

РГБ ОД

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ОЗЕРНОГО И РЕЧНОГО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА  
(ГОСНИОРХ)

На правах рукописи

АМОРОС ХИМЕНЕС Глория Каролина

МИКРОФЛОРА САЗАНА (*Surprinus carpio*) В ДЕЛЬТЕ  
Р. ВСЛГИ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ И ЕЕ ЭПИЗОТИЧЕСКОЕ  
ЗНАЧЕНИЕ

Специальность 03.00.19 Паразитология

А в т о р е ф е р а т  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург, 1993

Работа выполнена на кафедре рыбоводства Астраханского  
технического института рыбной промышленности и хозяйства  
г.Астрахань

Научные руководители: кандидат биологических наук Л.В.Ларцева,  
кандидат биологических наук, профессор  
Н.Е.Сальников

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
О.Н.Бауэр  
кандидат биологических наук Крылов С.Н.

Ведущее учреждение: ВНИИПРХ

Защита состоится "1" июня 1993 г. в 13 час. на  
заседании специализированного Совета К 117.03.01 при Государ-  
ственном научно-исследовательском институте озерного и речного  
хозяйства по адресу: 199053, г.Санкт-Петербург, наб.Макарова,26

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГосНИСРХа.

Автореферат разослан "30" апреля 1993г

Ученый секретарь  
специализированного Совета

М.А.Дементьева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В современном обществе получение рыбной продукции приобретает особую значимость, обусловленную введением многими странами квот на вылов рыбы в природных акваториях. Следствие - обеднение товарного рыбного рынка страны, повышенная себестоимость продукции. В связи с этим, перед рыбной промышленностью Астраханской области, которая является основной базой по промыслу и воспроизводству сазана, стоит проблема увеличения запасов этой ценной рыбы, рационального использования ее запасов и пополнения рынка продукцией, столь необходимой для людей.

Однако, начиная с 70-х годов Нижне-Волжский бассейн находится под влиянием многофакторного антропогенного пресса (Лукьяненко, 1991, 1992). В русло реки Волги ежегодно сбрасывается более 20 км<sup>3</sup> сточных вод (Ласкорин, Лукьяненко, 1991). Вместе с тем, скорость течения в дельте Волги замедлилась почти в 15 раз в связи с нерегулярной деятельностью волжских ГЭС и повышением уровня Каспийского моря на 1,7 м. Замедленное течение воды нарушает процессы самоочистки реки, а потребление волжской воды в количестве 20-25 км<sup>3</sup> для нужд промышленности и сельского хозяйства снижает разбавление стоков в водоемах (Иванов, 1989). Это, в свою очередь, сопровождается уменьшением численности индикаторных бактерий и увеличением условно патогенных (Алтон, 1991; Виноградова, Пархомчук, 1991). Кроме того, в результате загрязнения воды органическими веществами, пестицидами, нитратами, фосфатами наблюдается размножение более жизнеспособных микроорганизмов и приобретение патогенных свойств бактериями, которые ранее считались сапротрофами (Капраева, 1991; Ларцева, Катунин, 1992; Lehman et al. 1990).

Изменения микробного пейзажа рек, являющихся местом обитания рыб, определяют ее обсемененность условно патогенными и патогенными бактериями. Поэтому бактериологические показатели могут быть объективным критерием санитарного состояния водоема (Пученкова, 1991; Vachnil, 1987).

Актуальность изучения микрофлоры рыб диктуется тем, что под влиянием негативных абиотических и биотических факторов среды нарушается резистентность организма рыбы, повышается ее восприимчивость к микробному инфицированию и возникновению патологических процессов.

В Волго-Каспийском регионе до настоящего времени оставались неизученными бактериологические показатели сазана, а также среды его обитания.

Отсутствие детальных исследований по видовому составу микроорганизмов, инфицирующих сазана в современных условиях, их сезонной динамики, некоторых моментов биологии и факторов патогенности создает определенные трудности для выяснения причин массовой гибели сазана в дельте и на НВХ, а также разработки профилактических мероприятий по предотвращению гибели рыб и снижению их микробной обсемененности, направленных на улучшение гигиенических и товарных качеств этой ценной промысловой рыбы.

#### Цель и задачи исследований.

1. Изучить видовой состав микроорганизмов, обсеменяющих внутренние органы сазана, а также микрофлору окружающей среды (воды).

2. Проанализировать влияние абиотических и биотических факторов среды на интенсивность развития микрофлоры сазана.

3. Выяснить патогенность доминирующей микрофлоры и ее то-

лерантность к хлориду натрия.

4. Разработать диагностику протеоза рыб и меры по снижению микробной обсемененности сазана.

Научная новизна работы. На основании детальных бактериологических исследований от сазан выделено в дельте Волги и в условиях его содержания на НВХ 33 вида из 14 родов. Приведены диагнозы флавобактерий, псевдомонад и энтробактерий, которые не поддаются однозначной трактовке по доступным нам определителям. Установлены пределы экологических факторов (рН среды, температуры воды, содержания в ней кислорода и сезонной динамики), при которых отмечено максимальное развитие микрофлоры. Изучена патогенность доминирующих в условиях дельты Волги видов бактерий и патогенез протеоза сазана; ДНКазная активность аэромонад и ее сезонная динамика, характерная для юга России, а также толерантность выделенной микрофлоры к хлориду натрия.

Практическое значение работы состоит в разработке профилактических рекомендаций по снижению микробной обсемененности сазана и лабораторной диагностики протеоза рыб. Изученная толерантность к хлориду натрия позволяет сделать прогноз промышленности о выживаемости микрофлоры от свежевывловленной рыбы до соленой продукции.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на научных конференциях и коллоквиумах преподавателей и аспирантов Астраханского технического института рыбной промышленности и хозяйства (Астрахань, 1991, 1992), областном обществе микробиологов и эпидемиологов (Астрахань, 1990, 1991, 1992).

Публикации результатов исследования. Основные положения диссертационной работы опубликованы в 4 статьях и "Лабораторной диагностике протеоза рыб".

Структура и объем работы. Диссертация содержит 195 страниц, включая 21 таблицу, 27 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, шести глав, заключения, практических рекомендаций, приложения, списка литературы, включающего 363 названий работ, из которых 236 авторов стран СНГ.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении обсуждается актуальность темы, определены цель и задачи исследования.

### Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе представлены материалы, освещающие современное экологическое состояние водной экосистемы на Нижней Волге; историю заболевания сазана в дельте Волги и информацию о бактериологических исследованиях в ихтиологической науке в настоящий период. Проведен анализ данных по идентификации, таксономии и роли бактерий при заболеваниях рыб, а также их взаимосвязи с загрязнением водоемов.

Однако, многие вопросы, имеющие научный и практический интерес, оставались невыясненными. Так, до настоящего времени не был изучен видовой состав микрофлоры сазана, ее биология, патогенность, связь с экологическими факторами среды. Все это послужило основой для проведения данной работы.

### Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в период с 1990 по 1992 годы в лаборатории актиологии КаспНИРХа, кафедре рыбоводства Астрабвтуза, акваториальной завода ВЭРЗ, в дельте реки Волги, НВХ "Петухов".

Сазан анализировался в районе Главного, Гандуринского банков, р.Бузан. Вода исследовалась в тех же районах и в черте г.Астрахани (р.Болда) на рыбокомбинате. Было исследовано 55 экз. рыб здоровых и с клиническими признаками бактериоза. Всего за период проведения работы обработано 280 бактериологических проб, собранных из всех внутренних органов, жабр и мест поражения сазана. Параллельно отобрано 84 пробы воды на наличие в ней условно патогенной микрофлоры, содержания кислорода, pH и температуры. Сбор материала осуществляли посезонно.

При изучении биохимических и физиологических свойств выделенных изолятов микроорганизмов при исследовании микробного пейзажа использовали методы, принятые в бактериологии (Акулов, и др., 1975; Лобинская, 1978; Lahrman, 1978; Hsu et al, 1981; Биргер, 1982; Мусселиус, 1983).

Для выделения вибрионов применяли обогащение проб в I-ой и 2-ой нептонной воде. В качестве элективных сред использовали щелочной пентонный агар, среду с вторичными алкилсульфатами натрия и специальный селективный полужидкий агар. Для обнаружения сальмонелл воду фильтровали через мембранные фильтры № 3 и № 5. Нижний фильтр помещали в селенитовый бульон для обогащения. В качестве селективных сред при исследовании воды и сазана использовали агары Эндо и Плоскирева.

При идентификации энтеробактерий использовали монографии С.А.Голубевой с авторами (1985), псевдомонад - по В.В.Смирнову и Е.А.Киприановой (1990). Способность аэромонад продуцировать ДНКазу изучали по методу С.Джеффриса (Jeffris et al, 1957) и Л.Н.Юхименко (1988).

Искусственное воспроизведение протейной инфекции сазана проводили по методу, описанному в Лабораторном практикуме по

болезням рыб (Мусселиус, 1983). Патоморфологические исследования при изучении патогенеза заболевания сазана - по общепринятым гистологическим методам (Ромейс, 1954; Меркулов, 1969).

Полученные результаты обрабатывались математически на комплексе УВК СМ-4 с использованием стандартных программ статистической обработки данных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Глава 3. МИКРОФЛОРА ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ САЗАНА И ОКРУЖАЮЩЕЙ ВОДНОЙ СРЕДЫ В ДЕЛЬТЕ ВОЛГИ

Из воды выше указанных районов дельты Волги выделена микрофлора, состоящая из 21 вида и 12 родов: *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Mafnia*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Serratia*.

Во всех органах сазана зарегистрирована 100% микробная контаминация. Из отобранных проб органов и тканей исследуемой рыбы выделено 33 вида бактерий, относящихся к 14 родам: *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Actinobacillus*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Salmonella*.

В работе приведены характеристики этих видов и родов, построенные на оригинальных материалах наших сборов с указанием частоты встречаемости каждого вида в воде и рыбе. Особое внимание уделено тем видам, которые оказались вирулентными для сазана. Для всех видов и родов бактерий, обнаруженных в нашем материале приведены литературные данные об их эпизоотологической и санитарной значимости.

Род *Aeromonas* в исследуемом материале представлен

*A. hydrophila* (33 изолята), *A. caviae* (27 изолятов), *A. sobria* (40 изолятов), *A. salmonicida* (1 изолят). При изучении микрофлоры сазана и воды аэромонады выделялись практически из всех органов и тканей рыбы и проб воды. Они были доминирующей группой, контаминирующей сазана и воду с наибольшим удельным весом среди других условно патогенных бактерий. Известны как возбудители заболеваний рыб, животных и человека.

Семейство *Enterobacteriaceae* по числу выделенных родов и видов доминировали в микрофлоре сазана и в воде дельты Волги.

Род *Citrobacter* представлен *C. freundii* (16 изолятов) и *Citrobacter* sp. (2 изолята). Цитробактеры часто контаминировали кишечник, паренхиматозные органы сазана, а также воду в исследуемых районах. Зарегистрированы единичные случаи патогенности для рыб.

Род *Enterobacter* представлен видами *E. cloacae* (14 изолятов), *E. aerogenes* и *Enterobacter* sp. (по 1 изоляту соответственно). Изолировали из жабр, язв, паренхиматозных органов сазана и воды. По литературным данным, часто инфицирует рыбные продукты, вызывая их порчу.

Род *Escherichia* - *E. coli* (12 изолятов), выделяли из жабр, кишечника, язв, печени и селезенки сазана, а также небольшим числом штаммов из воды.

Сведений о патогенности *E. coli* не найдено.

Род *Proteus* составляли виды: *Pr. inconstans* (3 изолята), *Pr. mirabilis* (17 изолятов), *Pr. morgani* (10 изолятов), *Pr. rettgeri* (2 изолята) и *Pr. vulgaris* (28 изолятов). По общему числу штаммов представители этого рода доминировали среди всех энтеробактерий во всех органах и тканях сазана и исследуе-

мых проб воды. Массовым видом у сазана был *Pr. vulgaris*, который на основании проведенной биопробы отнесен нами к этиологическому агенту заболевания сазана.

В литературе отмечена приуроченность этого вида к сильно загрязненным органическими отбросами водами и его прямое участие в различных инфекциях у людей (Байрамова, 1989; Гуйда, Чайка, 1990; Miller, 1989).

Как патогены рыб бактерии этой группы были зарегистрированы в Израиле (Bernasossi et al., 1981).

Представители родов *Serratia* и *Salmonella* выделены от сазана по одному штамму: сerratия - из почек, сальмонелла - из жабр исследуемой рыбы. Зарегистрированы единичные случаи патогенности для рыб.

Род *Vibrio* представлен видами: *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. vulnificus*. *Vibrio fluvialis* (10 изолятов), *Vibrio furnissii* (16 изолятов) *Vibrio vulnificus* (1 изолят), которые изолировались нами только из воды в дельте Волги. Условные патогены для рыб и человека.

Род *Pseudomonas* составляли виды: *Ps. alcaligenes* (8 изолятов), *Ps. fluorescens* (3 изолята), *Ps. putida* (2 изолята), *Ps. syringae* (1 изолят), *Pseudomonas sp.* (5 изолятов). Бактерии этого рода выделялись небольшим числом штаммов из всех внутренних органов сазана и воды в исследуемых районах дельты Волги.

Известны как возбудители заболеваний для рыб и человека.

Род *Acinetobacter* представлен одним видом: *A. calcoaceticus* (23 изолята), изолированным практически из всех исследуемых органов сазана.

Бактерии этого рода часто выделяются от рыб, однако дан-

Род *Moraxella* - *Moraxella* sp. (3 изолята), выделялись от сазана единично из паренхиматозных органов сазана и из проб воды.

Данных о патогенности моракселл для рыб нами не найдено.

Роды *Actinobacillus* и *Alcaligenes* представлены по одному виду: *Act. lignieresii* (1 изолят) и *Al. faecalis* (9 изолятов), выделялись от сазана единичными штаммами из его кишечника, жабр и крови.

Сведений о патогенности этих видов для рыб не найдено. Однако, алкалигенины способны длительно сохраняться в рыбе и рыбной продукции, вызывая их автолиз и порчу.

Род *Flavobacterium* в анализируемом материале составляли виды: *F. aquatile*, *F. tirrenicum* (по 3 изолята), *F. breve* (4 изолята), *F. ferrugineum*, *F. rigense* (по 1 изоляту). Флавобактерии инфицировали у сазана кишечник, печень и почки.

Отмечены единичные случаи патогенности бактерий этого рода для рыб и человека.

Род *Micrococcus* - *Micrococcus* sp. (2 изолята) - изолировали только из жабр и печени сазана.

Отмечено носительство микрококков среди рыб и рыбной продукции.

Выявлена максимальная микробная контаминация кишечника и жабр сазана (59 и 55 штаммов соответственно) (Рис. I). При этом 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.

Анализ микрофлоры сазана и воды показал доминирование в исследуемом материале энтеробактерий и аэромонад. Известно,

что бактериологические показатели воды являются наиболее чувствительными индикаторами при оценке санитарного и эпизоотологического состояния водоема (Почкин и др., 1987; Rey Sylvie et al., 1991).

Нами выявлена близкая удельная связь аэромонад, протеев, центробактеров в рыбе и воде (рис. 2). Следовательно, бактерии этих родов могут быть показателями санитарного и эпизоотологического состояния дельты Волги. В то же время псевдомонады и кишечная палочка *E. coli* в современных условиях не имеют значимого индикаторного смысла, что согласуется с литературными данными (Виноградова, 1988; Виноградова, Пархомчук, 1991; Lehman et al., 1990).

Результат проведенных бактериологических исследований воды и рыбы позволил отнести р. Бузан и Гандуринский банк дельты Волги к наиболее неблагоприятным в санитарном и экологическом плане зонам в дельте Волги, где необходим тщательный бактериологический контроль за рыбой и средой ее обитания.

По бактериологическим показателям наиболее благоприятной средой обитания является Главный банк дельты Волги, к тому же в этом районе не было зарегистрировано ни одного экземпляра сазана с клиническими признаками заболевания.

#### Глава 4. ПАТОГЕННОСТЬ ВЫДЕЛЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ

Изучение патогенности микроорганизмов, выделенных от больного сазана, проведено по триаде Коха чистыми культурами: *P. vulgaris* и *A. hydrophila*. Они были изолированы из язв исследуемой рыбы, выловленной в урочище "Грязнуха" Гандуринского банка.

Проведена серия биопроб на годовиках карпа при 18-20°C,

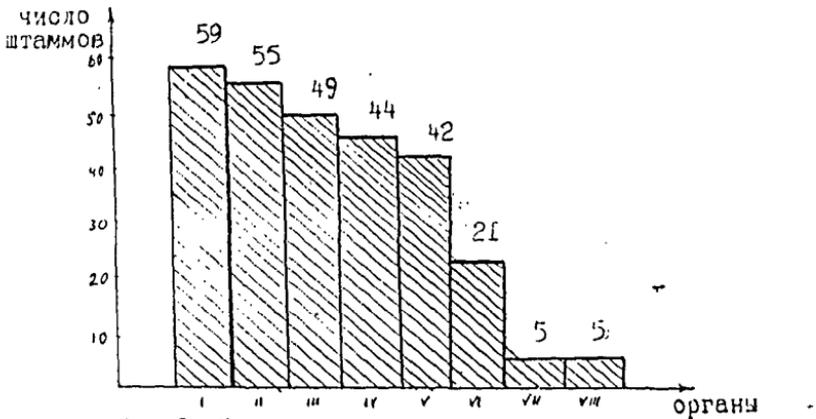


Рис. I. Число выделенных штаммов микроорганизмов из исследуемых органов сазана.  
 I-кишечник; II-жабры; III-селезенка; IV-печень; V-почки; VI-язык; VII-икра; VIII-кровь.

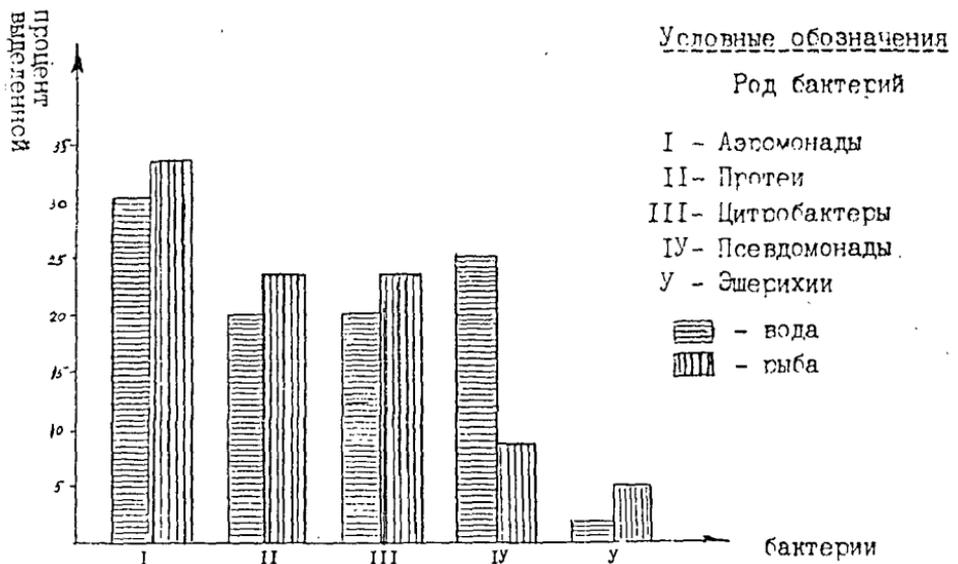


Рис. 2. Сравнение удельного веса условно патогенных бактерий в рыбе и воде

15-18<sup>0</sup>С, 7-8<sup>0</sup>С, то есть при температурах воды, при которых регистрировали заболевания и гибель сазана. Заражение осуществляли внутримышечно по 0,2 мл; контрольным рыбам вводили физиологический раствор в той же дозе.

Результаты биопробы позволили установить патогенность *P. vulgaris*, поскольку были воспроизведены клинические признаки заболевания сазана; отмечена 100% гибель опытных рыб. Из их эксудата и паренхиматозных органов реизолирована исходная культура.

В опыте, проведенном с *A. hydrophila* и *E. cloacae*, была получена аналогичная клиническая картина заболевания с 50% гибелью искусственно инфицированных рыб. По окончании наблюдений из эксудата и паренхиматозных органов реизолированы исходные культуры.

Клиническая картина заболевания характеризовалась появлением флюктуирующей папулы на месте инъекции; просачиванием гнойного эксудата через папулу. Гиперемизированные на следующий день после заражения участки тела депигментировались и некротизировались. На месте прободения папул образовались язвочки.

Патологоанатомическое вскрытие рыб показало обширную миопатическую дегенерацию миоцитов. Почки и селезенка увеличены, кровенаполнены, зернистые. Печень бледная, рыхлая, зеленоватого цвета. Слизистая кишечника гиперемизирована. Гистологический анализ позволил установить глубокую патологию в мышцах и паренхиматозных органах экспериментальной рыбы.

Протезолитическая активность является показателем патогенности микроорганизмов и фактором, определяющим порчу и аутолиз рыбы.

Наши исследования показали, что почти вся выделенная от сазана микрофлора обладает высокой протеолитической активностью: аэромонады, псевдомонады в 90–100% случаев; ацинетобактерии и флавобактерии – от 50 до 100%; энтеробактерии, в частности, протеи, цитробактерии и энтеробактерии – от 70 до 100% случаев.

Сезонный анализ протеолитической активности бактерий позволил установить подъемы протеолитически активных штаммов в весенний и осенний периоды, совпадающие с весенним и осенним промыслом рыбы в дельте Волги.

ДНКазная активность аэромонад, как убедительный фактор патогенности (Jeffris et al, 1957; Юхименко, 1988), была характерна для значительного числа штаммов аэромонад. На примере *A. hydrophila*, выделяемой от сазана в разные сезоны года, нами проанализирована сезонная динамика ее ДНКазы.

В феврале у исследуемых культур она была минимальной (6%). С марта по май число вирулентных штаммов возрастало с II до 22%; в октябре процент ДНКазноположительных штаммов достиг 33%. В ноябре был зарегистрирован резкий спад ДНКазноположительных штаммов до 20%. Установлен феномен увеличения зоны деполимеризации ДНКазы от весны к осени – это дает нам основание сделать вывод о возможном пассировании аэромонад через рыбу и в естественных водоемах.

Изучая толерантность к хлориду натрия, установлена жизнеспособность аэромонад, псевдомонад и энтеробактерий в 7% солевом бульоне от 40 до 100%. В 10% бульоне с NaCl способны выживать до 40% аэромонад; до 20% энтеробактерий. Псевдомонады в 10% солевом бульоне гибнут. Следовательно, значительная часть выделенной нами микрофлоры, инфицирующей сазана, будет

оставаться жизнеспособной не только в свежесловленной рыбе, но и в соленой рыбной продукции. При этом, в весенний и осенний периоды, совпадающие с промыслом сазана, число галофильных штаммов увеличивается.

В связи с этим и выше изложенным, необходим бактериологический контроль от свежесловленной рыбы до готовой продукции.

### Глава 5. ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РАЗВИТИЕ МИКРОФЛОРЫ САЗАНА

Бактерии являются постоянными компонентами гетеротрофного блока экосистем различных водоемов. Обладая большим набором ферментов, они принимают участие не только в биологической минерализации мертвого органического вещества, но многие из них, являясь условными патогенами, могут вызывать различные заболевания у рыб в естественных популяциях и в прудовых хозяйствах (Warren, 1980; Conroy, 1984; Austin, 1987; Юхименко и др., 1987; Ларцева, 1990). При этом, паразитирующие на рыбе и в рыбе бактерии находятся под двойным воздействием: под непосредственным влиянием хозяина-рыбы с ее различным физиологическим состоянием и иммунным статусом (среда первого порядка) и под влиянием окружающей хозяина среды с ее абиотическими факторами (среда второго порядка).

В разные сезоны года видовой состав выделенных бактерий определяется комплексом экологических факторов; активной реакцией среды, содержанием в воде кислорода и ее температурой, которая обуславливает сезонную динамику микрофлоры.

Оптимальной для развития микроорганизмов, выделенных нами от сазана, была нейтральная и слабощелочная реакция среды в

пределах 7,6 -8,2. В диапазоне приведенных значений pH воды были выделены бактерии родов *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Citrobacter* и *Proteus*. Максимальным числом видов и штаммов бактерии встречались при активной реакции среды от 7,6 до 7,9; 56 и 66 штаммов микроорганизмов соответственно. По мере подщелачивания среды число выделенных штаммов и видов бактерий несколько снизилось: от 56 до 50 изолятов. Исключение составляли только микроорганизмы группы протей (*P. mirabilis*, *P. morgani*, *P. vulgaris*), которые изолировались в исследуемом материале равномерно при pH среды от 7,6 до 8,2.

Поскольку, в условиях дельты Волги диапазон значений активной реакции воды во время сбора нашего материала был достаточно узкий (7,6-8,2), этот фактор не является лимитирующим для развития микрофлоры и играющим значимую роль в инфицировании рыб.

Температура воды и содержание в ней кислорода тесно взаимосвязаны между собой и оказывают значительное влияние на рост и развитие микрофлоры. При повышении температуры и снижении кислорода в воде сокращается цикл заражения рыбы микрофлорой, ускоряется темп ее инфицирования (Snieszko, 1974; Warren, 1980; Ведемейер, 1981; Борисенко, 1991; Каховский, 1991).

Выделенная нами микрофлора изолировалась при содержании кислорода в воде от 7,4 до 13,5 мл/л, соответствующим сбору материала.

Анализ встречаемости микроорганизмов в рыбе и воде показал, что оптимум содержания растворенного в воде кислорода для активного развития и вегетации большинства изолятов выделенной микрофлоры находится в пределах от 7,4 до 10,2 мл/л.

В этих параметрах было зарегистрировано наибольшее число штаммов и видов аэромонад, ацинетобактеров и энтеробактерий. Для бактерий этих родов и ранее была отмечена высокая экологическая пластичность (Нестерова, 1972; Калина, 1986; Голубева и др., 1990; Austin, 1987). Исключение составили только псевдомонады и флавобактерии, которые начали выделяться в исследуемом материале при содержании кислорода в воде 8,5 мг/л, однако, максимум их развития пришелся на 10,2-13,2 мг/л. Следовательно, изменения кислородного режима оказывают воздействие на видовой состав микрофлоры в дельте Волги, обуславливая преобладание в различные сезоны года конкретных видов и родов бактерий.

Температурный фактор активизирует или подавляет рост и развитие микрофлоры, формируя ее сезонную динамику (Ведемейер, 1981; Юхименко, 1984; Литвин, 1985; Ким, 1986; Conroy, 1984; Austin, 1987).

Наши исследования показали, что в зависимости от температуры воды в разные периоды года в дельте Волги наблюдается видовое разнообразие штаммов и видов микрофлоры сазана (рис. 3).

Минимальное число изолятов микроорганизмов у исследованной рыбы зарегистрировано в феврале и марте при температуре воды от 0,4 до 1,2<sup>o</sup>C (22 и 29 штаммов соответственно). Изолированная микрофлора была представлена в основном ацинетобактерами, флавобактериями, некоторыми аэромонадами (*A. caviae*, *A. sobria*), псевдомонадами (*Ps. alcaligenes*, *Ps. fluorescens*). Энтеробактерии зимой и ранней весной в анализируемом материале почти отсутствовали за исключением *S. freundii*, *Pr. mirabilis*, *P. vulgaris* которые выделялись единичными штаммами.

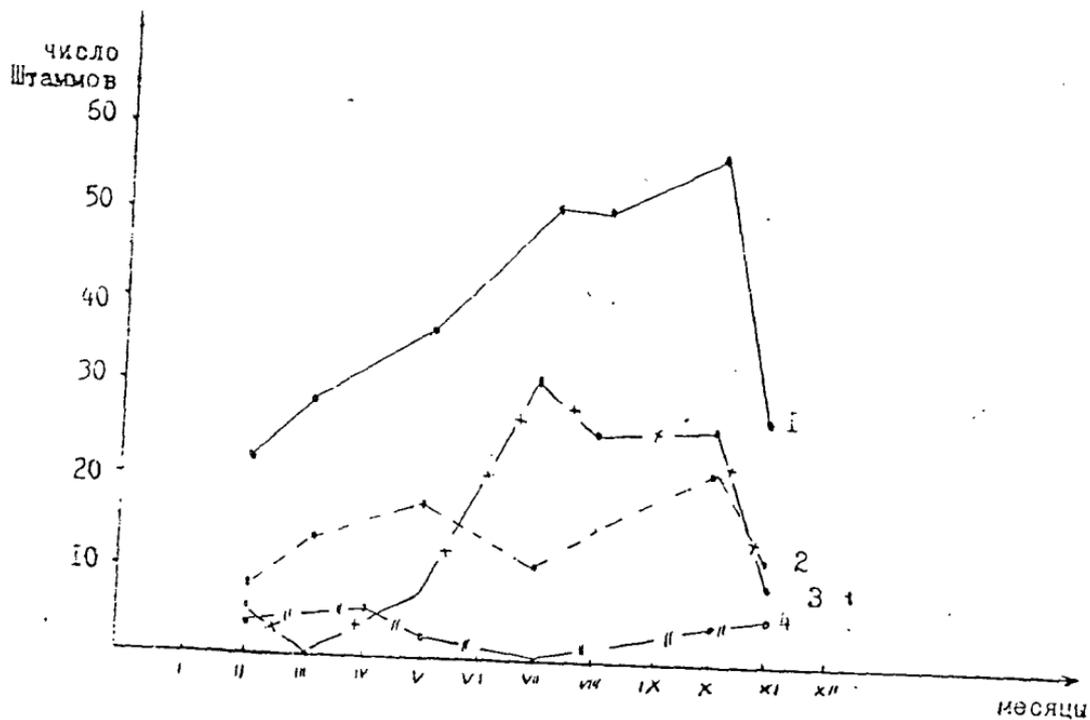


Рис. 3

Сезонная динамика выделенной от сазана микрофлоры (1990-1991 гг.)  
 I - общее число штаммов; 2 - аэромонады; 3 - энтеробактерии;  
 4 - псевдомонады

Поздней весной - в мае, в диапазоне температур воды от 12,1 до 14,8°C регистрировали подъем в развитии микрофлоры, представленной 37 штаммами. Возросло число видов и изолятов аэромонад, энтеробактерий, в частности, протеев; активизировались бактерии рода *Alcaligenes*.

В летний период, в июле и августе, при температуре воды в пределах от 20 до 25,2°C нами выделено 52 штамма микроорганизмов, это были аэромонады, алкалигенесы, разнообразные энтеробактерии. В августе, при температуре воды 25,2°C отмечен небольшой спад в развитии аэромонад; малочисленными в летнее время были псевдомонады и флавобактерии. В этот же период в анализируемом материале доминировали энтеробактерии из родов *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Salmonella*.

В воде в это время была активна вибриофлора. Летний цикл развития бактерий кишечной группы зарегистрирован ранее (Кавка 1984; Такако, 1990). Аналогичные данные получены по аэромонадам и псевдомонадам (Духименко и др., 1979; Борисенко, 1991; Каховский, 1991; Керекеша, 1991; Austin, 1987).

Ранней осенью, в первой половине октября при температуре воды в пределах 12,1-12,8°C, нами было зарегистрировано максимальное число выделенных от сазана штаммов (56) и видов бактерий. Так, аэромонады в исследуемом материале представлены 22 изолятами против 16, выделенных в летний период. В октябре, почти на одном уровне с летним сезоном выделялись от сазана и энтеробактерий (27 и 28 штаммов соответственно). Это были представители родов *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*. Остальная микрофлора, в том числе флавобактерии и псевдомонады в этом месяце у исследуемой рыбы представлена единичными штаммами. Моракселлы и ацинетобактеры изолировались в октябре

на одном уровне с летним сезоном.

Октябрьский максимум развития микрофлоры обусловлен ее активностью в воде и, по нашему мнению, способностью персистироваться и накапливаться в рыбе в ранний осенний период в дельте Волги. Подобная экологическая особенность характерна для многих условных патогенов и патогенов человека в бактериоценозе Нижней Волги (Андросова и др., 1989; Илюхин и др., 1989).

Поздней осенью, в ноябре, при температуре воды 4,6-5,2°C число выделенной микрофлоры резко снизилось до 30 штаммов. В первую очередь чувствительными к снижению температуры воды оказались аэромонады и энтеробактерии, доминирующие в рыбе и воде летом и ранней осенью. В то же время, по сравнению с летним сезоном, несколько активизировались представители родов *Flavobacterium* и *Pseudomonas*. Ацинетобактерии и в ноябре выделялись в исследуемом материале равномерно, а число штаммов моракселл резко снизилось.

Таким образом, подъемы в развитии микрофлоры, доминирующей из различных видов аэромонад и энтеробактерий, в дельте Волги, совпадает с весенней и осенней путинной в дельте Волги.

Интенсивность развития микроорганизмов в значительной степени зависит от физиологического состояния рыбы и уровня ее резистентности к возбудителям бактериозов (Warren 1980; Ведемейер, 1981; Hoffman, 1984; Snieszko, 1984; Юхименко и др., 1988; Борисенко, 1991; Каховский, 1991). Так, наличие аэромонад в паренхиматозных органах рыбы служит косвенным показателем степени резистентности организма рыб, на которое оказывает непосредственное влияние плотность посадки, "хендинг" и другие факторы (Керекеша, 1991).

Установлено, что во время содержания производителей сазана в нерестовых прудах НВХ "Петухов" в формировании качественного и количественного состава микрофлоры играет биотический фактор. Длительные, в несколько дней перевозки этой рыбы в прорезях с высокими плотностями загрузки, пересадки ее в мелководные, сильно прогреваемые пруды, снижают резистентность сазана, что подтверждается значительным его микробным обсеменением и появлением при спуске прудов (Через 1,5 месяца после зарыбления) у 5% особей изъязвлений на брюшной полости и жаберных крышках.

Анализ бактериологического материала сазана до посадки его в пруды и после их спуска показал накопление в его паренхиматозных органах аэромонад и энтеробактерий, в частности, цитробактеров и протеев, а также алкалигенесов. Так, при спуске прудов в печени общее число штаммов увеличилось в 2,2 раза; в почках - в 6 раз; селезенке и кишечнике - в 2 раза. Кроме того, при спуске прудов НВХ появились бактерии, отсутствующие в рыбе при зарыблении нерестовых прудов - это бактерии родов *Enterobacter* и *Serratia*.

Выделенные из изъязвлений сазана аэромонады, энтеробактеры и протей в биопробе на годовиках карпа оказались авирулентными, следовательно, были в данном случае секундарной инфекцией, следствием ослабления резистентности рыбы.

Таким образом, комплекс абиотических и биотических факторов среды способствует микробному инфицированию сазана, снижает его резистентность, ухудшает товарные качества рыбы и в некоторых случаях представляет угрозу для здоровья людей, так как аэромонады и энтеробактерии нередко являются этиологическими агентами кишечных инфекций (Голубева и др., 1985;

Чайка и др., 1986, 1988; Arias, 1987; Mersch et al., 1987).

В связи с этим основой профилактики бактериальной контаминации рыбы является строгий санитарно-микробиологический контроль как за средой обитания, так и за состоянием рыбы, а также проведение на водоеме общих санитарных и мелиоративных работ, направленных на оздоровление всей водной экосистемы в дельте Волги.

#### Глава 6. ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ МЕРОПРИЯТИЯ, РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОТЕЙНОЙ ИНФЕКЦИИ САЗАНА И СНИЖЕНИЕ ЕГО МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ

В главе приведены данные о возрастающей этиологической роли бактерий группы протей при возникновении патологических процессов у рыб. Пренебрежение санитарно-профилактическими мероприятиями в урочищах, протоках и НВХ дельты Волги радикально изменили условия обитания рыбы и биологические свойства протеев. Последние, как показали наши исследования, приобрели высокую патогенность, что в конечном счете привело к заболеванию и массовой гибели сазана. Это послужило поводом для разработки лабораторной диагностики протейной инфекции сазана. Она предусматривает: общие положения. Эпизоотологию. Клинические признаки и патологоанатомические изменения. Диагностику. Меры борьбы с протеезом.

Материалы оформлены и отправлены для утверждения в Главное управление ветеринарии МСХ РФ.

#### Практические рекомендации по снижению микробной обсемененности сазана

В целях профилактики протееза рыб и снижения их бактери-

альной обсемененности

- проводить комплексные мероприятия, направленные на предупреждение фекального загрязнения водоема;
- проводить строгий учет водоплавающей птицы и водостройных систем в районе, неблагополучном по протозоу;
- живорыбную тару и рыболовецкий инвентарь, используемый при транспортировке рыб, дезинфицируют до и после перевозки рыб, согласно "Наставлению по применению формалина по обеззараживанию орудий лова, рыбоводного инвентаря и спецодежды" от 21.04.81;
- при обловах не допускается травмирование рыб;
- регулярно следить за эпизоотическим состоянием на водоеме в период массового хода сазана;
- проводить мелисративные мероприятия, направленные на улучшение среды.

Ввиду значительной микробной обсемененности и регистрации протейной инфекции сазана улучшать качество охлажденной рыбы:

- при сдаче рыбы тщательно мыть приемный пункт и рыболовецкий инвентарь от слизи сдаваемой рыбы;
- использовать при охлаждении рыбы чистый доброкачественный лед;
- при сдаче рыбы отбраковывать рыб с травмами, изъязвлениями, поражениями писцикулезом;
- при разделке сазана тщательно изымать внутренности, подвергая их технической утилизации;
- проводить санитарно-бактериологический контроль рыбы. В случае доминирования в рыбе протеолитически активных и галлофильных протеев, рыбу использовать в консервном производстве;

- при заготовке маточного стада сазана для рыбоводных заводов и НВХ отбирать производителей без признаков поражения кожи, глаз и жабр;
- при доставке сазана в прорезях не допускать переуплотненных посадок рыбы и стрессовых ситуаций, повышающих уровень микробной обсемененности;
- не допускать выдерживания рыбы в прорезях более суток при заготовке производителей для рыбоводных предприятий;
- производителей сазана после использования его в рыбоводных целях отправлять на консервное производство.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ВЫВОДЫ

1. В водной экосистеме дельты р. Волги отмечается устойчивый дисбактериоз, для которого характерно уменьшение числа индикаторных бактерий на фоне значительного увеличения условно-патогенной и патогенной микрофлоры.

2. Установлена 100% микробная контаминация всех внутренних органов и тканей сазана разнообразной микрофлорой, относящейся к 33 видам из 14 родов: *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Actinobacillus*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Novaxella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*.

3. В условиях многофакторного антропогенного пресса в воде дельты р. Волги выделена условно-патогенная микрофлора, состоящая из 21 вида и 12 родов: *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Novaxella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio*.

4. В воде дельты р. Волги и в сазане доминируют условно-патогенные аэромонады, протеи и цитробактеры, характеризую-

щие экологическую загрязненность водоемов. При этом, индикаторная *E. coli* в пробах встречалась редко.

5. Жаберная и кишечная микрофлора сазана наиболее близка по составу и удельному весу к показателям водной микрофлоры. Показано, что эти органы сазана могут служить объективным тест-индикатором для оценки экологического состояния водоема.

6. На основании проведенных бактериологических исследований воды и сазана районы реки Бузан и Гандуринского банка дельты Волги следует отнести к наиболее загрязненным и экологически неблагоприятным зонам. По тем же показателям Главный банк отнесен нами к умеренно загрязненной зоне. Район рыбокомбината (черта г. Астрахани) характеризуется как крайне загрязненная зона.

7. В качестве организмов-индикаторов экологического и санитарного состояния водоема рекомендуется использовать бактерии родов: *Aeromonas*, *Citrobacter*, протеининдикаторная функция *E. coli* более не состоятельна.

8. Ведущими факторами в развитии микрофлоры в дельте р. Волги, определяющими ее видовой и количественный состав, сезонную динамику, являются температура и степень насыщения воды кислородом. Наиболее благоприятные сезоны для максимального развития условно-патогенных бактерий - это конец лета и ранняя осень.

9. Степень восприимчивости сазана к микробному инфицированию связана с его физиологическим состоянием. Установлено, что во время содержания производителей сазана в водоемах НВХ "Петухов" значительно повышается уровень bacteremia, в основном, за счет аэромонад, энтеробактерий и алкалигенесов. При спуске прудов у 5% особей были зарегистрированы признаки пора-

жения (изъязвления на теле, жаберных крышках, брюшной полости)

10. Экспериментально доказано, что этиологическим агентом заболевания сазана и причиной его гибели в дельте р. Волги был *Aeromonas hydrophila*. Согласно триаде Коха подтверждена сопутствующая инфекция, вызванная *Aeromonas hydrophila*, *Bacteriophage* и *Bacteriophage*.

11. Составлена и рекомендована для утверждения в Главном управлении ветеринарии МСХ РФ лабораторная диагностика по протеозу рыб, как вновь зарегистрированная в стране.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Аморос Хименес Глория Каролина, Ларцева Л.В. Протеоз рыб. Информационный листок № 138-92 АЦНТИ. Астрахань, 1991. - С. 1-2.
2. Аморос Хименес Глория Каролина, Ларцева Л.В., Катунин Д.Н. Микрофлора рыб - биоиндикатор санитарно-эпизоотологического состояния Волго-Каспийского региона. / Тез. докл. I международной конференции "Биологические ресурсы Каспийского моря" // Астрахань, 1992. - С. 225-226.
3. Аморос Хименес Глория Каролина, Ларцева Л.В. Кишечная микрофлора. / Тез. докл. молодых ученых. // Владивосток (в печати).
4. Аморос Хименес Глория Каролина. Сезонная динамика бактериальной микрофлоры сазана (*Carassius auratus*) в дельте р. Волги. / Вести Астраханского технического института рыбной промышленности и хозяйства (в печати).
5. Аморос Хименес Глория Каролина, Ларцева Л.В. Лабораторная диагностика протеоза рыб. / МРХ РФ. Главное управление ветеринарии (на утверждении).