

УДК 639.3.07:639.331:597.442

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ И СМЕШАННОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ГИБЕЛЬ ЛЕНСКОГО ОСЕТРА *ACIPENSER BAERII* В САДКАХ

© 2015 г. А.В. Казарникова¹, Е.В. Шестаковская², М. Галеотти³,
А.В. Тришина⁴, А.А. Турченко⁵

Поступила 20.06.2014

Проведены исследования двухгодовиков ленского осетра в садках рыбоводного водоема, расположенного в обводненном песчаном карьере нижнего течения р. Дон. Гибель рыб началась с середины лета 2013 г. и достигла к концу сентября 15%. Больные рыбы приобретали бледную окраску, не питались, становились вялыми и теряли в весе. На отдельных участках тела отмечались серозно-геморрагическое воспаление кожи и язвы. У погибающих особей жабры были бледные, брюшко увеличено, анус воспален. Рыбы теряли координацию движений, переворачивались спиной вниз и затем погибали. Неблагоприятные условия внешней среды выразились в температурной и кислородной стратификации водных слоев, которая привела к образованию зон, обедненных кислородом; нарушении соотношения азота и фосфора; повышении содержания сульфатов и хлоридов. В результате бактериологического исследования было выделено 67 изолятов (32 из воды и 35 из рыб), относящихся к трем родам – *Aeromonas*, *Vibrio* и *Edwardsiella*. Общее микробное число в воде в обследованных садках составило $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл; коли-индекс 2300; коли-титр 0,43. Уровень микробной обсемененности паренхиматозных органов ленского осетра был гораздо выше ($5 \cdot 10^4$ КОЕ/мл) в садках, где была зарегистрирована гибель. Все штаммы, выделенные из паренхиматозных органов рыб, оказались чувствительны к фуразолидону, ципрофлоксацину, доксициклину, тетрациклину, левомицетину. Гистологические изменения, наблюдаемые в печени, селезенке и сердце больных рыб, проявлялись в концентрированных геморрагических рассеянных очагах некроза. Бактерии, зарегистрированные в пораженных некрозом участках, окрашивались в красный цвет по Цилю–Нильсену и имели типичную форму бациллы. Их структура и характеристики свидетельствовали о возможной принадлежности к микобактериям. Изменения в составе красной крови ленского осетра сопровождались агглютинацией, пойкилоцитозом, анизоцитозом эритроцитов и развивающейся у рыб анемией. Возникающая у рыб лейкопения характеризовалась увеличением числа нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов и уменьшением относительного количества лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов.

Ключевые слова: аквакультура, ленский осетр *Acipenser baeri*, бактерии, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Edwardsiella*, условия внешней среды.

Включение всех видов осетровых во вторую категорию охраны СИТЕС (CITES, Convention on International Trade in Endangered Species of Wild

Fauna and Flora – Конвенция о международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой исчезновения) с 1998 г. стимулировало создание различных программ по их сохранению, а также по коммерческому выращиванию. Основными объектами искусственного разведения на юге России являются русский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii*), севрюга (*Acipenser stellatus*), белуга (*Huso huso*), стерлядь (*Acipenser ruthenus*), бестер (*H. huso* × *A. ruthenus*). В последнее десятилетие в аквакультуру юга России был введен сибирский (ленский) осетр, *A. baerii*, который с 1969 г. стал объектом искусственного разведения в европейской части России и с 1975 г. – за рубежом. Использование ленского осетра для коммерческого выращивания обусловлено способностью данного вида хорошо расти при высоких плотностях посадки,

¹ Южный научный центр Российской академии наук (Southern Scientific Centre, Russian Academy of Sciences), 344006, г. Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41, e-mail: kazarnikova@gmail.com

² Центральная производственная станция по акклиматизации и борьбе с болезнями рыб (Ростовский филиал) (Central Station for Acclimatization and Fish Disease Control (Rostov Branch)), 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. Обороны, 49, e-mail: fish_cps@mail.ru

³ Университет Удине, Италия (University of Udine, Italy); e-mail: marco.galeotti@uniud.it

⁴ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотrebnadzor)), 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40.

⁵ ООО “Луч” (JSC “Luch”).

питаться исключительно сухими гранулированными комбикормами, а также высоким качеством мяса и икры.

В последние годы объем выращивания осетровых в отдельных хозяйствах Российской Федерации доходил до 400 т/год [1]. Однако использование интенсивных форм разведения рыб, особенно в садках, приводит к ухудшению гидрохимического режима за счет загрязнения водной среды продуктами метаболизма и остатками корма [2]. Органическое загрязнение, температура, pH и другие факторы водной среды способствуют росту и развитию не только сапрофитной микрофлоры, но и условно-патогенной и патогенной. При этом растущая агрессивность среды приводит к снижению резистентности организма рыб и как следствие возникновению болезней [3].

О гибели в результате заболеваний осетровых рыб, являющихся объектами аквакультуры, сообщали разные авторы [4–9]. Интенсивное выращивание создает в водной среде такую экологическую нишу для водных организмов, в которой при симбиотических взаимодействиях микроорганизмов с рыбой возникающие ассоциации бактерий меняются в сторону паразитирования. К этой группе бактерий относятся представители родов *Aeromonas*, *Vibrio* и *Edwardsiella* [10]. В частности *A. hydrophila* [6–8] и *A. sobria* в отдельных случаях [6; 11] были зарегистрированы как возбудители заболеваний, они приводили к массовой гибели рыб в рыбоводных хозяйствах.

В данной работе заболевание ленского осетра в садках и сопутствующие условия выращивания были исследованы в едином комплексе: рыбы, тесно связанные с водным пространством, – водная среда.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Летом 2013 г. была зарегистрирована гибель двухгодовиков ленского осетра в садках рыбоводного водоема, расположенного в обводненном песчаном карьере нижнего течения р. Дон. Гибель единичных экземпляров началась с середины лета и достигла к концу сентября 15% от всего количества содержащихся *A. baerii*. Одновременно с ленским осетром на садковой базе выращивались русский осетр и стерлядь, однако признаков заболевания у этих видов отмечено не было. Пробы воды из основного водоема и садков были взяты на бактериологический и гидрохимический анализы. Согласно общепринятым в ихтиопатологии методам [12], заболевшие рыбы были осмотрены клинически, далее были проведены паразитологические, бактериологические, гистологические и гематологические исследования.

Каждую рыбу измеряли, взвешивали и осматривали клинически, уделяя внимание повреждениям на поверхности тела. Внутренние органы исследовали на наличие патологических изменений и затем отбирали для бактериологических исследований. Соскобы с жабр и поверхности тела, а также внутренние органы и желудочно-кишечный тракт исследовали компрессионным методом под микроскопом.

Исследования проводили в конце августа, когда гибель рыб начала возрастать. Воду для бактериологического исследования отбирали из поверхностных водоемов (садков и основного водоема), определяли общее микробное число (ОМЧ), коли-титр и коли-индекс. Отбор проб воды, фильтрацию через мембранные фильтры, выделение культур микроорганизмов, их идентификацию проводили по общепринятым методикам [13; 14]. Биохимические свойства представителей семейства Enterobacteriaceae определяли с помощью коммерческих тест-систем Enterotest фирмы Lachema (Чехия). Микробиологические исследования проводили согласно нормативной документации на продукцию МУК 13 – 14-2/1738 от 27.09.1999.

Материал для бактериологического исследования из паренхиматозных органов (печень, селезенка, почки) одновременно отбирали у пяти рыб. Взвеси органов эмульгировали в физиологическом растворе, высевали на селективные питательные среды для определения различных групп микроорганизмов. Наряду с качественным составом микробного обсеменения рыб проводили учет их количественного состава. Общую бактериальную обсемененность рассчитывали по количеству выросших колоний и выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ) на 1 грамм органа. Идентификацию выделенных бактериальных культур проводили путем изучения морфологии бактерий, их культуральных, биохимических и других признаков, присущих каждому виду [12; 14; 15]. Кроме этого, в специализированной лаборатории был проведен анализ на микобактериоз.

Определение чувствительности к антибиотикам выделенных микроорганизмов проводили по общепринятым методикам, интерпретацию результатов проводили согласно международным стандартам NCCLS. Исследована чувствительность к пяти антимикробным препаратам, принадлежащим к четырем различным фармакологическим группам.

Гидрохимические показатели воды в садках определяли согласно методическим указаниям по исследованию проб воды из рыбохозяйственных водоемов [16].

Для изготовления гистологических препаратов кусочки тканей (печень, селезенка, сердце) от

пяти рыб фиксировали в 4%-м нейтральном буферном формалине. После этого образцы выдерживали при комнатной температуре и помещали в автоматический гистопроцессор (TISBE-гистопроцессор, Diapath). Подготовленные экземпляры заливали в парафин (ParaplastPlus, Diapath). С помощью микротомы (Reichert-Jung 2050) получали срезы толщиной 5 мкм, которые затем окрашивали гематоксилином – эозином по Гимзе и Циллю – Нильсену. Препараты исследовали под световым микроскопом (Leica DMRB) и фотографировали системой “Никон”.

Изготовление мазков крови проводили с использованием общепринятых в ихтиопатологии методов [12; 16]. Лейкоцитарную формулу определяли, подсчитывая в окрашенных мазках 200 клеток белой крови. Индекс сдвига лейкоцитов рассчитывали по методу Яблунинского в модификации Сухопаровой [17]. При оценке интенсивности эритропоза определяли процентный состав незрелых эритроцитов. Методика сводится к просчету по всему мазку в различных его участках 500 эритроцитов. Среди них отмечалось количество патологически измененных форм клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показатели рН поверхностный (8,08) и рН придонный (7,45) указывали на опасность резкого снижения содержания кислорода в воде садков в отличие от основного водоема, где рН поверхности (7,42) был ниже рН придонного слоя (7,76). Содержание солей в воде составило 5‰. Полученные

значения соотношения азота и фосфора (10:1 и 12:1) в садках при температуре воды 25 °С не соответствовали ПДК и были типичными для развития синезеленых водорослей. На последнее оказало свое влияние загрязнение воды сульфатами (625,0–730,0 мг/л) и хлоридами (986,0–1003,0 мг/л). Превышение ПДК основных солеобразующих элементов (в том числе натрия 756,0 и 815,0 мг/л и магния 73,0 и 79,0 мг/л) обусловило увеличение минерализации и жесткости в 2–2,9 раза выше нормы (табл. 1).

Ленский осетр был единственным видом, заболевшим на садковой базе. Средняя длина рыб составила 56,1 см ($L = 47–60$ см), а масса 533,01 г ($P = 440–690$ г). Больные рыбы приобретали бледную окраску, теряли аппетит, становились вялыми и теряли в весе. Коэффициент упитанности по Фультону колебался в пределах 0,35–0,50. На отдельных участках тела отмечались серозно-геморрагическое воспаление кожи и язвы. У погибающих особей жабры были бледные (рис. 1), брюшко увеличено, анус воспален. Рыбы теряли координацию движений, переворачивались спиной вниз и затем погибали.

При вскрытии брюшной полости у больных рыб обнаруживали кровоизлияния на брюшной стенке и большое количество прозрачной, желтовато-кровоистой жидкости, увеличенный плавательный пузырь (рис. 2, 3), перитонит, катарально-геморрагическое воспаление кишечника, застой крови в паренхиматозных органах. Печень имела песочный цвет и мозаичную окраску с многочисленными участками кровоизлияний, желчный пузырь переполнен (рис. 4). Селезенка была увеличена. Желу-

Таблица 1. Гидрохимические показатели воды в основном водоеме и садках летом 2013 г.

Показатели	Ед. измерения	Водоем, поверхностные слои	Водоем (–5 м)	Садок, поверхностные слои	Садок (–5 м)	ПДК для воды водных объектов рыбохозяйственного назначения
Перманганатная окисляемость	мгО ₂ /л	6,4	8,5	14,4	12,8	до 20 (30 – не более 2–3 дней)
Реакция среды	рН	7,62	7,76	8,08	7,45	7–8
Аммонийный азот	мг/л	0,08	0,15	0,12	0,17	до 0,5
Нитритный азот	мг/л	0,005	0,007	0,006	0,008	до 0,08
Нитратный азот	мг/л	0,04	0,03	0,03	0,04	до 1,0
Суммарный азот	мг/л	0,13	0,19	0,16	0,21	2,0
Фосфаты	мг/л	0,016	0,018	0,15	0,017	до 0,5
Соотношение N:P		8:1	10:1	10:1	12:1	4:1–8:1
Сульфаты	мг/л	625,0		730,0		100, природный фон?
Гидрокарбонаты	мг-экв/л	3,6		3,6		до 4
Хлориды	мг/л	986,0		1003,0		300, природный фон?
Общая жесткость	мг-экв/л	12,0		12,0		6–8
Кальций	мг/л	112,2		120,0		до 180
Магний	мг/л	79,0		73,0		до 40
Натрий	мг/л	756,0		815,0		до 120
Минерализация	г/кг	2,8		2,9		1,0



Рис. 1. Жабры с участками кровоизлияний



Рис. 3. Экссудат в полости тела и увеличенный плавательный пузырь



Рис. 2. Кровоизлияния на слизистой брюшной полости



Рис. 4. Печень с очагами некроза и переполненный желчный пузырь

дочно-кишечный тракт был свободен от пищи, слизистая воспалена. Паразитов у исследованных рыб не обнаружено.

В результате бактериологического исследования было выделено 67 изолятов (32 из воды и 35 из рыб), относящихся к трем родам – *Aeromonas*, *Vibrio* и *Edwardsiella*. Общее микробное число воды в обследованных садках составило $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл; коли-индекс 2300; коли-титр 0,43, что позволяет отнести их ко второй категории загрязненности. В структуре рода *Aeromonas* был дифференцирован вид *Aeromonas sobria* ($5 \cdot 10^1$ КОЕ/мл); выделенные вибрионы отнесены к *Vibrio cholerae* non O1/non O139 ($4 \cdot 10^1$ КОЕ/мл).

Бактериальная контаминация паренхиматозных органов рыб обнаружена в 80% проб. Качественный состав микрофлоры был представлен грамотрицательными оксидазо-отрицательными бактериями группы кишечной палочки (БГКП), идентифици-

рованными как *Edwardsiella* spp., и оксидазоположительными бактериями *Aeromonas sobria* и *Vibrio cholerae* non O1/ non O139.

Наиболее высокие показатели микробной обсемененности паренхиматозных органов рыб были зарегистрированы для *Aeromonas sobria* ($5 \cdot 10^4$ КОЕ/мл), далее для *Vibrio cholerae* non O1/ non O139 ($5 \cdot 10^3$ КОЕ/мл) и *Edwardsiella* spp. ($2 \cdot 10^3$ КОЕ/мл – $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл).

Чувствительность к антибиотикам разных видов микроорганизмов представлена в табл. 2. Все штаммы, выделенные из паренхиматозных органов рыб, оказались чувствительны к фуразолидону, ципрофлоксацину, доксициклину, тетрациклину, левомицетину.

Гистологические изменения в селезенке больных рыб проявлялись в концентрированных геморрагических рассеянных очагах некроза (рис. 5). В этих участках среди клеточных оболочек можно

Таблица 2. Исследование чувствительности к антибиотикам выделенных микроорганизмов

Антибиотики	Микроорганизмы		
	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Vibrio cholerae</i> non O1/ non O139	<i>Edwardsiella</i> spp.
Фуразолидон	+	+	+
Ципрофлоксацин	+	+	+
Доксициклин	+	+	+
Тетрациклин	+	+	+
Левомецитин	+	+	+

Примечание: + чувствительный.

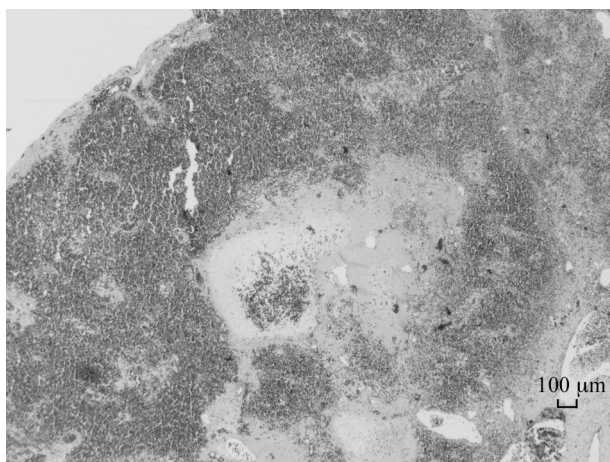


Рис. 5. Селезенка. Зона некротических изменений, содержащая бактерии (HE). Здесь и далее линейка – 100 мкм

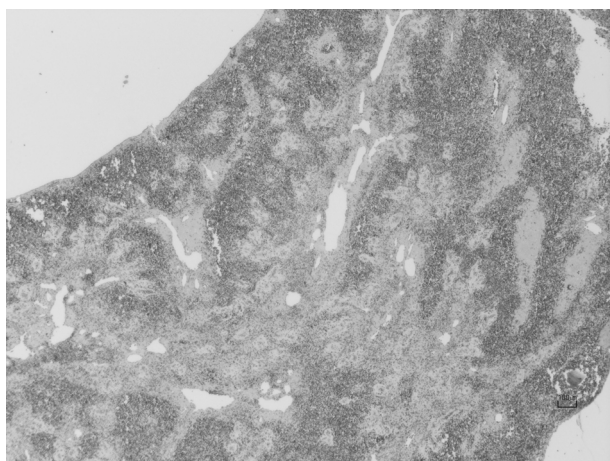


Рис. 6. Селезенка. Зона некроза. Лимфоциты с разрушенной оболочкой и кариорексисом (HE)

заметить лимфоциты с разрушенной оболочкой и кариорексисом (рис. 6). По периферии некротизированных участков, а иногда посередине можно заметить многочисленные скопления бактерий или захвативших бактерии макрофагов (рис. 7). У че-

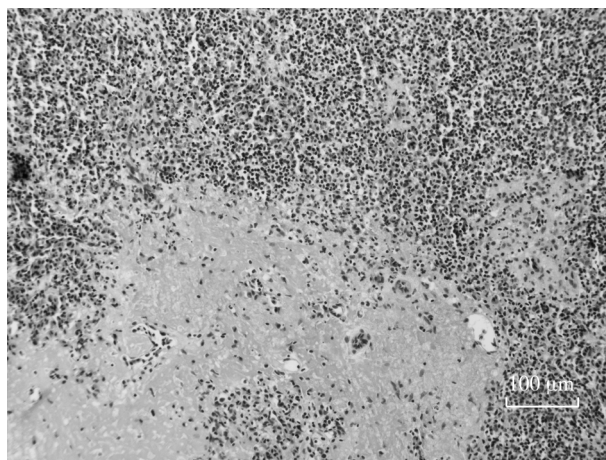


Рис. 7. Селезенка. Зона некроза. Бактерии (HE)

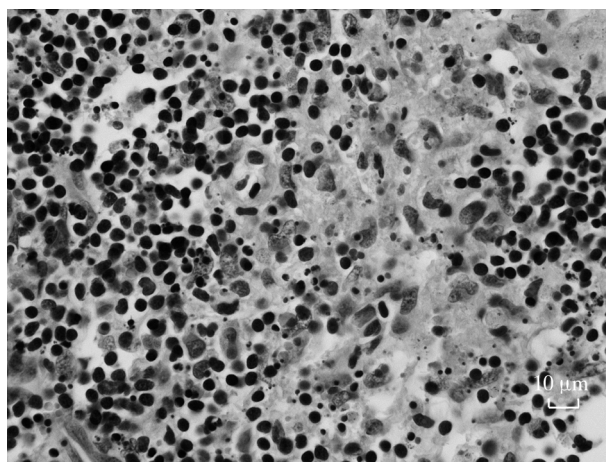


Рис. 8. Селезенка. Массовое разрушение лимфоцитов (HE)

тырех из пяти обследованных рыб в селезенке отмечалась лимфопения (рис. 8). В эпикардиальной ткани у трех из пяти рыб наблюдалось лимфомиелоидное истощение (рис. 9, 10). В печени всех обследованных рыб отмечены рассеянные очаги некроза. Эти очаги, от малого до большого, имели светлый центр, окруженный некротизированной ацидофильной тканью (рис. 11). Также можно наблюдать геморрагический очаг (рис. 12). Во всех некротизированных участках можно увидеть многочисленные скопления бактерий и макрофагов, поглотивших бактерии. Вокруг скоплений бактерий отмечены единичные моноциты/макрофаги. Окрашивание печени методом Циля–Нильсена позволило выделить бактерии красного цвета, которые располагались рядом с макрофагами или в очаге некроза (рис. 12). Эти бактерии имели типичную форму бациллы (рис. 13). В некоторых участках печени эти кислотоустойчивые бактерии были довольно многочисленными. По своему строению

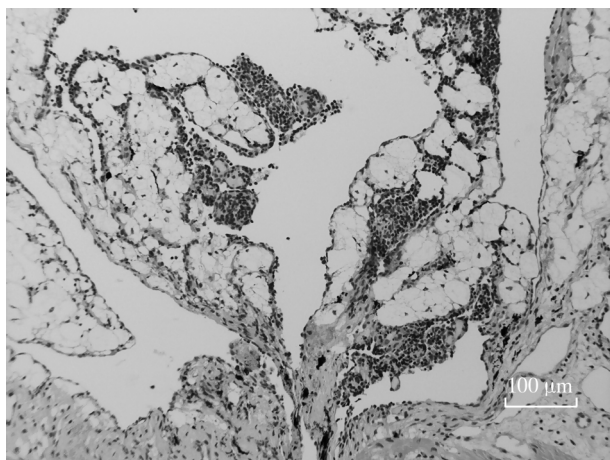


Рис. 9. Эпикардиум. Возможное разрушение лимфомиелоидной ткани, участок 1 (HE)

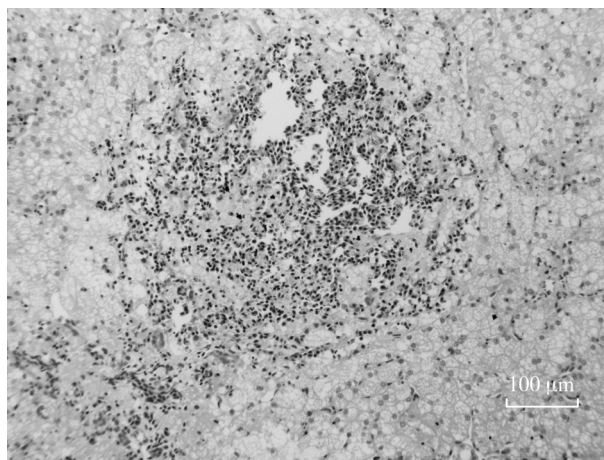


Рис. 12. Печень. Геморрагический некроз. Участок 1 (HE)

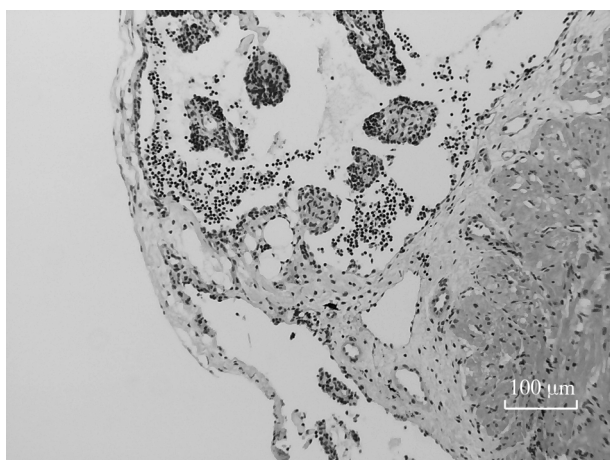


Рис. 10. Эпикардиум. Возможное разрушение лимфомиелоидной ткани, участок 2 (HE)

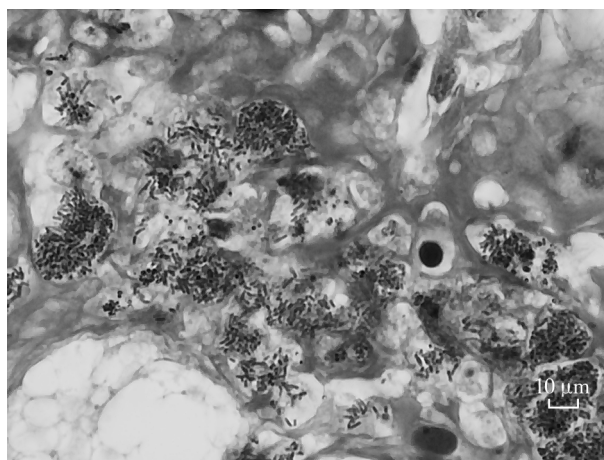


Рис. 13. Печень. Геморрагический некроз. Участок 2 (HE)

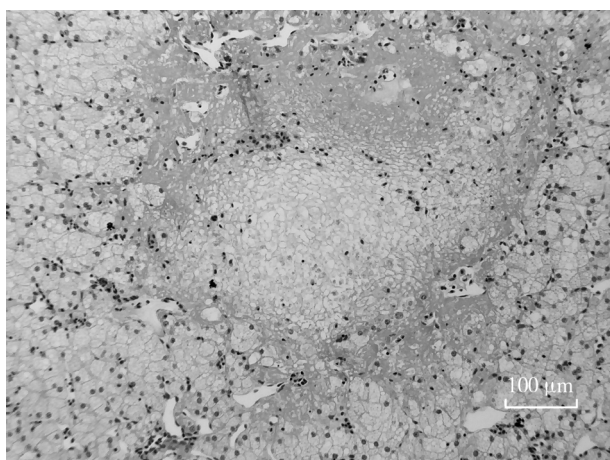


Рис. 11. Печень. Зона некроза. Многочисленные колонии бактерий (HE)

и характеристикам эти бактерии очень похожи на микобактерии.

Исследование мазков крови показало, что ортохромные эритроциты (14,3–12,2 мкм) составляли 74,6±3,05% от числа всех эритроцитов и были в состоянии ортохромазии. Молодые эритроциты (6,4±0,71%) отличались полихромазией и имели округлые очертания. Частота встречаемости эритробластов составила 0,34±0,12%. Анизохромия и гипохромазия отмечалась для 8,4±0,52 и 0,3±0,03% эритроцитов соответственно, а пойкилоцитоз и анизоцитоз – у 92,8 и 3,7±0,31%. Удельный вес микроцитов составил 6,6, а макроцитов 3,2±0,22%. В 9,4±0,75% случаев наблюдалась агглютинация эритроцитов, которые были собраны в “монетные столбики”.

Анализ лейкоцитарной формулы крови (ЛФК) рыб выявил ее лимфоидный характер (50,5±2,03%). Индекс сдвига лейкоцитов составил 0,68±0,04, что

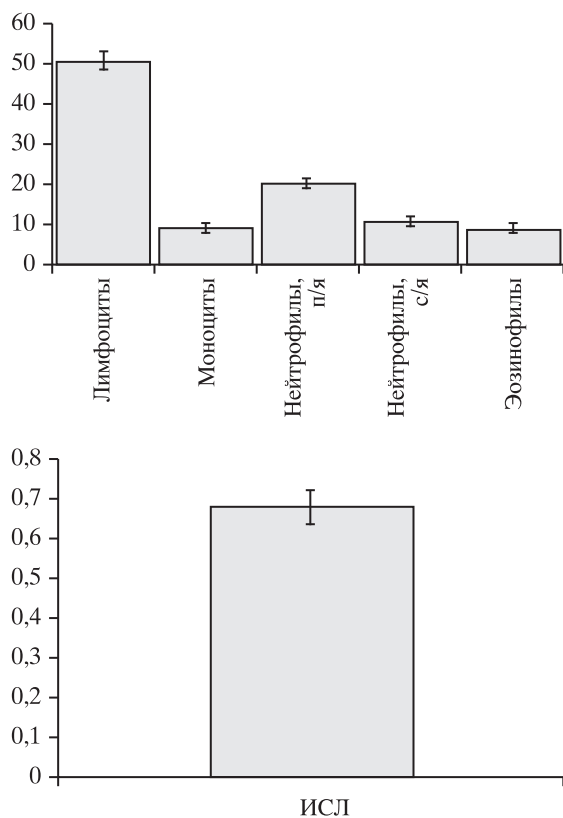


Рис. 14. Соотношение лейкоцитов и ИСЛ в ЛФК сибирского осетра (ИСЛ – индекс сдвига лейкоцитов, п/я – палочкоядерные, с/я – сегментоядерные)

превышало норму (0,22–0,43) и свидетельствовало о воспалительном процессе. В ЛФК (рис. 14) наблюдалось перераспределение клеток белой крови в сторону увеличения палочкоядерных (19,7±0,88%) и уменьшения сегментоядерных (10,8±0,79%) нейтрофилов. Средние размеры гранулоцитов составили 11,8±1,21 мкм. Палочкоядерные формы имели продолговатое, часто почкообразное ядро. У сегментоядерных форм ядро было рассечено на две-три доли, соединенные тонкими перетяжками. Доля моноцитов и эозинофилов составила 8,5±0,84 и 8,8±0,6% соответственно. Моноциты имели эксцентрично расположенное крупное ядро округлой, вытянутой или лопастной формы. Эозинофильные гранулоциты были представлены округлыми клетками с плотными ядрами, имеющими вогнутые края. Иногда ядра были двухсегментными или многолопастными. Эти клетки имели четко выраженную и ярко окрашенную зернистость. Тромбоциты (0,5–0,7 мкм) нередко образовывали большие плотные скопления.

ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация изолятов, выделенных из воды садков и ленского осетра, позволила отнести их к

родам *Aeromonas*, *Vibrio* и *Edwardsiella*. В количественном отношении среди бактерий доминировали аэромонады. Похожие результаты были получены А.А. Подзоровой с коллегами [6] при исследовании молоди осетровых рыб и случаев их гибели на азовских осетровых рыбоводных заводах и товарных хозяйствах, а также Л.В. Ларцевой [11] в Волго-Каспийском бассейне. Анализируя полученные данные, можно констатировать высокий уровень микробной обсемененности паренхиматозных органов ленского осетра ($5 \cdot 10^4$ КОЕ/мл) в садках, где отмечалась гибель рыб.

Для рыбоводных водоемов характерен относительно стабильный спектр микроорганизмов, где доминирует сапрофитная микрофлора, в частности бактерии рода *Aeromonas* [18], особенно при органическом загрязнении. По присутствию бактерий в паренхиматозных органах здоровых рыб данные разноречивы. Одни исследователи считают, что печень и почки здоровых особей свободны от бактерий (в частности, аэромонад), другие – что эти органы постоянно обсеменены микроорганизмами и из здоровых рыб выделяются те же бактерии, что и из больных, только в значительно меньших количествах [19–21]. Аэромонады разделены на семь видов: *A. caviae*, *A. schubertii*, *A. eucrenophila*, *A. hydrophila*, *A. media*, *A. sobria*, *A. veronii* [14].

A. sobria, доминировавшая среди выделенных микроорганизмов, может быть возбудителем заболеваний рыб. Однако чаще всего это вторичный, оппортунистический патоген, ассоциирующийся с плохим качеством воды или нарушением технологии выращивания [19; 22]. *A. sobria* ранее не была определена у ленского осетра, тогда как *A. hydrophila* была выделена из ленского осетра [23] и стерляди [24] в Италии, *A. hydrophila* и *A. caviae* – у русского осетра, севрюги и белуги [6] в России.

Vibrio spp. являются возбудителями заболеваний морских гидробионтов. Однако эти бактерии вызывают болезни и пресноводных рыб, что приводит к септицемии, гниению плавников, образованию язв на поверхности тела и пучеглазию [25; 26]. Более того, известно, что рыбы являются резервуаром для *Vibrio cholerae* non O1/ non O139 [27] и, перенося бактерий от одного источника к другому, служат вектором для распространения микроорганизмов. Скорее всего, *V. cholerae* non O1/ non O139 не является причиной заболевания и гибели рыб в описываемом случае и может рассматриваться как резервуар инфекции.

Обнаружение *Edwardsiella* spp., относящихся к бактериям группы кишечной палочки, указывало на неблагоприятное санитарное состояние воды. Эти микроорганизмы входят в число санитарно-показательных и являются этиологическими агентами за-

болеваный рыб и человека [28]. Изучение устойчивости белого осетра (*A. transmontanus*) к инфекции *E. ictaluri* показало, что при искусственном заражении бактерии не выделялись из паренхиматозных органов рыб и не вызывали заболевания [29]. Других сообщений о заражении осетровых *Edwardsiella* spp. не опубликовано; как и в предыдущем случае, скорее можно рассматривать роль данного вида как вторичного, оппортунистического патогена, ассоциирующегося с плохим качеством воды или нарушением технологии выращивания.

Условно-патогенные микроорганизмы, циркулирующие в природных экосистемах, обладают определенным потенциалом патогенности. Это в первую очередь относится к представителям рода *Aeromonas* и *Vibrio* [30]. Как возбудители сапронозов они весьма адаптивны к постоянно меняющимся факторам окружающей среды, и их массовое развитие может вызывать развитие заболеваний с различной локализацией, но преимущественно кишечной, однако чаще они опасны для людей с ослабленным иммунитетом [31].

Гистологические изменения, наблюдаемые в организме рыб в данном исследовании, похожи на описываемые в литературе случаи заражения разных видов рыб *A. sobria* [32–34] и заболеваний, вызванных *A. hydrophila* у ленского осетра [7] и стерляди [8]. На самом деле массовые поражения и очаги некроза, наблюдаемые в данном случае, являются характерной чертой при заражении *Aeromonas* spp. Кроме того, зарегистрированные в участках, пораженных некрозом, бактерии окрашивались в красный цвет по Цилю–Нильсену и имели типичную форму бациллы. Их структура и характеристики очень похожи на микобактерий. Среди представителей сем. Acipenseridae атипичные микобактерии ранее были обнаружены у ленского осетра. Авторы [9] сообщают, что на печени и почках были обнаружены мультифокальные сливающиеся узелки, характеризующие тяжелое гранулематозное воспаление, в основном состоящее из множества макрофагов, эпителиоидных клеток и нескольких лимфоцитов. Фагоцитирующие красные, кислотоустойчивые палочковидные бактерии присутствовали в больших количествах в макрофагах в печени и почках.

Заражение *Mycobacterium salmoniphilum* было описано у выращиваемого в аквакультуре русского осетра в Италии. В печени и почках обнаружены мультифокальные и сливающиеся узелки, характеризующие сильное гранулематозное воспаление, в основном состоящее из большого количества макрофагов, эпителиоидных клеток и нескольких лимфоцитов [9]. У русского осетра заражение *Mycobacterium chelonae* сопровождалось опухо-

леподобными образованиями на коже и в ротовой полости. Микобактерии не были обнаружены во внутренних органах, и окрашивание по Цилю–Нильсену дало положительный результат только в ротовой полости. Использование ПЦР показало положительный результат для кожи и ротовой полости [34]. Из китайского осетра *A. sinensis* и амурского осетра *A. schrencki*, выращиваемых в Китае, были выделены разные виды микобактерий, среди которых доминировали *M. marinum* (89,5%). Клинические признаки заболевания рыб проявлялись в виде одышки, поражений кожи, вздутия живота и гранулем в печени и селезенке. Гистологическое исследование печени, селезенки и почек 19 рыб показали, что гранулемы содержали типичные кислотоустойчивые бактерии [35]. Данные о заражении *Mycobacterium marinum* осетровых и рыбаков были получены на северном Каспии в Иране [36].

Таким образом, во всех случаях описанных на сегодня микобактериозов осетровых наблюдались типичные гранулематозные повреждения или опухолеподобные поражения, которые содержали внутри кислотоустойчивые, окрашенные по Цилю–Нильсену в красный цвет бактерии. Изменения, наблюдаемые в данном исследовании у ленского осетра, не выявили подобных гранулематозных повреждений, хотя в печени наблюдались небольшие очаги некроза, содержащие множество кислотоустойчивых бактерий, окрашенных по Цилю–Нильсену. Эти повреждения более характерны для острого эпизоотического процесса, подобного вызываемому *Edwardsiella* sp. На этом основании можно сделать предположение, что микобактерии больше играют роль оппортунистических патогенов, чем основных. На самом деле, как было отмечено Е. Антуофермо с соавторами [37], отсутствие типичных гранулем в органах рыб позволяет исключить лидирующую роль микобактерий в заболевании рыб. Возможно, микобактерии, присутствующие в водной среде, нашли легкий путь проникновения в поражения, вызванные другими бактериями. Можно предположить, что присутствие микобактерий в описываемом случае было только вторичным явлением, вызванным стресс-факторами окружающей среды. Однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Изменения в составе красной крови ленского осетра сопровождалась агглютинацией, пойкилоцитозом, анизоцитозом эритроцитов и развивающейся у рыб анемией. Возникающая у рыб лейкопения характеризовалась увеличением числа нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов и уменьшением относительного количества лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов.

Неблагоприятные условия внешней среды выразились в температурной и кислородной стратификации водных слоев, которая привела к образованию зон, обедненных кислородом. Преобладание деструкционных процессов в данных условиях привело к образованию вредных для рыб донных отложений. Вода в садках и основном водоеме была солоноватоводной, к тому же были превышены значения ПДК рыбохозяйственных водоемов по минерализации.

A. baerii населяет бассейны всех крупных сибирских рек. Согласно данным О.А. Алекина [38], показатели минерализации воды в этом регионе на несколько порядков ниже зарегистрированных в исследуемом водоеме. *A. baerii* – жилая, частично полупроходная донная рыба. Весь жизненный цикл ленского осетра проходит в пресной воде, и только редкие экземпляры встречаются в слабо-солоненных эстуарных участках [39]. Негативное воздействие абиотических факторов среды в описываемом случае, особенно неблагоприятного для данного вида ионного состава воды (высоких концентраций сульфатов, хлоридов, натрия и магния), способствовало снижению сопротивляемости организма *A. baerii* к инфекции и вызвало массовую гибель рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Матишов Г.Г., Матишов Д.Г., Бердников С.В. 2005. Состояние воспроизводства рыбы и пути возрождения биоресурсов Азовского моря. *Вестник Южного научного центра*. 1 (4): 30–37.
2. Матишов Г.Г., Пономарева Е.Н., Журавлева Н.Г., Григорьев В.А., Лужняк В.А. 2011. *Практическая аквакультура (разработки ЮНЦ РАН и ММБИ КНЦ РАН)*. Ростов н/Д., изд-во ЮНЦ РАН: 284 с.
3. Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И., Гаврилин К.В., Трифонова Е.С. 2005. Проблема экологической безопасности лечебных и профилактических мероприятий в рыбоводстве. В кн.: *Аквакультура и интегрированные технологии: проблемы и возможности*. Сб. науч. докл. (Москва, 11–13 апреля 2005 г.). Т. 2. М., ВНИИПРХ: 344–347.
4. Гусева Н.В., Головин П.П., Головина Н.А. 1998. Инфекция молоди осетровых рыб, вызванная *Flavobacterium jonsonae*-подобными бактериями. *ВНИЭРХ. Рыбное хозяйство. Аквакультура. Болезни рыб*. (Вып. 2): 1–7.
5. Казарникова А.В., Шестаковская Е.В. 2005. *Основные заболевания осетровых рыб в аквакультуре*. М., изд-во ВНИРО: 104 с.
6. Подзорова А.А., Стрижакова Т.В., Шестаковская Е.В., Казарникова А.В. 2009. Санитарно-эпизоотическое состояние донских осетровых заводов. *Ветеринария*. 9: 41–43.
7. Colussi S., Gasparri F., Brunetti R., Ferrari A., Marturano S., Prearo M. 2005. *Aeromonas hydrophila* infection in farmed Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Ihtiopatologia*. 2: 105–110.
8. Quaglio F., Bocus R., Delgado M.L., Gamberini L., Nobile L., Minelli C., Galuppi A. & Restani R. 2000. Infezione da *Aeromonas hydrophila* in sterleti (*Acipenser ruthenus*) in un allevamento della Pianura Padana. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*. 28: 17–32.
9. Righetti M., Favaro L., Antuofermo E., Caffara M., Nuvoli S., Scanzio T. and Prearo M. 2013. *Mycobacterium salmoniphilum* infection in a farmed Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii* (Brandt & Ratzeburg). *Journal of Fish Diseases*. 10: 111–121.
10. Бычкова Л.И. 2002. *Микробиоценоз радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) и водной среды при садковом выращивании: автореф. дис. ... канд. биол. наук*. М.: 130 с.
11. Lartseva L.V., Bormotova S.V. 1998. Sanitary-microbiological examinations of young sturgeon in Volga delta. *Bulletin of EAAP*. 18 (3): 102–105.
12. Лабораторный практикум по болезням рыб. 1983. (Под ред. В.А. Мусселиус). М., “Легкая и пищевая промышленность”: 296 с.
13. *Энтеробактерии. Руководство для врачей*. 1985. (Под ред. В.И. Покровского). М., “Медицина”: 320 с.
14. Определитель бактерий Берджи. 1997. (Под ред. Д. Холт, Н. Криг, П. Снит). Т. 1. М., “Мир”: 432 с.
15. Биргер М.О. 1973. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования*. М., “Медицина”: 73 с.
16. *Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб*. 1998 (ч. 1), 1999 (ч. 2). М.: 310 с., 234 с.
17. Житенева Л.Д., Рудницкая О.А., Калюжная Т.И. 1997. *Эколого-гематологические характеристики некоторых видов рыб. Справочник*. Ростов н/Д.: 149 с.
18. Каховский А.Е. 1987. Распределение сапрофитных бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* по акватории рыбоводного пруда. *Сборник научных трудов ВНИИПРХ*. Вып. 50. М.: 21–30.
19. Юхименко Л.Н., Викторова В.Ф. 1987. Выделение аэромонад из воды рыбоводных прудов. *Сборник научных трудов ВНИИПРХ*. Вып. 50. М.: 37–46.
20. Юхименко Л.Н., Викторова В.Ф. 1989. Аэромонады рыб. *Сборник научных трудов ВНИИПРХ*. Вып. 23. М.: 37–55.
21. Ларцева Л.В. 1998. *Гигиеническая оценка по микробиологическим показателям рыбы и рыбных продуктов Волго-Каспийского региона: автореф. дис. ... д-ра биол. наук*. М., МГУ: 43 с.
22. Padros F., Furones D. 2004. Patologia bacteriana en piscicultura. *Buletin de la Sociedad Espanola de Microbiologia*. 34: 13–21.
23. Colussi S., Gasparri F., Brunetti R., Ferrari A., Marturano S., Prearo M. 2005. *Aeromonas hydrophila* infection in farmed Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Ihtiopatologia*. 2: 105–110.
24. Quaglio F., Bocus R., Delgado M.L., Gamberini L., Nobile L., Minelli C., Galuppi A. & Restani R. (2000). Infezione da *Aeromonas hydrophila* in sterleti (*Acipenser ruthenus*) in un allevamento della Pianura Padana. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*. 28: 17–32.

25. Юхименко Л.Н. 2003. Бактериальные болезни рыб. В кн.: *Ихтиопатология*. (Под ред. Н.А. Головиной). М., "Мир": 132–173.
26. Carnevia D., Letamendia M., Perretta A. and Delgado E. 2013. Characterization de septicemia hemorrhagica bacteriana (SHB) diagnosticadas en peces Uruguay. *Veterinaria*. 46: 27–32.
27. Senderovich Y., Izhaki I., Halpern M. 2010. Fish as reservoirs and vectors of *Vibrio cholera*. *PLoS ONE* 5(1): e8607. doi:10.1371/journal.pone.0008607.
28. Погорелова Н.П., Ларцева Л.В. 1993. *Микробиологическая оценка загрязненности водных объектов дельты Волги*. № 6. М., "Гигиена и санитария": 80–81.
29. Ваха D.V., Groff J.M., Wishkovsky A., Hedrick R.P. 1990. Susceptibility of nonictalurid fishes to experimental infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 8: 113–117.
30. Austin B. 2010. Vibriosis as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*. 140: 310–317.
31. Обухова Е.С. 2013. *Экологические особенности псевдомонад в составе аутофлоры радужной форели в условиях Карелии: автореф. дис. ... канд. биол. наук*. Петрозаводск: 17 с.
32. Wahli T., Burr S.E., Pugovkin D., Mueller O., Frey J. 2005. *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Sobira fluviatilis* L. *Journal of Fish Diseases*. 28 (3): 141–150.
33. Juraj Majtán, Jaroslav Černý, Alena Ofúkaná, Peter Takáč, Milan Kozánek. 2012. Mortality of therapeutic fish *Garrarufa* caused by *Aeromonas sobria*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 35: 85–87.
34. Mokhlasur Rahman. 2002. Identification and Characterization of Pathogenic *Aeromonas veronii* Biovar Sobria Associated with Epizootic Ulcerative Syndrome in Fish in Bangladesh. *Applied Environmental Microbiology*. 68 (2): 650–655.
35. Antuofermo E., Pais A., Nuvoli S., Hetzel U., Burrari G.P., Rocca S., Caffara M., Giorgi I., Pedron C., Prearo M. 2014. *Mycobacterium chelonae* associated with tumor-like skin and oral masses in farmed Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). *BMC Veterinary Research*. 10: 18. URL: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/10/18>
36. De Feng Zhang, Cheng Ji, Xu Jie Zhang, Tong Tong Li, Ai Hua Li, Xiao Ning Gong. 2013. Mixed mycobacterial infections in farmed sturgeons. *Aquaculture Research*. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/are.12346/abstract>
37. Ghaemi E.O., Ghazesaed K., Nasab F.F., Hashemzade Z., Vatani S., Mohamedi M., Mansourian A.R. 2006. *Mycobacterium marinum* infection in caviar fishes and fisherman's in a Caspian Sea province in North of Iran. *Journal of Biological Science*. 6: 1150–1152.
38. Алевкин О.А. 1948. Гидрохимическая классификация рек СССР. *Труды ГГИ*. 4: 125 с.
39. *Промысловые рыбы России*. 2006. В двух томах. (Под ред. О.Ф. Гриценко, А.Н. Котляра и Б.Н. Котенева). М., изд-во ВНИРО: 1280 с.

THE INFLUENCE OF GROWTH CONDITIONS AND MIXED BACTERIAL INFECTION ON LENA STURGEON *ACIPENSER BAERII* MORTALITY IN CAGES

A.V. Kazarnikova, E.V. Shestakovskaya, M. Galeotti, A.V. Trishina, A.A. Turchenko

The studies of two-year old Lena sturgeons, *Acipenser baeri*, were conducted in cages of a fish farm located in watered sand quarry (sand-pit) downstream the Don River. Fish mortality lasted from the middle of summer to the end of September 2013, and reached 15% by the end of September. Moribund fish were pale, anorexic, lethargic and thin. In the cages, moribund fish would lose buoyancy, roll onto their back and expire died. The external examination of affected animals showed hemorrhages and ulcers on different parts of the body and fins. Moribund specimens also had pale gills, an enlarged abdomen, and a swollen anus. Unfavorable environmental conditions with temperature and oxygen stratification led to the formation of zones with decreased oxygen, disproportion of nitrogen and phosphorus, increased sulfate and chloride content. Sixty-seven bacterial isolates were identified in water (32) and fish (35). Three species of microorganisms from the genera *Aeromonas*, *Vibrio* and *Edwardsiella* were detected. The total bacterial amount in water of cages was $1 \cdot 10^3$ CFU/ml, coli-index 2300, coli-titer 0.43. High level of bacteriological contamination in parenchyma organs ($5 \cdot 10^4$ CFU/ml) was registered in cages with fish mortality. All fish strains from parenchyma organs were sensitive to furazolidone, ciprofloxacin, doxycycline, tetracycline, chloramphenicol. Histological changes in spleen, liver, and heart of fish appeared as congestion, hemorrhages, and scattered necrotic areas. Ziel-Neelsen stain of the liver showed the presence of bacteria similar to mycobacteria. The changes in red blood cells were accompanied by erythrocyte agglutination, poikilocytosis, anisocytosis and the development of anemia in fish. The white blood cell changes were characterized by an increase number of band neutrophils, monocytes and a decrease in the number of lymphocytes and segmented neutrophils.

Key words: aquaculture, Lena sturgeon, *Acipenser baeri*, bacteria, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Edwardsiella*, environmental conditions.