

УДК 504.064.36:579+[639.2+639.31.053.1]:614.3(282.247.33)

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ БАКТЕРИОЦЕНОЗА ИХТИОФАУНЫ В ПРИРОДНЫХ УСЛОВИЯХ И В АКВАКУЛЬТУРЕ НИЖНЕГО ДОНА

Морозова М.А., Мирзоян А.В.

*Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства,
Ростов-на-Дону, e-mail: morozova.q@mail.ru*

В статье приведены результаты бактериологических исследований промысловых видов рыб Нижнего Дона и заводской молоди рыбоводных предприятий Ростовской области: леща, карася, судака, сазана и шемаи. Молодь рыб обследовали перед выпуском в низовье р. Дон. Для анализа использовали пробы воды и образцы мышечной ткани, печени, кишечника, жабр. Объекты промысла оценивали по микробиологическим показателям безопасности рыбного сырья, установленные российским законодательством. Полученные данные свидетельствуют о встречаемости условно-патогенной и санитарно значимой микрофлоры в объектах промысла и искусственного воспроизводства. Большинство штаммов бактерий, ассоциированных с рыбами, обладали маркерами патогенности: гемолизин, лецитиназа, протеаза. В исследуемых гидробионтах доминировали условно-патогенные бактерии семейств Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Pseudomonadaceae. При этом доля аэромонад в рыбоводных хозяйствах была выше в сравнении с природными условиями, как в воде, так и в рыбе.

Ключевые слова: условно-патогенная микрофлора, санитарно-показательные микроорганизмы, промысловые рыбы, факторы патогенности, Нижний Дон

ECOLOGICAL FEATURES OF BACTERIOCENOSIS ICHTHYOFAUNA IN NATURAL CONDITIONS AND IN AQUACULTURE LOWER DON

Morozova M.A., Mirzoyan A.V.

Azov Research Institute of Fisheries, Rostov-on-Don, e-mail: irbis-77@bk.ru

The paper gives data obtained microbiological investigations of commercial fishes species of Lower Don and juveniles fish from the husbandry farms in Rostov region: bream, prussian carp pikeperch, common carp, shemaya. Juvenile fish these species were studied before release in the Lower Don. Bacteriological assay of its muscle tissue, liver, gills, intestines and water samples was used as a basic study. The main objects of fishing was evaluated by control of microbiological safety indicators for fish established by the Russian legislations. Pathogenic microflora was in target species and artificial reproduction we have established. Most of the isolated microflora showed various degrees of pathogenicity: haemolysine, lecithinase, protease. Opportunistic bacteria domination of the families Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Pseudomonadaceae in hydrobionts. Thus the share of aeromonads in fish-breeding farms was higher in comparison with an environment, both in water, and in fish.

Keywords: opportunistic microflora, sanitary-indicative microorganisms, commercial fishes, juveniles fish, pathogenic factors, Lower Don

Одной из важнейших экологических проблем является ухудшение качества пресных вод. Длительное антропогенное воздействие на водоем приводит к нарушению эволюционно сложившихся микробиоценозов водных экосистем, существенно увеличивается количество патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Микробиологический мониторинг в силу своей информативной значимости может быть тест-индикатором изменений экологической ситуации и характеризовать санитарное состояние гидрэкосистемы.

В современных условиях Нижний Дон является самым грузонапряженным участком Донского бассейна. Ухудшению качественного состава воды способствует загрязнение сточными водами от сосредоточенных и диффузных источников, разрушение берегов, зарастание и заиливание рукавов в его дельте [1].

Хозяйственная деятельность человека часто нарушает сформированное в природе равновесие. Так, зарегулирование стока р. Дон коренным образом повлияло на естественное воспроизводство промысловых видов рыб, значительно уменьшились нерестовые площади проходных и полупроходных рыб. Сокращение естественной водности особенно в период весеннего половодья снизило вероятность затопления поймы, тем самым существенно ухудшив состояние нерестилищ и условия для эффективного размножения ценных рыб [2]. Для сохранения и восстановления промысловых видов рыб рыбоводными организациями ежегодно осуществляется искусственное воспроизводство и выпуск молоди водных биоресурсов. В р. Дон выпускаются как проходные (русский осетр, севрюга, рыбец, шемая), так и полупроходные виды рыб (судак, лещ, сазан) [1].

Одним из ряда негативных лимитирующих факторов являются болезни объектов разведения [3]. Своевременное выявление нежелательных в гигиеническом и эпизоотическом плане микроорганизмов, циркулирующих в воде и рыбе, не только характеризует санитарное состояние производства, но и позволяет принять соответствующие меры по купированию и нераспространению заболеваний. Выживаемость заводской молоди в естественных условиях во многом определяется ее эпизоотическим состоянием на конечном этапе выращивания.

Цель исследования – установить роль экологических факторов в формировании состава микробных сообществ, ас-

социированных с промысловыми рыбами в природных условиях и в аквакультуре Нижнего Дона.

Материалы и методы исследования

Отбор проб воды и рыбы осуществляли сезонно с 2009 по 2012 гг. на водных объектах Ростовской области. Промысловых рыб отлавливали в приустьевом участке р. Дон выше г. Ростова-на-Дону (тоня «Осеledняя»); дельте Дона – на территории города в месте отделения рукава Мертвый Донец и в районе станицы Елизаветинской (рисунок). Молодь промысловых рыб обследовали ежегодно в летний период на нижнедонских рыбоводных предприятиях ФГУП «Рогожский рыбоводный завод», ФГУП «Рыбоводный завод «Взморье», ООО «Рыбартель им. Чкалова» перед выпуском в реку.

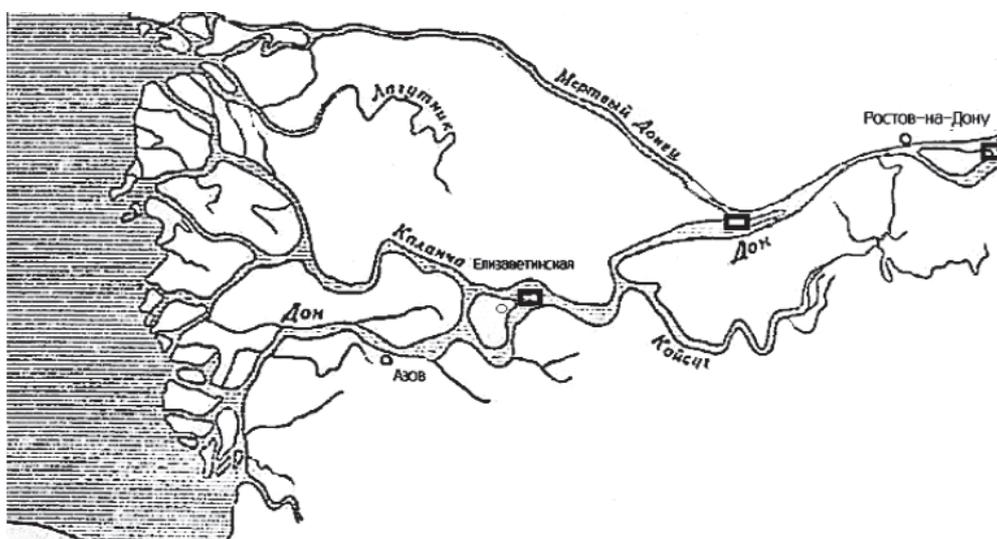


Схема расположения пунктов отбора проб воды и рыбы в устьевой области р. Дон

Для микробиологических исследований были выбраны следующие виды рыб: лещ, серебряный карась, судак, сазан, шемая. Материалом для анализа служили образцы мышечной ткани, печени, кишечника и жабр. Масса отбираемых навесок мышечной ткани от живых рыб соответствовала требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 [10]. Содержание санитарно-показательных микроорганизмов: мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАНМ) и наличие БГКП (колиформные бактерии), а также условно-патогенных бактерий – *Staphylococcus aureus* и патогенных – р. *Salmonella* и *Listeria monocytogenes*, проводили согласно соответствующим ГОСТам.

Санитарно-микробиологическая характеристика поверхностных вод включала следующие компоненты: бактерии группы кишечных палочек (БГКП), энтерококки (преимущественно фекальные стрептококки), золотистый стафилококк и сульфитредуцирующие клостридии (преимущественно *Clostridium perfringens*) [6].

Для получения чистых культур применяли среды общего назначения и селективные. Идентификацию выделенных штаммов проводили путем изучения их

морфологии, культуральных, биохимических и других признаков, присущих каждому виду [8]. Наряду с этим у изолированных микроорганизмов определяли факторы патогенности (протеазу, лецитиназу, гемолизин) и галотолерантность (способность бактерий расти в мясо-пептонном бульоне с 3, 7, 10% NaCl) [9].

Результаты исследования и их обсуждение

За период наших исследований из воды и рыбы Нижнего Дона было выделено 33 вида бактерий, относящихся к 20 родам: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Yersinia* а также несколько видов дрожжей рр. *Candida*, *Rhodotorula* и условно-патогенных грибов рр. *Fusarium*, *Saprolegnia*. Показано широкое персистирование в объектах

промысла различных возбудителей водных сапронозов таких как аэромонады, псевдомонады и многие виды энтеробактерий. В качественном составе микрофлоры донских рыб, независимо от района исследований и сезона, аэромонады и псевдомонады являлись доминантами. Так, вид *Aeromonas hydrophila* преобладал в составе микрофлоры воды и рыб, при этом *A. caviae* чаще изолировали из рыбы, *A. sobria* из воды. Удельный вес аэромонад в микробиоценозе реки и рыбы ($20 \pm 1,4\%$ и $23 \pm 0,5\%$ штаммов соответственно) был выше, чем псевдомонад. Псевдомонады в воде составили $16 \pm 1,3\%$, в рыбе – $19 \pm 1,5\%$ штаммов от общего числа выделенных микроорганизмов. Среди бактерий данного рода идентифицированы 5 видов: *Pseudomonas fluorescens*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, из которых преобладал *P. fluorescens*. Штаммы синегнойной палочки (*P. aeruginosa*) обнаруживали как в воде, так и в организме рыб (жабры, кишечник, печень). Эти бактерии попадают в основном со сточными водами и представляют потенциальную опасность для здоровья человека и гидробионтов. Из группы неферментирующих бактерий наряду с псевдомонадами идентифицировали ацинетобактеров (13% от общего числа микроорганизмов) с динамикой роста колониеобразующих единиц (КОЕ) к сентябрю ($19 \pm 0,8\%$). Следует отметить, что их удельный вес в реке превышал таковой в рыбе – $24 \pm 1,2\%$. Главной особенностью этой группы является способность использования различных составляющих нефти и нефтепродуктов в качестве источника углерода и энергии. Поэтому в случае загрязнения реки произойдет усиление бактериального прессинга на водоем за счет увеличения их биомассы [5].

В ассоциации с доминирующими группами грамотрицательных бактерий встречались грамположительные кокки (р. *Micrococcus*), споровые аэробные палочки (р. *Bacillus*) и спорообразующие анаэробы (р. *Clostridium*). Анализ внутригодовых изменений грамположительной микрофлоры, показал, что бациллы и микрококки несколько преобладали весной за счет паводковых вод, насыщенных взвешенными веществами органического и неорганического происхождения и подтопления береговой зоны, влекущей за собой попадание почвенной флоры в водную экосистему. Споровые формы сульфитредуцирующих клостридий были постоянным компонентом микрофлоры воды (обнаруживали в 20 мл воды). Известно, что споры способны существовать в воде значительно дольше, чем

колиформные бактерии, и они более устойчивы. С другой стороны, они являются показателем давнего фекального загрязнения и могут быть обнаружены дальше от источника загрязнения [9]. С одинаковым постоянством их регистрировали на жабрах рыб (10^2 – 10^3 КОЕ/г), с более высокой численностью (10^3 – 10^4 КОЕ/г) при интенсивной антропогенной нагрузке на водоем [7]. В частности, вегетативные формы клостридий (10^3 – 10^4 КОЕ/г) контаминировали жабры донских рыб при фекальном загрязнении участков Нижнего Дона. Учитывая тот факт, что контаминация спорными и вегетативными формами клостридий не имела клинических последствий для организма рыб, можно судить только о характере бактериального загрязнения воды.

Наибольшее видовое разнообразие отмечали у представителей семейства Enterobacteriaceae: *Citrobacter freundii*, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*. Энтеробактерии характеризовались активизацией в летние месяцы, в среднем $23 \pm 1,5\%$ от выделенной микрофлоры. Обращает на себя внимание частая встречаемость в воде индикаторных бактерий, весной – фекальных энтерококков, летом – кишечной палочки. Необходимо отметить, что микробиоценоз достаточно оперативно реагирует на фекальное загрязнение водной среды. Так, в летний период 2010 г. отмечали увеличение доли энтеробактерий до 35–40% и вегетативных клеток клостридий (10^3 – 10^4 КОЕ/г) в обследованных объектах промысла, что связывали с аварией на коллекторе в г. Ростове-на-Дону и аномально жарким летом [11]. Указанные микроорганизмы контаминировали в основном кишечник и жабры, без каких-либо патологических отклонений у рыб. В месте отделения р. Мертвый Донец от р. Дон довольно часто высевали *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis* из воды и мышц внешне здоровых рыб: леща, карася, судака, сазана. Обнаружение протеев свидетельствует о гнилостном процессе, а вида *P. mirabilis* – как правило, указывает на загрязнение фекальными стоками.

Практически все объекты промысла (лещ, серебряный карась, сазан, судак) на этом участке по микробиологическим показателям (КМАФАнМ, БГКП) оказались низкого качества. Бактериальная обсемененность их мышечной ткани (10^5 – 10^6 КОЕ/г) значительно превосходила нормативные требования, предъявляемые к живой рыбе, что обусловлено экологическими факторами среды их обитания.

Критерий безопасности для живой рыбы по показателю КМАФАнМ (норма не более $5 \cdot 10^4$ КОЕ/г) часто был превышен в районе промысла выше г. Ростова-на-Дону. Так, в 2010 г. регистрировали максимальную обсемененность объектов промысла, в частности у судака значения превышали норму в 7–8 раз. Возможно, действующими факторами, влияющими на санитарное состояние этого участка реки, являются развитое судоходство и территориальное расположение (между городами Ростов-на-Дону и Аксай). Следует отметить, что в низовье р. Дон (ст. Елизаветинская) бактериальная обсемененность мышечной ткани рыб была на порядок ниже. Несмотря на различия в уровне обсеменения обследованных рыб, патогенные – *p. Salmonella*, *L. monocytogenes* и условно-патогенные бактерии – *S. aureus* не обнаружены в нормируемой массе, в которой не допускается их содержание.

Факторы толерантности микроорганизмов к хлориду натрия непосредственно связаны с их персистенцией от сырья до готовой продукции, что снижает биологическую ценность последней, а в некоторых случаях делает ее непригодной для пищевого использования [4]. Анализ галотолерантности микроорганизмов, выделенных из рыбного сырья, свидетельствует о достаточно высокой их выживаемости ($75 \pm 1,5\%$ штаммов от общего числа) в 3% растворе NaCl и снижении в 7 и 10% растворах хлорида натрия ($36,5 \pm 1,5\%$ и $15,5 \pm 1,5\%$ штаммов соответственно).

В литературе имеются существенные расхождения по вопросу наличия бактерий в паренхиматозных органах (печень, почки, селезенка) клинически здоровых рыб. Интродукцию микроорганизмов в органы и ткани связывают с изменением санитарно-гигиенической и экологической обстановки среды обитания многих промысловых объектов [5]. Данные общего микробного числа (ОМЧ) печени донских рыб в низовье р. Дон в районе ст. Елизаветинская регистрировали в пределах (10^2 – 10^4 КОЕ/г). При этом более высокий уровень обсемененности (10^3 – 10^5 КОЕ/г) имели рыбы, выловленные в реке на территории и выше г. Ростова-на-Дону.

По мнению ряда исследователей, при достижении пороговой концентрации бактерий (10^4 КОЕ/мл) в рыбоводных прудах начинается возрастание их количества в органах и тканях рыб [3]. Летом содержание микроорганизмов в прудах нижнедонских хозяйств достигало значений до 10^5 КОЕ/мл. При этом обсемененность печени у молоди рыб изменялась в широких пределах от $6 \cdot 10^2$ до $1,5 \cdot 10^4$ КОЕ/г. В формировании

микробиоценоза молоди рыб и воды принимали участие 23 вида бактерий, относящихся к 13 родам из пяти семейств. Представители родов *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas* постоянно выделяли не только из жабр и кишечника, но часто из внутренних органов и тканей сеголеток. Доля аэромонад в рыбоводных хозяйствах, как правило, была выше в сравнении с природными условиями, как в воде $29 \pm 1,1$, так и рыбе $25 \pm 0,5$. Неоднократно, микробный пейзаж жабр и кишечника леща и сазана, в том числе карася, сопутствующего им в прудах, составляли сульфитредуцирующие кластридии, энтеробактерии, алкалигенесы. Наличие их в воде могло явиться следствием чрезмерного внесения органических удобрений и накоплением естественной органики, что привело к образованию субстрата для развития бактерий. Кроме того, были изолированы сапрофитные бактерии родов *Bacillus*, *Micrococcus*, которые являются представителями нормальной микрофлоры рыб и не имеют для них этиологического значения.

Изучение патогенных свойств бактерий показало, что микрофлора рыб в природных условиях и при искусственном воспроизводстве характеризовалась преимущественным выделением штаммов, проявлявших протеолитическую, лецитиназную и гемолитическую активность. Так, в летний период у донских рыб и выпускаемой молоди протеазой обладало 69,8 и 78,2% изолятов соответственно; лецитиназой 36,1 и 29,2%; гемолизином 32,1 и 35,7%.

Заключение

Проведенные исследования показали, что таксономический состав выделенных микроорганизмов отражал экологическое состояние водоема, сформированное под влиянием комплекса природных и антропогенных факторов. Вышеприведенные данные свидетельствуют о значительной персистенции в гидроэкосистеме Нижнего Дона условно-патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов. Микробный пейзаж ихтиофауны во многом был идентичен в природных условиях и аквакультуре. В микробиоценозе донских рыб доминировали аэромонады (*Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*). Как правило, их доля в рыбоводных хозяйствах была выше в воде и рыбе.

Список литературы

1. Администрация Ростовской области, Комитет по охране окружающей среды и природных ресурсов Администрации Ростовской области // Экологический Вестник Дона

«О состоянии окружающей среды и природных ресурсов Ростовской области в 2009 году». – Ростов н/Д., 2010. – 369 с.

2. Жукова С.В., Сыроватка Н.И., Беляев А.Г. и др. Дельта Дона: эволюция в условиях антропогенной трансформации стока. – Ростов н/Д.: ФГУП «АзНИИРХ», 2009. – 184 с.

3. Каховский А.Е. Профилактика болезней рыб бактериальной этиологии в интенсивно эксплуатируемых рыбободных прудах: автореф. дис. канд. биол. наук. – М., 1991. – 20 с.

4. Ларцева Л.В. Рыбы и гидробионты переносчики возбудителей инфекционных болезней человека. – Астрахань, 2003. – 99 с.

5. Ларцева Л.В., Пивоваров Ю.П. Экологическая эпидемиология. – Астрахань, 2007. – 187 с.

6. Методы контроля, биологические и микробиологические факторы. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов. МУК 4.2.1884-04 – Утв. 03.03.2004. – М., 2004.

7. Морозова М.А., Ларцева Л.В. Микробные сообщества гидрозосистемы Нижнего Дона и Таганрогского залива // Естественные науки. – 2012. – № 2.(39). – С. 50–56.

8. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. Т. 1 / под ред. Дж. Хоулта [и др.]; пер. с англ. под ред. Г.А. Заварзина. – 9-е изд. – М.: Мир, 1997. – 426 с.

9. Руководство по медицинской микробиологии. Общая санитарная микробиология. Книга 1 / под ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Волиной. – М.: БИНОМ, 2008. – 1080 с.

10. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. – М.: ИНФА, 2001.

11. Официальный сайт по охране окружающей среды и природных ресурсов Ростовской области / Об экологическом состоянии реки Темерник от 17 июня 2010 г. сайт. – URL: <http://www.doncomeco.ru/news/> (дата обращения 2.11.2012).

References

1. Administration of the Rostov region, the Committee on Environmental Protection and Natural Resources of the Rostov Region Administration Ecological Bulletin Don On the State of

the Environment and Natural Resources of the Rostov region in 2009. R., 2010. 369 p.

2. Zhukova S.V., Syrovatka N.I. Belyaev A.G. et al. Delta Don: evolution in terms of anthropogenic transformation of runoff. R., AzNIIRH, 2009. 184 p.

3. Kakhovsky A.E. Prevention of fish diseases of bacterial etiology in intensively exploited fish ponds: Author. Ph.D. diss biol. Sciences. M., 1991. 20 p.

4. Lartseva L.V. Fish and aquatic organisms vectors of pathogens of infectious diseases in humans. Astrakhan, 2003. 99 p.

5. Lartseva L.V. Pivovarov Y.P. Environmental Epidemiology. Astrakhan, 2007. 187 p.

6. Control methods, biological and microbiological factors. Sanitary-microbiological and parasitological analysis of water from surface water bodies. MUK 4.2.1884-04. Approved. 03.03.2004. M., 2004.

7. Morozova M.A., Lartseva L.V. Hydroecosystems microbial communities of the Lower Don and Taganrog Bay. Science, 2012, no. 2. (39). pp. 50–56.

8. Burgeys Manual of Determinative bacteriology. In 2 t. T. 1 / Ed. J. Holt [et al.]; per. from English. Ed. GA Zavarzin. 9th ed. Mir, Moscow, 1997. 426 p.

9. Manual of Medical Microbiology. General sanitary microbiology. Book 1 / [ed. Labinskaya A. S. Wolin E.G.]. Bean, M., 2008, 1080 p.

10. SanPin 2.3.2.1078-01. Hygienic requirements for safety and nutritional value of foods. Sanitary-epidemiological rules and standards. INFA, M., 2001.

11. Official website of the Environment and Natural Resources of the Rostov region / about the ecological state of the river Temernik of 17 June 2010: the site. – URL: <http://www.doncomeco.ru/news/> (date accessed 02/11/2012).

Рецензенты:

Корниенко Г.Г., д.б.н., профессор, зав. отделом генетико-биохимического мониторинга Азовского НИИ рыбного хозяйства, г. Ростов-на-Дону;

Чистяков В.А., д.б.н., руководитель ЦНИЛ ГБОУ ВПО РостГМУ, г. Ростов-на-Дону.

Работа поступила в редакцию 23.12.2014.