

На правах рукописи



Морозова Марина Александровна

**ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ
МИКРОБИОЦЕНОЗА РЫБ ТАГАНРОГСКОГО ЗАЛИВА
АЗОВСКОГО МОРЯ**

03.02.08 – экология (биологические науки)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ростов-на-Дону – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Южный федеральный университет» и в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства»

- Научный руководитель:** Доктор географических наук, профессор,
главный научный сотрудник
Института наук о Земле ЮФУ
Фёдоров Юрий Александрович
- Официальные оппоненты:** **Абросимова Нина Акоповна**
доктор биологических наук, профессор
кафедры технические средства аквакультуры,
Донской государственной технической
университет
- Журавлев Петр Васильевич**
доктор медицинских наук, зав. лабораторией
санитарной микробиологии водных объектов и
микробной экологии человека, Ростовский
научно-исследовательский институт
микробиологии и паразитологии»
- Ведущая организация:** **Полярный научно-исследовательский институт
морского рыбного хозяйства и океанографии
им. Н. М. Книповича, г. Мурманск**

Защита состоится «25» декабря 2017 г. в 15:00 на заседании диссертационного совета Д 212.208.32 по биологическим наукам на базе Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, к. 603.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им. Ю. А. Жданова Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, ул. Рихарда Зорге, 21ж и на сайте <http://hub.sfedu.ru/diss/>.

Объявление о защите и текст автореферата размещены на официальном сайте Южного федерального университета www.sfedu.ru и на сайте Министерства образования и науки Российской Федерации www.vak.ed.gov.ru.

Отзывы на автореферат в 2 экз., заверенные печатью, просим направлять по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, к. 803а, ученому секретарю совета Д 212.208.32 Ю. В. Акименко, e-mail: jvakimenko@sfedu.ru.

Автореферат разослан «___» ноября 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Акименко Юлия Викторовна

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Таганрогский залив представляет собой мелководный полужамкнутый водоем, сформированный на стыке двух крупных природных водных систем – р. Дон и Азовского моря. Как и многие другие водные объекты, подвержен многокомпонентному загрязнению, в особенности прибрежные его зоны. Зарегулирование речного стока, безвозвратные изъятия воды, небольшой размер и малая глубина Таганрогского залива способствуют накоплению в нем биогенных веществ и антропогенных поллютантов (Матишов и др., 2000; Довлатян, Королев, 2002; Беляев, 2003; Федоров, Беляев, 2004; Павленко и др., 2003, 2008; Кленкин и др., 2008). От качества водной среды зависит эпизоотическое и ветеринарно-санитарное благополучие объектов промысла.

Индикатором экологического состояния водной среды и рыбы может служить микробиоценоз рыб (Бычкова и др., 2000; Чухлебова, 2004). Показано, что в водных экосистемах в основном персистирует условно-патогенная микрофлора, в частности аэромонады, псевдомонады, вибрионы, энтеробактерии, ответственные за порчу рыбы при ее хранении (Пивоваров и др., 1989; Мухина, 1995; Ларцева, 1998), способные инициировать патологические процессы у гидробионтов (Ведеймейер и др., 1981; Рудиков, 1985; Борисенко, 1991; Аморос Хименес, 1993; Fouz et al., 1993; Бычкова и др., 1995; Конев, 1997; Юхименко, 1997) и людей, особенно при употреблении недоброкачественной продукции (Сомов, 1985; Varma et al., 1990; Liston, 1990; Hansmann, 2000; Ларцева, 2003; Ларцева, Пивоваров, 2007; Обухова, Ларцева; 2013). Основными факторами, определяющими их видовой и количественный состав, являются температура, гидролого-гидрохимический режим, органическое загрязнение и трофность водоемов (Обухова, 2004; Ларцева, Пивоваров, 2007).

Обладая ярко выраженной биологической и экологической пластичностью, условно-патогенные микроорганизмы (УПМ) способны к широкому распространению во внешней среде и длительной персистенции в организме (Прозоровский и др., 1998; Резников, 1999; Макаров, 2007; Kanno et al., 2009; Михайлова, 2011). Адаптационные возможности выражаются у них в проявлении ферментативной активности и антибиотикорезистентности. Формированию патогенных, вирулентных штаммов и с множественной антибиотикорезистентностью способствует воздействие биотических и абиотических факторов (Доморадский, 1997; Анганова, 2008, 2012; Обухова, Зайцев, 2015).

Все вышесказанное определяет актуальность изучения условно-патогенных микроорганизмов в микробиоценозе рыб и влияния экологических факторов, детерминирующих их распространенность.

Цель работы – провести изучение качественно-количественного состава условно-патогенных микроорганизмов в микробиоценозе рыб и определить влияние эколого-географических факторов, детерминирующих их распространенность.

В задачи исследования входило:

1. Изучить спектр условно-патогенных микроорганизмов в микрофлоре рыбы и среды ее обитания, их таксономическую характеристику, доминирующие группы и соотношение их численности.

2. Определить значение эколого-географических факторов на распространность и сезонные колебания УПМ.

3. Оценить микробиологическую безопасность рыбы с позиции содержания санитарно-показательных и регламентированных условно-патогенных микроорганизмов.

4. Определить и оценить частоту встречаемости ферментов патогенности и устойчивость к антибактериальным препаратам у микроорганизмов, выделенных из воды и рыбы.

5. Провести анализ эпизоотической ситуации по бактериальным болезням в популяциях рыб Таганрогского залива.

Научная новизна. Определен таксономический состав условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из воды и рыбы Таганрогского залива, выявлены доминирующие группы бактерий, соотношение их численности, изучены факторы патогенности и антибиотикорезистентность. У азовских рыб диагностированы заболевания бактериальной и протозойной этиологии, имеющие эпизоотическое значение.

Проведен мониторинг микробиологической безопасности промысловых рыб Таганрогского залива для потребителя и предложены нормативные показатели в качестве критерия санитарного состояния водных экосистем.

Установлены природные и антропогенные факторы, от которых зависит спектр условно-патогенных микроорганизмов, и показано, что применение системного подхода, основанного на теории единства организма и среды, повышает результативность микробиологических исследований и позволяет объективно оценить санитарно-экологическую и эпизоотическую ситуацию в водоеме.

Соответствие паспорту специальности. Результаты научного исследования соответствуют специальности 03.02.08 Экология, п. 2.2 «Системная экология – изучение взаимодействия сообществ с абиотической средой обитания, в том числе созданной и измененной в результате строительной и хозяйственной деятельности», п. 2.3 «Прикладная экология – разработка принципов и практических мер, направленных на охрану живой природы, как на видовом, так и на экосистемном уровне».

Основные защищаемые положения. Распространенность условно-патогенных микроорганизмов в воде и рыбе Таганрогского залива, их таксономическая характеристика, соотношение их численности и влияние эколого-географических факторов на их развитие постулируются как конечный результат взаимодействия компонентов экосистемы и используются в качестве биоиндикаторов в оценке загрязнения водоемов.

Показатели бактериальной обсемененности мышечной ткани рыб – важный критерий в оценке санитарного состояния ихтиофауны, среды обитания рыб и микробиологической безопасности объектов промысла для потребителя.

Условно-патогенные микроорганизмы в гидроекосистеме Таганрогского залива характеризуются набором факторов патогенности и множественной антибиотикорезистентностью, что свидетельствует об их этиологической значимости и потенциальной опасности водных микробиоценозов.

Фактический материал и личный вклад автора. В основу диссертационной работы положен фактический материал микробиологических исследований, полученный в период 2007–2013 гг. Отбор образцов и первичный бактериологический посев проведены при непосредственном участии автора. Микробиологический анализ, включающий идентификацию микроорганизмов и обработку полученных данных, выполнен автором лично. Анализ и обобщение результатов, формулировка выводов и положений, выносимых на защиту, выполнены автором лично при участии научного руководителя.

Практическая значимость работы. Полученные результаты диссертационной работы используются в государственном мониторинге комплексных исследований водных биологических ресурсов (ВБР) и среды их обитания в Азовском море, в разработке прогнозов промысловой обстановки и научно обоснованных рекомендаций по мерам, обеспечивающим сохранение и рациональное использование запасов ВБР, безопасность и качество продуктов из ВБР, для Федерального агентства по рыболовству. Материалы работы публикуются в ежегодном Экологическом вестнике Дона «О состоянии окружающей среды и природных ресурсов Ростовской области». Основные выводы и положения диссертационной работы используются в Институте наук о Земле ЮФУ при подготовке и чтении курсов лекций «Общая гидрология», «Современные проблемы экологии и природопользования», «Экологический мониторинг: теория и практика» по направлению бакалавриата «География» и магистерской программе «Экологический мониторинг и охрана природы».

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 27 работ, включая 9 статей в журналах, рекомендованных ВАК, получено 2 патента.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав, списка сокращений и списка литературы, включающего 363 источника.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность и признательность своему научному руководителю проф., д.г.н. Ю. А. Фёдорову за ценные советы, постоянную и всестороннюю помощь, оказанную при выполнении диссертационной работы. Автор также благодарит к.б.н. О. А. Зинчук, О. Н. Александрову, проф., д.г.н. П. М. Лурье, к.б.н. Я. Н. Фролову за поддержку и м.н.с. А. В. Демидову за помощь в сборе микробиологического материала и его обработке.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на научно-практической конференции грантодержателей РФФИ «Вклад фундаментальных исследований в развитие современной инновационной экономики Краснодарского края» (Анапа, 2009); на Всероссийской научно-практической конференции «Экологические проблемы промышленных городов» (Саратов, 2009); в материалах Международной научно-практической конференции «Теория и практика актуальных исследований» (Краснодар, 2012); на Международной научно-практической конференции «Дни науки-2012» (Прага, 2012); на II Международной научно-технической конференции «Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана» (Владивосток, 2012); на конференции «Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-Черноморского региона» (Керчь, 2013); в сборниках научных трудов ФГУП «АзНИИРХ» (Ростов-на-Дону, 2008, 2011, 2012, 2014); на Международ-

ной научной конференции «Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей России» (Ростов-на-Дону, 2014); на Международной научной конференции молодых ученых «Современные вопросы экологического мониторинга водных и наземных экосистем» (Ростов-на-Дону, 2015).

II. СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность выбранной темы; определены объект, предмет, цели исследования, основные задачи работы, сформулированы положения, выносимые на защиту; показаны научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

Глава 1. ОБЗОР ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ТАГАНРОГСКОГО ЗАЛИВА И УСЛОВНО-ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ В РЫБАХ

Глава 1 состоит из четырех разделов, в которых представлены краткая физико-географическая характеристика и описание гидрометеорологического режима Таганрогского залива, а также анализ состояния водных биоресурсов в современный период. Рассмотрены вопросы влияния на экосистему Таганрогского залива антропогенных и природных факторов, способствующих интенсивному накоплению загрязнителей в воде и гидробионтах. Проведен обзор имеющихся в литературе сведений, посвященных естественной микрофлоре рыбы. Показаны факторы, от которых зависит ее состав: образ жизни рыб, характер бактериального загрязнения водной среды, географическое положение водоема и время года. Рассмотрены инфекции рыб, вызванные УПМ. Освещена проблема бактериальной обсеменности рыбы, результатом которой является снижение качества рыбного сырья и продукции.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ «Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства» (ФГБНУ «АзНИИРХ») в период с 2007 по 2013 г., аналитические исследования выполнялись с 2015 по 2016 г. на кафедре физической географии, экологии и охраны природы Института наук о Земле ЮФУ.

Микробиологические исследования в Таганрогском заливе проводили по-сезонно (с апреля по ноябрь) в районах промысла (рис. 1). Всего обследовано 2566 экз. рыб (табл. 1) и параллельно 150 проб воды в местах лова.

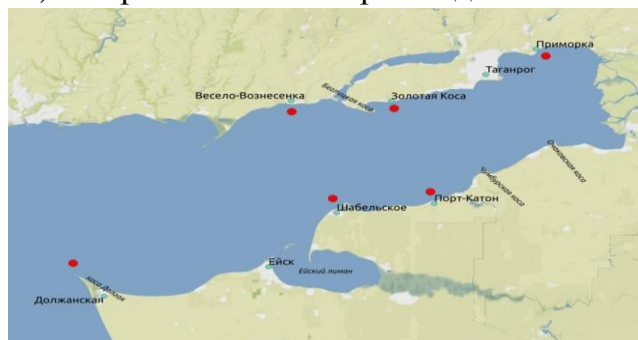


Рис. 1. Карта-схема района отбора проб воды и рыбы в Таганрогском заливе

Объектами исследования служили рыбы 7 видов из 4 семейств:

- Карповые (Cyprinidae) – серебряный карась *Carassius auratus gibelio*, тарань *Rutilus heckelii*, шемая *Chalcaldurnus chalcoilae*;
- Кефалевые (Mugilidae) – пиленгас *Liza haematocheilus*;
- Окуневые (Percidae) – судак *Sander lucioperca*;
- Бычковые (Gobiidae) – бычок-кругляк *Neogobius melanostomus*, бычок-сирман *Gobius syrman*.

Сбор материала осуществляли от живой свежевывловленной рыбы, пробы воды отбирали в стерильную посуду с соблюдением правил асептики.

При проведении микробиологических исследований использовали как стандартные, так и усовершенствованные и модифицированные методы (Вейант и др., 1999; Руководство..., 2008). Дополнительно применяли молекулярно-генетический метод исследований – полимеразную цепную реакцию – для подтверждения принадлежности дрожжей рода *Candida* к виду *C. albicans*.

Таблица 1 Объем выполненных работ по обследованию рыб микробиологическими и патологоанатомическими методами

Вид рыбы	Кол-во рыб, экз.	Число отобранных образцов органов и тканей	Районы исследований, экз. рыб					
			Весело-Вознесенка	Золотая коса	Приморка	Порт-Катон	Шабельское	коса Долгая
Серебряный карась	424	1696	55	75	135	45	53	61
Тарань	473	1892	105	85	75	65	73	70
Шемая	58	232	18	21	19	–	–	–
Пиленгас	293	1172	53	–	98	43	38	61
Судак	237	948	41	–	67	42	39	48
Бычок-кругляк	671	2684	165	85	241	85	–	95
Бычок-сирман	410	1640	115	135	–	75	–	85
Итого:	2566	10264	552	401	635	355	203	420

Для определения условно-патогенных микроорганизмов в организмах рыб и в среде их обитания проводили качественный анализ образцов печени, мышц, жабр, кишечника и проб воды в районах лова. В результате выделено и идентифицировано более 2 тыс. микроорганизмов. Идентификацию микроорганизмов выполняли с помощью определителей Красильникова (1949), Берджи (1997), Вейант с соавторами (1999) и МУ № 13-4-2/1403.

Выделенные бактериальные культуры тестировали на наличие ферментов, относящихся к факторам патогенности: каталаза, оксидаза, протеаза, лецитиназа, гемолизин (МУК 4.2.2602-10, Pickett et al., 1991). Вирулентность (ДНКазную ак-

тивность) определяли у аэромонад, стафилококков, моракселл и серраций (МУ № 13-4-2/1116).

На чувствительность к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом было протестировано 1350 штаммов микроорганизмов. В работе использовали следующие антибиотики: гентамицин (10 мкг/диск), левомицетин (30 мкг/диск), эритромицин (15 мкг/диск), тетрациклин (30 мкг/диск), полимиксин (10 мкг/диск), ципрофлоксацин (5 мкг/диск), ампициллин (10 мкг/диск), фуразолидон (300 мкг/диск).

Живую рыбу оценивали по 5 микробиологическим показателям: количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ в КОЕ/г), бактерии группы кишечных палочек (БГКП), *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, р. *Salmonella*. Масса пробы мышечной ткани рыб соответствовала требованиям санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.3.2.1078-01.

Статистическую обработку результатов исследований выполняли с использованием программ Excel и Statistica.

Глава 3. СОДЕРЖАНИЕ САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В РЫБЕ ТАГАНРОГСКОГО ЗАЛИВА. АНАЛИЗ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ОБЪЕКТОВ ПРОМЫСЛА

В главе представлена оценка рыбы по 5 микробиологическим показателям, характеризующим ее безопасность для человека. Количественные показатели обсемененности мышечной ткани рыб рассматриваются как индикатор бактериального загрязнения водной экосистемы. Описаны заболевания рыб бактериальной и протозойной этиологии, ранее не зарегистрированные в Таганрогском заливе.

3.1. Гигиеническая оценка рыбы по микробиологическим показателям

Проведенный в период 2007–2013 гг. анализ рыбы Таганрогского залива показал, что требованиям микробиологической безопасности не соответствовали 125 (22,4 %) из 558 проб рыбы. Превышение показателя КМАФАнМ выявлено в 103 пробах (18,4 %), наличие БГКП в 54 (9,7 %) и *S. aureus* в 1 пробе (0,2 %). Превышение по 2 микробиологическим показателям (КМАФАнМ, БГКП) зарегистрировали в 33 пробах (5,9 %).

Установлено, что доля проб, не отвечающих нормативным требованиям, подвержена годовым и сезонным колебаниям, а также значительно варьируется в конкретных районах лова. Характерно, что самый высокий удельный вес неудовлетворительных проб по показателю КМАФАнМ (не более 5×10^4 КОЕ/г) отмечали в паводковый период (апрель), а наличие бактерий группы кишечных палочек – в летние месяцы (июнь – июль), часто с превышением МАФАнМ (рис. 2). Обнаружение повышенных уровней содержания санитарно-показательных микроорганизмов расценивается как показатель санитарного неблагополучия водоема.

Максимальное число проб, не соответствующих нормативным требованиям, отмечено в 2010 г. – 40 %, что связано с ухудшением качества воды в реках Дон и

Темерник, длительно (февраль – апрель) принимавших неочищенные коммунальные стоки из-за аварии на коллекторе г. Ростова-на-Дону, и сбросом в Таганрогский залив загрязненных ливневых стоков (в мае – июне), зафиксированным Ростовской межрайонной природоохранной прокуратурой (Интернет-СМИ: Кавказский узел, 2010; Вести.Ru, 2010). В предыдущие годы доля неудовлетворительных проб незначительно варьировала, составив 22,2 % в 2007 г., 27,2 % в 2008 г., 26,1 % в 2009 г. Более низкое число неудовлетворительных проб регистрировали в 2012 и 2013 гг. – 10 и 7,2 % соответственно.

При ранжировании показателей по районам лова доля проб, не соответствующих нормативным требованиям, была самой низкой в западной части залива (район Долгой косы – 10,7 %). Более высокий процент приходился на центральную и восточную части залива (с. Весело-Вознесенка – 22,6 %, с. Золотая коса – 28,3 %, с. Приморка – 23,8 %, с. Порт-Катон – 25,5 %, с. Шабельское – 23,7 %).

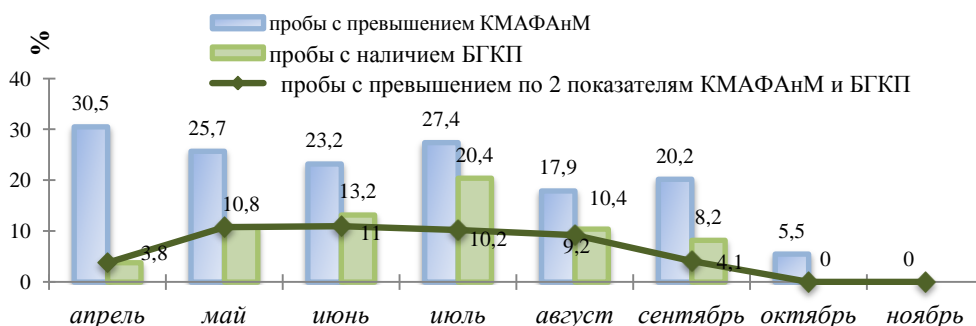


Рис. 2. Уровень неудовлетворительных проб рыбы по содержанию СПМ в период с апреля по ноябрь 2007–2013 гг.

Максимальное число проб, не отвечающих гигиеническим нормативам по микробиологическим показателям, регистрировали для бычка-кругляка, пиленгаса и бычка-сирмана (рис. 3).

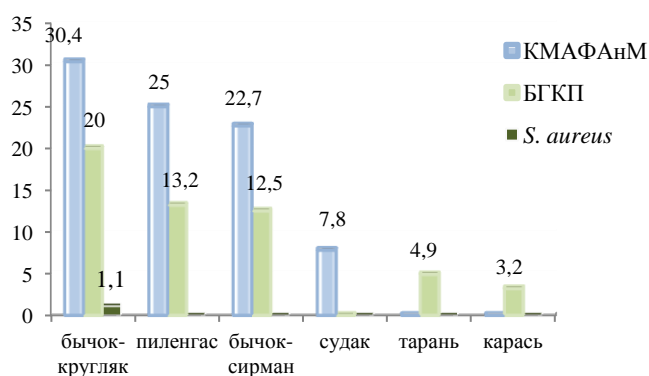


Рис. 3. Удельный вес проб рыб обследованных видов, не отвечающих требованиям гигиенических нормативов по микробиологическим показателям, %

Анализ кривых многолетних наблюдений показал различие в микробной контаминации обследованных видов рыб. Причем это выражалось не только в средних величинах, но и в показателях разброса между максимальным и мини-

мальными значениями обсемененности мышечных тканей. Наиболее сильную бактериальную нагрузку испытывают бычки, у которых значения КМАФАнМ были самыми высокими (рис. 4). Только у серебряного карася неоднократно регистрировали отсутствие бактерий в мышцах.

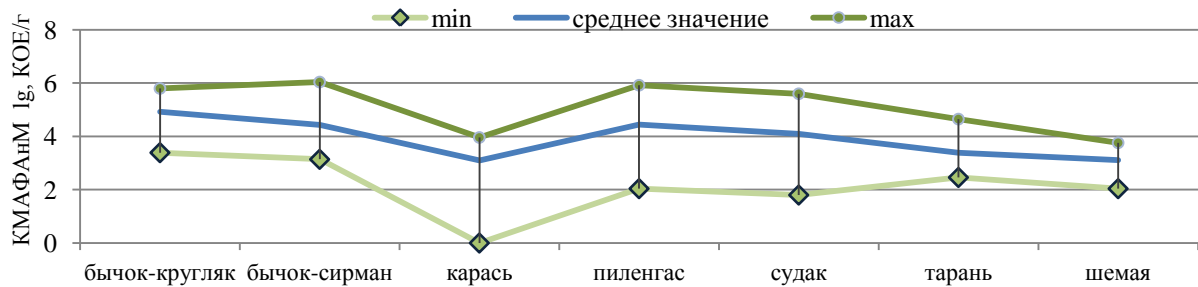


Рис. 4. Предельные и средние значения бактериальной обсемененности (КМАФАнМ) промысловых рыб Таганрогского залива, лг КОЕ/г

3.2. Эколого-эпизоотические аспекты оценки состояния рыбы в Таганрогском заливе

В условиях возрастающего антропогенного прессинга на природные водоемы особое значение приобретает проблема патологии гидробионтов (Захалева и др., 1990; Бычкова и др., 1995; Вялова, 2005; Ларцева, Пивоваров, 2007).

Заболевание, вызванное *Ichthyophonus hoferi*, обнаружено в авандельте Дона (район с. Приморка) в апреле 2010 г. у серебряного карася. Данные о смертности рыб неизвестны, но можно полагать, что инфицированные особи погибли. По данным наблюдений, с апреля по май число карасей с внешними патологиями в уловах колебалось от 1 до 10 экз. Ихтиофноз наносит существенный ущерб рыбоводству, поражает около 80 видов морских и пресноводных рыб (Post, 1987; Справочник..., 1999). В настоящее время в результате проведенного филогенетического анализа установлена принадлежность *I. hoferi* к простейшим (Protozoa, класс Ichthyophonida), а именно к протозойным жгутиковым (Mendoza et al., 2002). Признаки патологии у серебряного карася проявлялись в виде образования некротических полостей в мышцах под кожей (рис. 5). При гистологическом анализе в печени, почках и селезенке были обнаружены толстостенные многоядерные «покоящиеся споры» диаметром 50–230 мкм, вокруг которых формировались гранулемы, а также гигантские клетки, характерные для гранулематозного воспаления.

Вибриоз диагностирован у бычка-сирмана, возбудителем заболевания были *Vibrio vulnificus*, *V. fisheri*. Механизмы вирулентности вибрионов связаны с продукцией экзотоксина и протеаз, следствием чего является мионекроз (Fouz et al., 1993; Hjeltnes, Roberts, 1994).

Бычки с внешними патологиями встречались в июне – июле при температуре воды 21–27 °С в восточной части Таганрогского залива (с. Весело-Вознесенка, с. Золотая коса). При визуальном осмотре в выборках бычка (не менее 100 экз.) 10–13 % особей имели клинические признаки заболевания.



Рис. 5. Серебряный карась и бычок-сирман с патологиями

Бактериальная обсемененность мышц (10^5 – 10^6 КОЕ/г) и печени (10^4 – 10^5 КОЕ/г) больных бычков превышала аналогичные показатели у клинически здоровых особей в 10–100 раз. Увеличение температуры и солености воды является фактором активизации роста и развития вибрионов в микробиоценозе рыб. В 2011 г. соленость воды в Таганрогском заливе была максимальной (средние значения – 8,97 ‰) в сравнении с предыдущими годами исследований (2007 – 5,76 ‰; 2008 – 6,33 ‰; 2009 – 7,86 ‰; 2010 – 8,65 ‰) (Жукова и др., 2009; Куропаткин и др., 2009, 2013, 2015). Установлена прямая корреляция между температурой, соленостью воды и присутствием в ней этого микроорганизма (O’Neill et al., 1992; Thakur, Vaidya, 2003).

Таким образом, обсемененность мышечной ткани, даже в количествах, не превышающих гигиенические нормы, уже является индикатором санитарного неблагополучия водоема и физиологического состояния рыбы, поскольку известно, что мышечная ткань должна быть свободной от бактерий. Несоответствие промысловой рыбы гигиеническим нормативам по микробиологическим показателям (КМАФАнМ, БГКП, *S. aureus*) это фактор риска для человека. Заболевания, выявленные в восточной части Таганрогского залива у бычка-сирмана (вibriоз) и у серебряного карася (ихтиофоз), имеют эпизоотическую и санитарную значимость.

Глава 4. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕЙ В ВОДЕ И ОРГАНИЗМАХ РЫБ И ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ИХ РАЗВИТИЕ

В главе представлены данные о широкой циркуляции в воде и рыбе Таганрогского залива условно-патогенных микроорганизмов, их таксономическая характеристика и видовое разнообразие. Приведены основные эколого-географические факторы, определяющие их распространенность.

4.1. Микробиологическая характеристика грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, обсеменяющих рыбу и воду в местах промысла

Условно-патогенные микроорганизмы в микрофлоре рыб Таганрогского залива были представлены 55 видами из 28 родов: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*,

Bacillus, *Candida*, *Chryseobacterium*, *Clostridium*, *Edwardsiella*, *Empedobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Flavobacterium*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Rhodotorula*. Микроорганизмы этих родов обнаружены в воде, что является свидетельством формирования микробиоценоза рыб за счет водной микрофлоры и согласуется с литературными данными (Liston, 1988; Пивоваров и др., 1989; Ларцева, Катунин, 1993). Превалирующее положение занимали грамотрицательные условно-патогенные бактерии из 3 семейств: Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Vibrionaceae (рис. 6). Псевдомонады и аэромонады выступали в роли доминирующих таксонов (23,5 % и 16,9 % изолятов соответственно). В процентном соотношении доля грамположительных бактерий была незначительной (вода – 8,7 %, рыба – 9,9 %).

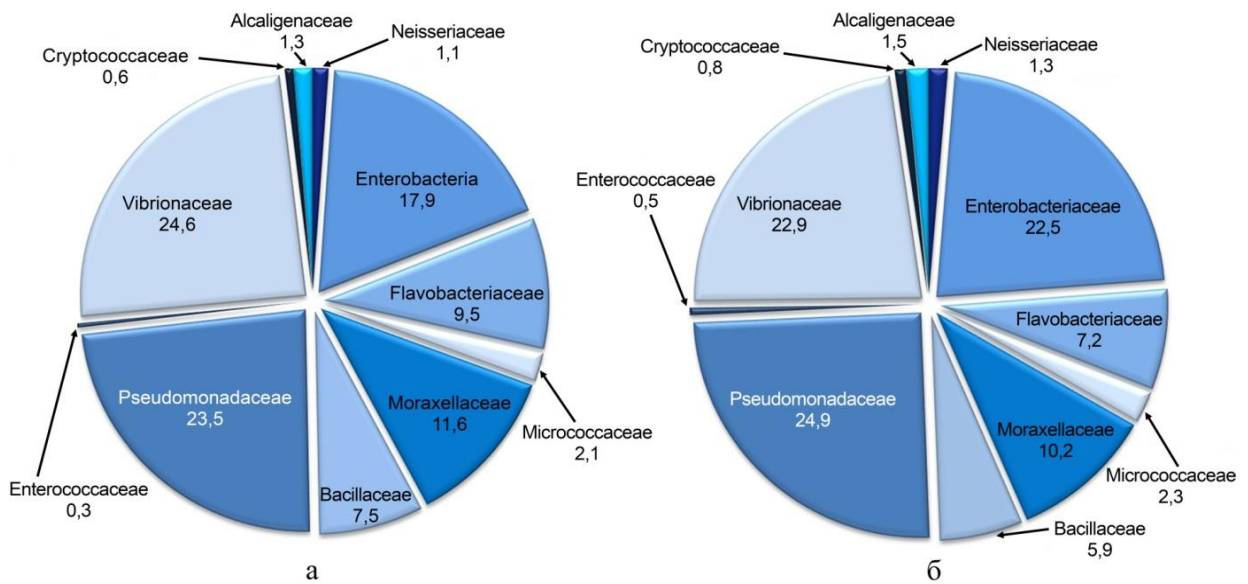


Рис. 6. Структура микробиоценоза рыб (а) и воды (б) Таганрогского залива, %

Семейство Enterobacteriaceae в микрофлоре азовских рыб доминировало по количеству как родов (10), так и видов (15): *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *E. agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *C. amalonaticus*, *C. diversus*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Providencia heimbacha*, *Serratia* sp. Основными биотопами энтеробактерий были кишечник и жабры рыб, также они встречались в мышцах и печени без каких-либо патологических отклонений у рыб. Цитробактеры занимали доминирующее место во всей выделенной микрофлоре этого семейства (табл. 2). Они санитарно-значимы, обнаруживаются в испражнениях и моче людей, откуда попадают в воду открытых водоемов (Голубева и др., 1985; Сайко, 1999; Пивоваров, Королик, 2000), способны инициировать патологические процессы у рыб (Carunasagar et al., 1992).

Таблица 2 Удельный вес в воде и рыбе представителей сем. Enterobacteriaceae от всей выделенной микрофлоры

Энтеробактерии	Выделенные изоляты, (%)	
	рыба	вода
<i>Edwardsiella</i>	2,1 ± 0,6	2,3 ± 0,2
<i>Enterobacter</i>	3,7 ± 0,8	4,4 ± 0,4
<i>Escherichia</i>	0,8 ± 0,3	2,2 ± 0,4
<i>Citrobacter</i>	9,6 ± 1,9	11,2 ± 0,8
<i>Hafnia</i>	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,02
<i>Klebsiella</i>	0,1 ± 0,02	0,2 ± 0,04
<i>Morganella</i>	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01
<i>Proteus</i>	1,2 ± 0,5	1,6 ± 0,4
<i>Providencia</i>	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,02
<i>Serratia</i>	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01

Группа неферментирующих бактерий из разных семейств получила свое название благодаря тому, что в отличие от семейства Enterobacteriaceae не ферментирует глюкозу, а использует ее оксидативно. Известно, что эти бактерии составляют преобладающую группу микроорганизмов морской среды, характеризуют продукционные процессы и процессы самоочищения, являются возбудителями инфекций и гибели гидробионтов, порчи рыбного сырья. В структуре этой группы псевдомонады в процентном соотношении (табл. 3) и по количеству видов (8) преобладали. Среди бактерий этого рода доминантами выступали *Pseudomonas fluorescens*, *P. alcaligenes* (8,4 ± 1,6 % и 6,3 ± 1,2 % штаммов от всей выделенной микрофлоры соответственно). Бактерионосительство патогенных для рыб псевдомонад (*P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. putida*) выявлено у бычков, судака, пиленгаса, тарани (печень, кишечник, жабры). Синегнойная палочка (*P. aeruginosa*), бактерия из числа наиболее частых этиологических агентов, встречалась единичными изолятами в кишечниках судака, бычка-кругляка и пиленгаса (2007 и 2009 гг.).

Таблица 3 Удельный вес группы неферментирующих бактерий, выделенных из воды и рыбы Таганрогского залива

Неферментирующие бактерии	Выделенные изоляты	
	рыба	вода
<i>Pseudomonas</i>	23,5 ± 3,8	24,9 ± 4,6
<i>Acinetobacter</i>	9,2 ± 1,4	6,6 ± 1,4
<i>Flavobacterium</i>	6,8 ± 0,8	5,1 ± 0,7
<i>Moraxella</i>	2,4 ± 0,6	3,6 ± 0,7
<i>Chrysebacterium</i>	1,9 ± 0,6	1,1 ± 0,7
<i>Alcaligenes</i>	1,3 ± 0,5	1,5 ± 0,6
<i>Empedobacter</i>	0,8 ± 0,2	1 ± 0,2

Семейство *Vibrionaceae* включало 8 видов из 3 родов: *Aeromonas* (*Aeromonas* sp., *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*), *Vibrio* (*V. alginoliticus*, *V. fischeri*, *V. vulnificus*), *Plesiomonas* (*Plesiomonas* sp.) (табл. 4). Удельный вес этого семейства в микробиоценозе рыб в среднем в 1,1–1,4 раза больше процентного содержания этих бактерий в гидромикрофлоре.

Таблица 4 Удельный вес представителей семейства *Vibrionaceae*, выделенных из воды и рыбы Таганрогского залива

Бактерии семейства <i>Vibrionaceae</i>	Выделенные изоляты (%)	
	рыба	вода
<i>Aeromonas</i>	16,9 ± 2,3	14,1 ± 1,8
<i>Vibrio</i>	5,4 ± 1,6	6,9 ± 1,8
<i>Plesiomonas</i>	2,3 ± 0,3	1,9 ± 0,3

Основным компонентом микрофлоры рыб были аэромонады: *Aeromonas hydrophila* (5,3 ± 0,7 %), *A. sobria* (4,8 ± 0,6 %), *A. caviae* (4,4 ± 0,7 %), *Aeromonas* sp. (2,4 ± 0,3 % от всей выделенной микрофлоры). Весьма актуальной остается этиологическая роль аэромонад при патологических процессах у рыб и при острых кишечных инфекциях, связанных с водным фактором, в летне-осенние месяцы (Rogulska et al., 1994; Wilson et al., 1994; Wiklund, 1994; Юхименко, 1997; Обухова, Ларцева, 2013).

Грамположительная микрофлора была представлена спорообразующими палочками *Bacillus subtilis*, *B. licheniformes*, *B. mesentericus*, *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*, *Lactobacillus sporogenes* и кокками *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *S. albae*, *Enterococcus faecium* (табл. 5). Споровые бактерии в основном высевали из кишечника рыб. Контаминация спорами сульфит-редуцирующих клостридий жабр и кишечника здоровых рыб не имела клинических последствий (Бойко и др., 2013; Морозова, Федоров, 2015).

Таблица 5 Удельный вес грамположительных бактерий, выделенных из воды и рыбы Таганрогского залива

Грамположительные бактерии	Выделенные изоляты, %	
	рыба	вода
<i>Clostridium</i>	4,2 ± 1,3	1,8 ± 0,6
<i>Bacillus</i>	2,1 ± 0,6	2,8 ± 0,6
<i>Lactobacillus</i>	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2
<i>Staphylococcus</i>	2,1 ± 0,4	2,3 ± 0,3
<i>Enterococcus</i>	0,3 ± 0,01	0,5 ± 0,01

В ассоциации с бактериями выделяли дрожжи (*Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula* sp., *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*), их численность не превышала 0,6 ± 0,1 % от общего числа микроорганизмов. В основном они контаминировали жабры рыб, а из кишечника выделяли только кандид. Известно, что

жаберная и кишечная микрофлора наиболее близка к показателям водной микрофлоры. В связи с этим при изучении санитарного состояния водоема эти органы рыб могут быть объективным тест-индикатором (Аморос Хименес, 1993).

4.2. Влияние экологических факторов на развитие условно-патогенных микроорганизмов

Видовой и численный состав условно-патогенной микрофлоры воды и рыбы Таганрогского залива формируется под воздействием экологических и природных факторов. Известно, что температура определяет динамику размножения микроорганизмов и продолжительность отдельных фаз роста бактериальной популяции (Warren, 1980; Congrou, 1984, 1986; Литвин, 1985), сезонную активность тех или иных микроорганизмов, так как обуславливает их рост, развитие, уровень микробной контаминации рыб (Канаев, 1974; Ведемейер, 1981; Austin, 1987; Рудиков, 1985; Борисенко, 1991; Каховский, 1991).

Весной в гидроэкосистеме Таганрогского залива при температуре воды 5–18 °С преобладали психрофильные бактерии, представители родов *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*. Псевдомонады, доминирующие в микрофлоре рыб весной и осенью, составляли 23,5–27,3 % от общего числа изолятов. Летом их численность снижалась до 19,7 %.

Летом с повышением температуры воды (24–27 °С) количество аэромонад (19–20,2 %) и энтеробактерий (17–21,9 %) в микробиоценозе рыб достигало своего максимума. Наиболее широким оказался спектр бактерий семейства Enterobacteriaceae. Если весной встречались энтеробактерии из 3 родов – цитробактеры, энтеробактеры и эдвардсиеллы, то летом уже из 10 родов.

Сезонные изменения температуры и водородного показателя воды создают оптимальные условия для развития определенных групп условно-патогенных бактерий. Так, защелачивание воды в заливе (рН от 8,4 до 9,67) летом, связанное с ежегодными «цветениями» водоема сине-зелеными водорослями, способствовало подавлению роста бактерий, предпочитающих кислые и нейтральные среды, и создавало преимущества для размножения аэромонад и энтеробактерий.

Важным индикатором экологической безопасности Таганрогского залива являются санитарно-значимые бактерии. Весенние паводки за счет подтопления береговой зоны приносят почвенную микрофлору в водную экосистему. В результате спорообразующие бактерии (бациллы, сульфитредуцирующие клостридии) и дрожжи (pp. *Rhodotorula*, *Candida*) контаминируют особенно донных рыб, в частности бычков. Численность клостридий на жабрах в этот период составила от 10 до 1000 КОЕ/г, бацилл и дрожжей – 10–100 КОЕ/г.

Обнаружение сульфитредуцирующих клостридий свидетельствует о некогда имевшем место фекальном загрязнении, так как споры позволяют им длительно сохраняться в окружающей среде (Руководство..., 2008). В воде источников водоснабжения содержание клостридий не нормируется. Для питьевой воды нормативы требуют отсутствия спор в 20 мл (СанПиН 2.1.4.1074-01). В Таганрогском заливе содержание клостридий составляло в среднем 20 ед. (КОЕ/20 мл), с макси-

мальным их развитием в весенний и ранне-осенний периоды – 100–200 ед. (КОЕ/20 мл). Весной 2010 г. был зарегистрирован максимум в 1000 ед., совпавший не только с паводком, но и с поступлением загрязненных ливневых стоков. В другие годы на период паводков также приходились небольшие пики, однако столь значительные максимумы, как в 2010 г., не наблюдались. В этот период установлено повышенное содержание сульфитредуцирующих клостридий на жабрах (порядка 10^4 КОЕ/г) не только придонных рыб, но и у всех обследованных видов.

Вибрионы являются в основном галлофилами, что определило их редкую высеваемость. Максимальную их численность регистрировали в западной части залива (в рыбе $6,1 \pm 0,9$ %, в воде $7,8 \pm 0,9$ % штаммов от всей выделенной микрофлоры). Их количество в восточной части водоема составило в воде $6,0 \pm 0,9$ % и рыбе $4,5 \pm 0,7$ % штаммов. Данный факт связывали с разной концентрацией соли в воде.

В современный период одной из особенностей формирования кислородного режима Азовского моря является возникновение зон дефицита кислорода в акватории Таганрогского залива, особенно в центральной и восточной его частях (63,5–80 % насыщения), в летний период. В 2008, 2009, 2013 гг. было зарегистрировано резкое снижение содержания кислорода в придонном горизонте (10–48 % насыщения) (Александрова, Баскакова, 2013). При повышении температуры низкая концентрация растворенного кислорода в воде вызывает увеличение скорости прохождения воды с содержащимися в ней токсикантами и бактериями через жабры и кишечник рыб (Ведемейер, 1980; Беляков, Яфаев, 1989; Bragg, 1991; Литвин, 1999). Следствием этого является высокое видовое разнообразие условно-патогенных микроорганизмов в организмах рыб в течение летнего сезона (табл. 6).

Таблица 6 Сезонная динамика видового разнообразия условно-патогенных микроорганизмов в органах и тканях рыб по индексу Маргалефа

Сезон исследований	Индекс видового разнообразия (DMg)			
	жабры	мышцы	печень	кишечник
Весна	5,02	1,75	0,76	6,03
Лето	8,04	3,2	1,02	10,3
Осень	4,77	2,2	0,51	6,78

Для районов промысла со сложившейся там формой хозяйственной активности, в частности с близостью крупных портов, значимым становится нефтяное загрязнение. В районе промысла Долгой косы из воды и жабр бычка-кругляка, пиленгаса выделены нефтеокисляющие бактерии: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas stutzeri*. Эти виды являются постоянными компонентами микрофлоры азовских рыб. Поэтому в случае загрязнения залива нефтяными углеводородами может произойти усиление бактериального прессинга на акваторию и гидробионтов за счет увеличения биомассы этих микроорганизмов (Лисицкая, 2008).

Таким образом, одним из ведущих факторов, влияющих на видовой и количественный состав микроорганизмов, является температура воды. Соленость

определяла развитие вибрионов, повышение рН – аэромонад и энтеробактерий. В случае фекального загрязнения происходит увеличение биомассы энтеробактерий и сульфитредуцирующих клостридий.

Глава 5. ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, КОЛОНИЗИРУЮЩИХ ВОДУ И РЫБУ ТАГАНРОГСКОГО ЗАЛИВА

5.1. Факторы патогенности УПМ, выделенных из воды и рыбы

Микробиологический анализ показал, что бактерии, выделенные из воды и рыбы Таганрогского залива, обладали набором тестируемых факторов патогенности со значительной долей вариабельности (табл. 7).

Таблица 7 Средние данные по факторам патогенности микроорганизмов, выделенных из воды и рыбы Таганрогского залива

Биотоп	Рост при +37 °С	Процент позитивных микроорганизмов					
		каталаза	оксидаза	протеаза	лецитиназа	гемолизин	ДНК-аза
Рыба	78,3 ± 2,1	91,9 ± 2,1	62,7 ± 9,9	52,7 ± 5,8	39,1 ± 3,7	31,4 ± 2,2	6,5 ± 1,1
Вода	82,5 ± 2,2	96,8 ± 2,3	64 ± 5,4	61,9 ± 6,0	37,3 ± 4,0	35,7 ± 4,2	4,6 ± 0,9

Одним из критериев оценки УПМ является температура, так как для большинства условно-патогенных бактерий температурный оптимум составляет +37 °С, что соответствует температуре организма человека и теплокровных животных. Доля жизнеспособных клеток была максимальной летом – 90,3 ± 2,5 % ($p < 0,05$), численность их весной и осенью снижалась: у рыбных изолятов – в 1,3 и 1,2 раза, у водных – в 1,2 и 1,1 раза соответственно.

Частота встречаемости бактерий с ферментативной активностью, коррелирующей с патогенностью, показала значительную их распространенность как в воде, так и в организмах рыб. Максимальное число водных и рыбных изолятов обладало каталазой и больше половины – оксидазой. Число водных бактерий с протеазой и гемолизином было в 1,1 раза больше, чем выделенных от рыб. Следует отметить, что летом число рыбных изолятов с лецитиназной активностью превышало число водных изолятов с этим фактором патогенности (табл. 8).

В сезонном аспекте численность бактерий, обладающих протеазой, была максимальной весной, минимальной летом и возрастала от лета к осени как в воде, так и в рыбе – в 1,5 раза, что было статистически достоверно ($p < 0,05$). Число культур с гемолитической активностью в воде и рыбе достигало максимума весной, снижаясь от весны к лету в воде в 1,8 и в рыбе в 1,6 раза. Их доля осенью имела значения, близкие к весенним показателям.

Таблица 8 Сезонная динамика факторов патогенности (протеаза, лецитиназа, гемолизин) бактерий, выделенных из воды и рыбы

Сезон исследований	Бактерии с факторами патогенности (%)					
	протеаза		лецитиназа		гемолизин	
	вода	рыба	вода	рыба	вода	рыба
Весна	86,3 ± 6,4	70,2 ± 6,1	32,1 ± 3,3	30,9 ± 3,4	42,8 ± 4,5	36,7 ± 3,2
Лето	39,8 ± 5,3	34,5 ± 5,5	42,0 ± 4,4	52,5 ± 3,6	23,7 ± 3,2	22,5 ± 2,9
Осень	59,7 ± 6,4	53,3 ± 5,9	37,8 ± 4,3	33,9 ± 4,1	40,6 ± 4,9	35,0 ± 4,7

Освоение условно-патогенным микроорганизмом различных экологических ниш в макроорганизме не всегда свидетельствует о роли УПМ в данном заболевании, но является фактором риска развития инфекции у бактерионосителей (Михайлова, 2011). В подобных ситуациях зачастую более существенным является определение у выделенных культур факторов патогенности. Ценность этого критерия повышается при обнаружении не одного, а нескольких признаков вирулентности (Бухарин и др., 1997, 2002, 2006).

Проявленная УПМ гетерогенность по наличию ферментов «защиты и агрессии» (лецитиназа, гемолизин, протеаза) бактерий позволила условно разделить их на четыре группы (рис. 7). Установлено, что бактерий с отсутствием ферментов среди выделенных из воды было в 1,4 раза меньше, чем среди выделенных из рыбы. В воде преобладали изоляты с одним ферментом, в рыбе – с двумя. Количество бактерий с тремя ферментами было выше (в 1,2 раза) в рыбе. Наблюдается усиление биологической активности УПМ (протеазной, лецитиназной, гемолитической), при пассировании через рыбу они не утрачивают своей патогенности, определяя экологическую значимость данной группы бактерий.

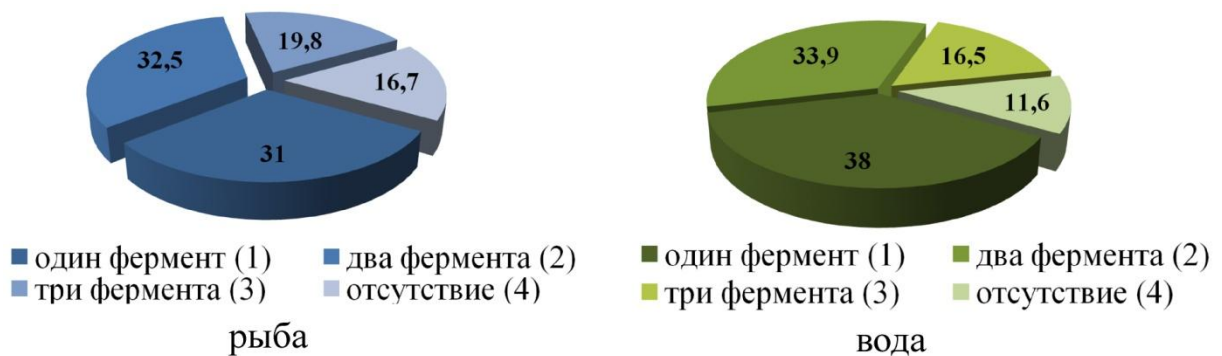


Рис. 7. Ранжирование микроорганизмов, выделенных из воды и рыбы, по наличию ферментов (протеаза, лецитиназа, гемолизин)

Таким образом, численность бактерий, обладающих факторами патогенности – оксидаза, каталаза, гемолизин, протеаза, лецитиназа (весна, осень), – в воде была выше, чем в рыбе, что свидетельствует о потенциальной опасности водных микробиоценозов и об их этиологической значимости.

5.2. Анализ устойчивости условно-патогенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам

Количество антибиотикорезистентных бактерий, циркулирующих в воде, в 1,1–1,2 раза больше, чем в рыбе. У 62–90 % рыбных изолятов наблюдалась устойчивость к одному и более препаратам, у 13–28 % зафиксирована полирезистентность к 4 из 8 АБП: ампициллину, левомецетину, тетрациклину, фуразолидону (или эритромицину). По данным некоторых авторов (Хвещук, 1999; Tambic Andrasevic, 2004), полирезистентные микроорганизмы являются причиной возникновения тяжелых форм инфекций, вызванных как патогенными, так и условно-патогенными бактериями.

Масштабное и долгосрочное использование ампициллина и других противомикробных препаратов этого класса привело к появлению и распространению микроорганизмов, реализующих лекарственную устойчивость за счет продукции различных вариантов β -лактамаз (Flamm, 2012). Число ампициллинрезистентных бактерий среди выделенных от рыб было достаточно высоким – 39–80 % изолятов (рис. 8). Резистентность к ампициллину и эритромицину выявлена у этиологически значимых видов грамотрицательных бактерий (*Vibrio alginolyticus*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium* sp.). При этом уже практически не активны в отношении всех групп ихтиопатогенных бактерий традиционные препараты, используемые в отечественном рыбоводстве – тетрациклин, фуразолидон (Методические указания..., 1973; Сборник..., 1998; Отчет..., 2013). Устойчивость к фуразолидону регистрировали у синегнойной палочки, моракселл и протеев (в 100 % случаев), аэромонад (80–100 %), ацинетобактеров (83,3 %), больше чем у половины штаммов (54,7 %) цитробактера, у 44 % энтеробактера. К тетрациклину были устойчивы синегнойная и кишечная палочки, а также больше половины штаммов энтеробактерий.

В настоящее время при лечении бактериальных заболеваний рыб эффективны гентамицин, левомецетин и ципрофлоксацин, входящий в состав препарата «Антибак» (Гаврилин, 2008, 2014; Отчет..., 2013). Среди тестируемых препаратов ципрофлоксацин и гентамицин обладали наибольшей активностью. К ципрофлоксацину проявляли резистентность клебсиеллы (100 %) и псевдомонады (38,6 % – *Pseudomonas* sp., 60 % – *P. aeruginosa*), к левомецетину – псевдомонады (100 %), аэромонады (60,3 % – *Aeromonas* sp., 80 % – *A. hydrophila*) и моракселлы (50 %).

Полимиксин характеризуется узким спектром антибактериальной активности к грамотрицательным бактериям, преимущественно к *Pseudomonas* sp. (Зверева, Бойченко, 2010). Препарат демонстрировал высокую активность против выделенных аэромонад, псевдомонад, ацинетобактеров, клебсиелл, но полностью неэффективен против альгенолитических вибрионов, моракселл, флавобактерий и стафилококков.

Общей тенденцией было увеличение частоты выделения культур, устойчивых к АБП, в апреле, июле – августе и снижение резистентности бактерий в ноябре в 1,2–1,7 раза. Наряду со снижением в осенний период чувствительности мик-

роорганизмов к АБП у водных изолятов резистентность была выше в 1,2–1,9 раза к 6 исследуемым препаратам, за исключением фуразолидона и эритромицина.

Существенные различия в антибиотикоустойчивости отмечены у бактерий, выделенных из жабр и мышц. Доля нечувствительных изолятов в составе микрофлоры жабр была в 1,25–3,2 раза выше, чем мышц. Известно, что микрофлора жаберной ткани повторяет водный пейзаж микрофлоры (Ларцева, 1998; Лисицкая, 2008).

Несмотря на высокий экономический эффект, бесконтрольное применение антибактериальной терапии и профилактики в аквакультуре, в частности при воспроизводстве молоди, сбросах воды из садков, прудов, наносит ущерб гидро-экосистеме водоемов, приводя к циркуляции антибиотикорезистентных штаммов. Наиболее экологически безопасным способом терапии является в настоящее время применение пробиотиков, в частности на основе *Bacillus subtilis*, являющихся антагонистами многих патогенных и условно-патогенных бактерий (Головки и др., 2009; Севрюков и др., 2013).

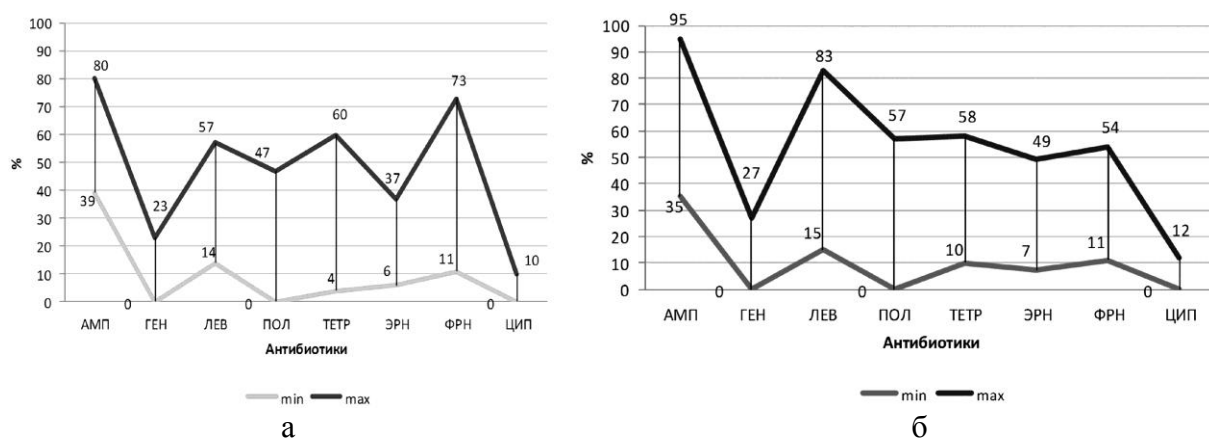


Рис. 8. Пределы устойчивости (%) бактерий, выделенных из состава микрофлоры рыбы (а) и воды (б) Таганрогского залива, к антибактериальным препаратам

Таким образом, численность антибиотикорезистентных бактерий, циркулирующих в воде, в 1,1–1,2 раза больше, чем в рыбе. Максимальная устойчивость отмечена к ампициллину, наименьшая к гентамицину и ципрофлоксацину. Левомецетин и фуразолидон, применяемые в рыбоводстве, неэффективны *in vitro* в отношении выделенных бактериальных патогенов рыб (аэромонад, псевдомонад).

III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были сделаны следующие выводы:

1. В формировании микробиоценоза рыб Таганрогского залива принимают участие условно-патогенные микроорганизмы из 28 родов 11 семейств: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Candida*, *Chryseobacterium*, *Clostridium*, *Edwardsiella*, *Empedobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Flavobacterium*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Rhodotorula*. Микроорганизмы этих родов обнаружены в воде, что явля-

ется свидетельством формирования микробиоценоза рыб за счет водной микрофлоры. Доминировали грамотрицательные палочки с превалированием представителей родов *Pseudomonas* (23,5 %) и *Aeromonas* (16,9 %). Доля грамположительных кокков и спорообразующих палочек составила в воде 8,7 %, в рыбе 9,9 %.

2. Эколого-географические факторы (температура, pH, соленость, антропогенно-техногенное загрязнение) определяли рост и развитие условно-патогенных бактерий.

3. Наличие факторов патогенности (оксидаза, каталаза, гемолизин, лецитиназа, протеаза) с более высокими значениями у водных изолятов свидетельствует о потенциальной опасности водных микробиоценозов и об их этиологической значимости.

4. В восточной части Таганрогского залива диагностированы инфекционные заболевания: ихтиофоз у серебряного карася и вибриоз у бычка-сирмана. Инфицирование серебряного карася *Ichthyophonus hoferi* свидетельствует о том, что в водоеме есть природные очаги ихтиофоза.

5. Установлена обсемененность МАФАНМ мышечной ткани у 7 обследованных видов рыб (бычка-сирмана, бычка-кругляка, карася, пиленгаса, судака, тарани, шемаи). У серебряного карася неоднократно регистрировали отсутствие бактерий в мышцах. Бычки и пиленгас, ведущие донный образ жизни, обсеменены больше, чем пелагические виды (судак, тарань, шемая).

6. Превышение содержания санитарно-показательных микроорганизмов зависело от сезона года (с максимальными пиками КМАФАНМ в апреле и БГКП в июле) и района лова (с более высокими микробиологическими показателями в центральной и восточной частях залива). Золотистый стафилококк из числа регламентируемых условно-патогенных бактерий обнаружен только у бычка-кругляка.

7. В рыбе циркулируют бактерии устойчивые к антибактериальным препаратам с более высокими значениями у водных изолятов (1,1-1,2 раза). У 62–90 % рыбных изолятов наблюдалась устойчивость к одному и более препаратам, у 13–28 % зафиксирована полирезистентность к 4 из 8 АБП. Максимальная устойчивость отмечена к ампициллину, наименьшая к гентамицину и ципрофлоксацину. Левомецетин и фуразолидон, применяемые в рыбководстве, неэффективны в отношении бактериальных патогенов рыб (аэромонад, псевдомонад). Антибиотикорезистентность бактерий отражает экологическое состояние микробиоценозов водных экосистем, и данный показатель может быть использован в биотестировании среды.

8. Качественный состав и количественные показатели условно-патогенной микрофлоры рыб Таганрогского залива являются результатом взаимодействия природных и антропогенных факторов и отражают экологическое состояние водоема. Это важно при решении вопроса о микробиологическом качестве объектов промысла и оценке пригодности залива для нормальной жизнедеятельности рыб, а также при разработке комплекса мероприятий по оздоровлению водного бассейна.

IV. СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Всего по теме диссертации опубликовано 27 научных работ, из них 9 в журналах, рекомендованных ВАК. Ниже перечислены основные работы.

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Головкин Г. В., Чистяков В. А., Сазыкина М. А., Зипельт Л. И., Коленко (Морозова) М. А., Сатаров В. В., Шепило В. Ю. Использование пробиотической добавки на основе *Bacillus subtilis* «В-1895» в аквакультуре // Рыбное хозяйство. – 2009. – № 5. – С. 60–64.
2. Цыбульский И. Е., Корпакова И. Г., Белова Л. В., Сазыкина М. А., Сазыкин И. С., Афанасьев Д. Ф., Коленко (Морозова) М. А. Характеристика процессов самоочищения морской среды с участием нефтеокисляющих микроорганизмов в районе аварии танкера в Керченском проливе // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2010. – № 1. – С. 78–82.
3. Морозова М. А., Ларцева Л. В. Микробные сообщества гидрозкосистемы Нижнего Дона и Таганрогского залива // Естественные науки. – 2012. – № 2 (39). – С. 50–56.
4. Афанасьев Д. Ф., Цыбульский И. Е., Ларин А. А., Корпакова И. Г., Сазыкина М. А., Морозова М. А., Воловик С. П. Разработка тест-системы оценки токсичности компонентов экосистем морских водоемов на основе флуориметрии аборигенных микроводорослей // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2012. – № 4. – С. 55–59.
5. Бойко Н. Е., Стрижакова Т. В., Рудницкая О. А., Ружинская Л. П., Морозова М. А. Материалы к характеристике функционального состояния черноморского калкана *Scophthalmus maeoticus maeoticus* в нерестовый период 2009–2010 гг. // Вопросы рыболовства. – 2013. – Т. 14, № 2 (54). – С. 272–282.
6. Севрюков А. В., Морозова М. А., Левченко Ю. И., Колмакова Т. С., Чистяков В. А. Эффективность применения синбиотического препарата на основе штамма *Bacillus subtilis* В 1895 в аквакультуре и ветеринарии // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2013. – № 4 (20). – С. 49–56.
7. Морозова М. А., Мирзоян А. В. Экологические особенности формирования бактериоценоза ихтиофауны в природных условиях и в аквакультуре Нижнего Дона // Фундаментальные исследования. – 2014. – №12 (8). – С. 1672–1676.
8. Морозова М. А., Федоров Ю. А. Роль сульфитредуцирующих клостридий в патологии у рыб // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2015. – № 1. – С. 60–66.
9. Федоров Ю. А., Морозова М. А., Трубник Р. Г. О связи физико-химических параметров и содержания восстановленных газов с сульфитредуцирующими клостридиями в донных отложениях малых рек // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2016. – № 1. – С. 79–84.

Патенты

1. Патент 2376755, Российская Федерация, МПК А01К 61/00. Способ подращивания молоди Азово-Черноморской шемаи в прудах / Головкин Г. В., Зипельт Л. И., Карпенко Г. И., Чистяков В. А., Сазыкина М. А., Коленко (Морозова) М. А.; заявитель и патентообладатель Федеральное Государственное унитарное предприятие Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства. №: 2008130542/12; 23.07.2008; опубл. 27.12.2009, Бюл. № 36. 8 с.: табл.
2. Патент 2013 131 303. С12N 1/12, С02F 9/04, С12Q 1/06. Способ получения бактериологически чистых культур морских микроводорослей / Афанасьев Д. Ф., Сазыкина М. А., Цыбульский И. Е., Корпакова И. Г., Морозова М. А.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное унитарное предприятие Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства. №: 2013131303/10; 08.07.2013; опубл. 20.01.2015, Бюл. № 2.: табл.

Статьи и тезисы в других изданиях

1. Сазыкина М. А., Коленко (Морозова) М. А., Чистяков В. А., Низова Г. А. Санитарно-микробиологическое состояние рыбы в Азовском и Черном морях в 2007 г. // Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна (2006–2007 гг.): Сб. науч. тр. / Азовский НИИ рыбн. хоз-ва (АзНИИРХ). – Ростов н/Д: Диапазон, 2008. – С. 110–117.
2. Сазыкина М. А., Цыбульский И. Е., Сазыкин И. С., Коленко (Морозова) М. А., Чистяков В. А. Выделение ассоциаций нефтеокисляющих микроорганизмов, участвующих в биоремедиации Азовского моря // Экологические проблемы промышленных городов. Сб. науч. тр. Ч. 1 / Под ред. Т. И. Губиновой. – Саратов: Фиеста-2000, 2009. – С. 58–60.
3. Цыбульский И. Е., Сазыкина М. А., Сазыкин И. С., Афанасьев Д. Ф., Коленко (Морозова) М. А. Выделение ассоциаций микроорганизмов-деструкторов нефти, участвующих в биоремедиации Азовского моря, и характеристика их биохимических и генетических свойств // Вклад фундаментальных исследований в развитие современной инновационной экономики Краснодарского края: тезисы научно-практической конференции грантодержателей РФФИ и администрации Краснодарского края (26–30 октября 2009 г., г. Анапа). – Краснодар: Просвещение-Юг, 2009. – С. 156.
4. Морозова М. А., Стрижакова Т. В., Мирзоян А. В., Шевкоплясова Н. Н. Оценка эпизоотического состояния промысловых рыб Азово-Черноморского бассейна по микробиологическим показателям в 2009 г. // Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна. Сб. науч. тр. (2008-2009 гг.). — Ростов н/Д: ФГУП «АзНИИРХ», 2011. – С. 111–118.
5. Морозова М. А., Мирзоян А. В., Стрижакова Т. В., Демидова А. В. Микробиологическая оценка промысловых видов рыб Азово-Черноморского бассейна в 2011 г. // Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна. Сб. науч. тр. (2010–2011 гг.) / Азовск. НИИ рыбн. хоз-ва (АзНИИРХ). – Ростов н/Д: Диапазон, 2012. – С. 194–201.

6. Морозова М. А., Шевкоплясова Н. Н., Демидова А. В. Оценка безопасности промысловых рыб Таганрогского залива по паразитарным и микробиологическим показателям в современный период // Теория и практика актуальных исследований: Материалы Международной научно-практической конференции. 17 апреля 2012 г.: Сб. науч. тр. Т. 2. – Краснодар: Издательский Дом – Юг, 2012. – С. 170–174.
7. Морозова М. А., Стрижакова Т. В., Шевкоплясова Н. Н., Демидова А. В. Эколого-эпизоотологическая характеристика и микробиологический мониторинг воды и рыбы Таганрогского залива Азовского моря // Материалы VIII Международной научно-практической конференции «Дни науки-2012» (г. Прага, 27.03–5.04.2012 г.). – Прага: Education and Science, 2012. – С. 35–40.
8. Морозова М. А., Шевкоплясова Н. Н. Микробиологические и паразитарные исследования видов-вселенцев пиленгаса и серебряного карася в Таганрогском заливе // Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана: Материалы II Международной научно-технической конференции (Владивосток, 22–24 мая 2012 г.). – Владивосток: Дальрыбвтуз, 2012. – С. 227–230.
9. Морозова М.А. Микробиологические исследования промысловых видов рыб Таганрогского залива //Материалы Всероссийской конференции молодых ученых и специалистов с международным участием, посвященной 90-летию со дня постройки научно-исследовательского судна ПИНРО «Персей». –Мурманск, 2012. – С 189-193.
10. Морозова М. А., Демидова А. В., Федоренко Г. А. Микробиологические критерии оценки промысловых рыб восточной части Таганрогского залива // Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-Черноморского региона: материалы VIII Международной конференции. Керчь, 26–27 июня 2013 г. – Керчь: ЮГНИРО, 2013. – С. 76–78.
11. Морозова М. А., Демидова А. В., Мирзоян А. В., Стрижакова Т. В. Резистентность к антибактериальным препаратам бактерий, выделенных из состава микрофлоры воды и рыбы Таганрогского залива // Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна. Сб. науч. тр. (2012-2013 гг.). – Ростов н/Д: ФГУП «АзНИИРХ», 2014. – С. 154–161.
12. Морозова М. А. Анализ устойчивости микрофлоры воды и рыбы Таганрогского залива к антимикробным препаратам // Современные вопросы экологического мониторинга водных и наземных экосистем: материалы Международной научной конференции молодых ученых, 26–29 октября 2015 г., г. Ростов-на-Дону, ФГБНУ «АзНИИРХ». – Ростов н/Д: ФГБНУ «АзНИИРХ», 2015. – С. 173–175.