

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ГИДРОБИОНТОВ

PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF HYDROCOLE

Научная статья
УДК 639.3.05
<https://doi.org/10.24143/2073-5529-2025-4-82-91>
EDN VOLNBS

Выделение и идентификация бактериальных изолятов из кишечного микробиома садковой радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*)

Виктория Алексеевна Потешкина^{1✉}, Инга Владимировна Ускова²,
Светлана Ростиславовна Деркач³, Варвара Сергеевна Кравцова⁴

¹⁻³Мурманский арктический университет,
Мурманск, Россия, poteshkinava@mauniver.ru✉

⁴Клиническая инфекционная больница имени С. П. Боткина,
Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Представлены результаты анализа качественного состава микробиоты кишечника садковой радужной форели, выращенной в условиях Крайнего Севера. Описаны культуральные, морфологические, тинкториальные, биохимические свойства выделенных бактериальных изолятов. Представлены результаты идентификации выделенных бактериальных изолятов, полученных с применением классических (традиционных) бактериологических методов и экспресс-метода MALDI-TOF MS. При использовании классических биохимических тест-систем была затруднена дифференцировка микроорганизмов до вида. Исследования различных морфолого-тинкториальных и биохимических характеристик не позволяют достоверно идентифицировать выделенные бактериальные изоляты до вида в связи с высокой биохимической вариабельностью выделенных микроорганизмов и выполняют лишь вспомогательную функцию. В результате идентификации микроорганизмов классическим биохимическим методом было определено, что большая часть микробиоты кишечника форели относилась к родам *Bacillus* и *Pseudomonas*, а остальные к родам *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*; удалось установить видовую принадлежность только одного изолята – *Escherichia coli*. В процессе проведения масс-спектрометрического анализа для всех выделенных изолятов были получены результаты идентификации микроорганизмов по белковому профилю. Показано, что для большей части бактерий (55 %), включенных в исследование, удалось получить результаты с высокой вероятностью видовой идентификации до категории А (*Micrococcus luteus*, *Bacillus pumilus*, *Escherichia coli*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Klebsiella oxytoca*), а для 45 % бактериальных изолятов (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*) провели с высокой вероятностью идентификацию до рода (категория В). Из 11 микробных изолятов, идентифицированных как с помощью классического биохимического подхода, так и с помощью современного масс-спектрометрического метода, только 8 совпадали на уровне рода. Доминирующей группой микроорганизмов, выделенных нами из кишечника радужной форели, являлись псевдомонады и бациллы. В микробиоценозе слизистой рыб из группы молочнокислых были обнаружены бактерии *Carnobacterium maltaromaticum*.

Ключевые слова: форель, кишечник, слизистая, микроорганизмы, идентификация, протеолитическая активность бактерии, изоляты, масс-спектрометрия

Благодарности: работа выполнена при поддержке гранта РФФ 25-16-00064.

Для цитирования: Потешкина В. А., Ускова И. В., Деркач С. Р., Кравцова В. С. Выделение и идентификация бактериальных изолятов из кишечного микробиома садковой радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. 2025. № 4. С. 82–91. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2025-4-82-91>. EDN VOLNBS.

Original article

Isolation and identification of bacterial isolates from the intestinal microbiome of cage rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Victoria A. Poteshkina^{1✉}, Inga V. Uskova², Svetlana R. Derkach³, Varvara S. Kravtsova⁴

¹⁻³Murmansk Arctic University,
Murmansk, Russia, poteshkinava@mauniver.ru✉

⁴Clinical Infectious Diseases Hospital named after S. P. Botkin,
Saint Petersburg, Russia

Abstract. The article presents the results of the analysis of the qualitative composition of the intestinal microbiota of caged rainbow trout grown in the conditions of the Far North. The cultural, morphological, tinctorial, and biochemical properties of the isolated bacterial isolates are described. The results of identification of the isolated bacterial isolates obtained using classical (traditional) bacteriological methods and the rapid MALDI-TOF MS method are presented. When using classical biochemical test systems, differentiation of microorganisms to the species level was difficult. Studies of various morphological-tinctorial and biochemical characteristics do not allow reliable identification to the species level due to the high biochemical variability of the isolated microorganisms and perform only an auxiliary function. As a result of identification of microorganisms by the classical biochemical method, it was determined that the majority belonged to the genera *Bacillus* and *Pseudomonas*, and the rest to the genera *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, it was possible to establish the species affiliation of only one isolate – *Escherichia coli*. In the process of conducting mass spectrometric analysis for all isolated bacteria, results of microorganism identification by protein profile were obtained. It was shown that for the majority of bacteria (55%) included in the study, it was possible to obtain results with a high probability of species identification up to category A (*Micrococcus luteus*, *Bacillus pumilus*, *Escherichia coli*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Klebsiella oxytoca*), and for 45% of bacterial isolates (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*) identification was carried out with a high probability up to the genus (category B). Of the 11 microbial isolates identified using both the classical biochemical approach and the modern mass spectrometric method, only 8 matched at the genus level. The dominant group of microorganisms isolated by us from the intestines of rainbow trout were pseudomonads and bacilli. *Carnobacterium maltaromaticum* bacteria were found in the microbiocenosis of the mucous membrane of fish from the lactic acid group.

Keywords: trout, intestines, mucosa, microorganisms, identification, proteolytic activity of bacteria, isolates, mass spectrometry

Acknowledgments: the work was supported by the Russian Science Foundation grant 25-16-00064.

For citation: Poteshkina V. A., Uskova I. V., Derkach S. R., Kravtsova V. S. Isolation and identification of bacterial isolates from the intestinal microbiome of cage rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing industry.* 2025;4:82-91. (In Russ.). <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2025-4-82-91>. EDN VOLNBS.

Введение

Систематическое изучение микробного сообщества кишечника рыбы, выращиваемой в условиях аквакультуры, позволит скорректировать пути поддержания его в стабильном состоянии, что способствует повышению количества необходимых ферментов в пищеварительной системе рыбы при включении отдельных компонентов питания в ее рацион [1]. Поэтому для будущих исследований весьма важно, чтобы применяемые методы идентификации микроорганизмов помогали распознавать уникальные характеристики рыб и избегать применения протоколов, разработанных для наземных го-

мойотермных животных.

В настоящее время наряду с традиционными методами стало возможным использование автоматизированных систем идентификации микроорганизмов, которые не требуют значительных временных и финансовых затрат. Широкое распространение получила методика определения степени соответствия уникального для каждого вида микроорганизма набора рибосомальных белков («протеомная дактилоскопия») с помощью десорбционного метода «мягкой» ионизации, обусловленной воздействием импульсами лазерного излучения на матрицу с анализируемым веществом на основе технологии

матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации времяпролетной масс-спектрометрии (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Time of Flight – MALDI-TOF MS) [2]. Несмотря на то, что MALDI-TOF MS – это «фенотипическая» система, она, в некотором смысле, заполняет пробел в достоверности результатов испытаний, полученных с помощью биохимических систем фенотипирования, а также идентификационных систем генотипирования [3].

Использование различных современных подходов к идентификации микроорганизмов, сочетающих стандартные микробиологические методы и современные автоматизированные «фенотипические» системы, позволит получить в дальнейшем достоверную картину взаимодействия макроорганизма с микробными сообществами и отнести их к определенному классу бонитета.

Цель исследования – проведение сравнительного анализа эффективности идентификации микроорганизмов при исследовании микробиома кишечника садковой радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) с помощью комплексного подхода, сочетающего использование классического (традиционного) биохимического метода и современного экспресс-метода – времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS).

Материал и методы исследований

Исследования проводились на базе кафедры микробиологии и биохимии Мурманского государственного технического университета (с мая 2023 г. – Мурманский арктический университет) в рамках реализации инициативных научно-исследовательских работ «Комплексные исследования объектов аквакультуры в условиях Кольского Заполярья» № ГР АААА-А19-119030590051-4 (период реализации 01.2019–01.2023 гг.).

Объектом исследования послужила пресноводная садковая радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*) генераций 2018–2023 гг.

Отбор проб рыбы проводили в период с сентября 2020 по март 2023 г. на форелевой садковой ферме, расположенной в районе п. г. т. Верхнетуломский.

Все манипуляции с рыбой осуществляли с соблюдением международных биоэтических норм и требований при работе с животными [4].

Клинический осмотр и патологоанатомическое вскрытие рыбы проводили по стандартной методике [5], принятой в ихтиопатологии.

Культуры микроорганизмов выделяли из образцов кишечной слизи и содержимого кишечника умерщвленной рыбы в соответствии с рекомендациями [6]. В зависимости от возраста рыбы объем кишечной слизи и содержимого рассчитывали по методике, разработанной коллективом авторов [7] (И. В. Ускова, В. А. Потешкина, К. А. Калинин).

Кишечник от среднего до дистального отдела асептически отделяли от брюшной полости стерильными ножницами и перемещали в стерильную чашку Петри. Вырезанный сегмент кишечника осторожно очищали от брыжеечного жира и вскрывали продольно. Слизистую и содержимое кишечника анализировали отдельно. Сначала извлекали содержимое кишечника в отдельную чашку Петри, а затем, после отмывки в 0,9 %-м физиологическом растворе, соскребали слизь стерильным скальпелем. Полученные образцы слизи и содержимого кишечника перемещали в стерильные пробирки с 0,9 %-м физиологическим раствором в объеме 1/10. Из исходного разведения готовили ряд последовательных десятикратных разведений и высевали в жидкие накопительные среды (первичный посев) – Бликфельда (НИЦ «Биокомпас-С», Россия) и ГМФ-бульон (НИЦФ, Россия) в двух-трехкратных повторностях.

Посевы инкубировали в аэробных условиях при температуре 18 ± 3 °C в течение 7–14 дней [8].

Просмотр посевов проводили ежедневно, отмечая интенсивность и характер роста микроорганизмов в жидких средах: в ГМФ-бульоне наблюдали диффузное помутнение среды, образование пристеночного кольца, пленки, осадка; в среде Бликфельда – изменение цвета среды с фиолетового на желтый.

Для получения изолированных колоний стерильной петлей делали пересевы культур из каждого посева с видимыми признаками роста на поверхность чашки Петри с плотной питательной средой: Бликфельда (НИЦ «Биокомпас-С», Россия), ГМФ-агара (НИЦФ, Россия). После 7 дней инкубирования отмечали размер, рельеф, контур края, поверхность, цвет, консистенцию колоний [9].

Чистоту выделенных чистых культур микроорганизмов проверяли визуально (рост микроорганизмов по штриху на поверхности скошенного агара), микроскопически (окраска по Граму и микроскопия с иммерсионной системой). Следует иметь в виду, что заключение о чистоте некоторых культур микроорганизмов нельзя сделать только по результатам посева на вышеуказанные питательные среды. Особенно это касается представителей гетеротрофов, склонных развиваться с одним или несколькими спутниками [10]. Таким образом, дополнительно чистоту культур микроорганизмов проверяли высевом на ряд сред производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, Россия): агар-ЭНДО-ГРМ для выделения энтеробактерий, SS-агар для выделения сальмонелл и шигелл, XLD-агар для выделения и идентификации патогенных энтеробактерий, дифференциально-элективная среда для выделения клебсиелл, среда № 10 для идентификации *Staphylococcus aureus*.

Полученные изоляты идентифицировали с применением традиционного метода, основанного на исследовании морфолого-тинкториальных, культуральных и биохимических свойств с использованием определителя Берджи [11, 12] и современного лабораторного экспресс-метода – MALDI-TOF MS.

Морфологические и тинкториальные особенности изучали с применением светового микроскопа Olympus CX23LED RFS1 (Япония) с общим увеличением $\times 1\,000$. Фотосъемку препаратов проводили с помощью цифровой камеры ADF и программного обеспечения ADF Image Capture. Фиксированные и живые препараты готовили стандартными методами [13]. Для окраски по Граму использовали коммерческий комплект реагентов Микро-ГРАМ-НИЦФ (Россия).

Биохимические свойства (сахаролитическая и протеолитическая активность) определяли как по стандартным методикам с использованием дифференциально-диагностических сред Гисса (индикатор бромкрезоловый пурпурный, мальтоза, ксилоза, рамноза, дульцит) фирмы Биокомпас-С (Россия), питательной желатины [14], так и коммерческих наборов для межродовой/видовой дифференцировки бактерий (системы индикаторных бумажек (СИБ) фирмы Микроген (Россия) – набор № 1 и 2, МикроКАТАЛАЗА-НИЦФ (Россия) согласно рекомендации производителя).

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре microfler MALDI-TOF MS с использованием программного обеспечения Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, Германия) в линейном режиме. Реактивы, используемые для идентификации с помощью MALDI-TOF MS: бактериальный калибровочный стандарт Брукер (BTS), порционная альфа-циановая матрица Брукер (Bruker HCCApportioned Matrix), стандартный раствор (OS, 50 % ацетонитрил, 2,5 % трифторуксусная кислота, 47,5 % вода), ультрачистая вода (ASTM Type I), этанол абсолют $\geq 99,8\%$ (неденатурированный), муравьиная кислота (чистота $\sim 98\%$), ацетонитрил $\geq 99,9$ для ВЭЖХ/МС (LC-MS grade).

Калибровку масс-спектрометра проводили пе-

ред исследованием каждой серии идентификаций согласно руководству пользователя масс-спектрометра microfler MALDI-TOF MS Biotyper 3.0, используя в качестве калибранта бактериальный калибровочный стандарт Брукер (BTS).

Для идентификации микроорганизмов использовали метод прямого нанесения материала единичной колонии микроорганизма на лунку металлического планшета масс-спектрометра стерильной одноразовой петлей. На лунку с нанесенным материалом капали матрицу и подсушивали. Затем мишень загружали в прибор для получения спектров. Для каждого исследуемого образца в методе MALDI-TOF MS использовали не менее 4-х повторений.

С целью анализа полученных масс-спектров применяли программное обеспечение flexControl – для измерений, flexAnalysis – для контроля качества, Biotyper OC – для создания новых записей в базе данных (MSP).

В процессе масс-спектрометрии определяются два параметра: отношение ионов к их заряду – m/z и количество частиц с конкретной величиной m/z . Зависимость этих двух величин называют масс-спектром (непрерывная зависимость на определенном интервале). В MALDI-TOF MS для видовой идентификации микроорганизмов используют иную характеристику – масс-спектр-профиль (МСП). В программном аппарате Bruker Daltonics для отображения силы сходства МСП неизвестного микроорганизма с типовым коллекционным штаммом используется переменная «score value». Также разработчики из Bruker Daltonics предложили категории (A, B, C), которые характеризуют не только совпадение с наиболее схожим МСП, но и отражают совокупность из 10 МСП, наиболее близких к исследуемому [15].

В соответствии с требованиями производителя при значениях коэффициента достоверности Score Value (SV) 1,6 и ниже идентификацию считали ненадежной. Для интерпретации полученных результатов применяли стандартные диапазоны значений коэффициента достоверности SV (табл. 1) и категории идентификации (табл. 2) [16].

Таблица 1

Table 1

Значение Score Value
The Score Value

Диапазон коэффициента достоверности SV	Описание	Символ	Цвет категории идентификации
2,30–3,00	Достоверная видовая идентификация микроорганизмов	(+++)	Зеленый
2,00–2,29	Достоверная родовая идентификация микроорганизмов. Высокая вероятность видовой идентификации	(++)	
1,70–1,99	Высокая вероятность родовой идентификации микроорганизмов	(+)	Желтый
0,00–1,69	Нет точного результата идентификации (ненадежная идентификация)	(–)	Красный

Категории идентификации (А – С)

Identification categories (A – C)

Категория идентификации	Описание
А	Все 10 наиболее вероятных кандидатов принадлежат к одному роду. Зеленая категория – точное видовое соответствие, желтая категория – точное родовое соответствие
В	Предложенные 10 наиболее вероятных кандидатов принадлежат к разным родам. Зеленая и желтая категории – видовое и родовое соответствие
С	Нет ни видового, ни родового соответствия. Проверьте родственные микроорганизмы или анализируемый образец на предмет загрязнения

Полученные результаты сравнивали с базой данных на NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Результаты и обсуждение

В результате исследования микробиома кишечника садковой радужной форели было выделено 11 различных микробных изолятов: 7 (№ 2, 5–8, 10, 11) – из содержимого, 4 (№ 1, 3, 4, 9) – из слизистой кишечника.

Необходимо отметить, что наибольшее количество микробных изолятов выделено из содержимого кишечника рыб, что соответствует литературным данным. Так, в результате подсчета доминирующих форм микроорганизмов в кишечнике радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) было выявлено, что на слизистой кишечника бактерий на 2–3 порядка ниже, чем в его содержимом [17]. Как правило, под воздействием различных стрессовых факторов нарушается уже сложившийся естественный баланс микробиома кишечника и, как следствие, бактерии намного слабее закрепляются на слизистой кишечника и легко удаляются вместе со слизью, что сопровождается значительным увеличением их количества в химусе [18].

В исследованиях Р. М. Fidopiastis [19] на 15 различных питательных средах количество культивируемых форм микроорганизмов от общего числа бактерий, изолированных из кишечника морских растительных рыб, не превышало 5 %. По расчетам Т. Ринго с соавторами [20], культивируется только 3 % микроорганизмов, выделенных из заднего отдела кишечника рыбы, что подтверждает результаты наших исследований.

На этапе лабораторного эксперимента полученные изоляты идентифицировали с применением традиционного метода, основанного на исследовании морфолого-тинкториальных, культуральных и биохимических свойств с использованием определителя Берджи и современного лабораторного экспресс-метода – MALDI-TOF MS. Проведенные исследования позволили установить различия в иден-

тификации бактерий по классическому биохимическому методу и MALDI-TOF MS.

При исследовании культуральных свойств микробных изолятов в жидких питательных средах рост в накопительной среде ГМФ-бульон визуально обнаруживали в виде диффузного помутнения и образования поверхностных пленок. На жидкой среде Бликфельдта отмечали равномерное помутнение и изменение цвета с фиолетового на желтый за счет кислотно-основного индикатора (бромкрезолового пурпурного), входящего в ее состав.

На неселективной плотной питательной среде ГМФ-агаре установили следующие культуральные свойства изолятов: № 1 формировал округлые, пастообразные, ярко-желтые или золотистые колонии; № 2 – гладкие, не пигментированные колонии; № 3 – морщинистые с неровными краями, сероватые; № 4 – ровные, пастообразные, слегка желтоватые колонии; № 5 – плоские, слизистые, гладкие; № 6 – округлые, гладкие, слизистые; № 7 – округлые, выпуклые, с ровными краями, светло-бежевого цвета; № 8 – округлые, гладкие, серо-белые, блестящие, с ровными краями; № 10 – округлые, гладкие, слизистые, со слегка сероватым налетом; № 11 – округлые, с глянцево-поверхностью колоний, слегка сероватого цвета. На плотной среде Бликфельдта изолят № 9 формировал округлые, гладкие, выпуклые светло-бежевые колонии, с ровным краем, однородной консистенцией. Вокруг колоний отмечали диффузное изменение цвета среды с фиолетового на желтый. На агаре-ЭНДО-ГРМ изоляты № 5, 6, 10 – небольшие бледно-розовые колонии, № 8 – средние колонии (диаметром до 3 мм) малинового цвета с ярким металлическим блеском. На XLD-агаре изолят № 8 формировал средние (диаметр до 3 мм) круглые желтые колонии с зоной вокруг. На дифференциально-элективной среде для выделения клебсиелл изолят № 7 формировал средние (диаметр до 4 мм) круглые слизистые колонии малинового цвета. На SS-агаре и среде № 10 видимых признаков роста не зафиксировано в течение всего периода инкубирования.

При исследовании морфологических и тинкториальных свойств выявили 5 грамположительных (№ 1–4, 9) и 6 грамотрицательных изолятов (№ 5–8, 10, 11). В морфологическом отношении преобладали палочковидные формы (№ 2–11). Микробные изоляты № 2–4 – спорообразующие.

Все исследованные изоляты протестировали на

способность использовать различные субстраты с помощью коммерческих систем (СИБ № 1 и 2) фирмы «Микроген» (Россия), микро-КАТАЛАЗА-НИЦФ (Россия). Биохимические свойства выделенных чистых культур микроорганизмов представлены в табл. 3.

Таблица 3

Table 3

Биохимическая характеристика выделенных чистых культур микроорганизмов

Biochemical characteristics of isolated pure cultures of microorganisms

Показатель	Микробные изоляты кишечника рыбы										
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+
Оксидаза	+	–	–	–	+	+	–	–	–	+	+
β-галактозидаза	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–
Декарбоксилаза лизина	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–
Декарбоксилаза орнитина	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
Глюкоза	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–
Сахароза	–	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+
Лактоза	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	–
Мальтоза	+	+	+	+	–	–	+	+	+	–	–
Манноза	–	–	–	–	+	+	+	+	+	–	–
Ксилоза	–	–	–	–	–	+	+	+	–	–	–
Рамноза	+	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–
Маннит	–	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+
Дульцит	+	–	–	–	–	–	+	+	+	–	–
Сорбит	+	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–
Желатин	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
Индол	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–
Сероводород	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Утилизация цитрата	+	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
Утилизация малоната	+	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
Реакция Фогеса – Проскауэра	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–	–

Большинство изолятов (№ 1–8, 10, 11) обладали каталазной активностью, изоляты № 1, 5, 6, 10, 11 обладали оксидазной активностью, а изоляты № 7, 8 – β-галактозидазной активностью. Способны декарбоксиллировать диаминокислоты: лизин – изоляты № 7, 8, орнитин – изоляты № 1, 8. Определена способность изолятов № 7 и 8 ферментировать весь предлагаемый в лабораторных условиях спектр углеводов (глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза, манноза, ксилоза, рамноза) и многоатомных спиртов (маннит, дульцит, сорбит), а также образовывать индол. Изолят № 9 не ферментировал ксилозу и сорбит, № 6 не ферментирует лактозу, мальтозу, дульцит, сорбит. Остальные штаммы могли ферментировать от двух до четырех наименований углеводов и многоатомных спиртов. Утилизировать цитрат и малонат оказались способны изоляты № 1 и 7, продуцировать ацетонин (ацетилкарбинол) могли изоляты № 7 и 9. При исследова-

нии протеолитической активности было выявлено, что изоляты № 1–4 оказались способны гидролизовать желатин в течение двух-трех недель.

Выявлено только две культуры бактерий, образующих фермент триптофаназу – изоляты № 7 и 8. Все изолированные микроорганизмы не способны восстанавливать сульфат до сероводорода (H₂S) для получения энергии.

Таким образом, в результате идентификации микроорганизмов классическим биохимическим методом было определено, что большая часть относилась к родам *Bacillus* (№ 2, 3, 4) и *Pseudomonas* (№ 5, 6, 10, 11), а остальные к родам *Micrococcus* (№ 1), *Klebsiella* (№ 7), *Lactobacillus* (№ 9). Изолят № 8 идентифицировали до вида – *Escherichia coli*.

В процессе проведения масс-спектрометрического анализа полученных изолятов были получены результаты идентификации микроорганизмов по белковому профилю (табл. 4).

Таблица 4

Table 4

Идентификация микробных изолятов методом MALDI-TOF MS

Identification of microbial isolates by MALDI-TOF MS

№ изолята	Значение SV	Категория идентификации	Символ	Цвет категории идентификации	Результаты идентификации до рода/вида
1	2,1 ± 0,1	A	(++)	Зеленый	<i>Micrococcus luteus</i>
2	2,0 ± 0,04	A	(++)		<i>Bacillus pumilus</i>
3	1,8 ± 0,09	B	(+)	Желтый	<i>Bacillus</i> spp.
4	2,0 ± 0,05	A	(++)	Зеленый	<i>Bacillus pumilus</i>
5	1,8 ± 0,05	B	(+)	Желтый	<i>Pseudomonas</i> spp.
6	1,8 ± 0,04	B	(+)		<i>Pseudomonas</i> spp.
7	2,1 ± 0,05	A	(++)	Зеленый	<i>Klebsiella oxytoca</i>
8	2,2 ± 0,13	A	(++)		<i>Escherichia coli</i>
9	2,1 ± 0,04	A	(++)		<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>
10	1,8 ± 0,05	B	(+)	Желтый	<i>Pseudomonas</i> spp.
11	1,9 ± 0,05	B	(+)		<i>Achromobacter</i> spp.

Значение коэффициента достоверности SV варьировало в достаточно широком диапазоне – от 1,8 до 2,2. Из 44 снятых МСП не получено ни одного значения показателя SV, входящего в диапазон от 2,3 до 3,0 (см. табл. 4). Только для 6 (55 %) микробных изолятов (№ 1 – *Micrococcus luteus*, 2 – *Bacillus pumilus*, 4 – *Bacillus pumilus*, 7 – *Klebsiella oxytoca*, 8 – *Escherichia coli*, 9 – *Carnobacterium maltaromaticum*) удалось получить МСП, находящиеся в диапазоне значений коэффициента достоверности SV от 2,0 до 2,3 (см. табл. 4), что позволяло уверенно отнести их к категории А (точное ро-

довое и видовое соответствие). Для 5 (45 %) микробных изолятов (№ 3 – *Bacillus* spp., 5 – *Pseudomonas* spp., 6 – *Pseudomonas* spp., 10 – *Pseudomonas* spp., 11 – *Achromobacter* spp.) удалось провести вероятную родовую идентификацию и отнести их к категории В.

Только для изолята № 8 удалось провести идентификацию до вида, что соответствовало результатам масс-спектрометрического анализа.

Сравнительные результаты идентификации микроорганизмов различными методами идентификации представлены в табл. 5.

Таблица 5

Table 5

Результаты идентификации микроорганизмов по классическому биохимическому методу и масс-спектрометрии MALDI-TOF MS (белковому профилю)

Results of identification of microorganisms by the classical biochemical method and MALDI-TOF MS (protein profile) mass spectrometry

№ изолята	Биохимический метод	MALDI-TOF MS
1	<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Micrococcus luteus</i>
2, 4	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus pumilus</i>
3	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.
5, 6	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.
7	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella oxytoca</i>
8	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
9	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>
10	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.
11	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Achromobacter</i> spp.

Из 11 микробных изолятов, идентифицированных как с помощью биохимического метода, так и с помощью метода MALDI-TOF MS, только 8 (№ 1–7, 10) совпадали на уровне рода.

У микробных изолятов № 9 и 11 провести при по-

мощи стандартных биохимических подходов идентификацию до рода не удалось – белковый профиль идентификации соответствовал *Carnobacterium* spp. и *Achromobacter* spp. Поэтому с целью улучшения классических методов биохимической идентифи-

кации необходимо применять современные экспресс-методы [21, 22], такие как MALDI-TOF MS, который выполняет поиск по существующим базам белковых профилей микроорганизмов, что сопоставимо с идентификацией по 16sPHK [23].

Заключение

В результате исследований микробиоты кишечника садковой радужной форели выделены и идентифицированы 11 микробных изолятов с применением комплексного подхода для достижения максимально высокой чувствительности полученных результатов. Проведенное исследование подтвердило высокие возможности MALDI-TOF MS ана-

лиза для быстрой и точной идентификации микроорганизмов до видового уровня. Для 5 изолятов удалось провести с высокой вероятностью родовую идентификацию, доминирующей группой оказались псевдомонады и бациллы. Достоверную родовую и высокую видовую идентификацию удалось провести для 6 изолятов (см. табл. 5), из них два изолята (№ 2, 4) оказались одного вида (*Micrococcus luteus*, *Bacillus pumilus*, *Escherichia coli*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Klebsiella oxytoca*). В микробиоценозе слизистой рыб из группы молочнокислых микроорганизмов были обнаружены бактерии рода *Carnobacterium*, а именно вид *Carnobacterium maltaromaticum*.

Список источников

1. Зуева М. С., Мирошникова Е. П., Аринжанов А. Е., Килякова Ю. В. Современные исследования по изучению микробиома кишечника рыб // Животноводство и кормопроизводство. 2023. Т. 106. № 2. С. 198–213.
2. Глушанова Н. А., Блинов А. И., Алексеева Н. Б. Масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов // Медицина в Кузбассе. Кемерово: Медицина и просвещение, 2015. С. 36–41.
3. Gaudreau A. M., Labrie J., Goetz C., Dufour S., Jacques M. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of bacteria growing as biofilms // J. Microbiol. Methods. 2018. V. 145. P. 79–81. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.01.003.
4. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals // Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, DC, USA: The National Academies Press, 2011. 246 p.
5. Лабораторный практикум по болезням рыб / под ред. В. А. Мусселиус. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1983. 296 с.
6. Kim D., Brunt J., Austin B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // J. Appl. Microbiol. 2007. V. 102. P. 1654–1664.
7. Ускова И. В., Потешкина В. А., Калинин К. А. Комплексный мониторинг бактериопланктона рыбного хозяйства реки Тулома и энтеральной микробиоты кишечника, культивируемой в садках форели // Вестн. МГТУ. 2019. Т. 22. № 3. С. 432–440. DOI: 10.21443/1560-9278-2019-22-3-432-440.
8. Анттила П. Диагностика бактериальных болезней рыб (лабораторное пособие на основе практики финских специалистов) // НИИ Охотничьего и рыбного хозяйства Финляндии. М.: Аквариум, 2010. 43 с.
9. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: учеб. пособие / под ред. А. С. Лабинской, Л. П. Блинковой, А. С. Ещиной. СПб.: Лань, 2016. 588 с.
10. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: учеб. пособие / под ред. Н. С. Егорова. М.: Изд-во МГУ, 1995. 224 с.
11. Определитель бактерий Берджи: в 2-х т. М.: Мир, 1997. Т. 1. 432 с.
12. Определитель бактерий Берджи: 2-х т. М.: Мир, 1997. Т. 2. 368 с.
13. Нетрусов А. И., Котова И. Б. Микробиология: теория и практика: в 2 ч. М.: Юрайт, 2018. Ч. 1. 315 с.
14. Васильев Д. А. и др. Методы общей бактериологии: учеб.-метод. пособие. Ульяновск: Изд-во УлГСА, 2003. 129 с.
15. Clinical Microbiology MALDI Biotyper Fast & Accurate Identification of Microorganisms Innovation with Integrity MALDI-TOF. URL: <https://pdf.directindustry.com/pdf/bruker-daltonics/maldi-biotyper/30029-313677.html> (дата обращения: 15.08.2025).
16. Рябинин И. А., Ершова А. И., Батаева К. Д. Анализ идентификации и группировки масс-спектров, получаемых при MALDI-TOF-масс-спектрометрии белковых экстрактов из культуры *Aspergillus fumigatus* Fres // Проблемы медицинской микологии. 2015. Т. 17. № 1. С. 52–57.
17. Spanggaard B., Huber I., Nielsen J., Nielsen T., Appel K., Gram L. The microflora of rainbow trout intestine: A comparison of traditional and molecular identification // Aquaculture. 2000. V. 182. Iss. 1–2. P. 1–15. DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00250-1.
18. Olsen R. E., Sundell K., Hansen T., Hemre G. I., Myklebust R., Mayhew T. M., Ringo E. Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: An electron microscopical study // Fish Physiology and Biochemistry. 2002. V. 26. P. 211–221.
19. Fidopastis P. M. Microbial activity in the gut of an herbivorous marine fish // Masters Abstracts International. 1996. V. 34. N. 3. P. 1102.
20. Ringo E., Lødemel J. B., Myklebust R., Kaino T., Mayhew T. M., Olsen R. E. Epithelium-associated bacteria in the gastrointestinal tract of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). An electron microscopical study // Journal of Applied Microbiology. 2001. V. 90. P. 294–300. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01246.x.
21. Church D. L. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria // Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: AMS Press, 2016. P. 3.17.1.1-3.17.48.3. DOI: 10.1128/9781555818814.ch3.17.
22. Reyes A. T. Morpho-biochemical aided identification of bacterial isolates from Philippine native pig // Adv. Pharmacol. Clin. Trials. 2018. V. 3 (5). P. 000148. DOI: 10.23880/apct-16000148.
23. Салгина А. В., Бондаренко Т. А., Иванова Е. В., Перунова Н. Б. Сравнение методов идентификации представителей рода *Bifidobacterium* // Вестн. ОГУ. 2014. № 13 (174). С. 92–95.

References

1. Zuyeva M. S., Miroshnikova E. P., Arinzhanov A. E., Kilyakova Yu. V. Sovremennyye issledovaniya po izucheniyu mikrobioma kishhechnika ryb [Modern research on the microbiome of fish intestines]. *Zhivotnovodstvo i kormoproduktivnost*, 2023, vol. 106, no. 2, pp. 198-213.
2. Glushanova N. A., Blinov A. I., Alekseyeva N. B. Mass-spektrmetricheskaya identifikatsiya mikroorganizmov [Mass spectrometric identification of microorganisms]. *Meditsina v Kuzbasse*. Kemerovo, Meditsina i prosveshcheniye Publ., 2015. Pp. 36-41.
3. Gaudreau A. M., Labrie J., Goetz C., Dufour S., Jacques M. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of bacteria growing as biofilms. *J. Microbiol. Methods*, 2018, vol. 145, pp. 79-81. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.01.003.
4. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC, USA, The National Academies Press, 2011. 246 p.
5. *Laboratornyy praktikum po boleznyam ryb* [Laboratory workshop on fish diseases]. Pod redaktsiyey V. A. Musseilius. Moscow, Legkaya i pishchevaya promyshlennost Publ., 1983. 296 p.
6. Kim D., Brunt J., Austin B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Microbiol.*, 2007, vol. 102, pp. 1654-1664.
7. Uskova I. V., Poteskina V. A., Kalinchuk K. A. Kompleksnyy monitoring bakterioplanktona rybovodnogo khozyaystva reki Tuloma i enteralnoy mikrobioty kishhechnika, kultiviruyemoy v sadkakh foreli [Comprehensive monitoring of bacterioplankton of the Tuloma River fish farm and enteral intestinal microbiota cultivated in trout cages]. *Vestnik MGTU*, 2019, vol. 22, no. 3, pp. 432-440. DOI: 10.21443/1560-9278-2019-22-3-432-440.
8. Anttila P. Diagnostika bakterialnykh boleznei ryb (laboratornoye posobiye na osnove praktiki finskikh spetsialistov) [Diagnosis of bacterial diseases of fish (laboratory manual based on the practice of Finnish specialists)]. NII Okhotnichyego i rybnogo khozyaystva Finlyandii. Moscow, Akvarium Publ., 2010. 43 p.
9. *Obshchaya i sanitarnaya mikrobiologiya s tekhnikoy mikrobiologicheskikh issledovaniy: uchebnoye posobiye* [General and sanitary microbiology with microbiological research techniques: a textbook]. Pod redaktsiyey A. S. Labinskoy, L. P. Blinkovoy, A. S. Eshchinoy. Saint Petersburg, Lan Publ., 2016. 588 p.
10. *Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po mikrobiologii: uchebnoye posobiye* [A guide to practical classes in microbiology: a textbook]. Pod redaktsiyey N. S. Egorova. Moscow, Izd-vo MGU, 1995. 224 p.
11. *Opredelitel bakteriy Berdzhii: v 2-kh tomakh* [Bergey's Bacterial Determinant: in 2 volumes]. Moscow, Mir Publ., 1997. Vol. 1. 432 p.
12. *Opredelitel bakteriy Berdzhii: 2-kh tomakh* [Bergey's Bacterial Determinant: 2 volumes]. Moscow, Mir Publ., 1997. Vol. 2. 368 p.
13. Netrusov A. I., Kotova I. B. *Mikrobiologiya: teoriya i praktika: v 2 chastyakh* [Microbiology: Theory and Practice: in 2 parts]. Moscow, Yurayt Publ., 2018. Part 1. 315 p.
14. Vasilyev D. A. i dr. *Metody obshchey bakteriologii: uchebno-metodicheskoye posobiye* [Methods of general bacteriology: a teaching aid]. Ulianovsk, Izd-vo UIGSA, 2003. 129 p.
15. Clinical Microbiology MALDI Biotyper Fast & Accurate Identification of Microorganisms Innovation with Integrity MALDI-TOF. URL: <https://pdf.directindustry.com/pdf/bruker-daltonics/maldi-biotyper/30029-313677.html> (accessed: 15.08.2025)
16. Ryabinin I. A., Ershova A. I., Batayeva K. D. Analiz identifikatsii i gruppirovki mass-spektrov, poluchayemykh pri MALDI-TOF-mass-spektrometrii belkovykh ekstraktov iz kultur *Aspergillus fumigatus* Fres [Analysis of identification and grouping of mass spectra obtained by MALDI-TOF mass spectrometry of protein extracts from *Aspergillus fumigatus* Fres cultures]. *Problemy meditsinskoy mikologii*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 52-57.
17. Spanggaard V., Huber I., Nielsen J., Nielsen T., Appel K., Gram L. The microflora of rainbow trout intestine: A comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture*, 2000, vol. 182, iss. 1-2, pp. 1-15. DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00250-1.
18. Olsen R. E., Sundell K., Hansen T., Hemre G. I., Myklebust R., Mayhew T. M., Ringo E. Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: An electron microscopical study. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, vol. 26, pp. 211-221.
19. Fidopiastis P. M. Microbial activity in the gut of an herbivorous marine fish. *Masters Abstracts International*, 1996, vol. 34, no. 3, p. 1102.
20. Ringo E., Ldemel J. B., Myklebust R., Kaino T., Mayhew T. M., Olsen R. E. Epithelium-associated bacteria in the gastrointestinal tract of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). An electron microscopical study. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, vol. 90, pp. 294-300. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01246.x.
21. Church D. L. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington, AMS Press, 2016. P. 3.17.1.1-3.17.48.3. DOI: 10.1128/9781555818814.ch3.17.
22. Reyes A. T. Morpho-biochemical aided identification of bacterial isolates from Philippine native pig. *Adv. Pharmacol. Clin. Trials*, 2018, vol. 3 (5), p. 000148. DOI: 10.23880/apct-16000148.
23. Salgina A. V., Bondarenko T. A., Ivanova E. V., Perunova N. B. Sravneniye metodov identifikatsii predstaviteley roda Bifidobacterium [Comparison of methods of identification of representatives of the genus Bifidobacterium]. *Vestnik OGU*, 2014, no. 13 (174), pp. 92-95.

Статья поступила в редакцию 04.09.2024; одобрена после рецензирования 08.09.2025; принята к публикации 28.11.2025
The article was submitted 04.09.2024; approved after reviewing 08.09.2025; accepted for publication 28.11.2025

Информация об авторах / Information about the authors

Виктория Алексеевна Потешкина – ассистент кафедры микробиологии и биохимии; Мурманский арктический университет; poteshkinava@mauniver.ru

Victoria A. Poteshkina – Lecturer of the Department of Microbiology and Biochemistry; Murmansk Arctic University; poteshkinava@mauniver.ru

Инга Владимировна Ускова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры микробиологии и биохимии; Мурманский арктический университет; uskovaiv@mauniver.ru

Inga V. Uskova – Candidate of Biological Sciences, Assistant Professor; Assistant Professor of the Department of Microbiology and Biochemistry; Murmansk Arctic University; uskovaiv@mauniver.ru

Светлана Ростиславовна Деркач – доктор химических наук, профессор; главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории химии и технологии морских биоресурсов; Мурманский арктический университет; derkachsr@mauniver.ru

Svetlana R. Derkach – Doctor of Chemical Sciences, Professor; Head Researcher of the Research Laboratory of Chemistry and Technology of Marine Bioresources; Murmansk Arctic University; derkachsr@mauniver.ru

Варвара Сергеевна Кравцова – врач-бактериолог централизованной бактериологической лаборатории; Клиническая инфекционная больница имени С. П. Боткина; varvara76@yandex.ru

Varvara S. Kravtsova – Bacteriologist at the Centralized of Bacteriological Laboratory; Clinical Infectious Diseases Hospital named after S. P. Botkin; varvara76@yandex.ru

