

УДК 639.2/3

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИКОВ В АКВАКУЛЬТУРЕ

© 2024 г. Н. И. Кочетков^{1, 2, *}, Д. Л. Никифоров-Никишин^{1, 2}, А. А. Климук^{1, 2},
С. В. Смородинская^{1, 2}, А. Л. Никифоров-Никишин^{1, 2}, М. В. Марсова^{2, **}, А. А. Ватлин²,
В. А. Климов¹

¹Факультет биотехнологий и рыбного хозяйства, Московский государственный университет технологий
и управления им. К.Г. Разумовского (ПКУ), Россия

²Лаборатория генетики микроорганизмов, Институт общей генетики
им. Н.И. Вавилова РАН, Россия

*e-mail: samatrixs@gmail.com

**masha_marsova@mail.ru

Поступила в редакцию 15.06.2024 г.

После доработки 22.07.2024 г.

Принята к публикации 22.07.2024 г.

Обобщены имеющиеся научные данные об исследованиях пробиотиков различного микробиологического состава на объектах аквакультуры, в которых приведены результаты воздействия пробиотиков на физиологическом, тканевом и клеточном уровнях, в том числе оцениваемые методами морфометрии. Систематизированы данные об объектах и методах исследования, наиболее часто используемых пробиотиках и их концентрациях. Установлено, что наиболее изученными объектами аквакультуры по применению пробиотиков являются *Oreochromis niloticus* (35.9%), *Oncorhynchus mykiss* (6.2%), *Cyprinus carpio* (4.6%). Эксперименты на этих видах, как правило, проводились в контролируемых условиях (бассейны, аквариумы, УЗВ), при этом продолжительность опытов варьировалась от 20 до 140 суток. Наиболее часто используемыми, в качестве пробиотиков, микроорганизмами являются бактерии родов *Bacillus* (41.6%) и *Lactobacillus* (24.3%), остальные 34.1% приходятся на другие микроорганизмы аллохтонного или автохтонного происхождения. В большинстве работ эффект от применения пробиотиков отмечали при концентрации от 1×10^6 до 1×10^9 КОЕ/г корма. Пробиотики демонстрируют различную эффективность, наиболее часто положительно влияя на рыбоводно-биологические показатели, активность пищеварительных ферментов, микробиом кишечника, экспрессию генов, ассоциированных с иммунитетом, а также сопротивляемость к патогенам. В большинстве случаев пробиотики не оказывают влияния на нутриентный состав ткани, гематологические, биохимические и иммунологические показатели. Среди гистоморфометрических методов при использовании пробиотиков наиболее часто исследуют показатели, характеризующие морфологию ворсинок, слоев/оболочек, составляющих кишечник, состав иммунокомпетентных клеток, микроворсинки, бокаловидные клетки. Реакцию на воздействие пробиотиков, чаще всего отмечали для высоты ворсинок, количества бокаловидных клеток, площади ворсинок, количества интраэпителиальных лимфоцитов, а также площади микроворсинок эпителиальных тканей кишечника. При этом большинство авторов указывают на необходимость использования системного подхода для изучения пробиотиков.

Ключевые слова: пробиотики, рыбное хозяйство, аквакультура, рыбоводно-биологические показатели, физиология, гистология

DOI: 10.31857/S0042132424050059 EDN: OGHJMV

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение потребительского спроса на рыбную продукцию определило распространение аквакультуры по всему миру (Troell et al., 2014; Sumon et al., 2022). На данный момент это один

из самых быстро развивающихся секторов сельского хозяйства, удовлетворяющий более 50% мирового спроса на рыбную продукцию (FAO, 2022). Для успешной интенсификации производства рыбы в промышленных условиях не-

обходимы поддержание надлежащего качества водной среды и полноценное удовлетворение пищевых потребностей объектов выращивания (Naylor et al., 2021). Однако при этом остается актуальной проблема подверженности рыб инфекционным заболеваниям, которые развиваются под воздействием различных стресс-факторов (высокая плотность посадки, низкое качество водной среды, неполноценные корма, нарушения технологий выращивания) и причиняют значительные финансовые потери (Ringø et al., 2016). В этом контексте разработка, создание и исследование новых кормовых рецептур, включающих различные функциональные компоненты, привлекают внимание исследователей. К таким компонентам можно отнести кормовые добавки, способные улучшать питательную ценность кормов и стимулировать иммунитет (Зуева, 2022). Среди них можно выделить антиоксиданты, витаминные и минеральные добавки в биодоступной форме, пигменты, аминокислоты, сорбенты и про/пребиотические препараты (Текебаева и др., 2020; Beltrán, Esteban, 2022).

Пробиотические микроорганизмы, согласно определению (Merrifield, 2010), представляют собой живую, мертвую микробную клетку или ее компонент, который при добавлении в корм и/или воду приносит пользу хозяину, улучшая состояние здоровья и устойчивость к заболеваниям, а также показатели роста и устойчивость к стрессовому воздействию. Такой эффект частично достигается за счет улучшения баланса между окружающей средой, хозяином и собственными микробными сообществами (Nayak et al., 2010). При этом пробиотики действуют не только как стимуляторы роста или профилактические препараты, но так же как иммуномодулирующие агенты (Hill et al., 2014; Sumon et al., 2022).

Рост коммерческого интереса к пробиотическим препаратам в аквакультуре отражает увеличение числа публикаций по данной тематике. И хотя активно ведется поиск эффективных микроорганизмов, тем не менее по-прежнему отсутствует целостное представление о механизмах их действия на организм рыбы (La Fata et al., 2018). По этим причинам все еще остается актуальным вопрос об установлении эффективных критериев оценки кандидатов в пробиотики. Первоначально, микроорганизмы, потенциально обладающие пробиотическими свойствами, оценивают *in vitro* (например, антагонизм к патогенам, синтез антиоксидантов, бактериостатиков). Следующим важным этапом является их изучение при применении в условиях выращивания объектов аквакультуры (Wanka et al., 2018).

В значительной части публикаций внимание акцентируется на влиянии пробиотиков на ры-

боводно-биологические показатели. В последние годы исследователи уделяют значительное внимание воздействию пробиотиков на различные физиологические параметры. Некоторые авторы фокусируются на изменениях микробного сообщества кишечника и других слизистых оболочек рыб (Standen et al., 2016; Xia et al., 2018; Yükghehnaish et al., 2020). Подобные исследования проводятся как с использованием методов микробиологического посева со слизистой рыб (культуризависимые методы), так и с применением молекулярно-биологических техник (культуриnezависимые подходы) (Castañeda-Monsalve et al., 2019; Nikiforov-Nikishin et al., 2022b). Комплексная взаимосвязь между пробиотиками, микробиомом и организмом хозяина, продемонстрированная в ряде публикаций, представляется одним из ключевых механизмов, благодаря которым пробиотики оказывают свой эффект (Llewellyn et al., 2014; Yükghehnaish et al., 2020). Непосредственное влияние пробиотиков на метаболизм и адсорбцию питательных веществ проявляется в изменениях различных биохимических показателей, например, активности пищеварительных ферментов (карбоксилазы, липазы, протеазы), что также было продемонстрировано в ряде работ (Wuertz et al., 2021; Assan et al., 2022; Haraz et al., 2023). Иммуномодулирующий эффект пробиотиков лежит в основе улучшения устойчивости к патогенам, определяется по клеточному составу крови и иммунологическим показателям, таким как титр антител и фагоцитарная активность (Nayak et al., 2010; Pirarat et al., 2011; Han et al., 2015). Большая часть пробиотических организмов потенциально способна влиять на окислительный баланс организма, что можно отследить по активности антиоксидантных ферментов и белков (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатион).

Несмотря на то что применение пробиотиков в сельском хозяйстве и аквакультуре широко распространено, а положительные эффекты их применения на рыбе доказаны многочисленными публикациями, существуют определенные расхождения в результатах, которые варьируют в зависимости от микробиологического состава пробиотического препарата, его дозировки и наличия видоспецифичных взаимодействий штамма микроорганизма и организма-хозяина (Shefat et al., 2018; Sumon et al., 2022; Ntakirutimana et al., 2023).

Гистологические показатели являются важным критерием в оценке кормовых добавок, так как могут предоставить данные о влиянии испытуемых компонентов на пищеварение и метаболизм. Применение гистологических методов при изучении кормов и кормовых добавок выражается в оценке ряда качественных морфоло-

гических показателей ткани, отражающих частное действие пробиотика и не дающих полного представления о его эффективности (Buddington et al., 1997). При этом в гистологической практике распространен способ оценки морфологических изменений ткани с помощью балльной (полуколичественной) модели (Bernet et al., 1999) либо с помощью морфометрических измерений (количественно) (Oropesa et al., 2013; Lai et al., 2014; Namidian et al., 2017). Второй способ оценки представляется более объективным, так как дает возможность применить к полученным данным статистические методы обработки, а также сравнить полученные результаты с другими авторами. Морфометрия или стереометрия в гистологии представляет собой метод измерения различных тканевых и клеточных структур (Elias, Hyde, 1980). Гистоморфометрия нашла широкое применение в гистопатологии, где сравнение различных размерных характеристик гистологических структур позволяет судить о степени выраженности и распространенности патологии и более точно ее классифицировать (viz. атрофия, гипотрофия). Подробности применения морфометрии в ихтиопатологии, водной токсикологии и экотоксикологии отражено в разных публикациях (Rašković et al., 2016; Barišić et al., 2018).

Ткань и клеточная структура организма обладают инертностью, т.е. способностью сохранять свои функциональные свойства при воздействии внешних факторов за счет изменения физиологических и морфологических характеристик (Гистопатология ..., 2023). Для сохранения гомеостаза происходит адаптация организма, проявляющаяся на разных уровнях организации живого. На тканевом и клеточном уровнях подобные трансформации могут выражаться в частоте встречаемости, изменении размеров и площади отдельных тканевых и клеточных структур, в том числе морфологии ткани. Факторами, приводящими к изменению гистоморфологии, могут являться не только различные поллютанты или инфекционные заболевания, но и экологические факторы, в частности, питание и нутриентный состав диеты. Данный факт нашел свое отражение в применении морфометрии в более ранних публикациях, например, при исследовании активности пищеварения личинок рыб (Theilacker, 1978; Martin, Malloy, 1980), оценке развития мышечной ткани по мере взросления (Kryvi, Eide, 1977) и влияния недостатка микроэлементов на состояние скелетной ткани (Takagi, Yamada, 1991). В настоящий момент использование морфометрических практик значительно упростилось за счет повсеместного использования камер в микроскопах с высоким разрешением, а также специализированного программного

обеспечения, значительно облегчающего и стандартизирующего процесс измерения тканевых структур. Все это определило высокую частоту применения гистоморфометрических методов в современных исследованиях кормов и кормовых добавок в аквакультуре.

По этим причинам обзор публикаций по теме исследования пробиотических препаратов в аквакультуре, использующих в качестве одного из методов оценки морфометрические измерения ткани, представляется актуальным. Рассмотрение и анализ результатов подобных публикаций позволят установить возможную связь между различными рыбоводно-биологическими, физиологическими и гистологическими показателями желудочно-кишечного тракта, а также выявить наиболее показательные гистологические структуры, чувствительные к применению в кормах пробиотиков.

В исследованиях на рыбах с применением пробиотиков, как правило, приводятся комплексные результаты, помимо гистоморфометрии, включающие различные физиологические, микробиологические, гидрохимические и другие параметры (табл. 1). Однако особый интерес представляют исследования, включающие совместное использование физиологических и гистоморфометрических методов для оценки влияния пробиотиков на гидробионты.

АНАЛИЗ ПУБЛИКАЦИЙ (2011–2023 гг.) ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБИОТИКОВ В АКВАКУЛЬТУРЕ

Результаты анализа публикаций в международных рецензируемых журналах, в которых проводилось изучение действия пробиотиков на объекты аквакультуры с совместным использованием физиологических и гистоморфометрических методов исследования, приведены в табл. 2.

Первое исследование за рассматриваемый промежуток времени было опубликовано в 2011 г. (Pirarat et al., 2011) и было посвящено действию *Lactobacillus rhamnosus* GG на ряд физиологических и гистологических параметров *Oreochromis niloticus*. Всего за период с 2011 по 2015 г. было опубликовано 7 исследований (6.25%). В свою очередь, в период с 2015 по 2019 г. было опубликовано уже 19 работ (29.6%). Так, рост в количестве публикаций за данный период составил 272% относительно предыдущего (рис. 16). Всего на конец 2019 г. было опубликовано 23 работы. За последний период (2019–2024 гг.) вышло 41 исследование, что составляет 64% от общего числа отобранных для обзора публикаций. Количество статей в данный период по сравнению с предыдущим увеличилось на 213%. Таким образом, можно

Таблица 1. Категории методов и соответствующие им параметры, оцениваемые в работах

Категория	Параметр
Рыбоводно-биологические показатели	Начальная, конечная масса; относительная, абсолютная скорость роста; выживаемость; кормовой коэффициент/конверсия корма и др.
Антиоксидантные ферменты	Относительное и абсолютное количество ферментов, например: лизоцим, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза
Нутриентный состав ткани	Состав мышечной, скелетной ткани и всего тела по показателям влажности, общего жира, сырого протеина, золы
Пищеварительные ферменты	Пепсин, трипсин, липазы, сахаразы и др.
Микробиом кишечника	Микробное сообщество кишечника, оцениваемое с использованием секвенирования 16S rPHK и NGS
Сопrotивляемость патогенам	Устойчивость организма к действию различных патогенов, например, по показателям выживаемости
Гематологические показатели	Количество красных и белых клеток крови, гемоглобин, относительное число лейкоцитов и другие сопутствующие показатели
Биохимические показатели	Билирубин, аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, мочеви́на, креатинин, белок общий, альбумин и другие сопутствующие показатели
Экспрессия генов, связанных с иммунитетом	Экспрессия цитокинов (например, IL-1a, IL-6, IL-8), хемокинов и факторов воспаления
Иммунологические показатели	Фагоцитарная активность, количество иммуноглобулинов и белков комплемента (C3, C4)
Культивируемый микробиом	Микробное сообщество кишечника, оцениваемое методами прямого посева
Качество воды	Гидрохимические показатели (растворенный кислород, pH, соединения азотистого ряда и т. д.)
Показатели пищеварения	Перевариваемость белков, жиров, углеводов
Содержание жирных кислот	Жирнокислотный состав ткани и содержимого кишечника

видеть значительный рост интереса исследователей к применению и изучению пробиотических препаратов на объектах аквакультуры, в том числе с использованием гистоморфометрических методов. При этом наиболее значительный рост числа публикаций наблюдается, начиная с 2019 г.

Распределение публикаций по странам носило следующий характер (рис. 1a): наибольшее число статей было опубликовано исследователями из Китайской Народной Республики ($n = 12$), далее идут исследования из Египта ($n = 9$), на третьем месте с равным количеством исследований сле-

дуют Бангладеш и Португалия ($n = 6$). Меньшее количество работ было опубликовано в Иране ($n = 5$) и Великобритании ($n = 4$). Количество статей из других стран не превышало двух. Примечательно, что на этом фоне увеличение публикационной активности в КНР и Египте наблюдается и по другим отраслям биологии, в частности токсикологии, экологии и молекулярной биологии (Canedo et al., 2021). К тому же КНР находится на первом месте по объемам выращиваемой рыбной продукции (Wang et al., 2020). Египет является региональным лидером в аквакультурной отрасли в Африке и одним из ведущих в

Таблица 2. Влияние пробиотических препаратов на различные физиологические и гистологические показатели выращиваемых видов рыб

Пробиотические штаммы	Доза, КОЕ/г (мл)	Период, сут	Вид рыб	Эффект/результат в сравнении с контролем	Эффект на гистологические показатели	Источник
BIOguil™: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> и <i>Pediococcus acidilactici</i>	1×10^{10}	56	<i>Acipenser baerii</i>	↑ Рыбоводно-биологические показатели, количественный состав ткани, показатели пищеварения, иммунологические показатели; ↔ биохимические показатели, гематологические показатели	↑ КМК, ВШК, ТМС, ВЭК; ↔ ТСМ	Shekarabi et al., 2022
<i>Clostridium butyricum</i>	0.75×10^8 , 1.5×10^8 , 3×10^8 , 6×10^8 и 2×10^9	56	<i>Oreochromis niloticus</i> × <i>O. aureus</i>	↑ Рыбоводно-биологические показатели, сопротивляемость <i>Aeromonas hydrophila</i> , активность ферментов, микробиом кишечника, показатели пищеварения, культивируемый микробиом; ↔ количественный состав ткани, биохимические показатели, гематологические показатели	↑ ВВ; ↔ ШВ, ТМС	Pool-sawat et al., 2020
(А) <i>Bacillus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp. и <i>Lactobacillus</i> sp.; (В) <i>Pediococcus acidilactici</i>	(А) 8.6×10^5 и 1.6×10^6 ; (В) 2.6×10^4 и 7.2×10^4	56	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	↔ Рыбоводно-биологические показатели, активность ферментов, количественный состав ткани; ↑ показатели пищеварения	↔ ВВ, КМК, ПМК; ↑ КВ	Ramos et al., 2015
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 и 1×10^9	84	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	↑ Рыбоводно-биологические показатели, пищеварительные ферменты, показатели пищеварения (переваримость липидов), культивируемая микробиота; ↔ количественный состав ткани	↑ ВВ; ↔ ШВ, ГК	Akter et al., 2019
<i>Bacillus subtilis</i> WB60 и <i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3928	1×10^6 , 1×10^7 и 1×10^8	56	<i>Anguilla japonica</i>	↑ Рыбоводно-биологические показатели, активность ферментов, сопротивляемость <i>Vibrio anguillarum</i> , экспрессия иммунных генов	↑ ВВ; ↔ ТМС	Lee et al., 2017
<i>Bacillus subtilis</i> WB60 и <i>Lactococcus lactis</i>	1×10^7 и 1×10^9	56	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологические показатели, активность ферментов, экспрессия про/антивоспалительных генов, сопротивляемость <i>Aeromonas hydrophila</i> ; ↔ биохимические показатели	↑ ВВ, ТМС	Won et al., 2016

Таблица 2. Продолжение

Пробиоти- ческие штаммы	Доза, КОЕ/г (мл)	Пе- риод, сут	Вид рыб	Эффект/результат в сравнении с контролем	Эффект на гистоло- гические показатели	Источ- ник
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1×10^2 , 1×10^4 и 1×10^6	56	<i>Cyprinus carpio</i>	↑ Рыбоводно-биоло- гические показатели, активность ферментов, экспрессия про/антивоспа- лительных генов	↑ ВВ, ШВ, ГК, ПВ	Adeshina et al., 2020
<i>Pediococcus acidilactici</i> MA18/5M	3.03×10^6	63	<i>Salmo salar</i>	↔ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, микро- биом кишечника; ↑ экспрессия про/антивос- палительных генов, актив- ность ферментов	↑ ВВ, КИЛ; ↔ КМК	Abid et al., 2013
<i>Acetobacter</i> spp., <i>Lacto- bacillus</i> spp. и <i>Pseudomonas</i> spp.	5×10^9	60	<i>Scophthalmus maximus</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, количе- ственный состав ткани, пищеварительные фермен- ты, активность ферментов; ↔ микробиом кишечника	↑ ВВ, ШВ, КМК	Li et al., 2019
AlCar®: <i>Bacil- lus licheniformis</i>	2×10^6 , 4×10^6 , 8×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7	70	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биоло- гические показатели, активность ферментов, иммунологические пока- затели, сопротивляемость <i>Streptococcus iniae</i>	↔ ВВ, ТМС	Han et al., 2015
<i>Bacillus amy- loliquefaciens</i> BN06, <i>Bacillus subtilis</i> WN07 и <i>Bacillus megate- rium</i> CT03	1×10^6 и 1×10^9	45	<i>Labeo rohita</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, гемато- логические показатели, пищеварительные фер- менты, активность фер- ментов, сопротивляемость <i>Aeromonas hydrophila</i>	↑ ВВ; ↔ ТМС	Sarava- nan et al., 2021
<i>Bacillus coag- ulans</i> ATCC 7050, <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 11946, и <i>Paenibacil- lus polymyxa</i> ATCC 842	1×10^9	56	<i>Sillago sihama</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, количе- ственный состав ткани, активность ферментов, биохимические показатели, микробиом кишечника, сопротивляемость <i>Vibrio harveyi</i> ; ↔ пищеварительные фер- менты	↑ ВВ, ШВ, ТМС	Amoah et al., 2021
Bactocell®: <i>Pediococcus aci- dilactici</i> CNCM I-4622	3×10^7 , 2.5×10^7 и 2×10^7	56	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, гемато- логические показатели, пищеварительные фермен- ты, активность ферментов, биохимические показатели количественный состав ткани, сопротивляемость <i>Aspergillus flavus</i> ; ↔ качество воды	↑ ВВ, ПВГ	Eissa et al., 2023

Таблица 2. Продолжение

Пробиоти- ческие штаммы	Доза, КОЕ/г (мл)	Пе- риод, сут	Вид рыб	Эффект/результат в сравнении с контролем	Эффект на гистоло- гические показатели	Источ- ник
<i>Enterococcus faecium</i> и <i>Bacillus subtilis</i>	6×10^{12}	45	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологические показатели, сопротивляемость <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; гематологические параметры, активность ферментов, пищеварительные ферменты;	↑ ВВ, КИЛ; ↓ ТМС	Ismail et al., 2019
AlCar®: <i>Bacillus licheniformis</i>	2×10^6 , 4×10^6 , 8×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7	70	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологические показатели, активность ферментов, иммунологические показатели, сопротивляемость <i>Streptococcus iniae</i>	↔ ВВ, ТМС	Han et al., 2015
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BN06, <i>Bacillus subtilis</i> WN07 и <i>Bacillus megaterium</i> CT03	1×10^6 и 1×10^9	45	<i>Labeo rohita</i>	↑ Рыбоводно-биологические показатели, гематологические показатели, пищеварительные ферменты, активность ферментов, сопротивляемость <i>Aeromonas hydrophila</i>	↑ ВВ; ↔ ТМС	Saravanan et al., 2021
<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050, <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 11946, и <i>Paenibacillus polymyxa</i> ATCC 842	1×10^9	56	<i>Sillago sihama</i>	↑ Рыбоводно-биологические показатели, количественный состав ткани, активность ферментов, биохимические показатели, микробиом кишечника, сопротивляемость <i>Vibrio harveyi</i> ; ↔ пищеварительные ферменты	↑ ВВ, ШВ, ТМС	Amoah et al., 2021
Bactocell®: <i>Pediococcus acidilactici</i> CNCM I-4622	3×10^7 , 2.5×10^7 и 2×10^7	56	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологические показатели, гематологические показатели, пищеварительные ферменты, активность ферментов, биохимические показатели количественный состав ткани, сопротивляемость <i>Aspergillus flavus</i> ; ↔ качество воды	↑ ВВ, ПВГ	Eissa et al., 2023
<i>Enterococcus faecium</i> и <i>Bacillus subtilis</i>	6×10^{12}	45	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологические показатели, сопротивляемость <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; гематологические параметры, активность ферментов, пищеварительные ферменты;	↑ ВВ, КИЛ; ↓ ТМС	Ismail et al., 2019

Таблица 2. Продолжение

Пробиоти- ческие штаммы	Доза, КОЕ/г (мл)	Пе- риод, сут	Вид рыб	Эффект/результат в сравнении с контролем	Эффект на гистоло- гические показатели	Источ- ник
AquaStar® Growout <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp. и <i>Enterococcus</i> sp.; Levabon® Aquagrow — Biomim®: <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	1.34×10^7 , нет данных	73	<i>Solea</i> <i>senegalensis</i>	↑ Активность ферментов, микробиом кишечника; ↔ рыбоводно-биологиче- ские показатели	↑ ПВ, ВВ; ↔ ТМС, ШВ, КМК	Batista et al., 2016
<i>Bacillus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp. и <i>Lactobacillus</i> sp.	Нет данных	72	<i>Solea</i> <i>senegalensis</i>	↑ Гематологические пока- затели, активность фермен- тов; ↔ рыбоводно-биоло- гические показатели, им- мунологические пока- затели, сопротивляемость <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	↑ ПВ; ↔ ШВ, КЭГ, ВВ	Barroso et al., 2016
<i>Bacillus sub- tilis</i> , <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> и <i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i>	2×10^{11}	42	<i>Oreochromis</i> <i>mossambicus</i>	↔ Рыбоводно-биологиче- ские показатели; ↑ пищеварительные фер- менты, биохимические показатели, активность ферментов, сопротивляе- мость <i>Streptococcus agalactiae</i>	↑ ВВ, ТМС; ↔ ШВ	Liu et al., 2021
Sanolife PRO-F®: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheni- formis</i> и <i>Bacillus pumilus</i>	1×10^{10}	49	<i>Oreochromis</i> <i>niloticus</i>	↑ Активность ферментов; ↔ рыбоводно-биологи- ческие показатели, гема- тологические показатели, микробиом кишечника	↑ КМК, ПМВ, ДМВ; ↔ ПВ, КИЛ, ВМВ, ВШК	Adeoye et al., 2016
<i>Bacillus amy- loliquefaciens</i> TPS17, <i>Bacil- lus velezensis</i> TPS3N и <i>Bacillus subtilis</i> TPS4	1×10^8	28	<i>Oreochromis</i> <i>niloticus</i>	↑ Иммунологические по- казатели (муцин слизистых кишечника, кожи), актив- ность ферментов (слизи- стые кишечника, кожи), пищеварительные фер- менты, сопротивляемость <i>Aeromonas hydrophila</i> ; ↔ микробиом кишечника	↑ ВВ, КМК, ШВ, ТМС	Kuebu- tornye et al., 2020
Sanolife PRO-F®: <i>Bacillus sub- tilis</i> , <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> и <i>Bacillus pumilus</i>	3.25×10^9 и 3.5×10^9	28	<i>Oreochromis</i> <i>niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, пищева- рительные ферменты; ↔ биохимические пока- затели, экспрессия про/ противовоспалительных генов, активность ферментов	↑ ВВ, ШВ, ВЭК, КМК	El-Son et al., 2022

Таблица 2. Продолжение

Пробиоти- ческие штаммы	Доза, КОЕ/г (мл)	Пе- риод, сут	Вид рыб	Эффект/результат в сравнении с контролем	Эффект на гистоло- гические показатели	Источ- ник
<i>Bacillus velezensis</i> , <i>Bacillus cereus</i> и <i>Lactobacillus casei</i>	0.1×10^6 / 0.26×10^6 , 5×10^6 / 1.26×10^6 , 1×10^7 / 2.52×10^6 , 2×10^7 / 5.04×10^6 и 3×10^7 / 7.56×10^6	60	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	↑ Рыбоводно-биологические показатели, сопротивляемость <i>Aeromonas hydrophila</i> ; ↔ количественный состав ткани, биохимические показатели, активность ферментов	↑ ВВ, КМК; ↔ ТМС	Chen et al., 2020
(А) <i>Bacillus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp. и <i>Lactobacillus</i> sp.; (В) <i>Pediococcus acidilactici</i>	(А) 1×10^6 и 4.6×10^6 (В) 3.5×10^5 и 3.5×10^5	30	<i>Solea senegalensis</i>	↔ Рыбоводно-биологические показатели, активность ферментов, количественный состав ткани	↑ ТМС; ↔ КМК, ВВ	Batista et al., 2015
AquaStar® Growout: <i>Bacillus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp.	1×10^6 и 2.3×10^6	56	<i>Oreochromis niloticus</i>	↔ Рыбоводно-биологические показатели, биохимические показатели, гематологические показатели, активность ферментов; ↑ Пищеварительные ферменты	↔ ТСМ, ПСМ; ↑ ВВ, КМК	Ramos et al., 2017
PAS-TRR™: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereustoyoi</i>	6×10^3 , 1.5×10^6	140	<i>Oncorhynchus mykiss</i> и <i>Salmo trutta</i>	↔ Рыбоводно-биологические показатели, активность ферментов, количественный состав ткани, иммунологические показатели	↑ КИЛ; ↓ КВ; ↔ КМК, ТМС, ВВ	Ramos et al., 2016
GroBiotic® и Aquablend®: <i>Bacillus</i> sp.	Нет данных, 1.1×10^7	110	<i>Tototaba macdonaldi</i>	↔ Рыбоводно-биологические показатели, активность ферментов, микробиом кишечника, количественный состав ткани	↑ ВВ; ↔ ШВ, ВЭК, ВШК	González-Félix et al., 2018
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CECT 5940	1×10^9	60	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологические показатели, экспрессия про/противовоспалительных генов; ↔ биохимические показатели	↑ ПВ; ↔ ВВ, КМК	Al-Deriny et al., 2020
<i>Bacillus licheniformis</i>	1×10^6 , 1×10^7 и 1×10^8	60	<i>Cyprinus carpio</i>	↑ Рыбоводно-биологические показатели, микробиом кишечника, экспрессия про/противовоспалительных генов	↑ ВВ	Zhang et al., 2021
<i>Bacillus mojavensis</i> B191 и <i>Bacillus subtilis</i> MRS11	1×10^6 и 1×10^8	60	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологические показатели, про/противовоспалительных генов, сопротивляемость <i>Streptococcus iniae</i>	↑ ВВ, КМК, ВМВ, ПМВ	Büyükdeveci et al., 2023

Таблица 2. Продолжение

Пробиоти- ческие штаммы	Доза, КОЕ/г (мл)	Пе- риод, сут	Вид рыб	Эффект/результат в сравнении с контролем	Эффект на гистоло- гические показатели	Источ- ник
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM1136 и <i>Lactococcus lactis</i> JCM5805	0.5×10^8 и 1×10^8	42	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биоло- гические показатели, экспрессия иммунных генов, сопротивляемость <i>Streptococcus agalactiae</i> , микробиом кишечника	↑ ПМВ, ВМВ	Xia et al., 2018
AquaStar® Growout: <i>Lac- tobacillus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp. и <i>Enterococcus</i> sp.	1.34×10^7 и 2.64×10^7	56	<i>Oreochromis niloticus</i>	↔ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, количе- ственный состав ткани; ↑ экспрессия про/антиво- спалительных генов, микробиом кишечника (в том числе культивируе- мый)	↑ ШВ, КМК, КИЛ	Standen et al., 2016
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	1×10^7	60	<i>Oreochromis niloticus</i>	↔ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, фагоци- тарная активность; ↑ экспрессия про/антиво- спалительных генов, имму- нологические показатели	↑ ВВ, КИЛ, КЭГ, КМК	Pirarat et al., 2011
<i>Lactococcus lactis</i>	2×10^9 и 5×10^9	98	<i>Sparus aurata</i>	↔ Рыбоводно-биологиче- ские показатели; ↑ экспрессия иммунных генов, микробиом кишеч- ника	↑ ВВ; ↔ ШВ, КСВ, ШСО	Moroni et al., 2021
<i>Bacillus</i> sp. SJ-10 и <i>Lactobacillus plantarum</i>	1×10^8	56	<i>Paralichthys olivaceus</i>	↑ Микробиом кишеч- ника, пищеварительные ферменты, экспрессия про/антиво-спалительных генов, сопротивляемость <i>Streptococcus iniae</i>	↔ ВВ, ВМВ	Jang et al., 2019
<i>Bacillus amylo- liquefaciens</i>	1×10^4 и 1×10^6	60	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, гематоло- гические показатели; ↔ количественный состав ткани	↑ КМК, КИЛ, ВВ	Reda, Selim, 2015
<i>Bacillus cereus</i>	1×10^7 , 1×10^9 и 1×10^{11}	70	<i>Carassius auratus</i> var. <i>pengze</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, качество филе, биохимические показатели крови, пищева- рительные ферменты	↑ ВВ; ↓ ВЭК; ↔ ВМВ	Yang et al., 2019
<i>Bacillus cereus</i> NY5 и <i>Bacillus subtilis</i>	1×10^8	42	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, сопро- тивляемость <i>Streptococcus agalactiae</i> , микробиом ки- шечника, экспрессия генов окислительных ферментов	↑ ПМВ, ВМВ	Xia et al., 2020
<i>Bacillus licheni- formis</i> , <i>Bacil- lus subtilis</i> и <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.6×10^{12}	60	<i>Acipenser persicus</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, пищева- рительные ферменты; ↔ количественный состав ткани	↑ ВВ, ШВ, КМК	Darafsh et al., 2020

Таблица 2. Продолжение

Пробиоти- ческие штаммы	Доза, КОЕ/г (мл)	Пе- риод, сут	Вид рыб	Эффект/результат в сравнении с контролем	Эффект на гистоло- гические показатели	Источ- ник
<i>Bacillus</i> spp. и <i>Lactobacillus</i> spp.	1×10^9 и 1×10^{11}	60	<i>Cirrhinus</i> <i>cirrhosus</i>	↑ Рыбоводно-биологи- ческие показатели, культиви- руемая микробиота; ↔ гематологические пока- затели	↑ ШВ, ВВ, ПВ, ТМС, ГК	Hossain et al., 2022
<i>Bacillus subtilis</i> B-2335	2.5×10^7 – 5×10^7	30	<i>Cyprinus</i> <i>carpio</i>	↔ Рыбоводно-биологи- ческие показатели	↑ ТМС; ↔ ВЭК, КМК, ПМК	Nikifor- ov-Ni- kishin et al., 2023
<i>Bacillus subtilis</i> B-2335, <i>B. subtilis</i> OZ-2 VKPM-11966 и <i>B. amylolique- faciens</i> OZ-3 VKPM-11967, <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> VKPM B-3235	12×10^7 ; 12×10^7 и 10×10^9 ; 20×10^7	30	<i>Oncorhynchus</i> <i>mykiss</i>	↑ Рыбоводно-биологи- ческие показатели	↑ ППВ, ВКГ, ПМК, ВЭК; ↔ ШСО; ↓ КИЛ, КМК	Nikifor- ov-Ni- kishin et al., 2022
<i>Bacillus subtilis</i> и <i>Bacillus toyoi</i>	4×10^8	63	<i>Oreochromis</i> <i>niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологи- ческие показатели	↑ ВЭК	Nakan- dakare et al., 2015
<i>Bacillus subtilis</i> и <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i>	1×10^7	98	<i>Oreochromis</i> <i>niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологи- ческие показатели, качество воды, пищеварительные ферменты, культивируемая микробиота	↑ ВВ, ШВ, КМК	Haraz et al., 2023
BioAqua®: <i>Pe- diococcus acid- ilactici</i> , <i>Entero- coccus faecium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Bifidobacte- rium bifidum</i> , <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	0.65×10^9 , 1.34×10^9 и 2.68×10^9	60	<i>Salmo trutta</i>	↑ Рыбоводно-биологи- ческие показатели, пищева- рительные ферменты	↑ ВВ, ВЭК; ↔ ШВ, ШСО, ТМС	Kalan- tarian et al., 2020
CAL- SPORIN®: <i>Bacillus subtilis</i> C-3102	8.4×10^6 , 1.7×10^7 , 3.3×10^7 и 3.5×10^7	20	<i>Pseudoplatysto- ma reticulatum</i> × <i>P. corruscans</i>	↑ Рыбоводно-биологи- ческие показатели, гемато- логические параметры, фагоцитарная актив- ность, сопротивляемость <i>Aeromonas hydrophila</i> , сопро- тивляемость гипоксии	↑ ВВ, ШВ, ВЭК	Nunes et al., 2020

Таблица 2. Продолжение

Пробиоти- ческие штаммы	Доза, КОЕ/г (мл)	Пе- риод, сут	Вид рыб	Эффект/результат в сравнении с контролем	Эффект на гистоло- гические показатели	Источ- ник
<i>Enterococ- cus faecalis</i> штамм 2674, <i>Aeromonas</i> sp. штамм A8-29 и <i>E. faecalis</i> штамм FC11682	1×10^8	90	<i>Tor tambroides</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, жирно- кислотный состав, структу- ра мышечной ткани; ↔ количественный состав ткани	↑ ВВ, ШВ, ПВ; ↔ ТМС, ГК	Hossain et al., 2024
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5×10^5 , 1×10^6 , 1.5×10^6 , 2×10^5	84	<i>Clarias gariepinus</i>	↑ Культивируемая микро- биота, рыбоводно-биологи- ческие показатели; ↔ количественный состав ткани	↑ ВВ, ШВ, ПВ, ГК	Falaye et al., 2016
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	1×10^8	30	<i>Oreochromis spp.</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, биохими- ческие показатели; ↔ иммунологические по- казатели	↑ ВВ, ШВ, ПВ, КМК	Sewaka et al., 2019
<i>Lactobacillus ssp.</i> и <i>Saccharomyces sp.</i>	1×10^5 и 2×10^6	30	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, биохими- ческие показатели, сопро- тивляемость <i>Trichodina</i> sp.	↑ ШВ, ВВ, КИЛ, КЭГ, КМК	Abdel- Aziz et al., 2020
<i>Lactococcus lac- tis</i> KT429892 и <i>Weissella confu- sa</i> KU055491.1	1.5×10^7 , 3×10^7 и 4×10^7	56	<i>Huso huso</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели; ↔ биохимические пока- затели, гематологические показатели, иммунологиче- ские показатели	↑ ВВ	Yega- neh Ras- tekenari et al., 2021
<i>Pediococcus aci- dilactici</i> CNCM I-4622	1×10^{10}	60	<i>Dicentrarchus labrax</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, качество воды; ↔ биохимические пока- затели, количественный состав ткани	↑ ВВ, ТМС	Eissa et al., 2022
pH FIXER®: <i>Bacillus pumilus</i> и <i>B. licheni- formis</i> ; Zyme- tin®: <i>Bacillus sp.</i> , <i>Strepto- coccus faecalis</i> и <i>Clostridium butyricum</i> ; Super PS®: <i>Rhodobacter</i> sp. и <i>Rhodococcus sp.</i>	1×10^6 , 1.1×10^8 , 1×10^9	75	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, гематоло- гические показатели, куль- тивируемая микробиота; ↔ качество воды	↑ ВВ, ВЭК	Tabas- sum et al., 2021

Таблица 2. Продолжение

Пробиоти- ческие штаммы	Доза, КОЕ/г (мл)	Пе- риод, сут	Вид рыб	Эффект/результат в сравнении с контролем	Эффект на гистоло- гические показатели	Источ- ник
Probiotic In- ternational ltd.: <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium</i> <i>bifidum</i> , <i>Strepto-</i> <i>coccus sali-</i> <i>varius</i> , <i>Entero-</i> <i>coccus faecium</i> , <i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i> , <i>Candida</i> <i>pintolopes</i>	2×10^8	62	<i>Acipenser</i> <i>baerii</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, пище- варительные ферменты, концентрация жирных кислот, культивируемая микробиота, жирнокислот- ный состав	↔ ВВ, ШВ, ПМК	Zare et al., 2021
<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	Нет данных (1, 2 и 4 г/ кг)	90	<i>Labeo</i> <i>rohita</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели; ↔ количественный состав ткани, гематологические показатели	↑ ВВ, ШВ, ГК; ↔ ТМС	Jahan et al., 2021
<i>Saccharomy-</i> <i>ces cerevisiae</i> DSY-5	1×10^6 и 1×10^8	120	<i>Pangasianodon</i> <i>hypophthalmus</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, иммуно- логические показатели; ↔ гематологические пока- затели	↑ ВВ	Boona- nuntana- sarn et al., 2019
Sanolife PRO-F®: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheni-</i> <i>formis</i> и <i>Bacillus pumilus</i>	1×10^7 и 1×10^6	70	<i>Oreochromis</i> <i>niloticus</i>	↑ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, гемато- логические показатели, качество воды; ↔ биохимические показа- тели	↑ ВВ, КМК	Elsabagh et al., 2018
<i>Bacillus amy-</i> <i>loliquefaciens</i> US573	1×10^7	42	<i>Dicentrarchus</i> <i>labrax</i>	↔ Рыбоводно-биологиче- ские показатели; ↑ микробиом кишечника	↑ ВВ, КВ, КМК, ВМВ, ПМВ	Chou- ayekh, 2023
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>	1×10^4	93	<i>Oncorhynchus</i> <i>mykiss</i>	↑ Культивируемая микро- биота; ↔ рыбоводно-биологиче- ские показатели, пищева- рительные ферменты	↑ ШВ, КМК; ↔ ПВ	Gis- bert et al., 2013
BiocenoI™: <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> R2 (CCM 8674) и <i>L. fermentum</i> R3 (CCM 8675)	1×10^8	65	<i>Salmo</i> <i>salar</i>	↔ Рыбоводно-биологиче- ские показатели; ↑ концентрация жирных кислот в кишечнике, экс- прессия генов антимикроб- ных белков и муцина	↔ ПМЭ, КМЭ, ВЭК, КИЛ; ↑ ПМЖ, КМЖ, КМК, ВВ, ШВ, ШСО, КСВ	Nimalan et al., 2023
<i>Lactobacillus</i> <i>brevis</i> и <i>L. buchneri</i>	Нет данных	109	<i>Seriola</i> <i>dumerili</i>	↔ Жирнокислотный со- став; рыбоводно-биологи- ческие показатели, количе- ственный состав ткани	↑ ТСС, ТСМ; ↔ ТМС, ВВ, ШВ, ШСО	Milián- Sorribes et al., 2021

Таблица 2. Окончание

Пробиоти- ческие штаммы	Доза, КОЕ/г (мл)	Пе- риод, сут	Вид рыб	Эффект/результат в сравнении с контролем	Эффект на гистоло- гические показатели	Источ- ник
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1×10^4 , 1×10^6 и 1×10^8	35	<i>Oreochromis niloticus</i>	↔ Рыбоводно-биологиче- ские показатели, гематоло- гические показатели	↔ ВВ, ШВ, ПМК; ↑ КМК	Ruiz et al., 2020
(A) <i>Lactoba- cillus</i> , <i>Sac- charomyces</i> , Photosynthet- ic bacteria, <i>Cusuanjun</i> , <i>Bacillus natto</i> и <i>Actinobacteria</i> ; (B) <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> , <i>Streptococcus faecium</i> и <i>P. bacteria</i>	(A) 7.47×10^7 (B) 2.33×10^8	80	<i>Polyodon spathula</i>	↑ Пищеварительные фер- менты, микробиом кишеч- ника	↑ ТМС, ВВ, ШВ; ↔ ТСМ	Fang et al., 2015
AquaStar® Growout: <i>Bacillus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp. и <i>Lactobacillus</i> sp.	2.3×10^6	56	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Культивируемая микро- биота, микробиом кишеч- ника	↑ КИЛ, ПМВ, ПВ; ↔ КМК, ВМВ	Standen et al., 2015
<i>Bacillus</i> sp.	Нет данных	90	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	↔ Качество воды	↑ ВВ, ШВ, ВЭК; ↔ ШПК	Hassan et al., 2020
<i>Bacillus subtilis</i> CECT 35	1×10^7	28	<i>Sparus aurata</i>	↔ Микробиом кишечника	↑ ПВ, ВВ, КЛЛ; ↔ ПМС, ШПК, КИЛ; ↓ КМК, ВМВ	Cerezu- ela et al., 2012

Примечание: ↑ — достоверный положительный эффект в сравнении с контролем; ↓ — достоверный отрицательный эффект в сравнении с контролем; ↔ — отсутствие эффекта; ВВ — высота ворсинки; ВМВ — высота микроворсинки; ВШК — высота щетиночной каймы; ВЭК — высота эпителиоцитов кишечника; ГК — глубина крипты; ДМВ — длина микроворсинки; КВ — количество ворсинок; КВГ — количество вакуолей гепатоцитов на 100 мкм; КИЛ — количество интраэпителиальных лимфоцитов; КЛЛ — количество лимфоцитов lamina propria; КМЖ — количество мукоидных клеток на эпителии жабр; КБК — количество мукоидных клеток на эпителии кишечника; КМЭ — количество мукоидных клеток на эпителии кожи; КСВ — количество супрануклеарных вакуолей; КЭГ — количество эозинофильных гранулоцитов; ПВ — площадь ворсинки; ПВГ — площадь вакуолей гепатоцитов; ПМВ — плотность микроворсинок; ПМЖ — площадь мукоидных клеток на эпителии жабр; ПМК — площадь мукоидных клеток; ПМС — площадь мускульного слоя; ПМЭ — площадь мукоидных клеток на эпителии кожи; ППС — площадь подслизистого слоя; ТМС — толщина мускульного слоя; ТПС — толщина подслизистого слоя; ТСС — толщина серозного слоя; ШВ — ширина ворсинки; ШПК — ширина просвета кишечника; ШСО — ширина собственной слизистой оболочки.

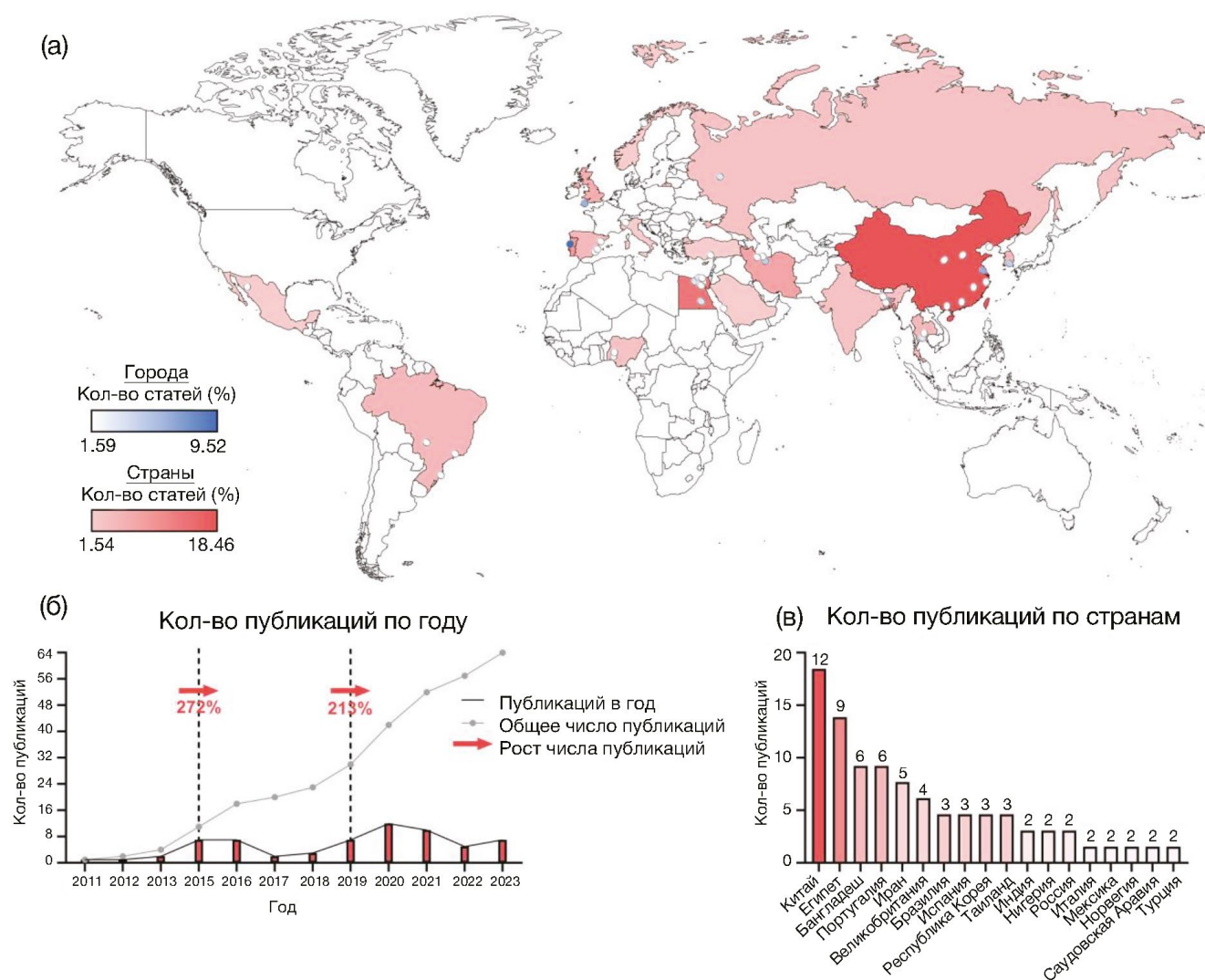


Рис. 1. Карта географического распределения (а), количество исследований по годам (б) и частота (%) публикаций (в) по странам, использующим для изучения пробиотиков в аквакультуре физиологические, биохимические маркеры и гистоморфометрические методы.

Средиземноморском регионе (Soliman, Yasout, 2016), а Португалия и Бангладеш — одни из ключевых поставщиков рыбной продукции в мире, в том числе полученной в аквакультуре. Возросшее внимание к исследованию пробиотиков по всему миру указывает на интерес к интенсификации аквакультуры путем применения при выращивании рыб различных биологически активных/функциональных компонентов. Развитие аквакультуры играет важную роль в обеспечении продовольственной безопасности и экономического роста во многих регионах мира (FAO, 2022), и по этой причине создание новых технологий выращивания и разработка кормовых добавок способствуют повышению конкурентоспособности отрасли.

Основные виды рыб, на которых проводятся исследования пробиотиков

Среди изученных работ наибольшее число исследований проводилось на нильской тилпии (*Oreochromis niloticus*; $n = 23$; 35.9%), вторым по популярности объектом исследования была радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*; $n = 4$; 6.2%), далее — обыкновенный карп (*Cyprinus carpio*; $n = 3$; 4.6%) (рис. 2а). Также существенное число работ было посвящено пангасиусу (*Pangasianodon hypophthalmus*; $n = 3$; 4.6%). Всего в публикациях встречалось 29 различных видов/гибридов рыб, включая представителей как пресноводной, так и морской ихтиофауны (см. рис. 2).

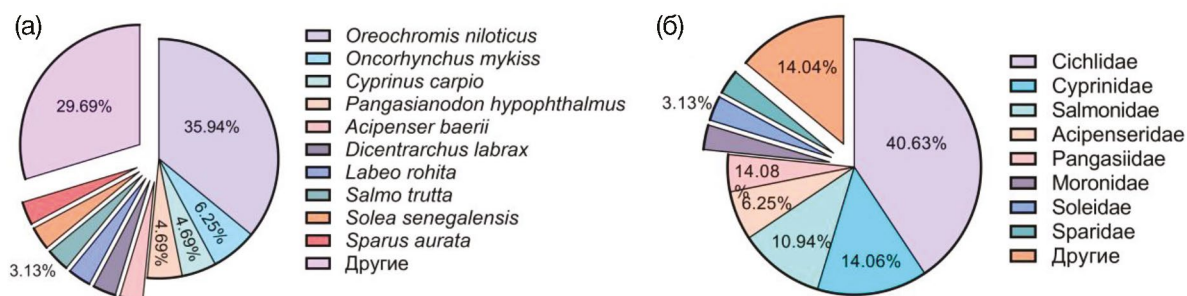


Рис. 2. Число исследований (%), проведенных на различных видах (а) и семействах (б) рыб.

Большое число исследований на тилapia продиктовано возросшей популярностью данного объекта выращивания, составляющего 65% от общемирового объема рыбной продукции, выращиваемой в искусственных условиях (El-Sayed et al., 2023). Тилapia представляет существенный интерес для культивирования, так как отличается высокой скоростью роста и высокой резистентностью к неблагоприятным факторам внешней среды. Стоит отметить исследования, проводимые на гибридах, в частности тилпии (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*; Poolsawat et al., 2020) и сорубиме (*Pseudoplatystoma reticulatum* × *P. corruscans*; Nunes et al., 2020). Данные гибриды являются распространенными объектами рыбоводства в некоторых странах (Lin et al., 2008).

Для более общего представления все объекты исследований были сгруппированы по семействам (рис. 2б). Представители семейства цихловых (Cichlidae) являлись наиболее изучаемыми ($n = 26$; 40.6%). Помимо нильской тилпии работы также проводились на *Oreochromis mossambicus*, *O. aureus* и *Oreochromis* spp. Далее, по количеству опубликованных работ, идут карповые (Cyprinidae) — махсир тайский (*Tor tambroides*) и роху (*Labeo rohita*) ($n = 6$; 14%). Представители семейства лососевых (Salmonidae) и осетровых (Acipenseridae) исследовались в 7 (10.9%) и 4 (6.2%) работах, соответственно. Семейства Pangasiidae, Moronidae, Soleidae, Sparidae являлись объектом исследования не более, чем в трех публикациях (4.6 и 3.1%).

Рыбы из семейства лососевых являются наиболее важными видами, выращиваемыми в странах с холодным климатом (FAO, 2022), а также служат объектом индустриального рыбоводства в различных регионах, включая Северную Америку, Европу и Азию (Ford, Myers, 2008). Рыбная продукция из лососевых пользуется стабильно высоким спросом на мировом рынке. Осетровые, в свою очередь, также представляют суще-

ственный коммерческий интерес в основном для получения икры (Biology, conservation ..., 2009). Применение пробиотиков для данных семейств рыб представляется особенно актуальным ввиду высокой ценности рыбной продукции.

Из представленных данных видно, что по сравнению с тилпией, другие виды рыб, в том числе представители семейств карповых, лососевых и осетровых, получают не столь значительное внимание со стороны исследователей. Приведенное разнообразие объектов исследования представляет существенный интерес для выявления видоспецифического эффекта пробиотиков, для разработки новых препаратов и их комбинаций и для совершенствования знаний о коэволюции микробных сообществ и водных организмов (Sadeghi et al., 2023). Разные хозяйственно значимые виды рыб обладают различными физиологическими (требования к рациону и условиям содержания) и иммунологическими (строение и функциональная активность иммунокомпетентных органов) особенностями, которые продиктованы экологией конкретного вида (Mokhtar et al., 2023). Пробиотические микроорганизмы могут проявлять нестабильную эффективность, что требует специфических исследований для оптимизации их применения.

Условия проведения испытаний пробиотиков в аквакультуре

Продолжительность опыта существенно варьировала в отобранных исследованиях (рис. 3а). Наибольшее число работ было проведено с продолжительностью 35–56 и 60–80 сут ($n = 21$ и 22; 32.8 и 34.3%). Опыты продолжительностью 20–30 и 84–98 сут составили 14 и 12.5%. Наименьшее число экспериментов проводили в течение 110–140 сут ($n = 4$; 6.25%). В настоящий момент нет однозначного мнения относительно связи между эффектом пробиотического препарата и продолжительностью его использования

(Liu et al., 2012). Установлено, что закрепление пробиотика в ЖКТ может зависеть не только от вида микроорганизма, но также от вида рыб и экзогенных факторов (тип корма, гидрохимические условия, сезон выращивания и др.; Langlois et al., 2021). Некоторые исследователи указывают на то, что 24–60 сут достаточно для закрепления пробиотического организма в составе микробного сообщества и/или проявления его биологически активных свойств (Liu et al., 2012). В целях профилактики бактериальных заболеваний возможно применение пробиотика в течение непродолжительного периода — 5–15 сут (Бычкова и др., 2008).

Отдельного внимания заслуживают условия содержания рыб в опытах (рис. 3б). В подавляющем числе работ рыба выращивалась в бассейнах или аквариумах различного объема ($n = 33$; 50.7%). В некоторых публикациях авторы не приводили данных по условиям выращивания, указывая только объем емкости. Опыты в установках замкнутого водоснабжения (УЗВ) составляли 35.3% ($n = 23$) от общего числа статей. В условиях прудового и садкового выращивания всего было проведено 13.8% исследований ($n = 9$). Несомненно, что лабораторные исследования, проводимые в условиях помещений (бассейны, УЗВ), представляются более удобными для проведения испытаний пробиотических препаратов, так как дают возможность большего контроля за условиями выращивания (гидрохимические показатели, плотность посадки, контроль поедаемости корма и т. д.). При этом проведение исследований в условиях садков и бассейнов предоставляет возможность испытания в рамках интенсивной аквакультуры, где применение различных кормовых добавок наиболее востребовано.

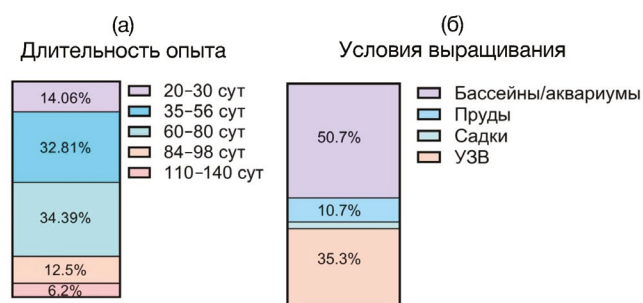


Рис. 3. Дизайн исследований: (а) продолжительность опыта, (б) условия выращивания.

МИКРООРГАНИЗМЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В АКВАКУЛЬТУРЕ

Происхождение пробиотиков является важным фактором при выборе микроорганизма для использования в аквакультуре (Shefat et al., 2018). Так, бактерии, выделенные вне рыбы, называются аллохтонными или экзогенными, а микроорганизмы, полученные из организма хозяина, — автохтонными или эндогенными (Ringø et al., 2016).

В рассматриваемых работах исследовали преимущественно коммерческие пробиотические составы ($n = 40$; 59.7%), в которых определение происхождения микроорганизмов не представляется возможным. Среди используемых препаратов можно выделить следующие: pH FIXER®, CALSPORIN®, Sanolife PRO-F®, AquaStar®, AlCar®, PAS-TRR™ и BioAqua®. В состав данных препаратов чаще всего входят сразу несколько видов/штаммов бактерий (от 2 до 12). Исследования, в которых авторы указывают происхождение пробиотиков (аллохтонные и автохтонные) составляют 16.4 ($n = 11$) и 5.9% ($n = 4$) соответственно. Работы, в которых не указано происхождение микроорганизмов составляли 17.9% ($n = 12$).

Коммерческие пробиотики являются наиболее доступными кормовыми добавками, что, вероятно, объясняет их высокую частоту использования в работах. Однако некоторые авторы указывают, что выживаемость и способность микроорганизмов из коммерческих препаратов закрепляться в ЖКТ гидробионтов нестабильна и зависит от множества факторов (Fijan et al., 2014). Вероятно, по этой причине зависимости между количеством бактерий в составе препарата и выраженностью эффектов на рыбе не наблюдалось. Многие авторы также предполагают, что автохтонные микроорганизмы будут проявлять большую эффективность, в сравнении с эндогенными, так как обладают большей специфичностью и необходимыми характеристиками (набор ферментов, липополисахаридов, адгезинов) для успешного закрепления и развития в условиях слизистой кишечника рыб (Shefat et al., 2018; Ntakirutimana et al., 2023; Büyükdavacı et al., 2023).

Видовой состав пробиотических микроорганизмов

Распределение родов и видов микроорганизмов в изученных работах приведено на рис. 4. В отобранных публикациях наибольшее число работ проводилось с применением бактерий рода *Bacillus* ($n = 60$; 41.6%), отдельно или в составе комплексного препарата. Второй по популярности род пробиотических бактерий —

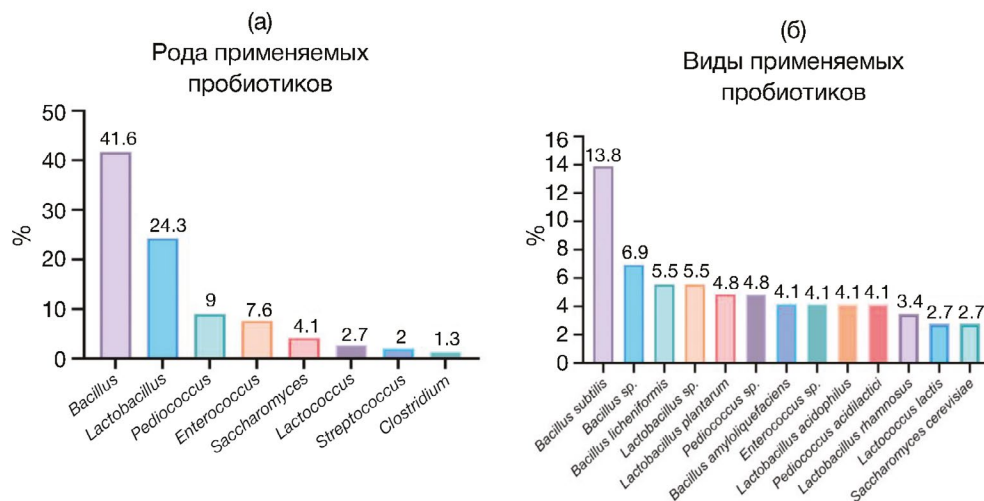


Рис. 4. Число исследований (%), проведенных с использованием различных родов (а) и видов (б) пробиотических организмов.

Lactobacillus ($n = 35$; 24.3%). Меньше были представлены в исследованиях пробиотики рода *Pediococcus*, *Enterococcus* и *Saccharomyces* (9, 7.6 и 4.1% соответственно). Другие рода встречались в оставшихся 17.3% работ ($n = 10$).

Среди наиболее применяемых видов пробиотических микроорганизмов (см. рис. 4) в составе препаратов доминировал *Bacillus subtilis*, встречаясь в 13.8% исследований ($n = 20$). Далее идут неопределенные представители бацилл (*Bacillus* sp.; 6.9%, $n = 10$) и *B. licheniformis* (5.5%; $n = 8$). Часто используемые виды лактобацилл (*Lactobacillus* sp. и *L. plantarum*) встречались, соответственно, в 5.5 и 4.8% статей. Молочно-кислые бактерии *Pediococcus* sp., также использовались в качестве пробиотиков в 4.8% работ ($n = 7$). Такие организмы, как: *B. amyloliquefaciens*, *Enterococcus* sp., *L. acidophilus*, *P. acidilactici*, *L. rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *Enterococcus faecalis* и *Lactobacillus* spp. встречались в исследованиях от 3 до 6 раз (2–4.1%). Среди микроорганизмов, применяемых не более, чем в двух работах (1.3%), стоит отметить: *Clostridium butyricum*, *Enterococcus faecium* и *L. delbrueckii*.

Представители родов *Bacillus* и *Lactobacillus* обладают рядом преимуществ, в частности: способностью выживать в условиях низких значений pH и действия желчных кислот, высокой степенью адгезии к слизи, а также доказанным положительным физиологическим действием (Wuertz et al., 2021; El-Son et al., 2022). Помимо прочего, бактерии рода *Lactobacillus* характеризуются возможностью синтезировать короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК),

которые служат энергетическим субстратом как для представителей комменсальной микрофлоры, так и для энтероцитов кишечника (Allameh et al., 2017). Кроме того, они отличаются способностью синтезировать различные антимикробные соединения, подавляющие активность патогенов и приводящие к развитию нормальной микрофлоры (Martínez Cruz et al., 2012; Fijan et al., 2014; Zhang et al., 2021). Дополнительно, широкое использование данных микроорганизмов в аквакультуре, обусловлено их высокой частотой обнаружения в водной среде и слизистых оболочках гидробионтов (Lauzon, Ringø, 2012).

Такие рода, как *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* и др., являются перспективными кандидатами в пробиотики, так как их применение способствует поддержанию иммунного статуса рыб, улучшению пищеварения и адсорбции нутриентов, снижению риска заболеваний и повышению продуктивности (Batista et al., 2016). Однако для дальнейшего внедрения данных микроорганизмов-пробиотиков в практику аквакультуры необходимы дополнительные исследования, направленные на более глубокое понимание взаимодействия между пробиотиками, микрофлорой рыб и окружающей средой.

Концентрации используемых пробиотических микроорганизмов

В рассмотренных работах используемые концентрации пробиотиков сильно варьировали, находясь в пределах 1×10^2 – 1×10^{12} КОЕ/г корма. Для удобства восприятия материала все встречающиеся в публикациях концентрации были распределены по группам со степенью

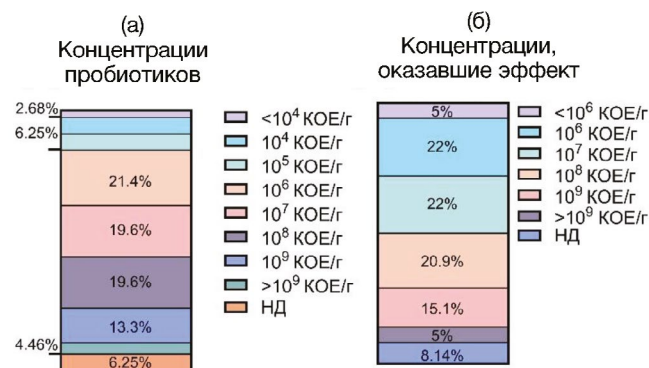


Рис. 5. Число исследований (%), проведенных с использованием различных концентраций пробиотиков (10ⁿ КОЕ/г): (а) все концентрации, (б) концентрации, продемонстрировавшие достоверный положительный эффект.

колониобразующих единиц на грамм корма (1×10ⁿ КОЕ/г) и приведены на рис. 5.

Учет концентрации в соответствии с вышеописанными условиями показал, что наиболее используемыми концентрациями микроорганизмов являются 1×10⁶, 1×10⁷ и 1×10⁸ КОЕ/г, которые составляли 21.4, 19.6 и 19.5% от общего числа публикаций, соответственно ($n = 24, 22, 21$). Высокую частоту применения отмечали в концентрации микроорганизмов 1×10⁹ КОЕ/г (13.3%; $n = 15$). В свою очередь, концентрации 1×10⁴ и 1×10⁵ КОЕ/г встречались лишь в 6.2% исследований ($n = 7$). Другие, упомянутые в отобранных работах, концентрации использовались не более трех раз. Стоит отметить, что число работ, в которых авторы не указывали используемую концентрацию пробиотиков составляло 6.2% ($n = 7$).

Концентрации, показавшие достоверный эффект, демонстрировали схожее распределение. Концентрации 1×10⁶ (22%; $n = 19$), 1×10⁷ (22%; $n = 19$), 1×10⁸ (20.9%; $n = 18$), а также 1×10⁹ (15.1%; $n = 13$) КОЕ/г наиболее часто оказывали положительный эффект на оцениваемые физиологические показатели объектов выращивания. Более высокие или более низкие концентрации, по сравнению с описанными выше, демонстрировали положительный эффект и составляли 19.7% от общего числа публикаций ($n = 8$).

В настоящее время нет однозначного мнения по поводу необходимости для проявления положительного эффекта концентрации пробиотического микроорганизма. Например, было показано, что концентрации 1×10⁵–1×10⁶ КОЕ/г достаточно для получения положительного эффекта от действия пробиотиков для человека (Georgieva et al., 2014). В большинстве работ концентрации, оказывающие действие, находились

в пределах 1×10⁶–1×10⁹ КОЕ/г (например: Won et al., 2016; Xia et al., 2018; Kuebutornye et al., 2020; Zare et al., 2021). В исследовании (Akter, 2019) даже концентрация 1×10⁵ КОЕ/г *L. acidophilus* приводила к достоверному улучшению веса, кормового коэффициента и показателей перевариваемости сухого вещества и белка *Pangasianodon hypophthalmus*. В свою очередь, в работе (Batista et al., 2015) многокомпонентный пробиотик в концентрациях 3.5×10⁵ и 4.6×10⁶ КОЕ/г не оказал действия на рыбоводно-биологические показатели и активность пищеварительных ферментов *Solea senegalensis*. По данным исследования с использованием *B. subtilis* и *B. licheniformis*, концентрации 1×10⁸ КОЕ/г (Merrifield et al., 2010) не приводили к значимому изменению биохимических показателей крови радужной форели. Предполагается, что для многих исследуемых штаммов пробиотических микроорганизмов характерно специфическое взаимодействие с хозяином, обусловленное вариативностью компонентов клеточной стенки бактерий, которые вызывают различные реакции у организма путем взаимодействия с рецепторами энтероцитов (Bron et al., 2012; Gisbert et al., 2013). Таким образом, для каждого микроорганизма (потенциального пробиотика) целесообразно проводить серию опытов с испытанием спектра концентраций (от 1×10⁵ до 1×10¹⁰ КОЕ/г).

Влияние пробиотиков на микробиом хозяина

Изучение микробиома кишечника является важным направлением исследований, нацеленных на изучение взаимодействия между комменсальными и симбиотическими микроорганизмами, населяющими слизистые хозяина и оказывающими влияние на здоровье рыбы (Nayak, 2010; Ringø et al., 2016). Во многих работах было продемонстрировано, что пробиотические бактерии способны оказывать значимое влияние на микробное сообщество кишечника, приводя к изменению относительной представленности отдельных групп бактерий, увеличивая или уменьшая общее разнообразие организмов (Standen et al., 2016; Feng et al., 2020; Bjørgen et al., 2020). В отобранных для обзора работах положительный эффект на микробное сообщество кишечника был выявлен в 12 статьях (66.6%). В данных исследованиях авторами установлены изменения в количестве определенных оперативных таксономических единиц (OTU), а также достоверные улучшения индексов насыщенности (ACE и Chao1) и разнообразия (Shannon и Simpson) микробиологических сообществ, показателей альфа/бета-разнообразия. В исследованиях с отсутствием эффекта не было установлено достоверного изменения данных индексов, од-

нако в большинстве случаев наблюдались некоторые сдвиги в составе отдельных групп микроорганизмов. Например, в работе (Li Z. et al., 2019) индексы разнообразия и насыщенности достоверно не отличались в группах, получавших комплексный пробиотический препарат (*Acetobacter* spp., *Lactobacillus* spp. и *Pseudomonas* spp. 5×10^9 КОЕ/г). При этом было выявлено достоверное изменение относительного количества родов *Sediminibacterium*, *Burkholderia* и *Bacteroides*. У тилипии, получавшей в составе корма пробиотический препарат Sanolife PRO-F® (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus pumilus* 1×10^{10} КОЕ/г) не наблюдалось достоверных изменений в альфа/бета-разнообразии, однако, у группы, получавшей опытные корма, было выявлено появление в составе микробиома представителей родов *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus* и *Rhodobacter*. Исследование микробиома гидробионтов представляется очень комплексной задачей, ввиду нестабильности микробных сообществ слизистых, которые могут включать как комменсальные/симбиотические организмы, непосредственно ассоциированные с хозяином, так и различную транзиторную микрофлору. При изучении влияния пробиотиков на рыб, исследования качественных и количественных характеристик микробного сообщества слизистой кишечника представляются целесообразными, если целью работы является установление механизмов действия пробиотического организма. В случае же работ по определению эффективности кандидатов в пробиотики, применение подобного ресурсозатратного метода исследования не рационально.

Изучение микробных сообществ с использованием стандартных микробиологических методов (прямой посев) показало наиболее значимую реакцию на применение пробиотиков (100%; $n = 10$). В данных работах наблюдалось повышение общего числа культивируемых микроорганизмов, а также представителей молочнокислых бактерий. Например, в исследовании (Standen et al., 2016) использование в кормах для тилипии коммерческого пробиотика AquaStar® Growout (*Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Bacillus* sp. и *Enterococcus* sp.; 1.34×10^7 и 2.64×10^7 КОЕ/г) приводило к достоверному увеличению количества общего числа микроорганизмов, бацилл и лактобацилл. В работе на клариевом соме (*Clarias faripepinus*) пробиотик *Lactobacillus plantarum* приводил к увеличению количества культивируемых бактерий и встречаемости энтеробактерий (Falaye et al., 2016). Важно отметить, что культивируемый микробиом слизистых оболочек значительно различается как по представленности микроорганизмов, так и по их количеству.

Культурозависимые методы всегда показывают меньшее таксономическое разнообразие и в то же время могут позволить установить значимые колебания на уровне культивируемых таксонов (Castañeda-Monsalve et al., 2019). Использование культурозависимых методов при изучении пробиотиков наиболее актуально для оценки закрепления пробиотика на слизистой оболочке кишечника, что может дополнительно подтвердить его пробиотическую активность.

Действие пробиотиков на микробиом слизистых оболочек водных организмов по-прежнему остается актуальной темой исследования. На данный момент предполагается, что поступление пробиотического микроорганизма с кормами приводит к сдвигам в составе микробного сообщества через: 1) действие на доминирующие филумы микроорганизмов, стимулируя развитие комменсалов; 2) колонизацию слизистой и изменение экологии микробиоты и занятие доминирующего положения в отдельных компартментах; 3) подавление развития и способность к колонизации патогенных бактерий путем продуцирования различных биологически активных веществ и вступление в гомеостаз с комменсальными микроорганизмами (Lazado, Caipang, 2014).

ОЦЕНОЧНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИКОВ В АКВАКУЛЬТУРЕ

Выявленная в рассмотренных исследованиях эффективность пробиотических препаратов на различные физиологические и гистоморфометрические показатели организма значительно варьировалась. Обобщенные результаты по количеству применений каждого из методов в работах и частота фиксации достоверных отличий при применении пробиотика для каждого из них приведены на рис. 6.

Рыбоводно-биологические параметры

Оценка рыбоводно-биологических параметров производилась в 58 работах, при этом достоверный эффект наблюдался в 68.9% случаев. Наиболее часто пробиотики приводили к увеличению конечной массы рыб, а также уменьшению кормового коэффициента. Например, пангасиус (*Pangasianodon hypophthalmus*), получавший в составе корма дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae* DSY-5) в концентрации 1×10^6 и 1×10^8 , продемонстрировал значимое увеличение скорости роста и коэффициента конверсии корма за 120 сут опыта (Boonanuntanasarn et al., 2019). Пробиотики на основе автохтонных бактерий *Lactococcus lactis* и *Weissella confusa* приводили к



Рис. 6. Количество использования различных групп показателей в публикациях и частота фиксации достоверных отличий при применении пробиотика.

увеличению финального веса и улучшению эффективности использования кормов у белуги (*Huso huso*) (Yeganeh Rastekenari et al., 2021). В свою очередь, в работе (Chouayekh et al., 2023) было выявлено, что *Bacillus amyloliquefaciens* в концентрации 1×10^7 КОЕ/г не приводит к существенному улучшению рыбоводно-биологических показателей, хотя его применение приводило к изменению гистоморфологических показателей кишечника и оказывало влияние на микробиом слизистой ЖКТ. Схожие результаты были получены на *Solea senegalensis*, где различные комбинации пробиотических бактерий (*Bacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp. и *Lactobacillus* sp.) не вызвали улучшения рыбоводно-биологических показателей (Barroso et al., 2016). Влияние пробиотиков на росто-весовые показатели и эффективность использования кормов, в первую очередь, обусловлено ферментативной активностью микроорганизмов, а именно их способностью к синтезу *in vivo* или стимуляции организма к выработке пищеварительных ферментов (Simón et al., 2021). Также микроорганизмы могут метаболизировать различные компоненты кормов, предоставляя хозяину нутриенты в удобной для адсорбции форме (Sumon et al., 2022). Как уже указывалось ранее, эффект пробиотиков на организм рыбы зависит от уникальных метаболических характеристик бактерий, и вероятно, некоторые микроорганизмы не способны закрепиться в составе комменсальной микробиоты кишечника.

Ферментативная активность

Значимый эффект на активность ферментов был выявлен в 70.8% работ ($n = 17$). Пробиотики приводили к увеличению концентрации лизоцима и супероксиддисмутазы (SOD) и каталазы (CAT) в тканях и сыворотке крови рыб. В частности, в работе (Shekarabi et al., 2022) было продемонстрировано положительное влияние поликомпонентного пробиотика на активность лизоцима слизистой оболочки кишечника сибирского осетра (*Acipenser baerii*). Лизоцим является ферментом класса гидролаз, увеличение которого наблюдается при заражении рыб различными патогенами, так как он способен гидролизовать клеточные оболочки бактерий (Magnadóttir, 2007). Увеличение концентрации данного фермента в сыворотке, может быть объяснено иммуномодулирующими свойствами пробиотиков.

Применение *Clostridium butyricum* в кормах для гибрида тиляпии (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) приводило к существенному повышению активности в сыворотке крови кислой фосфатазы (ALP), каталазы, глутаминовой оксалоуксусной трансминазы (GOT), глутаминовой пировиноградной трансминазы (GPT) и супероксиддисмутазы (Poolsawat et al., 2020). В свою очередь, у тиляпии, получавшей пробиотический препарат Sanolife® PRO-F, наблюдался разнонаправленный эффект на антиоксидантные ферменты, так, было выявлено повышение уровней SOD и CAT, а также ингибирование

выработки малонового диальдегида (MDA) (El-Son et al., 2022). Антиоксидантные ферменты и белки в организме играют важную роль в поддержании окислительного баланса организма, а именно — элиминации реактивных радикалов (Feng, Wang, 2020). Увеличение их выработки при действии пробиотиков может быть связано как с действием некоторых метаболитов бактерий (например КЦЖК), так и с иммуномодулирующим действием. В частности, при развитии клеточного иммунитета происходит выработка активных форм кислорода макрофагами и гранулоцитами, за счет чего реализуются бактерицидный и цитотоксический эффекты (Mokhtar et al., 2023), после чего, для элиминации остатков радикалов, происходит увеличение активности антиоксидантных ферментов.

Действие пробиотиков на активность пищеварительных ферментов является одним из ключевых свойств “полезных” микроорганизмов, и выступает важным показателем при подборе и изучении кандидатов в пробиотики. Пищеварительные ферменты (протеазы, липазы и карбоксиллазы) в кишечнике объектов выращивания значимо увеличивались в 88.8% исследований ($n = 16$). Среди отобранных работ положительный эффект от применения пробиотиков отмечался для сибирского остра (*Acipenser baerii*) (Zare et al., 2021), где наблюдалось увеличение химотрипсина, трипсина, липазы, амилазы и пепсина; для персидского осетра (*Acipenser persicus*) (Darafsh et al., 2020), где было выявлено повышение активности протеазы, амилазы и липазы; для тюрбо (*Scophthalmus maximus*) (Li X. et al., 2019), где активность таких ферментов, как амилаза, пепсин и липаза значимо повышалась при использовании пробиотического препарата. Повышение активности пищеварительных ферментов также было установлено для таких видов рыб, как веслонос *Polyodon spathula* (Fang et al., 2015), кумжа *Salmo trutta* (Kalantarian et al., 2020), тиляпия *Oreochromis niloticus* (Ramos et al., 2017a; Kuebutornye et al., 2020; Haraz et al., 2023; Eissa et al., 2023), роху *Labeo rohita* (Saravanan et al., 2021) и ряда других (см. табл. 2). Согласно результатам изученных публикаций активность пищеварительных ферментов представляется одним из наиболее чувствительных показателей, реагирующих на применение пробиотиков у рыб. Данное утверждение подтверждается общностью полученных результатов для разных систематических групп рыб. По этим причинам использование данного показателя при исследовании кандидатов в пробиотики позволяет объективно оценить их эффективность и сделать обоснованный вывод о целесообразности их применения.

Химический состав тканей

Среди наиболее часто используемых показателей минимальный эффект от применения пробиотиков был выявлен для параметра нутриентного состава ткани. Среди 21-й работы, оценивавшей данный параметр, лишь в 8-ми был зафиксирован значимый эффект (38.1%). Например, использование пробиотиков *B. licheniformis* и *B. polymyxa* в кормах для *Sillago sihama* приводило к значимому увеличению содержания сухого вещества, а также содержания белков, липидов и золы (Amoah et al., 2021). Напротив, применение коммерческих пробиотиков GroBiotic® и Aquablend®, содержащих *Bacillus* sp. не оказывало влияния на нутриентный состав мышечной ткани и печени *Totoaba macdonaldi* (González-Félix et al., 2018), несмотря на большую продолжительность кормления (120 сут). В других публикациях, где был отмечен эффект применения пробиотика, фиксировались противоречивые результаты — снижение или повышение показателей влажности, количества золы, белков и жира в тканях рыб (Yang et al., 2019; Li et al., 2019; Darafsh et al., 2020). Неоднозначные данные по влиянию пробиотиков на нутриентный состав ткани рыб могут быть объяснены различием в метаболизме объектов выращивания, которые обусловлены различным типом питания, температурными режимами выращивания и скоростью роста (Климов и др., 2023). Дополнительно необходимо указать, что изменение состава ткани напрямую связано с изменением скорости роста и набора массы. В частности, в работах, в которых пробиотики не оказывали влияния на рыбоводно-биологические показатели, также не отмечалось изменения параметров нутриентного состава ткани (Batista et al., 2015; Ramos et al., 2015; González-Félix et al., 2018).

Сопrotивляемость патогенам

Положительный эффект от применения пробиотиков отмечался при оценке сопротивляемости рыб к различным патогенам в водной среде (94.4%; $n = 17$). Увеличение устойчивости к бактериальным инвазиям связана со способностью пробиотиков в кишечнике занимать сайты адгезии на слизистой, конкурировать за питательные вещества, а также синтезировать бактериостатики, препятствующие росту и развитию условно-патогенной микрофлоры (Nayak et al., Chen et al., 2020). В ряде исследований на нильской тиляпии было показано, что применение пробиотиков в кормах приводит к увеличению выживаемости рыб при заражении такими патогенными микроорганизмами и их

метаболитами, как *Aspergillus flavus* (Eissa et al., 2023), *Pseudomonas fluorescens* (Ismail et al., 2019), *Aeromonas hydrophila* (Kuebutornye et al., 2020), *A. veronii* (Sewaka et al., 2019) и *Streptococcus agalactiae* (Xia et al., 2018; Liu et al., 2021). Помимо этого использование комплексных составов пробиотиков оказывало воздействие на резистентность *Anguilla japonica* (Lee et al., 2017) и *Labeo rohita* (Saravanan et al., 2021) к *Vibrio anguillarum* и *Aeromonas hydrophila* соответственно. Стоит отметить, что в перечисленных работах не наблюдается зависимости между дозой вносимого микроорганизма и временем его использования, что указывает на верность утверждения о возможности применения пробиотических бактерий в качестве профилактического средства от бактериальных инвазий (Юхименко, Бычкова, 2010). Можно утверждать, что показатель сопротивляемости рыб к патогенам представляется важным параметром, позволяющим более точно определить эффективность пробиотика.

В свою очередь, иммунологические показатели рыб достоверно изменялись при применении пробиотика лишь в 60% исследований ($n = 6$). Это может быть связано с тем, что вероятный механизм действия пробиотиков преимущественно ассоциирован со стимуляцией специфического и/или локального иммунного ответа слизистых оболочек, а увеличение концентрации иммуноглобулинов, белков комплемента и лизосомальной активности наблюдается при активации адаптивного иммунитета (Natnan et al., 2021). Например, в работе (Nunes et al., 2020) было продемонстрировано, что пробиотик *Bacillus subtilis* C-3102 приводил к существенному увеличению фагоцитарной активности у гибрида *Pseudoplatystoma* sp. В свою очередь особи синегальской солеи (*Solea senegalensis*), получавшей комплексный пробиотик (*Bacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp. и *Lactobacillus* sp.) не продемонстрировали достоверного изменения показателей общего количества иммуноглобулина и активности белков альтернативного пути комплемента относительно контроля (Barroso et al., 2016). Изменение иммунологических показателей фиксировалось в работах, в которых также было установлено увеличение устойчивости к патогенам (Han et al., 2015; viz. Nunes et al., 2020; Kuebutornye et al., 2020). Вероятно, специфичная активность пробиотика и его взаимодействие со слизистой кишечника рыбы могут выражаться в различной интенсивности иммунного ответа, что частично подтверждается результатами омиксных исследований (López Nadal et al., 2023). Использование иммунологических показателей (титр антител, фагоцитарная активность) в исследованиях но-

вых пробиотиков может быть востребовано в случае наличия у исследуемых микроорганизмов доказанного иммуностимулирующего действия или в комплексе с оценкой сопротивляемости патогенам.

Экспрессия про- и противовоспалительных генов

При изучении экспрессии различных про/антивоспалительных маркеров практически всегда наблюдалось увеличение относительных уровней мРНК при применении пробиотических препаратов (92.3%; $n = 12$). Данный эффект пробиотических микроорганизмов является одним из ключевых, так как способствует иммунизации организма и, как следствие, повышает его способность противостоять действию патогенов и различных стресс-факторов (Lazado, Caipang, 2014). В отобранных исследованиях наиболее часто оценивалась экспрессия интерлейкинов (IL-1 β , IL-8, IL-10), интерферона (IFN- γ), фактора роста опухоли (TNF- α), трансформирующего фактора роста (TGF- β), белка теплового шока (HSP70) и толл-подобного рецептора (TLR2/3). Преимущественно целевой тканью для оценки уровней мРНК являлся кишечник (Moroni et al., 2021), однако, в некоторых работах проводилось изучение экспрессии в печени (Al-Deriny et al., 2020). Пробиотики приводили к увеличению относительной экспрессии белков теплового шока (Lee et al., 2017), интерлейкинов и факторов роста (Won et al., 2016; Adeshina et al., 2020), а также толл-подобных рецепторов (Abid et al., 2013). Показательной является работа (Standen et al., 2016), в которой у нильской тилпии, получавшей коммерческий пробиотический состав AquaStar® Growout, фиксировалось достоверное увеличение относительного количества мРНК различных генов, связанных с иммунным ответом (TLR2, TNF- α , IL-1 β , IL-10, TGF- β). Отдельно стоит отметить, что в другом исследовании на тилпии (El-Son et al., 2022), применение в кормах пробиотика Sanolife PRO-F® не приводило к существенному изменению экспрессии интерлейкинов (IL-1 β , IL-8). Механизм действия пробиотиков на различные иммунные маркеры, в первую очередь, связан со стимуляцией неспецифического иммунного ответа и выработкой иммунокомпетентными клетками (макрофагами, лимфоцитами) цитокинов (Firdaus-Nawi, Zamri-Saad, 2016). Оценка профиля экспрессии про- и противовоспалительных факторов в кишечнике, является результативным методом, позволяющим с минимальными затратами подтвердить эффективность иммуномодулирующего действия изучаемого микроорганизма.

Гематологические и биохимические показатели крови

В отобранных статьях действие пробиотиков на гематологические и биохимические показатели было менее выраженным по сравнению с другими категориями параметров. Количество работ, в которых данные параметры достоверно отличались от контроля, составили 9 и 6 публикаций (52.9 и 37.5% соответственно). Возможно, низкий эффект на гематологию и биохимию крови связан со специфичным взаимодействием пробиотиков именно с лимфоидными тканями слизистых. Помимо этого, стоит отметить, что продолжительность кормления, при которой установлен положительный эффект на данные показатели, составляла более 60 сут. Кроме того, ранее уже было показано, что пробиотики оказывают различные эффекты на гематологические параметры рыб, в зависимости от применяемой концентрации (Грозеску и др., 2009; Jahan et al., 2021). В публикациях действие пробиотиков на рыб преимущественно оценивалось по следующим гематологическим показателям: количество лейкоцитов (WBC) и эритроцитов (RBC), содержание гемоглобина (Hb) и сопутствующие параметры (Hc, MCV, MCH, MCHC), кроме этого, исследователями подсчитывалось относительное число клеток лейкоцитарного ряда. В подавляющем большинстве исследований применение пробиотиков оказывало значительное влияние лишь на несколько гематологических показателей. В частности, в работе на сибирском осетре (*Acipenser baerii*) поликомпонентный пробиотик приводил только к увеличению относительного числа нейтрофилов и количества эритроцитов (Shekarabi et al., 2022). Клеточный состав крови белуги, получавшей два автохтонных штамма пробиотиков, также существенно не изменялся (Yeganeh Rastekenari et al., 2021). При этом положительное действие пробиотика было зафиксировано в работе на тилапии (Eissa et al., 2023), где группа рыб, получавшая корма со штаммом *Pediococcus acidilactici* CNCM I-4622, продемонстрировала значимое увеличение числа лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов. Подобный эффект, помимо этого, отмечался при применении *Bacillus amyloliquefaciens* (Reda, Selim, 2015) и коммерческого состава pH FIXER® (Tabassum et al., 2021).

Гистоморфометрические параметры и методы их измерения

Раскрывая механизмы взаимодействия пробиотика и слизистой оболочки хозяина, гистоморфометрический анализ дает возможность

оценить эффективность пробиотиков. При этом, неоднозначный эффект действия пробиотиков требует дальнейшего совершенствования морфометрических методов.

Всего в разных исследованиях анализировалось до 30 различных гистохимических параметров. Среди них лишь 16 применялись более трех раз. Они могут быть объединены в следующие группы: характеризующие морфологию ворсинок кишечника (высота, ширина, площадь, количество, высота эпителиоцитов, глубина крипты); характеризующие морфологию слоев/оболочек, слагающих кишечник (толщина/площадь подслизистого, мускульного и серозного слоев); отражающие состав иммунокомпетентных клеток (количество интраэпителиальных лимфоцитов, лимфоцитов собственной слизистой оболочки, количество эозинофильных гранулоцитов); характеризующее микроворсинки слизистой кишечника (высота, площадь микроворсинок, высота щетиночной каймы); характеризующие морфологию бокаловидных клеток (количество, площадь). Наиболее часто используемые в работах морфометрические параметры приведены на рис. 7. Полный список параметров, а также частота их использования приведены в табл. 2.

Методы измерения морфометрических параметров у разных авторов существенно варьировались. Исходя из приведенных в публикациях описаний, а также данных других авторов, были сформированы обобщенные методы измерений гистоморфометрических показателей кишечника, приведенные ниже. В целом все оцениваемые показатели можно отнести к трем категориям: высота/толщина тканевой структуры (высота эпителии, толщина мускульного слоя), площадь клетки или морфофункциональной единицы (площадь бокаловидных клеток) и встречаемость клеток (интраэпителиальных лимфоцитов, бокаловидных клеток) (Hassan et al., 2020; Nikiforov-Nikishin et al., 2022b; Hossain et al., 2022; Kochetkov et al., 2023).

Первоначально для измерений просматривается от 10 до 20 случайных полей зрения препарата (Nakandakare et al., 2013; Batista et al., 2016). Для измерений выбираются ворсинки без артефактов фиксации и проводки (Lee et al., 2017; Boonanuntanasarn et al., 2019).

Высоту ворсинки измеряют на 10 самых длинных складках слизистой, при этом измерения проводят от основания до верхней части, следуя всем изгибам (Pirarat et al., 2011; Aziza et al., 2014; Abdel-Aziz et al., 2020). Основанием ворсинки считают границу собственной оболочки слизистой и подслизистого или мускульного

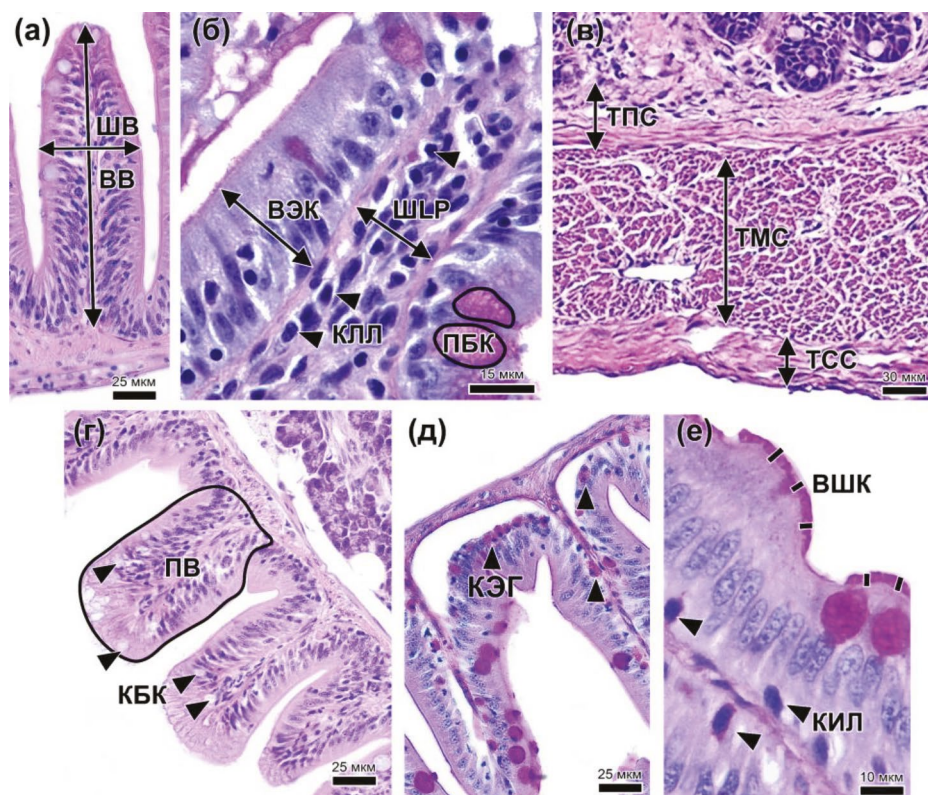


Рис. 7. Гистоморфометрические параметры, наиболее часто используемые в работах: характеризующие морфологию ворсинок кишечника (а, г); характеризующие морфологию бокаловидных клеток (б, г); отражающие состав иммунокомпетентных клеток (б, д, е); характеризующие морфологию слоев/оболочек, слагающих кишечник (в); характеризующие микроворсинки слизистой кишечника (е). Сокращения: ШВ — ширина ворсинок; ВВ — высота ворсинок; ВЭК — высота эпителиоцитов кишечника; КЛЛ — количество лимфоцитов собственной слизистой оболочки; ПБК — площадь бокаловидных клеток; ТПС — толщина подслизистой оболочки; ТМС — толщина мускульного слоя; ТСС — толщина серозного слоя; ПВ — площадь ворсинки; КБК — количество бокаловидных клеток; КЭГ — количество эозинофильных гранулоцитов; ВШК — высота щетиночной каймы; КИЛ — количество интраэпителиальных лимфоцитов (по: Nikiforov-Nikishin et al. 2022b; Kochetkov et al., 2023).

слоя (Al-Deriny et al., 2020). Толщина ворсинки измеряется на средней части путем проведения линии, перпендикулярной плоскости складки и проходящей от одного края щеточной каймы микроворсинок до другого (Kuebutornye et al., 2020). Согласно (Nimalan et al., 2023) измерения на каждой ворсинке необходимо проводить на шести различных участках, так как ширина ворсинок изменяется по высоте. Высоту адсорбирующего эпителия измеряют путем проведения линии, перпендикулярной плоскости собственной пластинки слизистой и плоскости щеточной каймы микроворсинок (Abid et al., 2013).

Плотность ворсинок определяется как соотношение между общим количеством ворсинок, представленных в каждом срезе/участке среза, и площадью среза/участка (мм^2) (Ramos et al., 2017b). При этом сросшиеся ворсинки рассма-

тривались как единое целое, так как высокая степень слияния приводит к снижению плотности ворсинок.

Количество интраэпителиальных лимфоцитов, лимфоцитов собственной слизистой оболочки, эозинофильных гранулоцитов и бокаловидных клеток подсчитывается либо в области одной ворсинки (Samanya, Yamauchi, 2002; Cerezuela et al., 2012; Abdel-Aziz et al., 2020), либо на определенной площади слизистой — 100 мкм^2 (Standen et al., 2015; Adeoye et al., 2016), 1 мм^2 (Al-Deriny et al., 2020) или 100 мм (Standen et al., 2016; Nikiforov-Nikishin et al., 2023). Количество эозинофильных гранулоцитов подсчитывается в области собственной пластинки слизистой, так как данные клетки наиболее часто обнаруживаются в ней (Picchietti et al., 2009; Pirarat et al., 2011).

Толщину слоев кишечника (подслизистый, мускульный, серозный) измеряют на участках среза без артефактов с четко просматриваемыми границами оболочек (Kuebutornye et al., 2020; Hossain et al., 2024). Для измерения проводят линию, параллельную направлению ворсинок, идущую от внешней границы слоя до внутренней (Ramos et al., 2015). Измерение толщины собственной пластинки слизистой (*lamina propria*) проводят путем проведения линии, перпендикулярной плоскости ворсинки (Milián-Sorribes et al., 2021). Для измерений выбирают участки слизистой без искривлений ворсинок.

Площадь адсорбции рассчитывают следующим образом (Adeshina et al., 2020): площадь всасывания (см²) = длина ворсинок (см) × ширина ворсинок (см). Функциональную площадь поверхности оценивают путем измерения внутреннего периметра (*IP*) поверхности слизистой и внешнего периметра (*EP*) кишечника, чтобы рассчитать соотношение периметров (*PR*) (произвольная единица: AU) следующим образом: коэффициент периметра $PR = IP / EP$ (Dimitroglou et al., 2009).

Частота использования и действие пробиотиков на гистоморфометрические показатели

Количество используемых одновременно в работе морфометрических параметров изменялось. В частности, наиболее часто исследователи измеряли 3 и 4 параметра (28.1 и 26.5%). Статей, в которых проводилось измерение 5 или 2 параметров, было существенно меньше (15.6 и 17.1%). Наибольшее число параметров ($n = 7$) было измерено в работе (Adeoye et al., 2016), где изучалось влияние пробиотической добавки Sanolife PRO-F® на тиллапию, а также в исследовании (Cerezuela et al., 2012), где оценивалось действие пробиотика *Bacillus subtilis* CECT 35 на *Sparus aurata*. Также в двух публикациях использовалось 6 морфометрических параметров (Milián-Sorribes et al., 2021; Nikiforov-Nikishin et al., 2022a).

Отдельно стоит отметить исследование (Nimalan et al., 2023), где было изучено индивидуальное и совместное применение двух штаммов *Lactobacillus plantarum* R2 (CCM 8674) и *L. fermentum* R3 (CCM 8675), в котором помимо морфометрических параметров кишечника производилось измерение площади и количества мукоидных клеток на эпителии кожи и жабр рыбы.

Среди гистоморфометрических параметров кишечника наиболее часто применялись следующие показатели: высота ворсинок кишечника (ВВ; $n = 54$), ширина ворсинок (ШВ; $n = 30$),

количество бокаловидных клеток на слизистой (КБК; $n = 27$), толщина мускульного слоя (ТМС; $n = 21$), площадь ворсинки (ПВ; $n = 13$), высота эпителиоцитов кишечника (ВЭК; $n = 11$), количество интраэпителиальных лейкоцитов (КИЛ; $n = 9$) (рис. 8). Другие морфометрические параметры использовались не более, чем в 8 работах. Так, измерение ширины собственной слизистой оболочки (ШСО) производилось лишь в 4 работах, а подсчет количества эозинофильных гранулоцитов — в 3 (КЭГ).

Стоит упомянуть, что морфометрический параметр “глубина крипт” является не совсем верным, так как у большинства рыб в кишечнике отсутствуют крипты, как у высших позвоночных, и более корректно было бы называть данный параметр “глубиной складок слизистой”.

Гистологические параметры значимо реагировали на использование пробиотиков в кормах для рыб. Так, высота ворсинок и количество бокаловидных клеток достоверно отличались от показателей контроля в 83.3 и 70.3% работ ($n = 45, 19$). Схожие данные установлены для площади ворсинок ($n = 11$; 84.6%). Меньшее действие исследуемые препараты оказывали на показатели ширины ворсинок и толщины мускульного слоя — 63.3 и 42.8% ($n = 19, 9$). Параметры количества интраэпителиальных лимфоцитов и высоты эпителиоцитов слизистой кишечника значимо превосходили контрольные значения в 63.6 и 66.7% исследований ($n = 6, 7$). Другие оцениваемые в работах морфометрические параметры обладали различным откликом на действие пробиотиков, однако, низкая частота их использования не позволяет сделать однозначных выводов.

Гистоморфометрические параметры являются важным показателем, позволяющим оценить состояние и структуру тканей кишечника. Пробиотики оказывают влияние на барьерную функцию слизистой и изменяют активность клеток слизистой, стимулируют иммунитет, что можно оценить с помощью количественного измерения тканей. Приведенные выше исследования показывают, что морфометрические параметры кишечника могут являться маркером, отражающим состояние ЖКТ. Гистоморфометрические параметры кишечника представляют собой комплексную основу для оценки структурных, функциональных и иммунологических эффектов пробиотиков на организм рыбы (Elsabagh et al., 2018; Eissa et al., 2022).

Рассматривая используемые гистологические методы, можно отметить, что в наибольшем числе работ для фиксации применялся 10%-ный нейтральный формалин (48.3%;

$n = 30$) (рис. 8б). Также исследователи часто применяли раствор Буэна (19.3%; $n = 12$). В ряде публикаций фиксация ткани выполнялась в 4%-ном нейтральном формалине (12.9%; $n = 8$) и 10%-ном формалине (11.2%; $n = 7$). Фиксирующий раствор играет крайне важную роль в итоговом качестве получаемых срезов ткани. Так, утверждается, что растворы Буэна и Дэвидсона являются наиболее подходящими фиксаторами

для тканей кишечника (Miki et al., 2018). Время фиксации также оказывает существенное влияние на качество гистологических препаратов. В большинстве статей авторами не указывалось время фиксации ткани (61.2%; $n = 38$) (рис. 8в). Наиболее популярным временем фиксации являлись 24 ч (30.6%; $n = 19$). Также в отдельных работах ткань фиксировалась на протяжении 6, 48 ч и 3 дней.

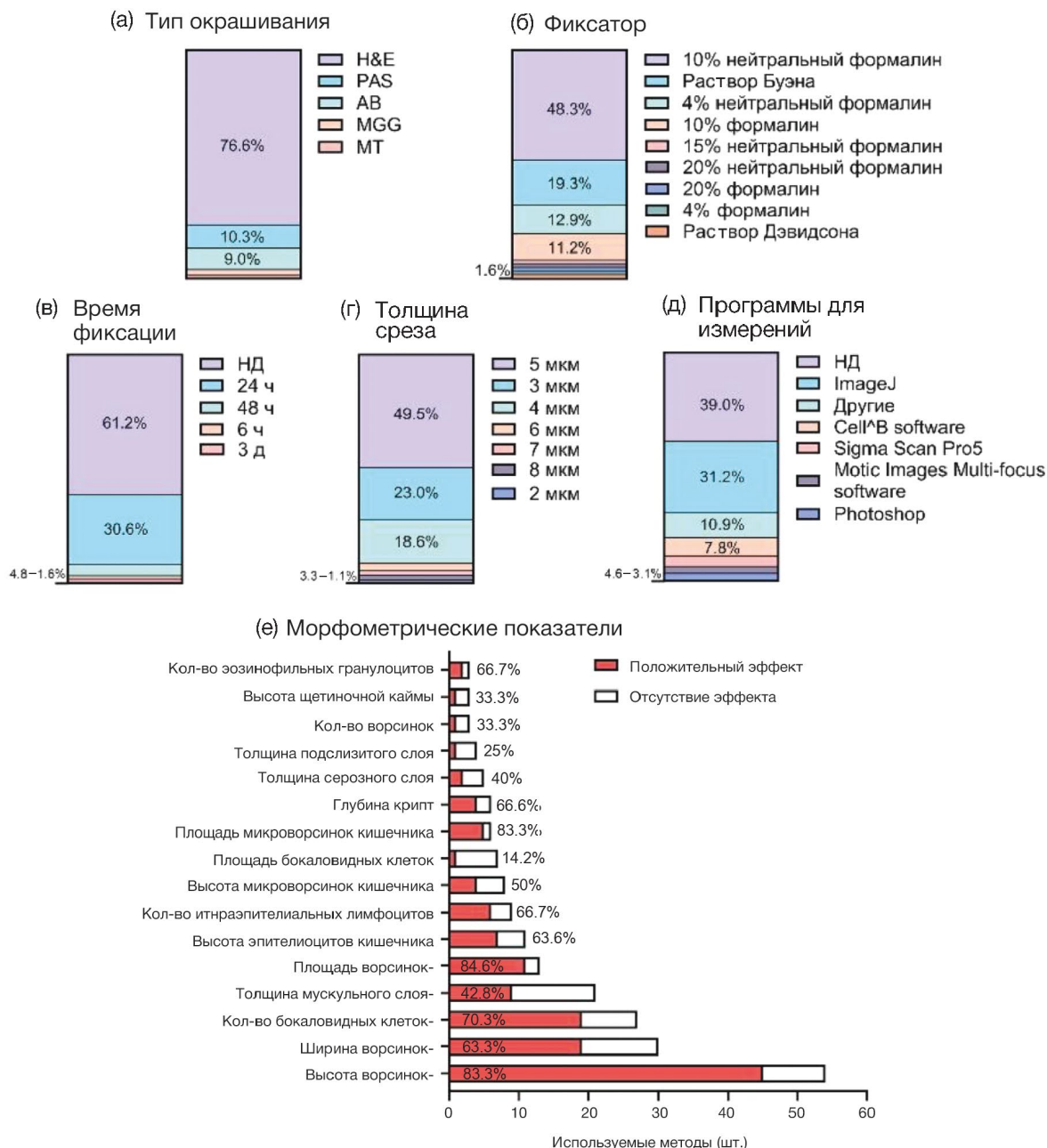


Рис. 8. Количество используемых различных морфометрических показателей кишечника в публикациях и частота фиксации достоверных отличий при применении пробиотика.

В качестве красителей: окраска гематоксилин эозином (H&E) производилось наиболее часто — 76.6% ($n = 59$) (рис. 8а). Периодическая кислота — Шиффа (PAS) использовалась реже (10.3%; $n = 8$). Такие способы окрашивания, как ализариновый синий (AB) и Май-Грюнвальд–Гимза (MGG) употреблялись в 9.0 и 2.6% исследований. Применение специфических красителей при окраске гистологических препаратов позволяет более точно оценивать изменения в клеточных структурах и проводить морфометрические измерения (например, количество и площадь бокаловидных клеток). Так, в работах, где использовалось сразу несколько методов окрашивания (Cerezuola et al., 2012; Abdel-Aziz et al., 2020), авторы измеряли морфометрию аффиных к различным красителям бокаловидных клеток (PAS+, AB+, PAS+ и AB+). Также в ряде публикаций авторами проводилось измерение морфометрических параметров микроворсинок (высота, плотность) энтероцитов с использованием электронной микроскопии (Xia et al., 2018, 2020; Jang et al., 2019; Chouayekh et al., 2023). Использование специфических гистологических красителей позволяет более точно классифицировать тканевые структуры и значительно упрощает процесс их измерения (Ruiz et al., 2020).

Для измерения приведенных морфометрических параметров исследователи наиболее часто применяли программы ImageJ или Fiji ImageJ (31.2%; $n = 20$) (рис. 8д), либо использовали программное обеспечение, предоставляемое производителями цифровых камер для микроскопов (например, Sigma Scan Pro5, Motic Images Multi-focus software, AxioVision 8.4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние 10 лет значительно возросло количество исследований воздействия различных пробиотических препаратов на объекты аквакультуры с совместным применением физиологических, биохимических и гистологических методов. Существенно изменился подход к изучению действия пробиотиков — от их влияния на рыбоводно-биологические показатели до изучения отдельных механизмов взаимодействия пробиотика и микробного сообщества кишечника рыбы. Тиляпия и карповые виды рыб преобладают в работах по изучению пробиотиков. Работы на данных видах рыб выполнялись по всему миру, однако, на КНР и Египет приходится большая их часть, так как там они являются основными объектами выращивания. Наиболее достоверные результаты были получены при применении родов микроорганизмов *Bacillus* и *Lactobacillus*, по причине простоты их культи-

вации и выделения из окружающей среды. На данный момент исследователи изучают либо уникальные автохтонные штаммы, выделенные из рыбы, либо комплексные пробиотические препараты, включающие несколько видов микроорганизмов. При этом стоит учитывать, что различные штаммы одного вида микроорганизмов, могут оказывать различное воздействие на организм рыбы. Наиболее популярным среди исследователей сроком внесения пробиотиков можно считать 60–90 сут. Предполагается, что именно длительность кормления пробиотиками позволяет реализовать весь комплекс ответных физиологических реакций рыбы (Текебаева и др., 2020).

Рассмотренные в рамках обзора исследования дают хорошее представление о взаимодействии желудочно-кишечного тракта рыбы с пробиотическими микроорганизмами. Многие авторы из приведенных работ применяют целый спектр методов для определения эффективности тех или иных пробиотических микроорганизмов, что представляется наиболее фундаментальным подходом. При этом применяющие небольшой набор методов исследования также представляют существенный интерес, так как являются источником информации для отбора перспективных штаммов/видов пробиотиков. Помимо этого, такие работы дают общее представление о действии пробиотиков на менее популярные объекты выращивания. Приведенные в публикациях результаты демонстрируют разный эффект на ряд физиологических показателей. В частности, пробиотики в большинстве статей оказывали значимое воздействие на рыбоводно-биологические показатели, активность пищеварительных ферментов, микробиом кишечника, экспрессию генов, ассоциированных с иммунитетом, а также сопротивляемость к патогенам. При этом было выявлено, что пробиотики в большинстве случаев не оказывают влияния на нутриентный состав тканей, гематологические, биохимические и иммунологические показатели.

Гистологические и гистоморфометрические показатели, к сожалению, часто остаются за рамками исследований, так, из 200 публикаций о воздействии пробиотиков на объекты аквакультуры, только в 64 детально изучалось их влияние на тканевые клеточные структуры ЖКТ, в то время как морфометрический анализ позволяет сопоставить физиологические изменения с реакцией отдельных клеток и тканей пищеварительной системы, что важно для понимания механизмов взаимодействия в оси пробиотик–микробиом–кишечник (Shefat et al., 2018).

Определение механизмов действия пробиотиков на те или иные физиологические параме-

тры представляется непростой задачей. Использование комплексного подхода, при котором проводится изучение целого ряда параметров на разном уровне организации организма (организменном, тканевом, клеточном, молекулярном) является универсальным инструментом изучения фундаментальных закономерностей взаимодействия живых систем. Приведенные в работе данные подтверждают комплексность взаимосвязи между пробиотиком и хозяином, а также необходимость проведения обсервационных исследований по оценке возможности применения пробиотиков в аквакультуре, и работ, направленных на установление механизмов действия пробиотических бактерий на организм хозяина. Как указывается в работе (López Nada et al., 2023), шаги в сторону обсервационных и экспериментальных научных исследований с интегративным взглядом, сочетающих наборы данных физиологических показателей с методами визуализации для понимания сложных многофакторных биологических процессов, таких как здоровье кишечника рыбы, могут помочь исследователям оценить эффективность новых кормов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование было выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-16-00123.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н., Ходак А.Г. и др. Суб-про — путь к улучшению качества рыбной продукции // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2008. №12. С. 33–35.
- Гистопатология костистых рыб / Ред. К.В. Гаврилин, Д.Л. Никифоров-Никишин, Н.И. Кочетков, Р.В. Смодинская. КурРк: ИП Бескровный А.А., 2023. 200 с. ISBN 978-5-605-14039-9.
- Грозеску Ю.Н., Бахарева А.А., Шульга Е.А. Биологическая эффективность применения пробиотика субтилис в составе стартовых комбикормов для осетровых рыб // Изв. Самарского науч. центра РАН. 2009. V. 11 (1–2). Р. 42–45.
- Зуева М.Р. Современный опыт включения биологически активных кормовых добавок в рацион рыб // Животноводство и кормопроизводство. 2022. Т. 105 (4). С. 146–164.
- Климов В.А., Никифоров-Никишин Д.Л., Кочетков Н.И. и др. Формирование качества получаемой рыбопродукции из радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) за счет применения кормов с хелатным соединениями микроэлементов и каротиноидов // Вестн. Керченского гос. морского технол. ун-та. 2023. Т. 2. С. 76–86.
<https://doi.org/10.26296/2619-0605.2023.2.2.007>
- Текебаева Ж.Б., Шахабаева Г.С., Сармурзина З.С. и др. Пробиотики и их применение в аквакультуре // Новости науки Казахстана. 2020. № 4. Р. 170–185.
- Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И. Испытания лечебного комбикорма с субалином в рыбхозах Московской области // Рыбное хозяйство. 2012. V. 1 (4). Р. 96–98.
- Abdel-Aziz M., Bessat M., Fadel A. et al. Responses of dietary supplementation of probiotic effective microorganisms (EMs) in *Oreochromis niloticus* on growth, hematological, intestinal histopathological, and antiparasitic activities // Aqua. Internat. 2020. V. 28. P. 947–963.
- Abid A., Davies S.J., Waines P. et al. Dietary synbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmo salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity // Fish Shellfish Immunol. 2013. V. 35 (6). P. 1948–1956.
- Adeoye A.A., Yomla R., Jaramillo-Torres A. et al. Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome // Aquaculture. 2016. V. 463. P. 61–70.
- Aadeshina I., Abubakar M.I.O., Ajala B.E. Dietary supplementation with *Lactobacillus acidophilus* enhanced the growth, gut morphometry, antioxidant capacity, and the immune response in juveniles of the common carp, *Cyprinus carpio* // Fish Physiol. Biochem. 2020. V. 46 (4). P. 1375–1385.
- Akter M.N., Hashim R., Sutriana A. et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation on growth performances, digestive enzyme activities and gut histomorphology of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878) juveniles // Aqua. Res. 2019. V. 50 (3). P. 786–797.
- Al-Deriny S.H., Dawood M.A., Abou Zaid A.A. et al. The synergistic effects of *Spirulina platensis* and *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal histomorphology, and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) // Aqua. Rep. 2020. V. 17. P. 100390.
- Allameh S.K., Ringø E., Yusoff F.M. et al. Dietary supplement of *Enterococcus faecalis* on digestive enzyme activities, short-chain fatty acid production, immune system response and disease resistance of Javanese carp (*Puntius gonionotus*, Bleeker 1850) // Aqua. Nutrition. 2017. V. 23 (2). P. 331–338.
- Amoah K., Dong X.H., Tan B.P. et al. Effects of three probiotic strains (*Bacillus coagulans*, *B. licheniformis* and *Paenibacillus polymyxa*) on growth, immune response, gut morphology and microbiota, and resistance against *Vibrio harveyi* of northern whittings, *Sillago sihama* Forss-

- kál (1775) // Anim. Feed Sci. Technol. 2021. V. 277. P. 114958.
- Assan D., Kuebutornye F.K.A., Hlordzi V. et al. Effects of probiotics on digestive enzymes of fish (finfish and shellfish); status and prospects: a mini review // Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol. 2022. V. 257. P. 110653.
- Aziza A.E., Awadin W.F., Quezada N. et al. Gastrointestinal morphology, fatty acid profile, and production performance of broiler chickens fed camelina meal or fish oil // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2014. V. 116 (12). P. 1727–1733.
- Barišić J., Marijić V.F., Mijošek T. et al. Evaluation of architectural and histopathological biomarkers in the intestine of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) challenged with environmental pollution // Sci. Tot. Environ. 2018. V. 642. P. 656–664.
- Barroso C., Ozorio R.O., Afonso A. et al. Immune responses and gut morphology in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fed dietary probiotic supplementation and following exposure to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* // Aqua. Res. 2016. V. 47 (3). P. 951–960.
- Batista S., Medina A., Pires M.A. et al. Innate immune response, intestinal morphology and microbiota changes in Senegalese sole fed plant protein diets with probiotics or autolysed yeast // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100 (16). P. 7223–7238.
- Batista S., Ramos M.A., Cunha S. et al. Immune responses and gut morphology of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) fed monospecies and multispecies probiotics // Aqua. Nutr. 2015. V. 21 (5). P. 625–634.
- Beltrán J.M.G., Esteban M.Á. Nature-identical compounds as feed additives in aquaculture // Fish Shellfish Immunol. 2022. V. 123. P. 409–416.
- Bernet D., Schmidt H., Meier W. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution // J. Fish Dis. 1999. V. 22 (1). P. 25–34.
- Bron P.A., Van Baarlen P., Kleerebezem M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa // Nat. Rev. Microbiol. 2012. V. 10 (1). P. 66–78.
- Biology, conservation and sustainable development of sturgeons / Eds. R. Carmona, A. Domezain, M. García-Gallego et al. Netherlands: Springer, 2009. V. 468.
- Boonanuntanasarn S., Dittab K., Jangprai A. et al. Effects of microencapsulated *Saccharomyces cerevisiae* on growth, hematological indices, blood chemical, and immune parameters and intestinal morphology in striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* // Prob. Antimicrob. Prot. 2019. V. 11. P. 427–437.
- Buddington R.K., Kroghdahl A., Bakke-McKellep A.M. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet // Acta Physiol. Scandinavica. Suppl. 1997. V. 638. P. 67–80.
- Büyükdavacı M.E., Cengizler İ., Balcázar J.L. et al. Effects of two host-associated probiotics *Bacillus mojavensis* B191 and *Bacillus subtilis* MRS11 on growth performance, intestinal morphology, expression of immune-related genes and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus iniae* // Dev. Comp. Immunol. 2023. V. 138. P. 104553.
- Canedo A., de Jesus L.W.O., Bailão E.F.L.C. et al. Micro-nucleus test and nuclear abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): past, present, and future trends // Environ. Poll. 2021. V. 290. P. 118019.
- Castañeda-Monsalve V.A., Junca H., García-Bonilla E. et al. Characterization of the gastrointestinal bacterial microbiome of farmed juvenile and adult white Cachama (*Piaractus brachipomus*) // Aquaculture. 2019. V. 512. P. 734325.
- Cerezuela R., Fumanal M., Tapia-Paniagua S.T. et al. Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae // Cell Tiss. Res. 2012. V. 350. P. 477–489.
- Chen X., Xie J., Liu Z. et al. Modulation of growth performance, non-specific immunity, intestinal morphology, the response to hypoxia stress and resistance to *Aeromonas hydrophila* of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by dietary supplementation of a multi-strain probiotic // Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol. 2020. V. 231. P. 108724.
- Chouayekh H., Mohamed R., Moustafa E.M. et al. Effects of dietary supplementation with *Bacillus amyloliquefaciens* US573 on intestinal morphology and gut microbiota of European sea bass // Prob. Antimicrob. Prot. 2023. V. 15 (1). P. 30–43.
- Darafsh F., Soltani M., Abdolhay H.A. et al. Improvement of growth performance, digestive enzymes and body composition of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) following feeding on probiotics: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae* // Aqua. Res. 2020. V. 51 (3). P. 957–964.
- Dimitroglou A., Merrifield D.L., Moate R. et al. Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) // J. Anim. Sci. 2009. V. 87 (10). P. 3226–3234.
- Eissa E.S.H., Baghdady E.S., Gaafar A.Y. et al. Assessing the influence of dietary *Pediococcus acidilactici* probiotic supplementation in the feed of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Linnaeus, 1758) on farm water quality, growth, feed utilization, survival rate, body composition, blood biochemical parameters, and intestinal histology // Aqua. Nutr. 2022. V. 2022. P. 1–11.
- Eissa M.E.H., Alaryani F.S., Elbahnasw S. et al. Dietary inclusion of *Pediococcus acidilactici* probiotic promoted the growth indices, hemato-biochemical indices, enzymatic profile, intestinal and liver histomorphology, and resistance of Nile tilapia against *Aspergillus flavus* // Anim. Feed Sci. Technol. 2023. V. 306. P. 115814.
- Elias H., Hyde D.M. An elementary introduction to stereology (quantitative microscopy) // Am. J. Anatol. 1980. V. 159 (4). P. 411–446.
- Elsabagh M., Mohamed R., Moustafa E.M. et al. Assessing the impact of *Bacillus* strains mixture probiotic on water quality, growth performance, blood profile and intestinal morphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* // Aqua. Nutr. 2018. V. 24 (6). P. 1613–1622.

- El-Sayed A.F.M., Fitzsimmons K. From Africa to the world—The journey of Nile tilapia // *Rev. Aquacult.* 2023. V. 15. P. 6–21.
- El-Son M.A.M., Elshopakey G.E., Rezk S. et al. Dietary mixed *Bacillus* strains promoted the growth indices, enzymatic profile, intestinal immunity, and liver and intestinal histomorphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* // *Aqua. Rep.* 2022. V. 27. P. 101385.
- Falaye A., Emikpe B., Ogundipe E. Influence of *Lactobacillus plantarum* supplemented diet on growth response, gut morphometry and microbial profile in gut of *Clarias gariepinus* fingerlings // *J. Coastal Life Med.* 2016. V. 4 (8). P. 597–602.
- Fang C., Ma M., Ji H. et al. Alterations of digestive enzyme activities, intestinal morphology and microbiota in juvenile paddlefish, *Polyodon spathula*, fed dietary probiotics // *Fish Physiol. Biochem.* 2015. V. 41. P. 91–105.
- FAO. 2022. The state of world fisheries and aquaculture 2022. Towards blue transformation. Rome, 2022. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Feng T., Wang J. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review // *Gut Microbes.* 2020. V. 12 (1). P. 1801944.
- Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature // *Int. J. Environ. Res. Publ. Health.* 2014. V. 11 (5). P. 4745–4767.
- Firdaus-Nawi M., Zamri-Saad M. Major components of fish immunity: a review // *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 2016. V. 39 (4). P. 393–420.
- Ford J.S., Myers R.A. A global assessment of salmon aquaculture impacts on wild salmonids // *PLoS Biol.* 2008. V. 6 (2). P. e33.
- Gisbert E., Castillo M., Skalli A. et al. *Bacillus cereus* var. *toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings // *J. Anim. Sci.* 2013. V. 91 (6). P. 2766–2774.
- González-Félix M.L., Gatlin III D.M., Urquidez-Bejarano P. et al. Effects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth, innate immune responses, and intestinal microbiota and histology of *Totoaba macdonaldi* // *Aquaculture.* 2018. V. 491. P. 239–251.
- Hamidian G., Zirak K., Sheikhzadeh N. et al. Intestinal histology and stereology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) administrated with nanochitosan/zeolite and chitosan/zeolite composites // *Aqua. Res.* 2018. V. 49 (5). P. 1803–1815.
- Han B., Bao N., Ren T. et al. Effects of dietary *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunological parameters, intestinal morphology and resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections // *Fish Shellfish Immunol.* 2015. V. 46 (2). P. 225–231.
- Haraz Y.G., Shourbela R.M., El-Hawarry W.N. et al. Performance of juvenile *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) raised in conventional and biofloc technology systems as influenced by probiotic water supplementation // *Aquaculture.* 2023. V. 566. P. 739180.
- Hassan R., Akter F., Uddin M.A. et al. Intestinal morphology of Thai pangas (*Pangasianodon hypophthalmus*) under probiotic supplemented conditions // *Bangladesh J. Fish.* 2020. V. 32 (2). P. 229–236.
- Hill C., Guarner F., Reid G. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014. V. 11 (8). P. 506–514.
- Hossain M.K., Hossain M.M., Mim Z.T. et al. Multi-species probiotics improve growth, intestinal microbiota and morphology of Indian major carp mrigal *Cirrhinus cirrhosus* // *Saudi J. Biol. Sci.* 2022. V. 29 (99). P. 103399.
- Hossain M.K., Ishak S.D., Iehata S. et al. Growth performance, fatty acid profile, gut, and muscle histomorphology of Malaysian mahseer, *Tor tambroides* post larvae fed short-term host associated probiotics // *Aqua. Fish.* 2024. V. 9 (1). P. 35–45.
- Ismail M., Wahdan A., Yusuf M.S. et al. Effect of dietary supplementation with a synbiotic (Lacto Forte) on growth performance, haematological and histological profiles, the innate immune response and resistance to bacterial disease in *Oreochromis niloticus* // *Aqua. Res.* 2019. V. 50 (9). P. 2545–2562.
- Jahan N., Islam S.M., Rohani M.F. et al. Probiotic yeast enhances growth performance of rohu (*Labeo rohita*) through upgrading hematology, and intestinal microbiota and morphology // *Aquaculture.* 2021. V. 545. P. 737243.
- Jang W.J., Lee J.M., Hasan M.T. et al. Effects of probiotic supplementation of a plant-based protein diet on intestinal microbial diversity, digestive enzyme activity, intestinal structure, and immunity in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) // *Fish Shellfish Immunol.* 2019. V. 92. P. 719–727.
- Kalantarian S., Mirzargar S.S., Rahmati-Holasoo H. et al. Effects of oral administration of acidifier and probiotic on growth performance, digestive enzymes activities and intestinal histomorphology in *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877) // *Iran. J. Fish. Sci.* 2020. V. 19 (3). P. 1532–1555.
- Kochetkov N., Smorodinskaya S., Vatlin A. et al. Ability of *Lactobacillus brevis* 47f to alleviate the toxic effects of imidacloprid low concentration on the histological parameters and cytokine profile of zebrafish (*Danio rerio*) // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24 (15). P. 12290.
- Kryvi H., Eide A. Morphometric and autoradiographic studies on the growth of red and white axial muscle fibres in the shark *Etmopterus spinax* // *Anatom. Embryol.* 1977. V. 151. P. 17–28.
- Kuebutornye F.K.A., Wang Z., Lu Y. et al. Effects of three host-associated *Bacillus* species on mucosal immunity and gut health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and its resistance against *Aeromonas hydrophila* infection // *Fish Shellfish Immunol.* 2020. V. 97. P. 83–95.
- La Fata G., Weber P., Mohajeri M.H. Probiotics and the gut immune system: indirect regulation // *Prob. Antimicrob. Prot.* 2018. V. 10. P. 11–21.
- Langlois L., Akhtar N., Tam K.C. et al. Fishing for the right probiotic: host–microbe interactions at the interface of effective aquaculture strategies // *FEMS Microbiol. Rev.* 2021. V. 45 (6). P. fuab030.

- Lai S., Yu W., Wallace L. et al. Intestinal muscularis propria increases in thickness with corrected gestational age and is focally attenuated in patients with isolated intestinal perforations // J. Pediatr. Surg. 2014. V. 49 (1). P. 114–119.
- Lauzon H.L., Ringø E. Prevalence and application of lactic acid bacteria in aquatic environments // Lactic Acid Bacteria. Microbiological and functional aspects, 4th ed. Boca Raton, FL.: CRC press, 2012. P. 593–631.
- Lazado C.C., Caipang C.M.A. Mucosal immunity and probiotics in fish // Fish Shellfish Immunol. 2014. V. 39 (1). P. 78–89.
- Lee S., Katya K., Park Y. et al. Comparative evaluation of dietary probiotics *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 on the growth performance, immunological parameters, gut morphology and disease resistance in Japanese eel, *Anguilla japonica* // Fish Shellfish Immunol. 2017. V. 61. P. 201–210.
- Li X., Ringø E., Hoseinifar S.H. et al. The adherence and colonization of microorganisms in fish gastrointestinal tract // Rev. Aquacult. 2019. V. 11 (3). P. 603–618.
- Li Z., Bao N., Ren T. et al. The effect of a multi-strain probiotic on growth performance, non-specific immune response, and intestinal health of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L // Fish Physiol. Biochem. 2019. V. 45. P. 1393–1407.
- Lin Y.H., Lin S.M., Shiau S.Y. Dietary manganese requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* // Aquaculture. 2008. V. 284 (1–4). P. 207–210.
- Liu C.H., Chiu C.H., Wang S.W. et al. Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides* // Fish Shellfish Immunol. 2012. V. 33 (4). P. 699–706.
- Liu Q., Wen L., Pan X. et al. Dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecalis* can effectively improve the growth performance, immunity, and resistance of tilapia against *Streptococcus agalactiae* // Aqua. Nutr. 2021. V. 27 (4). P. 1160–1172.
- Llewellyn M.S., Kumar P., Sivachandran P. et al. Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries // Front. Microbiol. 2014. V. 5. P. 81340.
- López Nadal A., Boekhorst J., Lute C. et al. Omics and imaging combinatorial approach reveals butyrate-induced inflammatory effects in the zebrafish gut // Anim. Microbiome. 2023. V. 5 (1). P. 15.
- Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview) // Fish Shellfish Immunol. 2006. V. 20 (2). P. 137–151.
- Martin F.D., Malloy R. Histologic and morphometric criteria for assessing nutritional state in larval striped bass, *Morone saxatilis* // Proc. 4th Annual Larval Fish Workshop. 1980. P. 157–161.
- Martínez Cruz P., Ibáñez A.L., Monroy Hermosillo O.A. et al. Use of probiotics in aquaculture // Int. School. Res. Not. 2012. V. 2012.
- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A. et al. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids // Aquaculture. 2010. V. 302 (1–2). P. 1–18.
- Miki M., Ohishi N., Nakamura E. et al. Improved fixation of the whole bodies of fish by a double-fixation method with formalin solution and Bouin's fluid or Davidson's fluid // J. Toxicol. Pathol. 2018. V. 31 (3). P. 201–206.
- Milián-Sorribes M.C., Martínez-Llorens S., Cruz-Castellón C. et al. Effect of fish oil replacement and probiotic addition on growth, body composition and histological parameters of yellowtail (*Seriola dumerili*) // Aqua. Nutr. 2021. V. 27 (1). P. 3–16.
- Mokhtar D.M., Zaccane G., Alesci A. et al. Main components of fish immunity: an overview of the fish immune system // Fishes. 2023. V. 8 (2). P. 93.
- Moroni F., Naya-Català F., Piazzon M.C. et al. The effects of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain used as probiotic on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, gut microbiota, and transcriptional response // Front. Marine Sci. 2021. V. 8. P. 659519.
- Natnan M.E., Low C.F., Chong C.M. et al. Integration of omics tools for understanding the fish immune response due to microbial challenge // Front. Marine Sci. 2021. V. 8. P. 668771.
- Nakandakare I.B., Iwashita M.K.P., Dias D.D.C. et al. Growth performance and intestinal histomorphology of Nile tilapia juveniles fed probiotics // Acta Sci. Anim. Sci. 2013. V. 35. P. 365–370.
- Nayak S.K. Probiotics and immunity: a fish perspective // Fish Shellfish Immunol. 2010. V. 29 (1). P. 2–14.
- Naylor R.L., Hardy R.W., Buschmann A.H. et al. A 20-year retrospective review of global aquaculture // Nature. 2021. V. 591 (7851). P. 551–563.
- Nikiforov-Nikishin A., Nikiforov-Nikishin D., Kochetkov N. et al. The influence of probiotics of different microbiological composition on histology of the gastrointestinal tract of juvenile *Oncorhynchus mykiss* // Microsc. Res. Techn. 2022a. V. 85 (2). P. 538–547.
- Nikiforov-Nikishin A., Smorodinskaya S., Kochetkov N. et al. Effects of three feed additives on the culturable microbiota composition and histology of the anterior and posterior intestines of Zebrafish (*Danio rerio*) // Animals. 2022b. V. 12 (18). P. 2424.
- Nikiforov-Nikishin D., Kochetkov N., Klimov V. et al. Effects of chelated complexes and probiotics on histological and morphometric parameters of the gastrointestinal tract of juvenile carp (*Cyprinus carpio*) // New Zealand J. Zool. 2023. V. 50 (3). P. 394–405.
- Nimalan N., Sørensen S.L., Fečkaninová A. et al. Supplementation of lactic acid bacteria has positive effects on the mucosal health of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed soybean meal // Aqua. Rep. 2023. V. 28. P. 101461.
- Ntakirutimana R., Syanya F.J., Mwangi P. Exploring the impact of probiotics on the gut ecosystem and morpho-histology in fish: current knowledge of tilapia // Asian J. Fish. Aqua. Res. 2023. V. 25 (3). P. 93–112.
- Nunes A.L., Owatari M.S., Rodrigues R.A. et al. Effects of *Bacillus subtilis* C-3102-supplemented diet on growth, non-specific immunity, intestinal morphometry and resistance of hybrid juvenile *Pseudoplatystoma* sp. challenged with *Aeromonas hydrophila* // Aqua. Internat. 2020. V. 28. P. 2345–2361.

- Oropesa A.L., Jiménez B., Fallola C. et al. Histological alterations on the structure of the excretory renal system in tench (*Tinca tinca*) after exposure to 17- α -ethynylestradiol // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2013. V. 91. P. 623–629.
- Picchietti S., Fausto A.M., Randelli E. et al. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.) // Fish Shellfish Immunol. 2009. V. 26 (3). P. 368–376.
- Pirarat N., Pinpimai K., Endo M. et al. Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG // Res. Vet. Sci. 2011. V. 91 (3). P. e92–e97.
- Poolsawat L., Li X., He M. et al. *Clostridium butyricum* as probiotic for promoting growth performance, feed utilization, gut health and microbiota community of tilapia (*Oreochromis niloticus* $\times$ *O. aureus*) // Aqua. Nutr. 2020. V. 26 (3). P. 657–670.
- Ramos M.A., Batista S., Pires M.A. et al. Dietary probiotic supplementation improves growth and the intestinal morphology of Nile tilapia // Animal. 2017a. V. 11 (8). P. 1259–1269.
- Ramos M.A., Gonçalves J.F.M., Batista S. et al. Growth, immune responses and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) supplemented with commercial probiotics // Fish Shellfish Immunol. 2015. V. 45 (1). P. 19–26.
- Ramos M.A., Gonçalves J.F., Costas B. et al. Commercial *Bacillus* probiotic supplementation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*): growth, immune responses and intestinal morphology // Aqua. Res. 2017b. V. 48 (5). P. 2538–2549.
- Rašković B., Čičovački S., Ćirić M. et al. Integrative approach of histopathology and histomorphometry of common carp (*Cyprinus carpio* L.) organs as a marker of general fish health state in pond culture // Aqua. Res. 2016. V. 47 (11). P. 3455–3463.
- Reda R.M., Selim K.M. Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal morphology, hematology and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* // Aqua. Internat. 2015. V. 23. P. 203–217.
- Ringø E., Zhou Z., Vecino J.G. et al. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? // Aqua. Nutr. 2016. V. 22 (2). P. 219–282.
- Ruiz M.L., Owatari M.S., Yamashita M.M. et al. Histological effects on the kidney, spleen, and liver of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed different concentrations of probiotic *Lactobacillus plantarum* // Trop. Anim. Health Prod. 2020. V. 52. P. 167–176.
- Sadeghi J., Chaganti S.R., Heath D.D. Regulation of host gene expression by gastrointestinal tract microbiota in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) // Mol. Ecol. 2023. V. 32 (15). P. 4427–4446.
- Samanya M., Yamauchi K. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. *natto* // Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol. 2002. V. 133 (1). P. 95–104.
- Saravanan K., Sivaramakrishnan T., Praveenraj J. et al. Effects of single and multi-strain probiotics on the growth, hemato-immunological, enzymatic activity, gut morphology and disease resistance in Rohu, *Labeo rohita* // Aquaculture. 2021. V. 540. P. 736749.
- Sewaka M., Trullas C., Chotiko A. et al. Efficacy of synbiotic Jerusalem artichoke and *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented diets on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology, immune parameters and protection against *Aeromonas veronii* in juvenile red tilapia (*Oreochromis* spp.) // Fish Shellfish Immunol. 2019. V. 86. P. 260–268.
- Shefat S.H.T. Probiotic strains used in aquaculture // Int. Res. J. Microbiol. 2018. V. 7 (2). P. 43–55.
- Shekarabi S.P.H., Zarak K., Sheikhzadeh N. et al. The multi-enzymes and probiotics mixture improves the growth performance, digestibility, intestinal health, and immune response of Siberian sturgeon // Ann. Anim. Sci. 2022. V. 22 (3). P. 1063–1072.
- Simón R., Docando F., Nuñez-Ortiz N. et al. Mechanisms used by probiotics to confer pathogen resistance to teleost fish // Front. Immunol. 2021. V. 12. P. 653025.
- Soliman N.F., Yacout D.M.M. Aquaculture in Egypt: status, constraints and potentials // Aqua. Internat. 2016. V. 24. P. 1201–1227.
- Standen B.T., Peggs D.L., Rawling M.D. et al. Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus* // Fish Shellfish Immunol. 2016. V. 49. P. 427–435.
- Standen B.T., Rodiles A., Peggs D.L. et al. Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 8403–8417.
- Sumon M.A.A., Sumon T.A., Hussain M.A. et al. Single and multi-strain probiotics supplementation in commercially prominent finfish aquaculture: review of the current knowledge // J. Microbiol. Biotechnol. 2022. V. 32 (6). P. 681.
- Tabassum T., Mahamud A.S.U., Acharjee T.K. et al. Probiotic supplementations improve growth, water quality, hematology, gut microbiota and intestinal morphology of Nile tilapia // Aqua. Rep. 2021. V. 21. P. 100972.
- Takagi Y., Yamada J. Effects of calcium and phosphate deficiencies on bone metabolism in a teleost, tilapia (*Oreochromis niloticus*): a histomorphometric study // Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological systems: 'Biomaterialization' 90. Japan: Springer, 1991. P. 187–191.
- Theilacker G.H. Effect of starvation on the histological and morphological characteristics of jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, larvae // Fish. Bull. 1978. V. 76 (2). P. 403–414.
- Troell M., Naylor R.L., Metian M. et al. Does aquaculture add resilience to the global food system? // PNAS USA. 2014. V. 111 (37). P. 13257–13263.

- Wang P., Ji J., Zhang Y. Aquaculture extension system in China: development, challenges, and prospects // Aqua. Rep. 2020. V. 17. P. 100339.
- Wanka K.M., Damerau T., Costas B. et al. Isolation and characterization of native probiotics for fish farming // BMC Microbiol. 2018. V. 18. P. 1–13.
- Won S., Hamidoghli A., Choi W. et al. Effects of *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactococcus lactis* on growth, immune responses, histology and gene expression in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* // Microorganisms. 2016. V. 8 (1).
- Wuertz S., Schroeder A., Wanka K.M. Probiotics in fish nutrition—long-standing household remedy or native nutraceuticals? // Water. 2021. V. 13 (10). P. 1348.
- Xia Y., Lu M., Chen G. et al. Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* // Fish Shellfish Immunol. 2018. V. 76. P. 368–379.
- Xia Y., Wang M., Gao F. et al. Effects of dietary probiotic supplementation on the growth, gut health and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) // Anim. Nutrition. 2020. V. 6 (1). P. 69–79.
- Yang G., Cao H., Jiang W. et al. Dietary supplementation of *Bacillus cereus* as probiotics in Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. *Pengze*): Effects on growth performance, fillet quality, serum biochemical parameters and intestinal histology // Aqua. Res. 2019. V. 50 (8). P. 2207–2217.
- Yeganeh Rastekenari H., Kazami R., Shenavar Masouleh A. et al. Autochthonous probiotics *Lactococcus lactis* and *Weissella confusa* in the diet of fingerlings great sturgeon, *Huso huso*: effects on growth performance, feed efficiency, haematological parameters, immune status and intestinal morphology // Aqua. Res. 2021. V. 52 (8). P. 3687–3695.
- Yukgehnaish K., Kumar P., Sivachandran P. et al. Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish // Rev. Aquacult. 2020. V. 12 (3). P. 1903–1927.
- Zare R., Abedian Kenari A., Yazdani Sadati M. Influence of dietary acetic acid, protexin (probiotic), and their combination on growth performance, intestinal microbiota, digestive enzymes, immunological parameters, and fatty acids composition in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) // Aqua. Internat. 2021. V. 29. P. 891–910.
- Zhang J., Huang M., Feng J. et al. Effects of dietary *Bacillus licheniformis* on growth performance, intestinal morphology, intestinal microbiome, and disease resistance in common carp (*Cyprinus carpio* L.) // Aqua. Internat. 2021. V. 29. P. 1343–1358.

Modern Approaches to Investigating the Effectiveness of Probiotics in Aquaculture

N. I. Kochetkov^{a, b, *}, D. L. Nikiforov-Nikishin^{a, b}, A. A. Klimuk^{a, b}, S. V. Smorodinskaya^{a, b},
A. L. Nikiforov-Nikishin^a, M. V. Marsova^{b, **}, A. A. Vatlin^b, V. A. Klimov^a

^aFaculty of Biotechnology and Fisheries, Moscow State University of Technologies and Management (FCU), Moscow, Russia

^bLaboratory of Bacterial Genetics, Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

*e-mail: samatrixs@gmail.com, **masha_marsova@mail.ru

This review summarizes the available scientific data on the use of probiotics of different microbiological compositions in aquaculture, showing the effects of probiotics at physiological, tissue, and cellular levels, including those assessed by morphometric methods. Additionally, this paper systematizes data on the objects of study, the most commonly used probiotics, their concentrations, and research methods. It was found that the most studied aquaculture species in the use of probiotics are *Oreochromis niloticus* (35.9%), *Oncorhynchus mykiss* (6.2%), and *Cyprinus carpio* (4.6%). Experiments on these species are usually conducted under controlled conditions (pools, aquariums, RAS), and the duration of experiments varied from 20 to 140 days. The most frequently used microorganisms as probiotics are bacteria of the genera *Bacillus* (41.6%) and *Lactobacillus* (24.3%); the remaining 34.1% are other microorganisms of allochthonous or autochthonous origin. In most studies, the effect of probiotics was observed at concentrations of 1×10^6 to 1×10^9 CFU/g feed. Probiotics show varying efficacy, most often positively affecting growth performance, activity of digestive enzymes, gut microbiome, expression of genes associated with immunity, and resistance to pathogens. In most cases, probiotics had no effect on tissue nutrient composition, hematologic, biochemical, and immunologic parameters. Among the histomorphometric methods used when studying probiotics, the most frequently examined indicators are those characterizing the morphology of villi, layers composing the intestine, the composition of immunocompetent cells, microvilli, and goblet cells. The response to probiotic exposure was most often noted in villus height, number of goblet cells, villus area, number of intraepithelial lymphocytes, and microvilli area of intestinal epithelial tissues. Most authors agree on the need to use a systematic approach to study probiotics.

Keywords: probiotics, fish farming, aquaculture, fish biology, physiology, histology