atyidae*.

Выделение бактерий из *N. heteropoda* проводили из гомогената всей пищеварительной системы креветки. Для выделения пищеварительной системы проводили операцию, основываясь на реконструкции структуры пищеварительной системы, полученной методом компьютерной микротомографии. В чашке Петри отмывали креветку 70% этиловым спиртом от поверхностных микроорганизмов, при помощи скальпеля разрезали хитиновый экзоскелет, энтомологической булавкой извлекали необходимую область кишечника и помещали ее в чашку Петри. Добавляли 0,1 мл 0,9% NaCl на чашку, шпателем растирали пищеварительную систему до получения однородной взвеси. Взвесь суспендировали в 0,9 мл 0,9% NaCl, 0,1 мл суспензии и высевали на разные агаризованные питательные среды. Затем инкубировали культуры при 25° С, 24 часа. Из полученных накопительных культур выделяли отдельные

колонии на агаризованной среде LB. Количество быстрорастущих бактерий (КОЕ/мл) определяли методом разведений суспензии содержимого кишечника креветки. Подсчёт клеток проводили на чашках Петри из разведений, которые давали рост от 30 до 150 колоний в 3-х кратной повторности. Рассев суспензии осуществляли на агаризованные среды: а) LB, б) триптон-соевую среду ИБФМ РАН (5/5), в) разведённую в 10 раз триптон-соевую среду ИБФМ РАН (5/5), г) питательную среду с аквариумной водой (ППСАВ) (г/л): дрожжевой экстракт – 1, пептон – 1, агар – 15. Определение бактерий проводили с помощью масс-спектрометрии пептидов.

Результаты и обсуждение. Численность популяции быстрорастущих бактерий кишечника креветки не превышала концентрации 10^4 КОЕ/мл. На среде LB выросло $9.1 \pm 0.8 \times 10^4$ клонов, на среде 5/5 - $7.7 \pm 0.9 \times 10^4$, на среде 5/5, разведённой в 10 раз - $8.2 \pm 0.4 \times 10^4$, на среде ППСАВ - $7.8 \pm 0.9 \times 10^4$. Было выделено более 40 штаммов быстрорастущих бактерий. Изоляты были очищены из отдельных колоний путем ряда последовательных пересевов.

С помощью MALDI масс-спектрометрии пептидов длиной 2–20 кДа на приборе Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Германия) было проведено определение бактерий. Идентификация штаммов производилась с использованием программы MALDI Biotyper (Bruker Daltonics), полученные спектры сравнивались как с базой данных Bruker, так и с локальной базой данных Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН. Выборочные результаты определения приведены в таблице 1. Достоверным результатов считались значения более 1,7.

Табл. 1. Определение таксономии ряда штаммов бактерий кишечника креветки *N. heteropoda* по базе данные Bruker

Название штамма бактерий	Результат определения	Значение по БД MALDI Biotyper
Pu-ZSH-11	<i>Shewanella putrefaciens</i>	2.302
Pu-ZSH-3g	<i>Aeromonas veronii</i>	2.384
Pu-ZSH-4	<i>Bacillus marisflavi</i>	1.833
Pu-ZSH-5	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2.129
Pu-ZSH-6	<i>Shewanella putrefaciens</i>	2.224
Pu-ZSH-7	<i>Bacillus cereus</i>	1.904
Pu-ZSH-18	<i>Pseudomonas mosselii</i>	2.225
Pu-ZSH-20	<i>Aeromonas media</i>	2.056
Pu-ZSH-20	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1.986
Pu-ZSH-22	<i>Bacillus vietnamensis</i>	1.812
Pu-ZSH-25	<i>Shewanella putrefaciens</i>	1.781

Заключение. Мажорными аэробными культивируемыми компонентами бактериального сообщества кишечника креветки *N. heteropoda* являются представители родов: *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Aeromonas* и *Bacillus*.

Литература

1. SOFIA . The State of World Fisheries and Aquaculture 2018—Meeting the Sustainable Development Goals. FAO; Rome, Italy: 2018.

2. Gaille B. 21 Shrimp Industry Statistics and Trends. [(accessed on 27 March 2019)];2018 Available online: Brandongaille.com.
3. Ellis A. Master's Thesis. Clemson University; Clemson, SC, USA: 2011. Evaluating the Impacts of Production Process and Product Origin on Willingness to Pay for Shrimp.
4. Greenberg P. The NOT-SO-SIMPLE Life of Shrimp. *Prevention*. 2012;64:68–77.