

**ТЕМПЕРАТУРНАЯ АДАПТАЦИЯ И ГАЛОТОЛЕРАНТНОСТЬ
ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДЫ И РЫБЫ
В ДЕЛЬТЕ Р. ВОЛГИ
TEMPERATURE ADAPTATION AND HALOTOLERABILITY
OF ENTEROBACTERIAS DIVIDED FROM WATER
AND FISH IN THE VOLGA DELTA**

*Л.В. Ларцева¹, О.В. Обухова²
L.V. Lartseva¹, O.V. Obuhova²*

¹ *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования*

«Астраханский государственный университет»

² *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования*

«Астраханский государственный технический университет»

¹ *Federal State Budget Educational Institution of Higher Education
"Astrakhan State University"*

² *Federal State Budget Educational Institution of Higher Education
"Astrakhan State Technical University"*

Аннотация: в статье представлены результаты исследования температурной адаптации и галотолерантности энтеробактерий, выделенных из воды и рыбы в дельте р. Волги, которые были доминирующими в микробном пейзаже данных биотопов. Они имели четко выраженную сезонность, достигая максимума своего развития летом с небольшим спадом осенью. Их галотолерантность изучали путем посева суточных чистых культур на мясо-пептонный бульон (МПБ) с 3,0, 7,0 и 10,0 % содержанием хлорида натрия; инкубировали при 37⁰ С. Установлено, что вся исследованная микрофлора имела значительные показатели галотолерантности с превалированием у водных изолятов. Причем в 3,0 и 7,0 % концентрациях с NaCl они были весьма близки, но в 10,0%-ном бульоне с NaCl галотолерантность водных штаммов была почти в 2,0 раза выше, чем рыбных. Среди выделенных энтеробактерий наиболее галофильными оказались бактерии группы протей, цитробактеры и энтеробактеры. Галотолерантность выделенных энтеробактерий в гидроэкосистеме дельты р. Волги имела сезонную специфичность и динамичность. Установлен динамичный рост этого признака у водных и рыбных штаммов от весны к осени. Таким образом, анализ результатов многолетнего исследования показал широкое распространение условно-патогенных энтеробактерий в воде и рыбе, их высокую галотолерантность и способность некоторых из них оставаться жизнеспособными до изготовления соленой продукции. Это дает основание рекомендовать необходимость введения в нормативную документацию при осуществлении санитарно-микробиологического контроля не только сырья, но и готовой соленой рыбопродукции.

Abstract: The article presents the results of the study of the temperature adaptation and halotolerance of enterobacteria isolated from water and fish in the Volga River delta, which were dominant in the microbial landscape of these biotopes. They had a pronounced seasonality, reaching a maximum of its development in the summer with a slight fall in autumn. Their halotolerance was studied by means of inoculation of daily pure cultures of

meat – peptone broth with 3, 7 and 10 % of sodium chloride and incubation at 37°C. At that all studied microflora was found to have significant indices of halotolerance with a predominance of aquatic isolates. At that in 3,0 and 7,0 % NaCl concentrations were very similar, but in 10 % NaCl broth the halotolerance of water strain was almost 2,0 times higher than the in fish ones. Among isolated Enterobacteriaceae most halophilic bacteria were from the Proteus group, Citrobacteria and Enterobacteria. The halotolerance of isolated enterobacteria in hydroecosystem of the Volga River delta had seasonal specificity and dynamics. There was established the dynamic growth of this sign in the water and fish strains from spring to autumn. Thus, the analysis of the obtained results of the long-term conducted study has shown the wide dissemination of conditionally pathogenic enterobacteria in water and fish, and their high halotolerance and the ability of some of them to remain viable up to salt production. It gives grounds to recommend the necessity of the introduction of them into the normative documentation in the implementation of the sanitary-microbiological control of not only raw materials but also ready salted fish production.

Ключевые слова: вода, рыба, энтеробактерии, сезонная динамика, галотолерантность.

Key words: water, fish, enterobacteria, seasonal dynamics, halotolerance.

В природе не существует так называемых чистых биосистем. Подавляющее большинство явлений, наблюдаемых в естественных условиях, является результатом эволюционно сложившихся форм существования различных ассоциаций микроорганизмов. Последние представляют собой смешанные культуры бактерий огромного биологического разнообразия, составляющего, например, микробиоценоз гидроэкосистем. При этом они находятся в постоянной конкурентной борьбе за какой-либо фактор, ограничивающий рост их популяций [2, 3, 4, 11].

Условно-патогенные энтеробактерии (сем. Enterobacteriaceae), как возбудители сапронозных инфекций людей, весьма адаптивны к широкому спектру абиотических факторов водной среды: температуре, рН, солёности, концентрации кислорода в воде и токсических веществ. Как следствие, их экологические ниши, механизмы и формы существования в природе необычайно широки и разнообразны [1, 7, 10, 21].

Результаты многолетнего микробиологического мониторинга воды и судака в дельте р. Волги (1995–2010 гг.) показал наличие в этих биотопах значительного родового и видового разнообразия представителей энтеробактерий. В анализируемом материале они были представлены 11 видами из родов: Citrobacter, Edwardsiella, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Morganella, Proteus, Providencia, Salmonella.

За период исследований из воды было выделено 150; из рыбы – 883 штамма всех энтеробактерий. Среди всей выделенной и разнообразной микрофлоры в воде они составляли $24,0 \pm 0,8$; в рыбе – $25,5 \pm 0,9$ % проб. Ранее в дельте р. Волги и Каспийском море энтеробактерии составляли значительную долю в микробиоценозе воды и ценных видах рыб, в том числе осетровых [8, 9, 12]. В 2014 г. была отмечена аналогичная тенденция [14].

Среди представителей этого семейства в анализируемых пробах субдоминировали штаммы бактерий группы протей (протеи, морганеллы и провиденсии), составляя в воде и рыбе $42,0 \pm 0,8$ и $46,7 \pm 0,9$ % проб, соответственно. Среди них в структуре семейства преобладали штаммы *Pr. mirabilis* и *Pr. vulgaris*. Другие доминанты – цитробактеры – составляли в воде и рыбе $24,0 \pm 0,6$ и $22,3 \pm 0,8$ % проб, соответственно, среди которых доминировали штаммы *C. freundii*.

Кишечные палочки и сальмонеллы в исследуемом материале были представлены единичными штаммами. Их регистрировали в воде в 1,3 раза чаще, чем из рыбы ($P < 0,05$; $r = 0,83$). Они выделялись преимущественно из жаберной ткани рыб и желудочно-кишечного тракта, что свидетельствует о продолжающемся антропогенном прессинге на гидроэкосистему дельты р. Волги. При этом, изоляты доминирующих групп энтеробактерий (группы протей и цитробактеры) в микробиоценозе воды и рыбы высевали на Главном банке в 1,2–1,5 раза реже, чем в эвтрофированных акваториях Беленского и Гандуринского банков, а также р. Бузан ($P < 0,05$; $r = 0,84$), в которые впадают водотоки с урбанизированных территорий. Полученные данные свидетельствуют о продолжающемся антропогенном прессинге на гидроэкосистему в дельте р. Волги, когда условно-патогенная микрофлора преобладает над индикаторной и согласуются с литературными данными [1, 3, 5].

Основной абиотический фактор всех водных экосистем – это температура воды, которая играет регулируемую роль в экологической пластичности условно-патогенных микроорганизмов. Она активизирует или подавляет их рост, обуславливая сезонную динамику с периодическим доминированием сменяющих друг друга популяций бактерий в объектах окружающей среды. Благодаря этому абиотическому фактору, по-видимому, можно объяснить экологическую особенность «прихода» и «ухода» сапронозных инфекций людей в разные сезоны года [2, 3, 11, 15, 18]. Авторы показали, что сезонная сукцессия характерна для большинства водоемов и является одним из важных показателей устойчивости микробного сообщества, а также степени его приспособленности к условиям обитания, где лимитирующим фактором является термический режим гидроэкосистемы.

Так, доминирующие в анализируемом материале энтеробактерии имели четко выраженную сезонность, достигая максимума своего развития летом с небольшим спадом осенью. Они были зарегистрированы в воде весной в 14,2; летом – в 33,8; осенью – в 24,4 % проб; в рыбе – весной – в 19,0; летом – в 32,4; осенью – в 25,2 % проб. Осенью, по сравнению с летним сезоном, бактериальная обсемененность исследуемых биотопов снизилась только в 1,0–1,3 раза ($P < 0,05$; $r = 0,82$). Видимо, поэтому пик кишечных инфекций в дельтовых районах Астраханской области приходился на лето и раннюю осень. Следует отметить, что в летнем и осеннем материале, собранном из воды и рыбы преобладали бактерии pp. *Citrobacter* и *Proteus*. Однако среди бактерий группы протей морганеллы и провиденсии

из анализируемых проб чаще изолировали ранней весной (в апреле) и поздней осенью (в ноябре), а протеи начинали вегетировать в середине мая при температуре воды 12–15 °С. При этом, летом все штаммы энтеробактерий в 1,2 раза чаще высевали из воды, чем от рыбы ($P < 0,05$; $r = 0,87$).

Таким образом, для персистирующих в воде и рыбе-судаке энтеробактерий характерна сезонная цикличность их развития с максимумом летом и небольшим спадом осенью, обусловленная температурным режимом гидроэкосистемы дельты р. Волги.

Условно-патогенные микроорганизмы, обитающие в водных экосистемах, относятся к факультативным галофилам. В то же время существует группа бактерий умеренных галофилов, которые могут быть жизнеспособными при концентрации соли 5,0–15,0 %. Основным механизмом этой адаптации служит синтез микроорганизмами осмопротекторов (осмолитов) – низкомолекулярных органических веществ (аминокислоты, их производные сахара и гетерогликозиды), концентрация которых в цитоплазме клетки уравнивает внешнее давление. Их состав зависит от концентрации NaCl в среде и не одинаков у разных групп микроорганизмов [11]. В то же время, обладая галофильностью, они остаются жизнеспособными в готовой соленой рыбной продукции, снижая ее пищевую ценность [6, 8, 19, 20]. Поэтому изначальное присутствие бактерий в воде и рыбе, обладающих галотолерантностью, можно рассматривать как фактор риска или биологическую опасность возникновения диарейных инфекций у людей при употреблении соленой рыбной продукции [16, 17].

Результаты проведенных экспериментальных работ по испытанию жизнеспособности всех выделенных из воды и рыбы штаммов энтеробактерий в мясо-пептонном бульоне (МПБ) с 3,0; 7,0 и 10,0 % содержанием NaCl в течение 24 и 48 часов при 37 °С показали, что они имели значительные показатели галотолерантности с их превалированием у водных штаммов [13]. Так, в 3,0 – ной концентрации с NaCl оставались жизнеспособными 87,2 водных и 82,9 % рыбных штаммов. В 7,0 – ной концентрации с NaCl были жизнеспособны 47,3 водных и 42,3 % рыбных штаммов. В 10,0-ной концентрации с NaCl оставались жизнеспособными 13,9 водных и 7,0 % рыбных штаммов.

Среди выделенных из воды и рыбы штаммов энтеробактерий наиболее галофильными оказались бактерии группы протей, цитробактеры и энтеробактеры. Их водные штаммы оставались жизнеспособными в 3 – ном МПБ с NaCl в $100,0 \pm 0,4$; $73,8 \pm 0,9$ и $70,4 \pm 0,9$ % случаев, соответственно. Их рыбные изоляты имели показатели галотолерантности в 1,1 – 1,2 раза ниже. В 7,0 – ном МПБ с NaCl водные штаммы были галотолерантны соответственно в $68,8 \pm 0,8$; $52,6 \pm 1,0$; $47,6 \pm 1,2$ % случаев. В 10,0 – ном МПБ с NaCl водные штаммы были галотолерантны соответственно в $30,1 \pm 0,9$; $20,2 \pm 0,9$ и $18,0 \pm 0,8$ % случаев ($P < 0,05$; $r = 0,91$).

Санитарно-значимые эшерихии и сальмонеллы оставались жизнеспособными в 3,0 % хлориде натрия в $77,0 \pm 1,2$ и $47,8 \pm 1,0$; в 7,0 % МПБ с NaCl – в $59,0 \pm 0,9$ и $33,1 \pm 1,0$ %; в 10,0; МПБ с NaCl – в $17,6 \pm 1,4$ и $9,2 \pm 1,2$ % случаев, соответственно ($P < 0,05$; $r = 0,87$). Похожая тенденция в Волго-Каспийском бассейне была отмечена и ранее [8, 9, 12].

Установлено, что галотолерантность выделенных из воды и рыбы в дельте р. Волги энтеробактерий имела сезонную специфичность. Анализ фактического материала показал возрастание показателей галотолерантности в 7,0%-ном МПБ с NaCl в весенний сезон у водных штаммов в 1,3–1,8 раза по сравнению с рыбными. Осенью эти значения увеличились в обоих исследуемых биотопах. Повышенная галотолерантность энтеробактерий в эти сезоны, вероятно, связана с повышением солености воды в результате нагонных «морянных» ветров, перемешивающих в дельте морскую и пресную воду. Это природное явление проявляется только в весенний и осенний сезоны на протяжении 10–20 км от морского края дельты. Осенняя галотолерантность энтеробактерий, обсеменяющих судака, обусловлена его миграцией из Северного Каспия в дельту Волги. Возможность длительного персистирования бактерий этого семейства в речных и морских экосистемах отмечена и в литературе [13]. Следовательно, у бактерий этого семейства высока вероятность оставаться жизнеспособной вплоть до готовой соленой продукции и при этом инициировать диарейные инфекции у людей.

Таким образом, анализ фактического материала и литературных данных свидетельствует о частой встречаемости энтеробактерий в воде и рыбе дельты р. Волги, а также наличия у этой группы микроорганизмов значительной температурной адаптации, определяющей сезонную динамику и галотолерантности, которые обуславливают экологическую и эпидемиологическую напряженность гидроэкосистемы, особенно в летний и раннеосенний сезоны.

Библиографический список

1. Анганова Е. В. Условно-патогенные энтеробактерии: доминирующие популяции, биологические свойства, медико-экологическая значимость : автореф. дис. ... докт. биол. наук / Е. В. Анганова. – Иркутск, 2012. – 44 с.
2. Бухарин О. В. Персистенция патогенных бактерий / О. В. Бухарин. – М. : Медицина, 1999. – 366 с.
3. Бухарин О. В. От персистенции к симбиозу / О. В. Бухарин // Микробиология, 2012. – № 4. – С. 4–9.
4. Бухарин О. В. Патогенные бактерии в природных экосистемах / О. В. Бухарин, В. Ю. Литвин. – Екатеринбург : Из-во УрО РАН, 1997. – 276 с.
5. Виноградова Л. А. Комплексные санитарно-микробиологические критерии оценки качества водных объектов в условиях возрастающей антропогенной нагрузки / Л. А. Виноградова, Т. К. Пархомчук. – Гигиена и санитария. – М., 1991. – № 1. – С. 24–26.
6. Долганова Н. В. Микробиология рыбы и рыбных продуктов / Н. В. Долганова, Е. В. Першина, З. К. Хасанова. – М. : Мир, 2005. – 224 с.

7. Лавренова Э. С. Оценка роли условно-патогенной флоры в развитии острых диарейных заболеваний / Э. С. Лавренова, А. Т. Подколзин, Т. А. Коновалова, И. А. Бочков // *Инфекционные болезни*. – 2012. – Т. 10. – № 3. – С. 53–55.
8. Ларцева, Л. В. Гигиеническая оценка по микробиологическим показателям рыбы и рыбных продуктов Волго-Каспийского региона : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Л. В. Ларцева. – М., 1998. – 44 с.
9. Литвин В. Ю. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий / В. Ю. Литвин, А. Л. Гинцбург, В. И. Пушкарева, Ю. М. Романова, Б. В. Боев. – М., 1998. – 256 с.
10. Лисицкая И. А. Бактериальные сообщества некоторых компонентов экосистемы дельты Волги и Северного Каспия : автореф. дис. ... канд. биол. Наук / И. А. Лисицкая. – Астрахань, 2008. – 23 с.
11. Нетрусов А. И. Экология микроорганизмов : учебник для студ. вузов / А. И. Нетрусов. – М. : Изд. центр «Академия», 2004. – 272 с.
12. Обухова О. В. Бактериоценоз воды и судака (*Stizostedion lucioperca*) в дельте Волги : автореф. дис. ... канд. биол. наук / О. В. Обухова. – М., 2004. – 23 с.
13. Обухова О. В. Микробиоценоз воды и судака (*Sander lucioperca*) в дельте р. Волги / О. В. Обухова, Л. В. Ларцева. – СПб. : Из-во «Проспект науки», 2015. – 224 с.
14. Обухова О. В. Динамика условно-патогенной микрофлоры воды и судака в дельте реки Волги / О. В. Обухова, Л. В. Ларцева, В. В. Володина // *Сибирский экологич. журн.* – 2017. – № 5. – С. 655–668.
15. Сомов, Г. П. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды / Г. П. Сомов, Л. С. Бузалева. – Владивосток : Примполиграфкомбинат, 2004. – 168 с.
16. Шульгина Л. В. Микрофлора дальневосточных морей и ее влияние на продукцию из промысловых объектов / Л. В. Шульгина, Г. И. Загородная, Ю. П. Шульгин, Т. М. Бывальцева, Л. М. Галкина. – Гигиена и санитария. – М., 1995. – № 1. – С. 14–16.
17. Шульгин Ю. П. Гигиеническая оценка потребления и качества рыбных продуктов / Ю. П. Шульгин, Л. Ю. Лаженцева, Л. В. Шульгина // *Гигиена и санитария*. – М., 2007. – № 2. – С. 39–42.
18. Яковлев, А. А. Экологическое направление в эпидемиологии / А. А. Яковлев // *Эпидемиология и инфекционные болезни*, 2011, № 3. – С. 33–37.
19. Ganthier, M. J. Nouvelles perspectives sur l'adaptation des enterobacteries dans le milieu marin / M. J. Ganthier, P. M. Munro, G. N. Flatan, R. L. Clement, V. A. Breittmayer // *Mar. Lefe.* – 1993. – Vol. 3. – No. 1–2. – Pp. 1–18.
20. Liston J. Microbial hazards of seafood consumption / J. Liston // *Food Technol.* – 1990. – Vol. 44. – No. 12. – Pp. 58–62.
21. Simon M. Temperature control of bacterioplankton growth in a temperate large lake / M. Simon, C. Wunsch // *Aquat. Microb. Ecol.* – 1998. – Vol. 16. – Pp. 119–130.