

УДК 576.89:597(261)

А. Н. ХАНАЙЧЕНКО, Ю. Е. БИТЮКОВА, О. Г. НАЙДАНОВА,
Н. К. ТКАЧЕНКО, О. Д. ПАНТЕЛЕЕВА, Т. Г. БЕЛОИВАНЕНКО

**МОНИТОРИНГ МИКРОФЛОРЫ В СИСТЕМЕ ВЫРАЩИВАНИЯ
ЛИЧИНОЧНЫХ СТАДИЙ КАМБАЛЫ КАЛКАНА *PSETTA MAEOITICA PALLAS***

Впервые проведенный в технологической цепи выращивания черноморской камбалы калкана (*Psetta maeotica* Pallas) мониторинг численности общих гетеротрофов (ОГ) и группы вибрио (ГВ) (по росту КОЕ на МА и ТСBS, соответственно) показал возможные источники инфекции. УФ обработка воды снижает уровень ОГ до 10^2 и ГВ до 0. В экспоненциальной фазе роста микроводорослей ОГ не превышают 10^3 КОЕ/мл¹ при полном отсутствии ГВ. Повышение бактериального числа (ОГ 10^3 - 10^5 и ГВ 10^2 - 10^3 КОЕ/мл¹) происходит при инкубации икры и при интенсивном выращивании коловраток и метанауплиев артемий. Колонии ГВ $4 \cdot 10^2$ КОЕ/экз⁻¹ (50% ОГ) в теле 19-суточных личинок и превышающее 10^3 КОЕ/мл¹ (>90% ОГ) в среде умирающих 28-суточных личинок были сходны только с обнаруженными на икре.

Несмотря на то, что в практике мировой марикультуры уже в течение двух десятилетий совершенствуются методики промышленного воспроизводства морских рыб, смертность личинок на ранних стадиях развития от бактериальных инфекций все еще является основной проблемой при их искусственном выращивании. *Vibrio* являются одной из групп микроорганизмов, наиболее типичной для естественных морских сообществ, и их присутствие не всегда сопряжено с появлением инфекции. Однако при вспышках заболеваний в морских рыбопитомниках именно *Vibrio* пресобладают среди общих гетеротрофов. Большая часть видов группы *Vibrio* являются оппортунистической микрофлорой, но отдельные виды признаны безусловными патогенами, вызывающими пики смертности личинок морских рыб.

Цель данной работы – провести контроль микрофлоры (численности общих гетеротрофов - ОГ и группы *Vibrio* - ГВ) в процессе очистки воды для искусственного выращивания камбалы калкана, в среде выращивания живых кормов, в инкубаторах, выростных бассейнах, на икре и в кишечном тракте кормовых организмов и личинок калкана для выявления возможных патогенов, приводящих к высокой смертности личинок в технологической цепи выращивания.

Материал и методика. Методика культивирования личинок камбалы калкана Подготовка воды для культивирования микроводорослей, живых кормов и личинок камбалы калкана заключалась в очистке морской воды, включающей фильтрацию через картриджные фильтры (с диаметром пор 10, 5, 1 мкм) и последующую обработку воды УФ (UV-15 GPD; 30 000μW) (УФУ). Для маточных культур использовали морскую воду, которую дополнительно пастеризовали. В процессе культивирования личинок калкана использовали микроводоросли (из расчета 10^4 кл/мл¹): для регуляции среды в системе выращивания личинок на начальном этапе – *Chlorella marina* = *Nannochloropsis oculata* (CHLO) (Eustigmatophyceae), для внесения в систему выращивания перед началом перехода личинок на внешнее питание и питания коловраток и метанауплиев артемий - *Isochrysis galbana taitiana* (T-Iso) (Prymnesiophyceae). Оплодотворенную икру, полученную от диких производителей, промывали стерильной морской водой и инкубировали в 100 л проточных инкубаторах, с использованием воды, прошедшей обработку УФУ, при плотности 1000 экз/л¹ при 15°C. Выращивание личинок производили при $17 \pm 1^\circ\text{C}$ в 3 м³ бассейнах, заполненных за 3 суток до начала питания личинок водой, обработанной УФУ. Личинок вносили за сутки до начала питания при плотности 10 экз/л¹ и культивировали по стандартной методике [1].

Метод мониторинга микрофлоры. Для микробиологического мониторинга среды в системах выращивания личинок пробы (10 мл) отбирали стерильными пипетками в стерильные пробирки, и в течение 30 мин производили посев на твердые

среды. Для мониторинга микрофлоры коловраток, артемий и личинок отфильтровывали на стерильные капроновые сита, 3-кратно промывали стерилизованной водой, переносили в стерильную фарфоровую ступку и измельчали; после чего измельчали в объеме стерильной морской воды, соответствующей исходной концентрации организмов. Посевы производили на стандартные микробиологические среды, применяемые в аквакультуре: MA (Marine Agar, DIFCO, USA) - для общих морских гетеротрофов, и селективную для группы *Vibrio* - TCBS (Oxoid, England) на 70 мм чашки Петри (10 мкл в 2-х повторностях на MA и 40 мкл в 2-х повторностях на TCBS). После 48 ч при 25°C инкубации чашек Петри с посевами, колонии просматривали под биноклем при увеличении (12.5x2 и 12.5x7) и проводили подсчет колоний образующих единиц (КОЕ) на агаре по стандартной методике [2].

Результаты и обсуждение. Исследования показали, что последовательная фильтрация исходной морской воды (SW) через картриджные фильтры (FW) и обработка ультрафиолетом (UVW) приводили к снижению численности ОГ на 3 порядка, а ГВ до 0 (рис.1). УФ-облучение более эффективно элиминирует группу *Vibrio*. Известно, что доза 20,000 $\mu\text{W}/\text{сек}/\text{см}^2$ уничтожает до 99.9% бактериальных клеток в среде, содержащей $10^6 - 10^7$ КОЕ/мл [9].

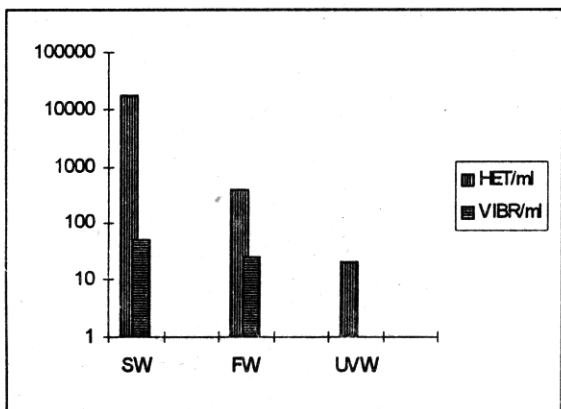


Рис. 1 Изменения численности общих гетеротрофов (HET/ml) и группы *Vibrio* (VIBR/ml): в исходной морской воде - SW; после фильтрации через картриджные фильтры - FW; после облучения UVW морской воды на 3-и (D3) и 8-е (D8) сутки функционирования ультрафильтрационной установки
Fig. 1 Dynamics of the number of total heterotrophs (HET/ml) and *Vibrio* (VIBR/ml) in the initial (input) marine water - SW; after filtration through the cartridge filters - FW; after UV treatment - UYW on the 3rd (D3) and 8th (D8) days of ultrafiltration unit functioning

Формирование микрофлоры в среде культивирования личинок рыб при интенсивном культивировании связано с такими субстратами, как метаболиты микроводорослей, кормовых организмов, личинок и разлагающаяся органика.

Таким образом, состав микрофлоры в системе выращивания на начальном этапе определяется микрофлорой, вносимой в систему вместе с микроводорослями. Соотношение между численностью микроводорослей и ассоциированной с ними гетеротрофной микрофлоры изменяется в зависимости от вида микроводорослей и фазы роста аксеничных культур [5, 6]. Микроводоросли в экспоненциальной фазе роста, CHLO в большей степени, чем T-ISO, снижали рост численности ОГ (КОЕ менее 10^3 в мл). Численность ОГ снижается в экспоненциальной фазе роста (D2-D6) и возрастает параллельно численности микроводорослей при переходе к стационарной фазе роста (D6-D9) культур CHLO (рис.2). При росте микроводорослей наблюдали три варианта взаимодействия микроводорослей и ассоциированной микрофлоры: параллельный рост численности микроводорослей и ОГ в экспоненциальной фазе роста маточных культур T-ISO (D1i-D3i) (рис. 3); ускорение роста численности ОГ во время лаг-фазы (D5b-D7b) при большом разбавлении концентрации микроводорослей при переходе от маточного культивирования к массовому; ингибирование ОГ в начале экспоненциальной фазы роста (D5b-D7b) массовых культур (рис.3). ГВ обычно отсутствуют в культурах морских микроводорослей [7], так как микроводоросли, например, *Chlorella*, в экспоненциальной фазе роста подавляют рост бактерий [5].

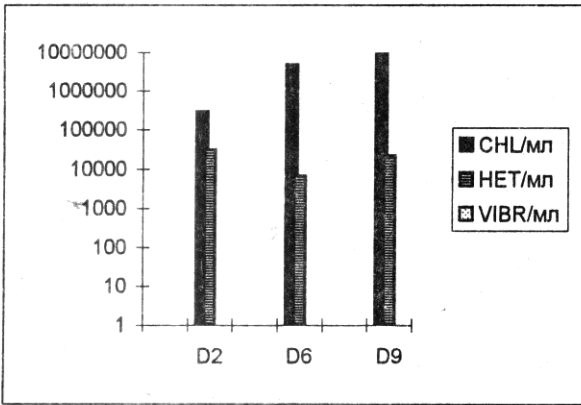
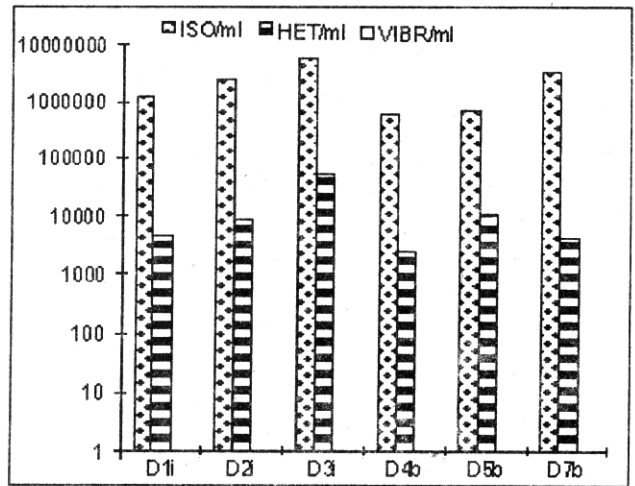


Рис. 2 Динамика численности общих гетеротрофов (HET/мл) и группы *Vibrio* (VIBR/мл) при росте культуры микроводорослей *Chlorella marina* (CHL/мл) со 2-х (D2) по 9-е (D9) сутки

Fig. 2. Dynamics of the number of total heterotrophs (HET/ml) and *Vibrio* (VIBR/ml) during the growth of the microalgae *Chlorella marina* culture (CHL/ml) from 2nd (D2) to 9th (D9) days

Рис. 3 Динамика численности общих гетеротрофов (HET/ml) и группы *Vibrio* (VIBR/ml) при росте микроводорослей *Isochrysis galbana* (ISO/ml) в маточных - с 1 (D1i) по 3-и (D3i) сутки, и массовых культурах - с 4 (D4b) по 7-е (D7b) сутки

Fig. 3 Dynamics of the number of total heterotrophs (HET/ml) and *Vibrio* (VIBR/ml) during the growth of the microalgae *Isochrysis galbana* in the initial - from 1st (D1i) to 3rd (D3i), and batch cultures - from 4th (D4b) to 7th (D7b) days



В накопительной маточной культуре коловраток ГВ в среде культивирования отсутствовала, а уровень ОГ составлял $5 \cdot 10^4$ КОЕ/мл. Через 4 ч после инокуляции этих коловраток в массовую культуру микроводорослей T-ISO (концентрация $5 \cdot 10^6$ кл/мл) обнаруживается микрофлора ГВ, уровень которой достигает 10^3 КОЕ/мл, при уровне ОГ в среде более $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, на 3 сутки роста массовой культуры коловраток (рис.4). В коловратках, вносимых в бассейн для кормления личинок, титр ОГ слегка превышал 10^3 КОЕ/экз, при единичных ГВ (рис.5 BRA), и был сопоставим с уровнем ОГ в 1-суточных метанауплиях артемий из инкубатора (рис. 5, MNA). После промывания артемий стерилизованной пресной водой уровень ОГ снижался на порядок (рис. 5, MNA_{pur}), а ГВ отсутствовали. После суток питания T-ISO количество ОГ, выросших на МА, составляло $5 \cdot 10^3$ КОЕ/экз, преобладающее число которых составляла микрофлора, прораставшая на TCBS в форме прозрачных однородных колоний (рис. 5, MNA_{iso}).

Число ОГ в теле исследованных личинок возрастало от начала экзогенного питания до конца фазы питания коловратками до 10^6 КОЕ на личинку с присутствием только следов ГВ (рис.7, LD12 BRA). У 19-суточных личинок, питающихся метанауплиями артемий, было обнаружено возрастание титра ГВ, составивших 40% от ОГ (рис 7, LD19 MNA_{iso}). Численность ОГ в воде инкубаторов перед посадкой личинок составляла ниже 10^2 КОЕ/мл, ГВ отсутствовала. Перед выклевом личинок в воде инкубаторов бактериальная нагрузка резко возрастала: ОГ $5 \cdot 10^4$ и ГВ 10^2 - 10^3 КОЕ/мл⁻¹ (рис.6 ID0). В 3 м³ бассейнах после инокуляции микроводорослей до внесения личинок ГВ отсутствовала, ОГ составляли 10^3 КОЕ/мл⁻¹ (рис. 6 CD0). Через сутки после начала

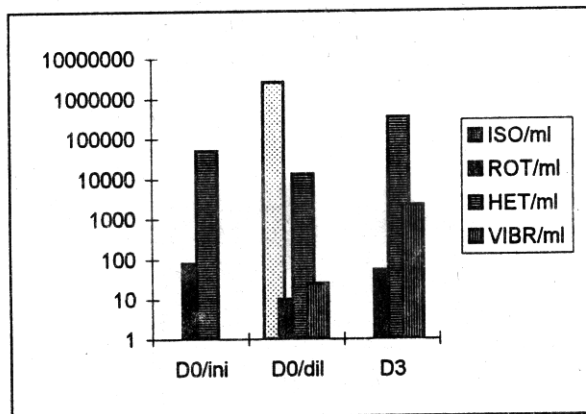
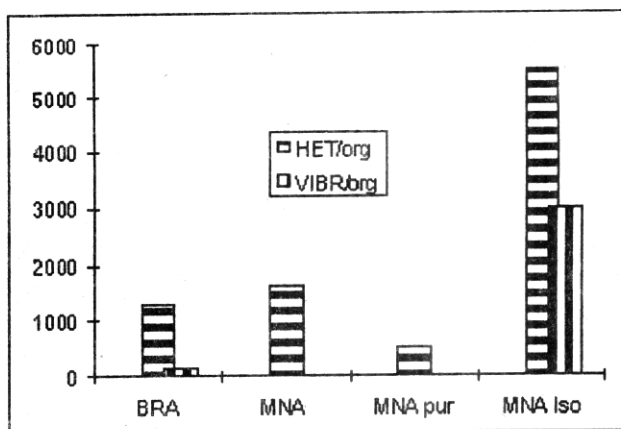


Рис. 4 Численность общей гетеротрофной (HET/ml) и микрофлоры группы *Vibrio* (VIBR/ml) в накопительных культурах коловраток (ROT/ml): до разбавления (D0/ini), после разбавления *Isochrysis galbana* (ISO/ml) (D0/dil) и на 3-и сутки роста (D3).

Fig. 4 Number of total heterotrophs (HET/ml) and *Vibrio* (VIBR/ml) in the batch cultures of rotifers (ROT/ml): before (D0/ini) and after dilution by microalgae *Isochrysis galbana* (ISO/ml) (D0/dil) and on the 3rd day of growth (D3).

Рис. 5 Численность общих гетеротрофов (HET/org) и группы *Vibrio* (VIBR/org) в кормовых организмах: BRA - коловратки *Brachionus plicatilis*; MNA - метанауплии *Artemia* sp. из инкубатора до начала питания; MNA_{pur} - после дезинфекции; MNA_{Iso} - питающиеся *Isochrysis*.

Fig. 5 Number of total heterotrophs (HET/org) and *Vibrio* (VIBR/org) in the food organisms: BRA - rotifers *Brachionus plicatilis*; MNA - metanauplii *Artemia* sp. from incubator before start of feeding; MNA_{pur} - after disinfection; MNA_{Iso} - feeding *Isochrysis*.



экзогенного питания личинок коловратками (рис.6, CD4) ОГ возрастали до 10^5 КОЕ·мл⁻¹, и достигали максимальной величины $3 \cdot 10^5$ КОЕ·мл⁻¹ на последние сутки нахождения личинок при отсутствии протока (рис.6, CD7). После включения протока в 3 м³ бассейне с 8-суточного возраста личинок, на 12 сутки ГВ в воде исчезают, а уровень ОГ снижается до 10^3 КОЕ·мл⁻¹ (рис.6, OD12). В среде проточного 600 л бассейна, куда была отсажена группа погибающих 21-28 суточных личинок с темной пигментацией, характерной для стрессовых условий, титр ГВ уже составлял более 90% (рис.6, OD21-OD28). Качественные характеристики колоний ГВ, преобладающих на среде ТСBS, не совпадали с описанием ни одной из колоний, характерных для пищевых объектов (коловраток и артемий), но совпадали с характеристиками колоний, выросших на 20% инкубируемой икры калкана.

Наши данные подтверждают, что УФ-облучение эффективно ингибирует рост потенциальных патогенов группы *Vibrio*. Однако неселективное снижение численности бактерий с помощью мембранной фильтрации и УФ-обработки в воде, используемой для искусственного выращивания личинок морских рыб, нарушает исходное бактериальное сообщество морской воды. Среда интенсивного культивирования с повышенным содержанием разлагающейся органики может стимулировать селекцию и рост оппортунистических бактерий, присутствующих первоначально в незначительном количестве. Начальная колонизация личинок бактериями, присутствующими на поверхности икры, может происходить во время их выклева или пассивного заглатывания воды при эндогенном питании [8]. С началом экзогенного питания в кишечной микрофлоре личинок происходит сдвиг к преобладанию микрофлоры,

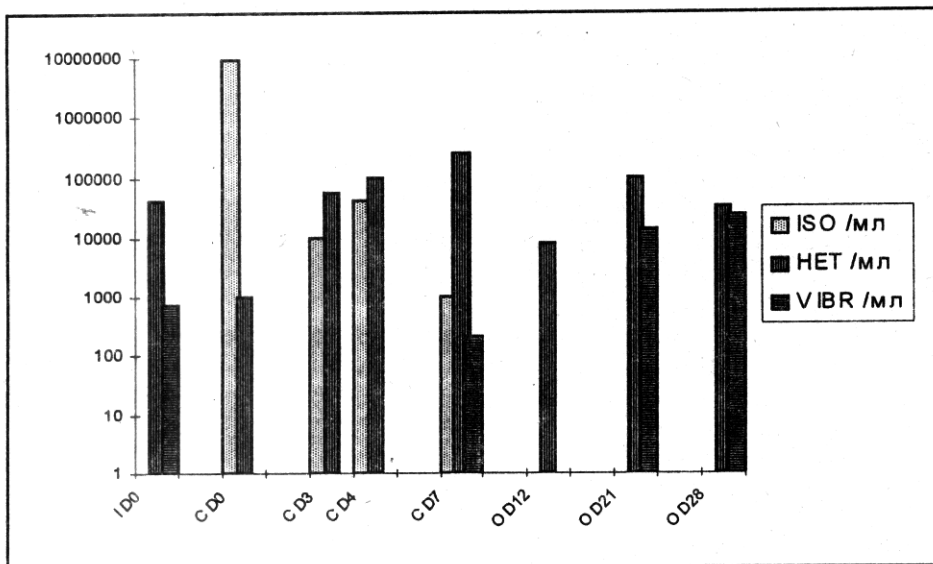
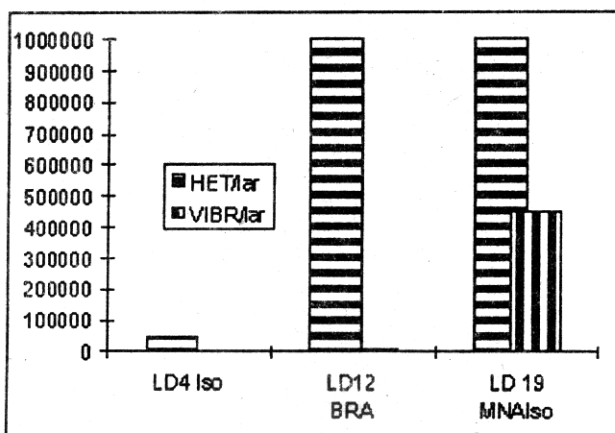


Рис. 6 Изменение численности общих гетеротрофов (HET/мл) и группы *Vibrio* (VIBR/мл) в морской воде в процессе выращивания личинок: в инкубаторе перед выклевом личинок (ID0), в замкнутой системе выращивания во время водоподготовки в 3 м³-бассейне (CD0) и при питании коловратками в замкнутой (CD3-7) и открытой системе (OD12) на 3-12 сутки и в проточной системе 0.6 м³-бассейне при питании метанауплиями артемий на 21-28 сутки (OD21-28).

Fig. 6 Dynamics of the number of total heterotrophs (HET/ml) and *Vibrio* (VIBR/ml) in the water during the turbot larvae rearing: in the incubator before hatching (ID0), in the closed system before the larvae introduction in the 3 m³-basin (CD0); during the larvae feeding rotifers in the closed (CD3-7) and opened system (OD12) on the 3-12 days and in the opened system in 0.6 m³-basin feeding *Artemia metanauplii* on the 21-28 days (OD21-28).

Рис. 7 Изменение численности микрофлоры - общих гетеротрофов (HET/lar) и группы *Vibrio* (VIBR/lar) личинок *Psetta maeotica* Pallas в онтогенезе: в начале активного питания (LD4) в присутствии в бассейне микроводорослей T-Iso; в конце фазы питания коловратками (LD12 BRA) и при питании метанауплиями артемий (LD19 MNA)

Fig. 7 Dynamics of the number of total heterotrophs (HET/lar) and *Vibrio* (VIBR/lar) in the larvae of *Psetta maeotica* Pallas in ontogenesis: before start of exogenous feeding (LD4), at the end of rotifer feeding stage (LD12 BRA) and during feeding *Artemia metanauplii* (LD19 MNA)



ассоциированной с живыми кормами, с доминированием ферментативных бактерий, преимущественно *Vibrio* [8]. Известно, что со старением культуры коловраток растет тенденция роста численности *Vibrio* [7], но в рассмотренной экспериментальной схеме накопительные культуры коловраток пересеивали каждые 3 суток. Основные вспышки смертности личинок камбаловых чаще приурочены к самому критическому периоду, соответствующему 12-30-суточному возрасту и совпадающему с периодом кормления артемиями. Наибольшую смертность личинок камбаловых в описываемом эксперименте

наблюдали также в этот период, но смертность личинок, предположительно, обусловлена вспышкой микрофлоры, присутствующей на эмбрионах калкана во время развития икры в инкубаторе. Известно, что в среде выращивания личинок при благоприятных условиях бактериальное число, получаемое на среде TCBS, обычно в 10-100 раз ниже общей численности гетеротрофов, но при повышенной смертности личинок они оказываются близкими по значению [4], что мы и наблюдали в личинках, начиная с 19-ти суточного возраста и в дальнейшем в воде в присутствии умирающих личинок.

Таким образом, в процессе мониторинга микрофлоры обнаружено, что наиболее уязвимым звеном в рассмотренной технологической схеме является отсутствие стерилизации поверхности икры, полученной от диких производителей, через которую и может происходить начальная колонизация личинок условно патогенной микрофлорой. Последняя, возможно, начинает доминировать в период наиболее критического периода личинок (метаморфоза), совпадающего со сменой метаболического субстрата, при смене питания от коловраток к метанауплиям артемий. С целью повышения выживаемости личинок необходима разработка эффективного метода стерилизации икры для получения качественного посадочного материала.

1. Битюкова Ю.Е., Ткаченко Н.К., Владимирцев В.Б. и др. Способ искусственного получения молоди черноморской камбалы калкана: Патент N 2017413. RU C15 AO1K/1/00.N5054176/13.- Бюл. N 15, Пр. 20.04.92. - Россия, 1992. - 10 с.
2. Родина А.Г. Методы водной микробиологии. Практик.рук. М.-Л.: Наука, 1965.- 364 с.
3. Chowdhury M.J.U. Probiotic manipulation of the gut microflora in first-feeding larval turbot (*Scophthalmus maximus* L.): MD Thesis. University of Ghent. - 1995. -72 p.
4. Dehasque M., Verdonec L., Sorgeloos P. et al. Determination of bacterial contamination in the live food production systems in marine fish hatcheries in southern Europe // Larvi'91. Fish and Crustacean Larviculture Symposium / P.Lavens, P.Sorgeloos, E.Jaspers, F.Ollevier (eds.). - Gent, Belgium, 1991. - EAS Sp.Publ. 15. - P. 399 - 402.
5. Kellam S.J., Walker J.M. Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture // Br.Phycol. J. - 1989. - 24. - P.191 - 194.
6. Khanaichenko A.N., Buivolova O.G. Effect of microalgae type on composition of associated microflora ("green" water benefits - anti- or probiotic?) // Aquaculture '97. Trondheim (Norway).- 1997. - EAS Sp.Publ.26. - P. 48-49.
7. Nicolas J.L., Robic E., Ansqer D. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larvae survival //Aquaculture. -1989. - 83. - P. 237 - 248.
8. Olafsen J.A. Marine animals as hosts for fish-pathogenic vibrios // 3rd Intern. Mar. Biotech. Conf. Progr. Abstracts - Tromsø-Norway, 1994. - p. 92.
9. Sugita H., Mitsuya T., Amanuma K. et al. Ultraviolet susceptibility of three marine fish pathogens. //Bull. Coll. Agric. Vet. Med. Nihon. Univ. Nichidai. Nohuno. - 1992. - no. 49.- P. 117 - 121.

Институт биологии южных морей НАНУ,
Севастополь

Получено 26.09.2000

A. N. KHANAICHENKO, Y. E. BITYUKOVA, O. G. NAIDANOVA,
N. K. TKACHENKO, O. D. PANTELEEVA, T. G. BELOIVANENKO

MONITORING OF MICROFLORA IN THE SYSTEM OF REARING OF THE LARVAE STAGES OF THE BLACK SEA TURBOT *PSETTA MAEOITICA* PALLAS

Summary

Monitoring of the total heterotrophs (TH) and *Vibrio* group (VG) (CFU on MA and TCBS, correspondingly) showed the possible ways of pathogens in the technological chain of artificial rearing of the Black Sea turbot (*Psetta maotica* Pallas). UV treatment decrease the TH level to 10^2 CFU ml⁻¹ VG - to 0. In the exponential stage of microalgae growth TH is below 10^3 CFU ml⁻¹ and VG are absent. Bacterial number (TH 10^3 - 10^5 and VG 10^2 - 10^3 CFU ml⁻¹) increased during eggs incubation and intensive feeding of rotifers and *Artemia* metanauplii. Colonies of VG $4 \cdot 10^5$ CFU ml⁻¹ (50% TH) in the guts of 19-DAH larvae and VG - 10^3 КОЕ.мл⁻¹ (>90% ОГ) in the water with moribund 28-DAH larvae resemble only those found on the incubated eggs.