



## Биология и экология гидробионтов

УДК 639.3.07

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАУПЛИЙ РАЧКОВ *ARTEMIA SALINA* В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ ПРОБИОТИКОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* В АКВАКУЛЬТУРЕ

© 2023 М. С. Мазанко<sup>1</sup>, А. В. Горовцов<sup>1</sup>, В. А. Чистяков<sup>1</sup>,  
М. А. Морозова<sup>2</sup>, Е. В. Празднова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет» (ЮФУ), Ростов-на-Дону 344006, Россия

<sup>2</sup>ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» (РНИИМП),  
Ростов-на-Дону 344010, Россия

E-mail: gorovtsov@gmail.com

**Аннотация.** В работе представлены результаты исследования влияния пробиотических препаратов на основе бактерий *Bacillus* на науплий рачков *Artemia salina*. Использование живых кормов является необходимым этапом при разведении многих видов рыб, и науплии артемии широко применяются для этой цели. Весьма актуально применение в аквакультуре пробиотиков, которые могут выступать как естественные антагонисты патогенов гидробионтов, а также стимулировать их рост и развитие. Целью данной работы являлось изучение иммобилизации пробиотических штаммов *Bacillus* на науплиях артемии для разработки высокоэффективных кормов для молоди рыб, которые бы обладали пробиотическими свойствами. Проведены эксперименты по внесению различных доз препаратов на основе трех пробиотических штаммов *Bacillus* в воду при выращивании цист *Artemia salina*. Оценивалась численность бактерий в воде, а также на поверхности и внутри науплий методом посева на питательные среды. Установлено, что несмотря на то, что на стадии науплии артемии не питаются, при внесении в воду пробиотических штаммов происходит иммобилизация бактерий на покровах рачков; при этом концентрация внесенных штаммов бацилл в смывах с науплий на 1 порядок выше, чем находится в воде в планктонной форме. Внесение бацилл в дозе 0,0017 г/л активизировало выход науплий из цист на 9–41 % от контроля, тогда как повышение дозы до 0,17 г/л приводило к снижению доли вылупившихся рачков. Таким образом, при условии правильного подбора дозировки препарата можно добиться решения сразу двух задач: получения живых кормов с пробиотическим эффектом для личинок рыб и увеличения выхода науплий.

**Ключевые слова:** *Bacillus*, пробиотики, *Artemia salina*, биоинкапсуляция

**USE OF *ARTEMIA SALINA* NAUPLII AS THE CARRIER FOR PROBIOTIC BACTERIA OF *BACILLUS* GENUS IN AQUACULTURE****M. S. Mazanko<sup>1</sup>, A. V. Gorovtsov<sup>1</sup>, V. A. Chistyakov<sup>1</sup>,  
M. A. Morozova<sup>2</sup>, E. V. Prazdnova<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*FSAEI HE "Southern Federal University" (SFedU), Rostov-on-Don 344006, Russia*<sup>2</sup>*FBIS "Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology" (RRIMP),  
Rostov-on-Don 344010, Russia**E-mail: gorovtsov@gmail.com*

**Abstract.** This paper presents the results of the investigation of the effect of probiotic preparations based on *Bacillus* strains on *Artemia salina* nauplii. The use of live food is a necessary step in cultivation of many fish species, and *Artemia* nauplii are widely used for this purpose. It is crucial to use probiotics in aquaculture, as they can act as natural antagonists of aquatic pathogens, as well as stimulate fish growth and development. This work aims to study the immobilization of probiotic *Bacillus* strains on *Artemia* nauplii in order to develop highly effective feeds with probiotic properties for juvenile fish. Experiments on the introduction of various doses of preparations based on three probiotic strains of *Bacillus* into the water during the rearing of *Artemia salina* cysts were carried out. The number of bacteria in the water, as well as on the surface and inside the nauplii, was estimated by plating on nutrient media. It has been established that, despite the fact that brine shrimps do not feed at the orthonauplius stage, when probiotic strains are introduced into the water, bacteria are immobilized on the covers of the crustaceans; the concentration of the introduced *Bacillus* strains in the wipe samples taken from the nauplii surface is 1 order higher than it is for the planktonic form in the water. The introduction of bacilli at a dose of 0.0017 g/L activated the release of nauplii from cysts by 9–41 % of the control, while increasing the dose to 0.17 g/L led to a decrease in the proportion of hatched crustaceans. Thus, if the correct dosage were identified, it would make it possible to accomplish two important tasks at once: to obtain the live feed with probiotic properties for fish larvae and to increase the yield of nauplii.

**Keywords:** *Bacillus*, probiotics, *Artemia salina*, bioencapsulation

**ВВЕДЕНИЕ**

В разведении многих видов рыб необходимым этапом является кормление личинок живыми кормами, поскольку не все виды рыб способны на ранних стадиях развития питаться искусственным кормом [1]. Одним из широко используемых кормов являются рачки *Artemia salina* (Linnaeus, 1758), причем для личинок и молоди рыб используются науплии рачка, характеризующиеся малым размером, мягкими покровами и высокой питательной ценностью [2, 3]. Для повышения питательной ценности науплий применяют метод биоинкапсуляции, заключающийся в скармливании метанауплиям полиненасыщенных жирных кислот [4] или микроводорослей [1]. Ограничением метода является то, что на стадии науплии артемии не питаются, используя запасы из желточного мешка, и начинают активно питаться лишь на стадии метанауплии [5]. При этом гораздо удобнее использовать в качестве живых кормов именно науплий, в связи с их малым размером и возможностью быстро получить корм из длительно хранящихся цист.

Одним из перспективных направлений для аквакультуры представляется использование пробиотических препаратов, которые могут играть роль как антагонистов патогенных для рыб бактерий, так и адаптогенов, позволяющих снижать негативное действие стрессовых факторов на молодь рыб. В настоящее время находят применение пробиотические препараты на основе спорообразующих бактерий р. *Bacillus* [6]. Известно, что пробиотики на основе *Bacillus* не вызывают токсические эффекты при кормлении объектов аквакультуры и могут производить антимикробные вещества, что делает их более подходящими кандидатами по сравнению с другими пробиотиками, применяемыми в аквакультуре [7, 8].

Обогащение живого корма пробиотиками в виде инкапсуляции является сравнительно новым подходом, при котором пробиотики могут оставаться жизнеспособными или даже размножаться в живом корме. Следовательно, живой корм может эффективно доставлять пробиотики хозяевам. Обогащение живого корма, такого как *Artemia*

[9], коловратки [10] и веслоногие рачки [11], пробиотиками представляет значительный интерес. Например, науплии артемии наиболее эффективно инкапсулировали комбинацию *Pseudomonas synxantha* и *Ps. aeruginosa* для западных королевских креветок, *Penaeus latisulcatus* [12].

В последнее время значительное внимание привлекается к возможности сочетания пробиотических штаммов бацилл и живых кормов на основе науплиусов артемии. Показано, что использование пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* вместе с науплиусами артемий улучшало показатели роста у личинок веслоносового сома (*Pseudoplatystoma reticulatum*) [13], повышало выживаемость и скорость роста личинок клариевого сома (*Clarias batrachus*) [14], а также золотых рыбок (*Carassius auratus*) [15]. Также выявлено, что при использовании пробиотических штаммов бацилл снижается вероятность заражения науплиусов и объектов аквакультуры патогенными видами вибрионов [16].

В наших предыдущих исследованиях были выделены перспективные штаммы пробиотических бацилл, обладающие выраженным антагонистическим эффектом в отношении актуальных для аквакультуры патогенов [17]. Эти штаммы представляют интерес для использования их в целях лечения и профилактики объектов аквакультуры на различных стадиях роста.

Целью настоящей работы является изучение возможности использования науплий рачков *Artemia salina* в качестве носителей пробиотических бактерий р. *Bacillus* для разработки высокоэффективных кормов для молоди рыб.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы три пробиотических препарата на основе выделенных нами на предыдущем этапе исследований штаммов *Bacillus mojavensis* R1, *Bacillus subtilis* R4 и *Bacillus velezensis* R5 [17]. Данные штаммы были выделены из биоматериала карповых рыб, выловленных в низовьях р. Дон. Идентификация штаммов проведена с использованием методов масс-спектрометрии и секвенирования гена 16S рРНК. Все препараты были изготовлены методом твердофазной ферментации соевых бобов. Содержание жизнеспособных клеток целевого штамма в готовом препарате составляло для *B. mojavensis* R1  $1,5 \times 10^8$ , *B. subtilis* R4 —  $1,1 \times 10^8$  и *B. velezensis* R5 —  $6,5 \times 10^5$ .

Для получения науплий были использованы цисты *Artemia salina*, производитель ООО «Экофонд», Барнаул, Россия.

Каждый из препаратов, использованный в опытах, содержал монокультуру соответствующего штамма *Bacillus*. Для исследования препаратов использовали следующую схему опытов.

В сосуды наливали дистиллированную воду объемом 3 л, вносили поваренную соль до уровня солености 33 ‰, а также цисты из расчета 1,7 г/л [3]. В сосудах обеспечивались непрерывный высокий уровень освещенности и аэрация. Пробиотические препараты вносили в соленую воду вместе с цистами артемий (*Artemia salina*) в концентрации 0,0017 г/л и 0,17 г/л. В контрольный сосуд вносили только цисты.

Температура выращивания артемий составила 30 °С.

После экспозиции в течение 2 суток живых науплий (стадия науплии [3]) отделяли от цист. Для этого выключали аэрацию и выдерживали сосуд с науплиями в затененной комнате при единственном точечном источнике света от осветителя у стенки сосуда. После того как науплии сконцентрировались преимущественно у освещенной стенки, их отбирали пластиковой трубкой и процеживали через несколько слоев стерильного нетканого полотна.

Рачков тщательно снимали с полотна и взвешивали, а после разделяли на две равные части. Одну часть заливали стерильным физиологическим раствором из расчета 1:10 и тщательно встряхивали на VXMNAL Vortex Mixer (ОНАУС, USA) в течение 5 мин., получая тем самым смыв с поверхности науплий. Вторую часть помещали на предметное стекло и раздавливали стерильным шпателем, а затем так же заливали физиологическим раствором из расчета 1:10 и тщательно встряхивали на VXMNAL Vortex Mixer в течение 5 мин. Таким образом, производилось исследование микроорганизмов как находящихся на поверхности, так и из внутреннего содержимого рачков.

Из смывов, а также воды, в которой развивались науплии, готовили ряд последовательных разведений, а затем производили посев на твердую питательную среду LB [18] в трехкратной повторности. Инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 суток, затем учитывали бациллярные колонии согласно морфологии колоний, подтверждая микроскопированием. Чтобы снизить влияние

антагонизма со стороны посторонней микробиоты, учет бактерий производился только на чашках, где число колоний не превышало 100. Пробиотические бактерии отделялись от других морфологически, учет производился с использованием чашек с чистыми культурами исследуемых штаммов в качестве образца сравнения.

Для оценки полноты выхода соответствующего штамма бактерий из спор вода, в которой находились рачки, была также пастеризована (5 мин. при температуре 95 °С) и высеяна поверхностно на твердую питательную среду LB. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 суток, затем учитывали количество колоний LB [18].

Для исследования токсичности препаратов проводили все манипуляции, описанные в предыдущем пункте, но количество каждого препарата составляло 1,7 г/л.

Для исследования характера влияния препарата на выход рачков из цист был поставлен опыт с препаратом *B. mojavensis* R1 в концентрации 0,0017 г/л и аналогичной концентрацией стерильной гидролизованной сои, не содержащей пробиотических штаммов. Рачков выращивали до стадии науплий в тех же условиях, что описано выше, затем их собирали и взвешивали по описанной выше методике.

Все опыты были произведены в трехкратной повторности.

Все расчеты, в т. ч. статистические, осуществлялись в системе электронных таблиц Microsoft Office Excel. Для определения достоверности результатов использовали t-критерий Стьюдента с определением р-уровня значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе были использованы три пробиотических препарата, полученных способом твердофазной ферментации соевых бобов пробиотическими бактериями [17]. Используемые на первом этапе концентрации препаратов составляли 0,0017 г/л (0,1 % сухого препарата от массы цист) — данное соотношение препарата с носителем показало себя эффективным в наших предыдущих работах [19, 20] — и 0,17 г/л (10 % сухого препарата от массы цист), для уточнения возможного усиления эффекта препарата, примененного в более высоких концентрациях.

Все препараты имели разное значение КОЕ/г спор. Препараты уравнивали не по значению КОЕ/г, а по массе, поскольку носителем спор *Bacillus* в них является ферментированная соя, и разное количество внесенной в воду органики могло повлиять на экспериментальные условия и возможность сравнения опытов между собой.

В табл. 1–4 представлены результаты исследования инкапсулирования пробиотического препарата в науплиях артемий.

**Таблица 1.** Количество бактерий *Bacillus mojavensis* R1 в воде (КОЕ/мл), а также на поверхности науплиусов *Artemia salina* и после их раздавливания (КОЕ/г)

**Table 1.** Number of *Bacillus mojavensis* R1 bacteria in the water (CFU/ml), as well as on the surface of *Artemia salina* nauplii and after crushing them (CFU/g)

Показатели Parameters	Контроль Control group	Концентрация препарата Concentration of the preparation	
		0,0017 г/л 0.0017 g/L	0,17 г/л 0.17 g/L
1	2	3	4
Количество бактерий в воде на начало эксперимента, КОЕ/мл Bacterial numbers in the water at the start of the experiment, CFU/ml	—	$2,6 \times 10^5$	$2,6 \times 10^7$
Количество бактерий в воде после окончания эксперимента, КОЕ/мл Bacterial numbers in the water at the end of the experiment, CFU/ml	$3,9 \pm 0,1 \times 10^3$	$3,5 \pm 0,2 \times 10^5$	$7,2 \pm 0,3 \times 10^7$

Таблица 1 (окончание)

Table 1 (finished)

1	2	3	4
Количество бактерий на поверхности науплий, КОЕ/г Bacterial numbers on the surface of nauplii, CFU/g	4,4±0,3×10 <sup>4</sup>	2,1±0,3×10 <sup>6</sup>	6,5±0,3×10 <sup>8</sup>
Общая обсемененность науплий, включая внутреннее содержимое, КОЕ/г Total bacterial count of the nauplii, including their inner content, CFU/g	4,8±0,2×10 <sup>4</sup>	2,0±0,2×10 <sup>6</sup>	4,5±0,3×10 <sup>8</sup>
Масса науплий, г Weight of the nauplii, g	1,03±0,09	1,28±0,10*	0,83±0,08
Масса, % от контроля Weight, % of the control group		+Δ24	-Δ17

Примечание: \* Достоверное отличие от контрольных значений, p<0,05

Note: \* Significant difference from the control values, p<0.05

Таблица 2. Количество бактерий *Bacillus subtilis* R4 в воде (КОЕ/мл), а также на поверхности науплиусов *Artemia salina* и после их раздавливания (КОЕ/г)

Table 2. Number of *Bacillus subtilis* R4 bacteria in the water (CFU/ml), as well as on the surface of *Artemia salina* nauplii and after crushing them (CFU/g)

Показатели Parameters	Контроль Control group	Концентрация препарата Concentration of the preparation	
		0,0017 г/л 0.0017 g/L	0,17 г/л 0.17 g/L
Количество бактерий в воде на начало эксперимента, КОЕ/мл Bacterial numbers in the water at the start of the experiment, CFU/ml	—	1,8×10 <sup>5</sup>	1,8×10 <sup>7</sup>
Количество бактерий в воде после окончания эксперимента, КОЕ/мл Bacterial numbers in the water at the end of the experiment, CFU/ml	5,5±0,2×10 <sup>3</sup>	1,4±0,1×10 <sup>5</sup>	1,7±0,1×10 <sup>6</sup>
Количество бактерий на поверхности науплий, КОЕ/г Bacterial numbers on the surface of nauplii, CFU/g	1,4±0,3×10 <sup>4</sup>	3,1±0,3×10 <sup>6</sup>	4,2±0,2×10 <sup>7</sup>
Общая обсемененность науплий, включая внутреннее содержимое, КОЕ/г Total bacterial count of the nauplii, including their inner content, CFU/g	1,0±0,3×10 <sup>4</sup>	1,1±0,2×10 <sup>6</sup>	1,8±0,2×10 <sup>7</sup>
Масса науплий, г Weight of the nauplii, g	1,12±0,15	1,58±0,21*	0,63±0,25*
Масса, % от контроля Weight, % of the control group		+Δ41	-Δ44

Примечание: \* Достоверное отличие от контрольных значений, p<0,05

Note: \* Significant difference from the control values, p<0.05

**Таблица 3.** Количество бактерий *Bacillus velezensis* R5 в воде (КОЕ/мл), а также на поверхности науплиусов *Artemia salina* и после их раздавливания (КОЕ/г)

**Table 3.** Number of *Bacillus velezensis* R5 bacteria in the water (CFU/ml), as well as on the surface of *Artemia salina* nauplii and after crushing them (CFU/g)

Показатели Parameters	Контроль Control group	Концентрация препарата Concentration of the preparation	
		0,0017 г/л 0.0017 g/L	0,17 г/л 0.17 g/L
Количество бактерий в воде на начало эксперимента, КОЕ/мл Bacterial numbers in the water at the start of the experiment, CFU/ml	–	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$
Количество бактерий в воде после окончания эксперимента, КОЕ/мл Bacterial numbers in the water at the end of the experiment, CFU/ml	$1,5 \pm 0,1 \times 10^4$	$1,6 \pm 0,1 \times 10^4$	$4,0 \pm 0,3 \times 10^5$
Количество бактерий на поверхности науплий, КОЕ/г Bacterial numbers on the surface of nauplii, CFU/g	$1,8 \pm 0,2 \times 10^5$	$1,4 \pm 0,2 \times 10^5$	$5,1 \pm 0,1 \times 10^6$
Общая обсемененность науплий, включая внутреннее содержимое, КОЕ/г Total bacterial count of the nauplii, including their inner content, CFU/g	$3,6 \pm 0,2 \times 10^5$	$4,2 \pm 0,2 \times 10^5$	$4,1 \pm 0,2 \times 10^6$
Масса науплий, г Weight of the nauplii, g	$3,62 \pm 0,15$	$3,94 \pm 0,22$	$2,81 \pm 0,32^*$
Масса, % от контроля Weight, % of the control group		+Δ9	-Δ22

Примечание: \* Достоверное отличие от контрольных значений,  $p < 0,05$

Note: \* Significant difference from the control values,  $p < 0.05$

Из представленных данных можно сделать несколько выводов. Во-первых, концентрация исследуемых бацилл не увеличивалась в воде, т. е. данные штаммы не делятся в этих условиях. Во-вторых, количество бактерий в смывах и внутри рачков не отличалось, т. е. к 48 часам экспозиции науплии еще не перешли к стадии метанауплий, способных заглатывать корм, в т. ч. и бацилл, внутри кишечника [3].

При этом количество бацилл на поверхности рачков везде было на порядок выше, чем в воде. По-видимому, бациллы используют науплиусы в качестве поверхности, на которой можно закрепиться для образования биопленки.

Для оценки полноты выхода бацилл из спор в воде в каждом исследовании оценивали количество бацилл, выживающих после пастеризации, т. е. находящихся на момент анализа в споровой

форме. Во всех трех исследуемых препаратах процент бацилл, сохранивших споровую форму, не превышал 1–2 %.

Таким образом, при использовании артемий в стадии науплий не обязательно добиваться истинной инкапсуляции — науплии даже без нее являются концентраторами и носителями пробиотических бактерий и в дальнейшем могут быть использованы для подкормки личинок рыб.

В табл. 1–3 также представлена масса науплий в разных вариантах опыта.

Можно отметить, что препараты на основе *B. mojavensis* R1 и *B. subtilis* R4 в более низкой концентрации (0,0017 г/л) стимулируют выход науплий из цист по сравнению с контрольными значениями; при этом препарат *B. velezensis* R5 достоверных отличий не показал. С другой стороны, более высокие концентрации всех препаратов

(0,17 г/л) *B. subtilis* R4 и *B. velezensis* R5 вызывали снижение выхода рачков из цист, особенно при использовании препарата на основе *B. subtilis* R4. Эту особенность необходимо учитывать при расчете дозы препарата для науплий.

Для уточнения влияния малых доз препарата (0,0017 г/л) на выклев науплий из цист был поставлен дополнительный опыт по сравнению влияния пробиотического препарата на основе *B. mojavensis* R1 и того же количества (0,0017 г/л) стерильного гидролизата соевой муки, являющегося аналогом используемых препаратов, но не содержащего спор пробиотических бактерий. Результаты представлены в табл. 4.

Как следует из табл. 4, разницы между внесением препарата с микроорганизмами или просто сои не наблюдается. По-видимому, выход стимули-

руют не бактерии, а поступление в воду питательных веществ, в первую очередь пептидов.

В связи с неоднозначностью результатов влияния биопрепарата на выход науплий из цист и возможным негативным влиянием его в высоких дозах, был поставлен дополнительный опыт с десятикратным увеличением концентрации препарата до 1,7 г/л. Результаты представлены в табл. 5.

Дальнейшее повышение концентрации препарата, как и ожидалось, вызвало значительное подавление процесса выхода науплий из цист. Препараты на основе *B. mojavensis* R1 и *B. subtilis* R4 вызывали снижение выхода науплий более чем на три четверти, а выход науплий при внесении препарата на основе *B. subtilis* R4 составил всего 9 % от контроля. Скорее всего, это вызвано слишком большой концентрацией в воде компонентов сои,

**Таблица 4.** Масса вылупившихся науплиусов *Artemia salina* при внесении препарата на основе *Bacillus mojavensis* R1 и гидролизованной сои

**Table 4.** Weight of the hatched nauplii of *Artemia salina* after introduction of a preparation based on *Bacillus mojavensis* R1 and hydrolyzed soy proteins

Показатели Parameters	Контроль Control group	<i>Bacillus mojavensis</i> R1	Гидролизат соевой муки Soybean flour hydrolysate
Масса науплий, г Weight of the nauplii, g	3,03±0,22 <sup>a</sup>	3,58±0,22 <sup>b</sup>	3,50±0,18 <sup>b</sup>
Масса, % от контроля Weight, % of the control group		+Δ18	+Δ16

Примечание: <sup>a, b</sup> Достоверно различающиеся варианты эксперимента

Note: <sup>a, b</sup> Variants of experiments, significantly different from each other

**Таблица 5.** Влияние высоких доз (1,7 г/л) исследуемых препаратов на науплий *Artemia salina*

**Table 5.** Effects of high doses (1.7 g/L) of the investigated preparations on *Artemia salina* nauplii

Показатели Parameters	Контроль Control group	Препараты		
		<i>Bacillus mojavensis</i> R1	<i>Bacillus subtilis</i> R4	<i>Bacillus velezensis</i> R5
1	2	3	4	5
Количество бактерий в воде на начало эксперимента, КОЕ/мл Bacterial numbers in the water at the start of the experiment, CFU/ml	–	2,6×10 <sup>8</sup>	1,8×10 <sup>8</sup>	1,1×10 <sup>6</sup>
Количество бактерий в воде после окончания эксперимента, КОЕ/мл Bacterial numbers in the water at the end of the experiment, CFU/ml	1,7±0,1×10 <sup>4</sup>	2,2±0,1×10 <sup>8</sup>	1,5±0,2×10 <sup>8</sup>	3,3±0,3×10 <sup>6</sup>

Таблица 5 (окончание)

Table 5 (finished)

1	2	3	4	5
Количество бактерий на поверхности науплий, КОЕ/г Bacterial numbers on the surface of nauplii, CFU/g	2,1±0,3×10 <sup>5</sup>	3,8±0,2×10 <sup>8</sup>	1,8±0,1×10 <sup>8</sup>	8,4±0,2×10 <sup>7</sup>
Общая обсемененность науплий, включая внутреннее содержимое, КОЕ/г Total bacterial count of the nauplii, including their inner content, CFU/g	2,2±0,2×10 <sup>5</sup>	2,6±0,3×10 <sup>8</sup>	2,1±0,2×10 <sup>8</sup>	8,8±0,2×10 <sup>7</sup>
Масса науплий, г Weight of the nauplii, g	3,65±0,35 <sup>a</sup>	0,76±0,21 <sup>b</sup>	0,32±0,22 <sup>c</sup>	0,87±0,34 <sup>b</sup>
Масса, % от контроля Weight, % of the control group		-Δ71	-Δ91	-Δ76

Примечание: <sup>a, b, c</sup> Достоверно различающиеся варианты эксперимента

Note: <sup>a, b, c</sup> Variants of experiments, significantly different from each other

на основе которой создан препарат. За счет этого увеличивается общее количество микроорганизмов в воде, что приводит к снижению уровня кислорода, увеличению концентрации токсичных веществ и т. д. и негативно влияет на науплий.

Также следует отметить, что при высоких концентрациях бактерий в воде не происходило их дальнейшего концентрирования на поверхности рачков: если в случае *Bacillus velezensis* R5 концентрация в воде составляла 3,3±0,3×10<sup>6</sup> КОЕ/мл, то на науплиях она возросла до 8,4±0,2×10<sup>7</sup> КОЕ/г. При концентрациях бактерий, достигающих 10<sup>8</sup> КОЕ/мл, дальнейшего концентрирования на науплиях не происходило, концентрации в воде и на науплиях были одного порядка.

Внесение излишне высоких концентраций препарата не только нерентабельно, но даже может привести к убыткам. Поэтому необходимо точно рассчитывать дозу препарата к объему воды для создания необходимой концентрации пробиотических бактерий.

При этом низкие дозы биопрепарата, напротив, хорошо иммобилизуются на поверхности науплий. Это позволяет создать живой корм с пробиотическим эффектом для самых ранних этапов развития рыб, когда членистоногие более крупного размера или искусственные корма еще не подходят для питания [3].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований позволяют заключить, что внесение в воду пробиотических препаратов на основе бактерий р. *Bacillus* при получении науплиусов артемии позволяет добиться иммобилизации части клеток на покровах рачков — даже в период, когда они еще не приступают к активному питанию. Это позволяет использовать пробиотические препараты на самых ранних этапах подкормки личинок рыб, которые еще не способны питаться метанауплиями или ювенильными артемиями, имеющими большие размеры. Иммобилизация, по-видимому, связана с высокой способностью пробиотических бацилл к адгезии и биопленкообразованию.

Следует учитывать, что низкие дозы биопрепаратов обладают стимулирующим действием на выход науплий, тогда как высокие, напротив, вызывают угнетение выхода.

Таким образом, при условии правильного подбора дозировки препарата можно добиться решения сразу двух задач: получения живых кормов с пробиотическим эффектом для личинок рыб и увеличения выхода науплий без применения других стимулирующих препаратов.

*Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 20-516-81004.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Смирнов Д.Ю., Аганесова Л.О., Ханайченко А.Н. Изменчивость размерных характеристик и выживаемости науплиусов крымских артемий *Artemia* spp. (Branchiopoda: Anostraca) при питании микроводорослями разных видов // Морской биологический журнал. 2019. Т. 4, № 1. С. 91–99. doi: 10.21072/mbj.2019.04.1.08.
- Emmerson W.D. Predation and energetics of *Penaeus indicus* (Decapoda: Penaeidae) larvae feeding on *Brachionus plicatilis* and *Artemia* nauplii // Aquaculture. 1984. Vol. 38, no. 3. Pp. 201–209. doi: 10.1016/0044-8486(84)90144-3.
- Manual on the production and use of live food for aquaculture / P. Lavens, P. Sorgeloos (Eds.) // FAO Fisheries Technical Paper. 1996. No. 361. 295 p.
- Merchie G. Use of nauplii and meta-nauplii // Manual on the production and use of live food for aquaculture / P. Lavens, P. Sorgeloos (Eds.). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations Publ., 1966. Pp. 137–163.
- Van Stappen G. Use of cysts // Manual on the production and use of live food for aquaculture / P. Lavens, P. Sorgeloos (Eds.). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations Publ., 1966. Pp. 107–136.
- Kuebutornye F.K.A., Abarike E.D., Lu Y. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture // Fish & Shellfish Immunology. 2019. Vol. 87. Pp. 820–828. doi: 10.1016/j.fsi.2019.02.010.
- Абросимова Н.А., Абросимова К.С., Абросимова Е.Б., Морозова М.А. Кормовое сырье и биологически активные добавки для рыбных объектов аквакультуры: учеб. пособие. СПб: Лань, 2019. 151 с.
- Kuebutornye F.K.A., Abarike E.D., Lu Y., Hlordzi V., Sakyi M.E., Afriyie G., Wang Z., Li Y., Xie C.X. Mechanisms and the role of probiotic *Bacillus* in mitigating fish pathogens in aquaculture // Fish Physiology and Biochemistry. 2020. Vol. 46, no. 3. Pp. 819–841. doi: 10.1007/s10695-019-00754-y.
- Daniels C.L., Merrifield D.L., Ringø E., Davies S.J. Probiotic, prebiotic and synbiotic applications for the improvement of larval European lobster (*Homarus gammarus*) culture // Aquaculture. 2013. Vol. 416. Pp. 396–406. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.08.001.
- Gatesoupe F.-J. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus* // Aquatic Living Resources. 1997. Vol. 10, no. 4. Pp. 239–246. doi: 10.1051/alr:1997026.
- Sun Y.-Z., Yang H.-L., Huang K.-P., Ye J.-D., Zhang C.-X. Application of autochthonous *Bacillus* bioencapsulated in copepod to grouper *Epinephelus coioides* larvae // Aquaculture. 2013. Vol. 392. Pp. 44–50. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.01.037.
- Van Hai N., Buller N., Fotedar R. Encapsulation capacity of *Artemia* nauplii with customized probiotics for use in the cultivation of western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896) // Aquaculture Research. 2010. Vol. 41, no. 6. Pp. 893–903. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02370.x.
- Oliveira F.C., Kasai R.Y.D., Fernandes C.E., da Silva W.S., de Campos C.M. Probiotic, prebiotic and synbiotics supplementation on growth performance and intestinal histomorphometry *Pseudoplatystoma reticulatum* larvae // Journal of Applied Aquaculture. 2022. Vol. 34, no. 2. Pp. 279–293. doi: 10.1080/10454438.2020.1841060.
- Kamble S.P., Sahu A.K., Mohanty S., Sahoo S.K., Murmu K., Chandra P., Chadha N.K. Feeding *Artemia* nauplii enriched with the probiotic bacterium *Bacillus subtilis* improved growth performance, survival and digestive enzyme activity of *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758) larvae // Indian Journal of Fisheries. 2019. Vol. 66, no. 2. Pp. 136–141. doi: 10.21077/ijf.2019.66.2.75241-19.
- Hire J.K., Wasave S.S., Pai R., Meshram S.J., Ghode G.S., Sawant S.S., Wasave S.M. Effect of probiotic, *Bacillus* spp. enriched artemia on growth of gold fish, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) larvae // Journal of Experimental Zoology, India. 2020. Vol. 23, suppl. 1. Pp. 741–745.
- Azrin N.A.R., Yuzine E., Ina-Salwany M.Y., Murni K. The efficacy of potential probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* strain L11 in protecting *Artemia* nauplii and blue crab juveniles against *Vibrio harveyi* infection // Journal of Pure and Applied Microbiology. 2019. Vol. 13, no. 2. Pp. 923–932. doi: 10.22207/JRAM.13.2.29.
- Чистяков В.А., Пепоян А., Миралимова Ш. Выделение штаммов — антагонистов патогенных аэромонад из природных популяций рыб и донных отложений // Евразийский союз ученых. Серия: медицинские, биологические и химические науки. 2021. Т. 1, № 12 (93). С. 34–38. doi: 10.31618/ESU.2413-9335.2021.4.93.1571.
- Microbiology: A laboratory manual / J.G. Cappuccino, N. Sherman (Eds.). Boston: Pearson Education, 2014. 560 p.
- Mazanko M.S., Popov I.V., Prazdnova E.V., Refeld A.G., Bren A.B., Zelenkova G.A., Chistyakov V.A., Algburi A., Weeks R.M., Ermakov A.M., Chikindas M.L. Beneficial effects of spore-forming *Bacillus* probiotic bacteria isolated from poultry microbiota on broilers' health, growth performance, and immune system // Frontiers in Veterinary Science. 2022. Vol. 9. e877360. doi: 10.3389/fvets.2022.877360.
- Prazdnova E.V., Mazanko M.S., Chistyakov V.A., Denisenko Y.V., Makarenko M.S., Usatov A.V., Bren A.B., Tutelyan A.V., Komarova Z.B., Gorlov I.F., Weeks R., Chikindas M.L. Effect of *Bacillus subtilis*

KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 on the productivity, reproductive aging, and physiological characteristics of hens and roosters // Beneficial Microbes. 2019. Vol. 10, no. 4. Pp. 395–412. doi: 10.3389/fvets.2022.877360.

## REFERENCES

- Smirnov D.Yu., Aganesova L.O., Khanaychenko A.N. Izmenchivost' razmernykh kharakteristik i vyzhivayemosti naupliusov krymskikh artemiy *Artemia* spp. (Branchiopoda: Anostraca) pri pitanii mikrovodoroslyami raznykh vidov [Variability of size characteristics and survival of the nauplii of Crimean brine shrimp *Artemia* spp. (Branchiopoda: Anostraca) feeding on different species of microalgae]. *Morskoy biologicheskiy zhurnal [Marine Biological Journal]*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 91–99. doi: 10.21072/mbj.2019.04.1.08. (In Russian).
- Emmerson W.D. Predation and energetics of *Penaeus indicus* (Decapoda: Penaeidae) larvae feeding on *Brachionus plicatilis* and *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, 1984, vol. 38, no. 3, pp. 201–209. doi: 10.1016/0044-8486(84)90144-3.
- Manual on the production and use of live food for aquaculture. P. Lavens, P. Sorgeloos (Eds.). *FAO Fisheries Technical Paper*, 1996, no. 361, 295 p.
- Merchie G. Use of nauplii and meta-nauplii. In: *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. P. Lavens, P. Sorgeloos (Eds.). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations Publ., 1966, pp. 137–163.
- Van Stappen G. Use of cysts. In: *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. P. Lavens, P. Sorgeloos (Eds.). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations Publ., 1966, pp. 107–136.
- Kuebutornye F.K.A., Abarike E.D., Lu Y. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, vol. 87, pp. 820–828. doi: 10.1016/j.fsi.2019.02.010.
- Abrosimova N.A., Abrosimova K.S., Abrosimova E.B., Morozova M.A. Kormovoe syr'e i biologicheski aktivnye dobavki dlya rybnnykh ob'ektov akvakul'tury : uchebnoe posobie [Fish food sources and biological additives for the fish species cultivated in aquaculture. Study guide]. Saint Petersburg: Lan' [Doe], 2019, 151 p. (In Russian).
- Kuebutornye F.K.A., Abarike E.D., Lu Y., Hlordzi V., Sakyi M.E., Afriyie G., Wang Z., Li Y., Xie C.X. Mechanisms and the role of probiotic *Bacillus* in mitigating fish pathogens in aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020, vol. 46, no. 3, pp. 819–841. doi: 10.1007/s10695-019-00754-y.
- Daniels C.L., Merrifield D.L., Ringø E., Davies S.J. Probiotic, prebiotic and synbiotic applications for the improvement of larval European lobster (*Homarus gammarus*) culture. *Aquaculture*, 2013, vol. 416, pp. 396–406. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.08.001.
- Gatesoupe F.-J. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources*, 1997, vol. 10, no. 4, pp. 239–246. doi: 10.1051/alr:1997026.
- Sun Y.-Z., Yang H.-L., Huang K.-P., Ye J.-D., Zhang C.-X. Application of autochthonous *Bacillus* bioencapsulated in copepod to grouper *Epinephelus coioides* larvae. *Aquaculture*, 2013, vol. 392, pp. 44–50. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.01.037.
- Van Hai N., Buller N., Fotedar R. Encapsulation capacity of *Artemia* nauplii with customized probiotics for use in the cultivation of western king prawns (*Penaeus latissulcatus* Kishinouye, 1896). *Aquaculture Research*, 2010, vol. 41, no. 6, pp. 893–903. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02370.x.
- Oliveira F.C., Kasai R.Y.D., Fernandes C.E., da Silva W.S., de Campos C.M. Probiotic, prebiotic and synbiotics supplementation on growth performance and intestinal histomorphometry *Pseudoplatystoma reticulatum* larvae. *Journal of Applied Aquaculture*, 2022, vol. 34, no. 2, pp. 279–293. doi: 10.1080/10454438.2020.1841060.
- Kamble S.P., Sahu A.K., Mohanty S., Sahoo S.K., Murmu K., Chandra P., Chadha N.K. Feeding *Artemia* nauplii enriched with the probiotic bacterium *Bacillus subtilis* improved growth performance, survival and digestive enzyme activity of *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758) larvae. *Indian Journal of Fisheries*, 2019, vol. 66, no. 2, pp. 136–141. doi: 10.21077/ijf.2019.66.2.75241-19.
- Hire J.K., Wasave S.S., Pai R., Meshram S.J., Ghode G.S., Sawant S.S., Wasave S.M. Effect of probiotic, *Bacillus* spp. enriched artemia on growth of gold fish, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) larvae. *Journal of Experimental Zoology, India*, 2020, vol. 23, suppl. 1, pp. 741–745.
- Azrin N.A.R., Yuzine E., Ina-Salwany M.Y., Murni K. The efficacy of potential probiont *Bacillus amyloliquefaciens* strain L11 in protecting *Artemia* nauplii and blue crab juveniles against *Vibrio harveyi* infection. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2019, vol. 13, no. 2, pp. 923–932. doi: 10.22207/JPAM.13.2.29.
- Chistyakov V.A., Pepoyan A., Miralimova Sh. Vydelenie shtammov — antagonistov patogennykh aeromonad iz prirodnykh populyatsiy ryb i donnykh otlozheniy [Isolation of strains antagonistic to pathogenic aeromonads from natural populations of fish and bottom sediments]. *Evrasiyskiy soyuz uchenykh. Seriya: meditsinskie, biologicheskie i khimicheskie nauki [Eurasian Union of Scientists. Series: Medical, Biological and Chemical Sciences]*,

- 2021, Т. 1, no. 12 (93), pp. 34–38. doi: 10.31618/ESU.2413-9335.2021.4.93.1571. (In Russian).
18. Microbiology: A laboratory manual. J.G. Cappuccino, N. Sherman (Eds.). Boston: Pearson Education, 2014, 560 p.
19. Mazanko M.S., Popov I.V., Prazdnova E.V., Refeld A.G., Bren A.B., Zelenkova G.A., Chistyakov V.A., Algburi A., Weeks R.M., Ermakov A.M., Chikindas M.L. Beneficial effects of spore-forming *Bacillus* probiotic bacteria isolated from poultry microbiota on broilers' health, growth performance, and immune system. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, vol. 9, e877360. doi: 10.3389/fvets.2022.877360.
20. Prazdnova E.V., Mazanko M.S., Chistyakov V.A., Denisenko Y.V., Makarenko M.S., Usatov A.V., Bren A.B., Tutelyan A.V., Komarova Z.B., Gorlov I.F., Weeks R., Chikindas M.L. Effect of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 on the productivity, reproductive aging, and physiological characteristics of hens and roosters. *Beneficial Microbes*, 2019, vol. 10, no. 4, pp. 395–412. doi: 10.3389/fvets.2022.877360.

Поступила 30.09.2022

Принята к печати 12.02.2023