

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ЮЖНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ АРИДНЫХ ЗОН ЮНЦ РАН
ИНСТИТУТ СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКИХ И ГУМАНИТАРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЮНЦ РАН



**МАТЕРИАЛЫ НАУЧНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ,
ПРИУРОЧЕННЫХ К 15-ЛЕТИЮ
ЮЖНОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК:**

**МЕЖДУНАРОДНОГО НАУЧНОГО ФОРУМА
«ДОСТИЖЕНИЯ АКАДЕМИЧЕСКОЙ НАУКИ
НА ЮГЕ РОССИИ»**

**МЕЖДУНАРОДНОЙ МОЛОДЕЖНОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«ОКЕАНОЛОГИЯ В XXI ВЕКЕ:
СОВРЕМЕННЫЕ ФАКТЫ, МОДЕЛИ, МЕТОДЫ И СРЕДСТВА»
ПАМЯТИ ЧЛЕНА-КОРРЕСПОНДЕНТА РАН Д.Г. МАТИШОВА**

**ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«АКВАКУЛЬТУРА:
МИРОВОЙ ОПЫТ И РОССИЙСКИЕ РАЗРАБОТКИ»**

Г. РОСТОВ-НА-ДОНУ, 13–16 ДЕКАБРЯ 2017 Г.

Редколлегия:

академик Г.Г. Матишов (главный редактор), академик В.А. Бабешко, академик Ю.Ю. Балег, академик И.А. Каляев, академик В.И. Колесников, академик В.И. Лысак, академик В.И. Минкин, академик И.А. Новаков, академик Ю.С. Сидоренко, чл.-корр. РАН А.М. Никаноров, д.г.н. С.В. Бердников, д.ф.-м.н. В.В. Калинин, д.и.н. Е.Ф. Кринко, д.б.н. Е.Н. Пономарёва, к.б.н. Н.И. Булышева, к.г.н. Е.Э. Кириллова, к.б.н. В.В. Стахеев, Р.Г. Михалюк

М34 **Материалы научных мероприятий, приуроченных к 15-летию Южного научного центра Российской академии наук:** Международного научного форума «Достижения академической науки на Юге России»; Международной молодежной научной конференции «Океанология в XXI веке: современные факты, модели, методы и средства» памяти члена-корреспондента РАН Д.Г. Матишова; Всероссийской научной конференции «Аквакультура: мировой опыт и российские разработки» (г. Ростов-на-Дону, 13–16 декабря 2017 г.) / [гл. ред. акад. Г.Г. Матишов]. – Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2017. – 548 с. – ISBN 978-5-4358-0165-1.

УДК 001(063)

Издание включает материалы Международного научного форума «Достижения академической науки на Юге России», Международной молодежной научной конференции «Океанология в XXI веке: современные факты, модели, методы и средства» памяти члена-корреспондента РАН Д.Г. Матишова, Всероссийской научной конференции «Аквакультура: мировой опыт и российские разработки», проходивших в период с 13 по 16 декабря 2017 г. и приуроченных к 15-летию Южного научного центра РАН.

Представлены результаты, полученные ведущими учеными научных организаций Юга России, молодыми учеными, студентами и аспирантами при выполнении фундаментальных и прикладных исследований в приоритетных областях науки с целью обеспечения комплексного решения технологических, инженерных, экологических, геополитических, экономических, социальных, гуманитарных проблем в интересах устойчивого развития южных регионов Российской Федерации.

Материалы научных мероприятий рассчитаны на широкий круг читателей, представляют интерес для ученых, преподавателей, аспирантов, студентов высших учебных заведений и всех, кто интересуется достижениями современной науки.

Издание опубликовано при финансовой поддержке Федерального агентства научных организаций.

Отдельные результаты опубликованы в рамках популяризации результатов исследований по проекту «Разработка технических средств, биотехнологий выращивания нетрадиционных видов рыб и беспозвоночных для прогресса аквакультуры Южного и Северо-Западного федеральных округов России» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.» (соглашение № 14.607.21.0163, уникальный идентификатор RFMEF160716X0163).

Равен Х. Оогенез. М.: Мир, 1964. 306 с.

Ando S. Physiological study on egg formation of the fish. I. Accumulation of carbohydrates and proteins during oogenesis // Embryologia. 1960. Vol. 5. № 3. P. 239–246.

Selman K., Wallace R.A., Oocyte R.A. Wallace growth in the sheephead minnow: Uptake of exogenous proteins by vitellogenic oocyte // Tissue Cell. 1982. Vol. 14. № 3. P. 555–571.

Selman K., Wallace R.A. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. III. Vitellogenesis // J. Exp. Zool. 1983. Vol. 226. № 3. P. 441–457.

Terner C. Metabolism and energy conversion during early development // Fish physiology. N.Y.: Acad. press, 1979. Vol. 8. P. 261–278.

О ПРИЧИНАХ ГИБЕЛИ КАРПА (*Cyprinus carpio*) В ПРУДАХ НА ЮГЕ РОССИИ

А.В. Казарникова¹, Е.В. Шестаковская², А.В. Тришина³, М. Галеотти⁴, М. Манзано⁴

¹Южный научный центр РАН, г. Ростов-на-Дону
kazarnikova@ssc-ras.ru

²Ростовский филиал Центральной производственной станции по акклиматизации и борьбе с болезнями рыб,
г. Ростов-на-Дону
fish_cps@mail.ru

³Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону
alenatrichina@mail.ru

⁴ Университет Удинэ, Италия
marco.galeotti@uniud.it, marisa.manzano@uniud.it

Yersinia ruckeri – грамотрицательная бактерия, вызывающая септическое заболевание рыб. Факторы, способствующие заражению рыбы и распространению инфекции, – стрессы (хэндлинг и др.), неблагоприятные условия окружающей среды (дефицит кислорода, накопление органических веществ).

С 2010 г. йерсиниоз регистрируют и в Российской Федерации, где он в список карантинных заболеваний не входит [Приказ ... 2011], но наносит ущерб рыбоводным хозяйствам.

Весной 2015 г. в прудах рыбоводного хозяйства, расположенного в нижнем течении р. Дона (Ростовская обл.), произошла вспышка болезни, сопровождавшаяся массовой гибелью карпа (*Cyprinus carpio*), а также гибрида белого и пестрого толстолобиков (*Hypophthalmichthys molitrix* × *H. nobilis*). От тех и других выделили *A. hydrophila*, а от карпа – также *Y. ruckeri*. Ранее на юге России йерсиниоз никогда не регистрировали у карпа.

Целью работы было установить причины, которые привели к гибели рыб во время упомянутой вспышки, изолировать и описать бактерию *Y. ruckeri*, исследовать чувствительность выделенных микроорганизмов к часто применяемым в рыбоводческих хозяйствах антибиотикам.

Гибель производителей карпа, имевших массу тела 0,4–3,7 кг, длину L = 28–58 см и l = 20–49 см, а также гибрида белого и пестрого толстолобиков с соответствующими параметрами 6,2–7,6 кг, 80–88 и 72–75 см началась в середине марта. К началу наших исследований (апрель 2015 г.) погибло 300 экз. рыб. Их содержали в прудах глубиной 1,6 м и площадью 1 га. Плотность популяции рыбы составляла 8 т/га.

Заболевшую рыбу осматривали, уделяя особое внимание повреждениям на поверхности тела. Внутренние органы исследовали на наличие патологических изменений и затем отбирали для бактериологического, гистологического и молекулярно-генетического анализов.

Ихтиопатологическому исследованию подвергли 15 рыб, из них 10 клинически здоровых и 5 с признаками заболевания. Сбор, фиксацию и дальнейшую обработку гельминтов проводили общепринятыми в паразитологии методами [Быховская-Павловская, 1985; Мусселиус ... 1983]. Соскобы с жабр и поверхности тела, а также

внутренние органы и желудочно-кишечный тракт исследовали компрессионным методом под микроскопом. Обнаруженных гельминтов идентифицировали на видовом уровне с помощью «Определителя паразитов пресноводных рыб» [Определитель ... 1984; 1985; 1987].

Для изготовления гистологических препаратов кусочки органов (печень, селезенка, сердце), взятые от 5 рыб, фиксировали в 4 %-ном нейтральном забуференном формалине, помещали в автоматический гистопроцессор TISBE (Diapath, Италия), заливали в парафин ParaplastPlus (Diapath), получали срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином-эозином по Гимзе и Граму. Препараты исследовали под световым микроскопом DMRB (Leica Microsystems, Германия) и фотографировали системой Nikon (Япония).

Анализы воды проводили согласно руководству по химическому анализу поверхностных вод суши [Боева, 2009], ГОСТ 31861-2012 и МУК 4.2.1884-04. В общей сложности для бактериологического анализа взяли пробы от 5 больных рыб и 1 пробу воды. Выделенные изоляты бактерий идентифицировали по культуральным, морфологическим, биохимическим и молекулярно-генетическим свойствам [Хоулт и др., 1997]. Для биохимических исследований применяли ручные системы идентификации микроорганизмов API20 NE, RapID 20 E (bioMeieux, Франция). Для идентификации изолятов также использовали MALDI TOF масс-спектрометрию. Оценку чувствительности выделенных бактерий к антимикробным препаратам осуществляли диско-диффузионным методом. Тест проводили со стандартными дисками с различными антибактериальными субстанциями производства Hi Media (Индия).

Предназначенные для исследования в ПЦР образцы, полученные от 5 карпов, поместили в пробирки с физиологическим раствором и хранили в холодильнике при температуре 4 °С до начала исследования. Образцы ДНК стандартизировали до концентрации 250 нг/мкл, используя стерильную дистиллированную воду, и исследовали в ПЦР. Для амплификации 575 базовых пар использовали 2 специфических для *Y. ruckeri* праймера: YER8F (5'-GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG-3') и YER10 R (5'-GAAGGCACCAAGGCATCTCTG-3') [Gibello et al., 1999].

Результаты гидрохимических исследований указывали на неблагоприятные условия, сложившиеся при выращивании рыбы – высокие перманганатная окисляемость (2,4–2,8 предельно допустимой концентрации (далее ПДК)), концентрация нитритного (1,5–2 ПДК) и нитратного (1,4–1,5 ПДК) азота. Содержание кислорода в придонном слое было в пределах 0,0–2,0 мг/дм³.

Больные рыбы держались у поверхности воды. При клиническом осмотре карпа у 53,3 % рыб обнаружили изменения в жабрах (отечность, анемичность). Их покрывали слизь и водоросли. На основании жаберных лепестков и поверхности тела некоторых рыб обнаружили белый ватообразный налет, образованный грибами порядка *Saprolegniales*. На брюшной стороне тела отмечали точечные кровоизлияния. На поверхности тела 60 % осмотренных производителей карпа выявили плоские эпителиальные новообразования, имевшие мягкую, вязкую консистенцию и гладкую блестящую поверхность. На основании результатов эпизоотологического анализа и клинического исследования диагностировали оспу.

У 100 % осмотренных особей гибрида толстолобика имелись кровоизлияния на кожном покрове, жаберных крышках и основании грудных плавников. У отдельных экземпляров (40 %) регистрировали помутнение хрусталиков глаз.

Патолого-анатомическое вскрытие карпа и гибрида толстолобика не показало отклонения состояния печени и селезенки от нормы. Почки были отечными. В серозной оболочке брюшной полости, плавательном пузыре и заднем отделе кишечника имелись кровоизлияния (в последнем их было особенно много).

У обследованных рыб выявили 4 вида паразитов – моногеней, трематод и моллюсков. Наиболее экстенсивной и интенсивной была инвазия *D. extensus* (100 %; 12–40 экз.) у карпа.

ОМЧ воды в обследованных садках достигало 3×10^5 КОЕ/мл, коли-индекс – 900, коли-титр – 1,11, что позволяет констатировать вторую категорию загрязненности прудов. В результате бактериологического исследования выделили 62 изолята бактерий (30 из воды и 32 из рыб), являвшихся аэромонадами и йерсиниями. Обнаруженные аэромонады относились к 2 видам – *A. salmonicida* и *A. hydrophila*; их титр в воде составлял 1×10^5 КОЕ/мл.

Из паренхиматозных органов карпов и гибридов толстолобика изолировали *A. hydrophila*, а карпы оказались также инфицированными *Y. ruckeri*. Степень обсемененности *A. hydrophila* оценили 5×10^3 КОЕ/г (толстолобик) и 2×10^2 КОЕ/г (карп), а *Y. ruckeri* – 2×10^3 КОЕ/г (карп).

Выделенные штаммы *Y. ruckeri* формировали на мясо-пептонном агаре (МПА) круглые, беловатые, сливающиеся, а на среде Эндо – выпуклые, округлые (диаметром 0,1–0,2 мм) с ровным краем колонии. По Граму не окрашивались. В нативных препаратах проявляли подвижность. Не образовывали оксидазу, индол и сероводород. Сбраживали глюкозу до кислоты без газа. Не ферментировали лактозу, сахарозу, рафинозу, арабинозу, рамнозу, дульцит, сорбит, инозит, салицин. Разжижали желатин. Редуцировали нитраты в нитриты. Декарбокслировали орнитин и лизин, не имели аргининдегидролазы и фенилаланиндезаминазы, но проявляли сильную липолитическую активность. Результаты бактериологического исследования и MALDI-TOF масс-спектрометрии (2, 238) полностью совпали.

При использовании протокола индикации исследуемого образца праймерами YER8F и YER10R с последующим анализом фрагмента 16S рРНК установили, что исследуемые культуры соответствуют общему генетическому профилю штаммов *Y. ruckeri* под №№ JQ657818.1, CP011078.1, KJ606914.1, CP009539.1, LN681231.1, KM220889.1, KM220888.1 (совпадение 99 %), приведенному в базе данных GenBank.

Результаты оценки чувствительности к антибактериальным препаратам микроорганизмов, выделенных в данном исследовании, показали, что все штаммы *A. hydrophila* и *Y. ruckeri*, выделенные из паренхиматозных органов рыб, оказались чувствительны к ципрофлоксацину, тетрациклину, левомицетину. 90 % изолятов аэромонад и 100 % штаммов йерсиний проявили резистентность к фуразолидону.

При гистологическом исследовании у рыб не выявили патологических изменений. В селезенке обследованных рыб обнаружили скопления лимфоцитов, небольшой плотности в печени всех обследованных карпов – небольшие скопления лейкоцитов вокруг кровеносных сосудов. В сердце подобные скопления локализовались вокруг миофибрилл. В почках не зарегистрировано изменений ни в гемопоэтической, ни в выделительной частях. В исследуемых органах бактерий не обнаружили.

Заболевания являются основной причиной потерь в аквакультуре [Meyer, 1991]. Возрастающие объемы перевозок рыбопосадочного материала повышают риск завоза возбудителей инфекционных и инвазионных болезней рыб как в активном, так и в пассивном состоянии. Локальные сообщества рыб не всегда могут быть к ним устойчивы. Случай, описанный в данной работе, еще раз служит тому подтверждением. Привезенная из Краснодарского края радужная форель, скорее всего, была носителем *Y. ruckeri*. При переходе на карпа, не имеющего к ней иммунитета, бактерии способствовали снижению резистентности организма рыб к неблагоприятным факторам окружающей среды и при комплексном воздействии с другими паразитическими организмами приводили к последующей гибели рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Быховская-Павловская И.Е. Паразиты рыб: Руководство по изучению. М.: Наука, 1985. 121 с.
- ГОСТ 31861-2012. Вода. Общие требования к отбору проб. URL: <http://docs.cntd.ru/document/gost-31861-2012>
- Лабораторный практикум по болезням рыб / под ред. В.А. Мусселиуса. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 296 с.
- МУК 4.2.1884-04. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов. URL: http://ohranatruda.ru/ot_biblio/normativ/data_normativ/45/45900/
- Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. М.: Мир, 1997. Т. 1–2.
- Определитель паразитов пресноводных рыб / под ред. О.Н. Бауера. Л.: Наука, 1984, 1985, 1987. Т. 1–3.
- Приказ от 19 декабря 2011 г. № 476. «Об утверждении перечня заразных, в том числе особо опасных болезней животных, по которым могут устанавливаться ограничительные мероприятия (карантин)». URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/laws/2964.html>.
- Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши / под ред. Л.В. Боевой. Ростов-на-Дону: НОК, 2009. Ч. 1. 1046 с.
- Gibello A., Blanco M.M., Moreno M.A. et al. Development of a PCR Assay for the Detection of *Yersinia ruckeri* in Tissue of inoculated and naturally infected Trout // Applied Environmental Microbiology. 1999. P. 346–50.
- Meyer F.P. Aquaculture diseases and health management // Journal of Animal Science. 1991. 69: 4201–4208.