

Лисица

На правах рукописи



Лисицкая Ирина Анатольевна

**БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА НЕКОТОРЫХ КОМПОНЕНТОВ
ЭКОСИСТЕМЫ ДЕЛЬТЫ ВОЛГИ И СЕВЕРНОГО КАСПИЯ**

Специальность: 03.00.18 – Гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

02 ОКТ 2008

Астрахань 2008

Работа выполнена в Федеральном государственном унитарном предприятии
«Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства»
(ФГУП «КаспНИРХ»)

Научный доктор биологических наук
руководитель: Ларцева Любовь Владимировна

Официальные доктор биологических наук, профессор
оппоненты: Зинченко Татьяна Дмитриевна

кандидат биологических наук, доцент
Бычкова Лариса Ивановна

Ведущая
организация: ГУ «Астраханский государственный природный
биосферный заповедник»

Защита состоится «21» октября 2008г. в 14.00 час. на заседании диссертационного совета Д 307.001.05 при Астраханском государственном техническом университете по адресу: 414025, г. Астрахань, ул. Татищева, 16, ГК ауд. 309

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке АГТУ

Автореферат разослан

«19» сентября 2008г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук,
доцент



Мелякина Э. И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Антропогенное загрязнение является существенным экологическим фактором, лимитирующим жизнедеятельность биологических систем на разных уровнях их организации в водной среде. Изучение особенностей функционирования водных организмов, обитающих в хронически загрязненной среде и их патологии, – одна из актуальных проблем гидроэкосистем. Наиболее пристальное внимание ученых вызывают условно-патогенные микроорганизмы вследствие их широкого распространения и важной роли в различных гидробиоценозах. В то же время информация о состоянии здоровья водных животных очень важна для оценки санитарно-гидробиологической ситуации в акваториях, подвергнутых техногенному воздействию.

Морские бактерии как эпibiонты составляют часть нормального бактериоценоза различных гидробионтов, на который в значительной степени влияет эвтрофирование Каспийского моря и где всегда присутствуют потенциально патогенные виды бактерий (Салманов, 1999; Сокольский, Умербаева, 2001; Катунин с соавт., 2004; 2005). Любое нарушение экологической обстановки, в частности, загрязнение водной среды нефтяными углеводородами, сопровождается изменениями, которые охватывают как свободноживущих, так и паразитических животных (в том числе микроорганизмов), обуславливая жесткий отбор видов, идущий по пути приспособления к экстремальным условиям гидроэкосистемы. Трансформирование среды обитания представителей ихтиофауны сказывается не только на видовом составе и численности их микрофлоры, но также инициирует ослабление защитных механизмов самих гидробионтов, что делает последних более доступными для патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, способствует возникновению и тяжелому протеканию инфекций. Многие возбудители болезней гидробионтов, считавшиеся ранее относительно безопасными, становятся причиной их гибели и как следствие, значительных экономических ущербов (Карасева, 2002; Головина с соавт., 2003; Вялова, 2006; Osukoda, 2002; Robichaud, 2004).

Цель данной работы – выявить особенности распределения бактериальных сообществ некоторых компонентов экосистемы дельты Волги и Северного Каспия и оценить воздействие на них антропогенных факторов, в том числе интенсивного поиска углеводородного сырья в Северном Каспии.

Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить видовой состав бактериальных сообществ, выделенных из внутренних органов и тканей бычковых рыб-стенобионтов, осетровых-эврибионтов и среды их обитания.
2. Определить роль отдельных экологических факторов в развитии бактериальных сообществ морской и пресноводной биот. температурного фактора, определяющего сезонную динамику; галотолерантность микрофлоры.
3. Изучить в экспериментальных условиях изменение патогенных свойств отдельных видов бактерий при загрязнении их среды обитания различными концентрациями сырой нефти
4. Оценить факторы патогенности выделенной микрофлоры и ее антибиотикорезистентность

5. Определить методом биопробы на рыбе и белых мышках степень патогенности некоторых штаммов микроорганизмов, выделенных из исследованных нами объектов.

Научная новизна. Впервые в Волго-Каспийском регионе проведены систематические исследования по качественному составу условно-патогенной микрофлоры, обсеменяющей бычковых и осетровых рыб, а также среду их обитания в условиях многофакторного антропогенного пресса. Проведен сравнительный анализ бактериальных сообществ морской и речной биот. Показано их пространственное распределение в море в зависимости от ряда факторов природного и антропогенного происхождения. Впервые выявлены и определены различия проявления факторов персистенции и/или патогенности выделенной микрофлоры и антибиотикорезистентности в зависимости от ее экотипической принадлежности. Определено влияние разных концентраций нефти на морфологию и патогенные свойства доминирующих видов микроорганизмов. Проведенные исследования позволяют объективно оценивать и прогнозировать санитарно-экологическую и эпизоотическую ситуацию в водоеме.

Теоретическое и практическое значение данной работы заключается в раскрытии роли фенотипических особенностей бактериальных сообществ, обуславливающих политропность, смену нозоареала и стадии переадаптации микрофлоры морских и речных биот. Результаты проведенных санитарно-микробиологических исследований являются составной частью производственного экологического мониторинга морской среды при проведении нефтеразведочных работ на шельфе Северного Каспия. Материалы, изложенные в диссертационной работе, нашли применение в учебном процессе по многим прикладным дисциплинам: «Общая экология», «Экологическая эпидемиология», «Санитарная гидробиология», «Ихтиопатология» в Астраханском государственном техническом университете, «Экологическая экспертиза», «Экология микроорганизмов» в Астраханском государственном университете. Результаты работы также могут быть использованы в аквакультуре для санитарно-микробиологической оценки осетровых-производителей.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. На структуру бактериальных сообществ осетровых, бычковых рыб и воды дельты Волги и Северного Каспия доминирующее влияние оказывают температура воды и антропогенный прессинг.
2. Сезонная динамика выделенной условно-патогенной микрофлоры обусловлена температурным и гидрохимическим режимами, сложившимися на акватории дельты Волги и Северного Каспия, а также антропогенным прессом.
3. Степень патогенности бактерий, выделенных из пресноводной и морской биот, их множественная антибиотикорезистентность и галотолерантность являются факторами выживания микроорганизмов в меняющихся условиях среды обитания.
4. Нефтяное загрязнение оказывает стимулирующее воздействие на рост, развитие и патогенные свойства некоторых микроорганизмов, степень угнетения или возрастания их патогенных свойств зависит от степени превышения ПДК по нефтеуглеводородам.

5. Результаты проведенных биопроб свидетельствуют о мощном патогенном потенциале условно-патогенных бактерий, циркулирующих в гидроэко-системе Волго-Каспия.

Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы были пред-ставлены и получили положительную оценку на заседаниях Астраханского отдела-ния Всероссийского общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов (2002, 2003, 2004); на совместном заседании научно-консультативного совета по бо-лезням рыб ФГУ «Межведомственная ихтиологическая комиссия» и Секции патоло-гии рыб и охраны гидробионтов Отделения ветеринарной медицины Россельхозака-демии (Москва, 2007), на международной конференции «Современные проблемы океанологии шельфовых морей России» (Мурманск, 2002), международной научно-практической конференции «Аквакультура начала XXI века: истоки, состояние, стратегия развития» (п Рыбное, 2002); международной конференции молодых уче-ных «Проблемы аквакультуры и функционирования и водных экосистем» (Киев, 2002); Proceedings of the Second Bilateral Conference between Russia and United States (Shepherdstown, West Virginia, 2003); I международной научно-практической конфе-ренции молодых ученых «Комплексные исследования биологических ресурсов юж-ных морей и рек» (Астрахань, 2004); III международной научно-практической кон-ференции «Человек и животные» (Астрахань, 2005), международной научной кон-ференции «Современные проблемы и адаптации и биоразнообразия» (Махачкала, 2006); международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию Астраханского Государственного университета «Экология биосистем: проблемы изучения, индикации и прогнозирования» (Астрахань, 2007); второй научно-практической конференции студентов, аспирантов, преподавателей и научных сот-рудников, посвященной 10-летию кафедры экологии и безопасности жизнедеятель-ности Астраханского Государственного Университета (Астрахань, 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 работ.

Декларация личного участия автора. Автором самостоятельно в полевых ус-ловиях собран и обработан материал, проведены бактериологические исследования и биопробы, выполнена видовая идентификация выделенных микроорганизмов, осуществлен анализ и статистическая обработка полученных данных.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 152 страницах, включа-ет 13 рисунков, 8 таблиц и 3 приложения. Состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 169 наименований, из них 60 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Литературный обзор состоит из 3-х разделов, в которых рассмотрены вопросы физико-географической и гидробиологической характеристик Северного Каспия и дельты Волги, эколого-токсикологической обстановки этих районов, распростра-нения условно-патогенной микрофлоры в различных промысловых рыбах морского и речного комплекса, а также среде их обитания. Приведены данные о распределении микроорганизмов в природе, их толерантность к абиотическим и биотическим фак-торам среды. Описана биологическая характеристика бычка-песочника и осетра с учетом экологических и природно-социальных условий региона.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в лаборатории научной диагностики рыб ФГУП «КаспНИРХ» в период с 2001 по 2005 гг. Объектами исследования являлись бактериальные сообщества бычка-песочника (*Neogobis fluviatilis Pallas, 1814*), русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii Brandt, 1833*) в морской и речной период его жизни, мнемнопсиса (*Mnemopsis leidyi*), а также пробы морской и речной воды. Сбор материала осуществляли весной и осенью в Северном Каспии (в том числе по мнемнопсису на дагестанском побережье в районе г. Махачкала) и на Главном банке дельты р. Волги во время промысла. У рыб исследовали жабры, кишечник, печень и кровь. У осетра в реке дополнительно обследовали гонады. Объем проанализированного материала представлен в таблице 1.

Таблица 1- Объем проанализированного материала

Исследуемый объект	Район исследования	Количество проб, шт	Количество выделенных бактериальных культур, штамм
Бычки	Северный Каспий	4268	4354
Осетр	Северный Каспий	310	402
Вода	Северный Каспий	90	208
Осетр	Дельта Волги (ВКК)	310	406
Вода	Дельта Волги (ВКК)	70	90
Мнемнопсис	Дагестанское побережье Каспия	50	90
Итого		5098	5550

Сбор материала осуществлен согласно принятым в ихтиопатологии методикам. Пробы отбирали с соблюдением правил асептики на накопительные среды и доставляли для дальнейшей работы в лабораторию. В лабораторных условиях для видовой идентификации качественного состава выделенной микрофлоры использовали как общепринятые традиционные, так и усовершенствованные, модифицированные методы. При этом использовали основные принципы и этапы бактериологического исследования согласно Лабораторному практикуму по болезням рыб (1983), Сборнику инструкций по борьбе с болезнями рыб (1999) и Практикуму по микробиологии (2005).

У всех выделенных штаммов определяли галотолерантность, т.е. способность расти в МПБ (мясопептонном бульоне) с 3,0; 7,0; и 10,0% хлоридом натрия; анализировали факторы патогенности: протеолитическую, лецитиназную, гемолитическую активности, а у аэромонад – ДНКазную активность по МУ № 13-4-2/1116. Все изолированные микроорганизмы проверяли на чувствительность к антибиотикам с использованием метода диффузии в агар дисков с бензилпенициллином, ампициллином, стрептомицином, левомицетином, тетрациклином и фурадонинном.

В итоге вся микрофлора, изолированная из органов рыб и воды, проведена по 38-40 микробиологическим тестам и идентифицирована до вида с помощью определителя Берджи (1997), монографии Ю. П. Пивоварова и В. В. Королика (2000)

Для изучения влияния различных концентраций (0,05; 0,25; 0,5 и 10,0 мг/л) сырой каспийской нефти на ростовую реакцию и адаптационные возможности условно-патогенной микрофлоры были проведены экспериментальные работы с использованием штаммов бактерий, выделенных из морской и речной биот: *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, обладающие протеолитической, гемолитической, лецитиназной и ДНКазной (только *A hydrophila*) активностями. На

третьи сутки после посева проводили повторное тестирование всех испытуемых штаммов на наличие и изменение маркеров патогенности.

С целью определения вирулентности выделенной микрофлоры была проведена серия биопроб на представителях каспийской ихтиофауны (по 15 экз. бычков, воibly, кефали, годовиков осетра) в Дагестанском отделении КаспНИРХа («Турали-2»). Проведение биопробы и наблюдение за экспериментально зараженными рыбами осуществлен согласно лабораторному практикуму по болезням рыб (Мусселиус и др., 1983; Сборник инструкций по болезням рыб, 1999). Эксперименты на белых нелинейных мышах были поставлены на базе Астраханской областной ветеринарной лаборатории. Испытывали вирулентность бактерий (по два штамма) следующих видов: *A. hydrophila*, *Ps. aeruginosa*, *C. freundii*, *Pr mirabilis*, *V fischeri*.

Математическая обработка полученных данных проведена с помощью биометрических методов (Лакин, 1990) и методом вариационной статистики на компьютере по программе MS Excel

Глава 3. Структура бактериальных сообществ воды и рыбы дельты Волги и Северного Каспия

3.1 Эколого-биологическая характеристика выделенных микроорганизмов

В разделе приведены характеристики выделенных микроорганизмов, их встречаемость в различных биотопах, распространенность в природе, а также данные об эпизоотической, санитарной и эпидемиологической их значимости. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что бактериоценозы каспийских бычков, осетровых в морской и речной периоды их жизни, а также среды их обитания были многообразны и состояли из 83 видов микроорганизмов, относящихся к 25 родам: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Candida*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Flavobacterium*, *Photobacterium*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Morganella*, *Moraxella*, *Lusibacterium*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*

3.2 Бактериальные сообщества осетровых-эврибионтов и бычковых-стенобионтов, а также среды их обитания

Анализ полученных материалов выявил существенные различия в бактериоценозах морских и речных биотопов, обусловленные неодинаковым образом жизни гидробионтов, комплексом абиотических и биотических факторов в дельте Волги и Северном Каспии.

Семейство *Enterobacteriaceae*

От анализируемых объектов нами выделено 1392 штамма, представленные 24 видами из 13 родов этого семейства (табл. 2).

В речной период жизни у осетров энтеробактерии превалировали среди грамотрицательных бактерий, составляя $25,5 \pm 0,3\%$ штаммов от всей выделенной микрофлоры. При этом в рыбе субдоминировали бактерии группы р. *Proteus* и р. *Citrobacter* ($15,0 \pm 1,7\%$ и $6,4 \pm 1,3\%$ проб, $P < 0,05$). Среди выделенных цитробактеров доминировал *C. freundii* ($5,4 \pm 1,1\%$), в группе протея превалирующее положение занимал *P. mirabilis* ($10,6 \pm 0,8\%$). Процентное соотношение выделенных энтеробактерий

внутри семейства также указывает на доминирование в микробном пейзаже осетров рр. *Citrobacter* и *Proteus* (табл. 2).

Таблица 2 - Удельный вес энтеробактерий, выделенных из воды и рыбы (в структуре семейства), %

Микрофлора	Процент выделенных штаммов, %				
	бычки	осетры (мо-ре)	вода морская	осетры (река)	вода речная
p <i>Citrobacter</i>	52,2±0,8	59,3±0,8	52,9±0,8	25,0±0,6	35,7±0,7
p <i>Edwardsiella</i>	12,3±0,4	6,3±0,2	6,0±0,2	3,9±0,1	0,8±0,01
p <i>Enterobacter</i>	15,7±0,5	15,6±0,5	17,6±0,6	1,9±0,01	0,8±0,01
p <i>Escherichia</i>	-	-	-	2,9±0,1	0,8±0,01
p <i>Hafnia</i>	1,1±0,1	-	1,1±0,1	0,9±0,02	0,8±0,01
p <i>Klebsiella</i>	-	-	-	0,9±0,02	0,8±0,01
p <i>Morganella</i>	-	-	-	3,9±0,1	0,8±0,01
p. <i>Proteus</i>	17,1±0,6	12,5±0,4	17,6±0,6	51,0±0,7	28,6±0,6
p <i>Providencia</i>	-	-	-	3,9±0,1	0,8±0,01
p. <i>Serratia</i>	-	-	-	0,9±0,02	0,8±0,01
p. <i>Salmonella</i>	-	-	-	3,9±0,1	7,1±0,3
p. <i>Shigella</i>	2,5±0,2	6,3±0,2	4,8±0,1	0,9±0,02	21,4±0,5
p <i>Yersinia</i>	-	-	-	0,9±0,02	0,8±0,01

В море у бычков и осетров удельный вес энтеробактерий был ниже в 3,1 раза, по сравнению с осетровыми в речной период их жизни. Это обусловлено самоочищающей способностью моря, а также более слабым техногенным и хозфекальным прессингом на морскую гидрозкосистему, в отличие от речной. Субдоминантами среди этого семейства, инфицировавших морские объекты, были представители р. *Citrobacter* (осетры – 4,2±0,8%, бычки – 4,2±0,8% штаммов от всей выделенной микрофлоры), в частности, *C. freundii* - 2,8±0,6% у осетров, 2,4±0,5% - у бычков. Бактерии р. *Proteus* в морской биоте, в среднем, составили 1,1±0,1% штаммов. Обращает на себя внимание редкая встречаемость в речной воде и рыбе (а в море их полное отсутствие) индикаторно-значимых *E. coli* - 1,3±0,2% и 0,7±0,3% и *Salmonella sp.* - 1,2±0,5% и 1,3±0,2% проб соответственно, что свидетельствует о продолжающемся антропогенном прессинге на водную экосистему, когда условно-патогенная микрофлора превалирует над индикаторной.

Анализ полученных данных по гидромикрофлоре также выявил некоторое снижение удельного веса энтеробактерий в морской воде (в 1,3 раза), по сравнению с речной. Субдоминантами среди них в морской и речной воде, как и в рыбе, являлись цитробактеры Доминирующим видом среди «водных» цитробактеров, как и в рыбе, был *C. freundii*: море – 2,9±0,6; река – 5,2±1,0% штаммов от всей выделенной микрофлоры. Протеи в воде зарегистрированы реже, чем цитробактеры: в морской - в 4,8; речной – в 1,3 раза (табл. 2).

В прибрежной и мелководной зонах Северного Каспия (как в западной, так и восточной частях), наиболее подверженной речным стокам (вольжскому и уральскому), выявлены энтеробактерии, близкие по своему количественному и качественному составу к речному микробному пейзажу (табл. 2). На приглубых станциях западной части Северного Каспия удельный вес энтеробактерий был относительно низким, а их видовой состав менее разнообразным. В восточной части обследован-

ной акватории на больших глубинах энтеробактерии зарегистрированы не были. Это обусловлено уменьшением антропогенного пресса речных стоков и изменением химического состава морской воды.

Основными биотопами всех энтеробактерий, обсеменявших как осетров, так и бычков, были желудочно-кишечный тракт ($34,1 \pm 0,3\%$ проб), жабры ($29,2 \pm 0,8\%$) и гонады осетра ($25,2 \pm 0,8\%$). Из этих органов изолировали в комплексе несколько видов этого семейства (цитробактеры, эдвардсIELлы, энтеробактеры, протеи), а также представителей других семейств (вибрионы, аэромонады, псевдомонады, флавобактерии), т.е. для многих бактериальных сообществ была характерна политропность. Удельный вес энтеробактерий, выделенных из морских объектов, был близким (табл. 2).

Полученные данные свидетельствуют о ярко выраженных персистентных свойствах и высокой пластичности этой многообразной группы бактерий. Следовательно, энтеробактерии могут быть показателями санитарного состояния Волго-Каспия. Среди них в современный период наиболее объективными индикаторными микроорганизмами могут быть бактерии pp. *Citrobacter* и *Proteus*.

Семейство *Vibrionaceae*

Состав семейства *Vibrionaceae* в изученных нами микробиоценозах был представлен 20 видами из 5 родов (табл. 3). Всего выделено 1356 штаммов этого семейства. В море доминантами являлись бактерии р. *Vibrio* (осетры – $14,4 \pm 4,3$; бычки – $12,0 \pm 4,1$; вода – $12,0 \pm 4,1\%$), а в реке – р. *Aeromonas* (осетры – $3,5 \pm 0,8$; вода – $5,2 \pm 0,7\%$ штаммов от всей выделенной микрофлоры).

Бактерии р. *Vibrio* в большинстве своем являются галофилами и этот фактор определил их разнообразие (10 видов) в микробном пейзаже морских рыб и среде их обитания. Субдоминантой был *V. fischeri* (в бычках – $6,8 \pm 1,4$; в осетре – $7,0 \pm 2,1$; в воде $7,0 \pm 2,1$ % штаммов). В «речном» микробиоценозе представители р. *Vibrio* выделены единичными изолятами, составляя в рыбе $0,3 \pm 0,01$, а в воде – $1,3 \pm 0,2\%$, т.е. их удельный вес был почти в 10 раз меньше, чем у аэромонад, это свидетельствует о том, что вибрионы являются специфической микрофлорой морской воды и населяющих ее гидробионтов. Встречаемость галофильных вибрионов в реке обусловлена их стадиями переадаптации в воде и организме рыб, совершающих нерестовые миграции (осетровые), а также нагонными ветрами с моря, способствующими некоторому перемешиванию северокаспийских и волжских вод. Бактерии pp. *Lucibacterium* и *Photobacterium* зарегистрированы нами только в экосистеме Каспия.

Таблица 3 - Удельный вес вибрионов, аэромонад и др., выделенных из воды и рыбы (в структуре семейства), %

Микрофлора	Процент выделенных штаммов				
	бычки	осетры (море)	вода морская	осетры (река)	вода речная
р. <i>Vibrio</i>	$52,0 \pm 0,8$	$57,4 \pm 0,8$	$47,7 \pm 0,6$	$5,6 \pm 0,1$	$12,5 \pm 0,3$
р. <i>Aeromonas</i>	$26,8 \pm 0,4$	$22,8 \pm 0,3$	$29,5 \pm 0,4$	$83,3 \pm 0,8$	$62,5 \pm 0,7$
р. <i>Lucibacterium</i>	$3,1 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	-	-
р. <i>Photobacterium</i>	$7,4 \pm 0,2$	$5,9 \pm 0,2$	$10,0 \pm 0,3$	-	-
р. <i>Plesiomonas</i>	$10,7 \pm 0,5$	$11,9 \pm 0,3$	$11,4 \pm 0,3$	11,1	$24,5 \pm 0,3$

В бактериоценозе обследованной морской экосистемы доля микроорганизмов семейства *Vibrionaceae* превышала таковую в речной в 5,6 раза. Частота встречаемости галофильных вибрионов, лусибактерий и фотобактерий увеличивалась по мере удаления всех обследованных станций от прибрежной зоны (в западной, центральной и восточной частях Северного Каспия), на которой происходило распреснение морской воды за счет речных стоков.

Аэромонадный комплекс в море был представлен 5-ю, в реке – 6-ю видами. Представителей р. *Aeromonas* чаще регистрировали в речных обследованных объектах (табл. 3). Как в море, так и в реке доминировал один вид – *A. hydrophila*: бычки и морская вода по $3,3 \pm 0,3\%$, морские осетры – $3,5 \pm 1,3\%$ штаммов; речные осетры – $1,2 \pm 0,1\%$, речная вода – $2,6 \pm 0,5\%$ штаммов от всей выделенной микрофлоры. При этом, на границе Северного и Среднего Каспия, а также в районе научно-производственной базы «Турали-2» (дагестанское побережье) наличие аэромонадного комплекса в микробиоценозе обследованных объектов в конце лета – начале осени обусловлено частой встречаемостью этих бактерий в микробном пейзаже вселенца из Черного моря мнемипсиса (*Mnemopsis leidyi*).

Бактерии р. *Plesiomonas* в анализируемом материале были представлены одним типовым видом *Pl. shigelloides*. В структуре всего бактериоценоза они зарегистрированы в морских осетрах и бычках большим числом штаммов, чем у осетров в реке ($3,0 \pm 1,4$ и $2,5 \pm 0,2\%$ против $0,5 \pm 0,2\%$ штаммов, соответственно). В водной среде различий по этим микроорганизмам не отмечено, их удельный вес был практически на одном уровне в пробах морской и речной воды ($2,5 \pm 1,3$ и $2,6 \pm 0,5\%$, соответственно). Внутри семейства массовая доля плезиомонад была на одном уровне во всех обследованных объектах (табл. 3). Их частая встречаемость в речной воде обусловлена саморегуляцией микроорганизмов внутри популяции, необходимой для сохранения своего вида. Распределение плезиомонад по районам исследований было таким же, как у энтеробактерий.

Основными биотопами бактерий семейства *Vibrionaceae* были жабры ($35,1 \pm 0,5\%$), кишечник ($24,8\% \pm 0,3\%$) печень ($29,7 \pm 0,5\%$) исследованных рыб и гонады осетра ($23,0 \pm 0,4\%$). Инфицирование гонад у осетра и печени у всех обследованных рыб свидетельствовало об их напряженном санитарном состоянии и ослабленной резистентности организма, что может негативно отразиться на использовании осетровых в аквакультуре.

Следует отметить, что вибрионы и аэромонады чаще остальных бактерий семейства *Vibrionaceae* регистрировались при кишечных инфекциях людей Астраханской области (Бойко, 1998). Это дает основание считать их показателями санитарно-эпизоотического и эпидемиологического благополучия экосистемы Волго-Каспийского бассейна. В качестве тест-объектов могут быть *A. hydrophila* и *V. fischeri*.

Грамотрицательные неферментирующие бактерии в обследованном микробном пейзаже гидробионтов и среде их обитания представлены 30 видами следующих родов: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*. Всего было выделено 1510 штаммов вышеназванных родов бактерий. Псевдомонады, являясь доминантами в качественном составе всей выделенной микрофлоры морской биоты, в речной экосистеме были зарегистрированы незначительно. Их рост в реке ингибировали более ферментативно-активные бактерии (энтеробактерии и грампозитивная

флора). Удельный вес псевдомонад в структуре этой группы указывает на их доминирование и близкую корреляцию в микробном фоне морских объектов (табл. 4). В реке они были зарегистрированы в 2-3 раза реже, по сравнению с морским материалом.

Таблица 4 - Удельный вес грамотрицательных неферментирующих бактерий, выделенных из воды и рыбы (в структуре этой группы), %

Микрофлора	Процент выделенных штаммов				
	бычки	осетры (море)	вода морская	осетры (река)	вода речная
p <i>Pseudomonas</i>	48,0±0,7	43,0±0,6	48,0±0,7	20,5±0,4	11,7±0,3
p <i>Acinetobacter</i>	16,1±0,3	18,0±0,3	16,1±0,3	54,7±0,8	61,8±0,8
p <i>Moraxella</i>	16,9±0,4	14,5±0,3	17,9±0,4	4,3±0,2	5,9±0,2
p <i>Flavobacterium</i>	16,0±0,2	22,5±0,4	14,3±0,2	6,0±0,2	20,6±0,4
p <i>Alcaligenes</i>	3,0±0,1	2,0±0,1	3,7±0,1	14,5±0,3	-

В море видовой состав псевдомонад был более многообразным (10 видов), с доминированием *Pseudomonas sp.*, *Ps. fluorescens* и *Ps. alcaligenes* (7,8±2,4; 6,6±1,8; 6,5±1,3% штаммов от всей выделенной микрофлоры, соответственно). В пробах морской воды и бычках также были обнаружены единичные штаммы *Ps. aeruginosa* (синегнойная палочка), являющейся патогеном для человека и животных. В реке р. *Pseudomonas* представлен 5-ю видами у осетровых и 3-мя – в воде, при этом субдоминировали *Pseudomonas sp.* и *Ps. fluorescens*.

По районам исследований выявлены различия в частоте встречаемости псевдомонад, удельный вес которых увеличивался по мере удаления станций сбора материала от реки и мелководной прибрежной зоны Северного Каспия к центральной его части, где их развитие ингибировали доминанты речного микробного пейзажа – энтеробактерии, аэромонады и грампозитивная флора. Это свидетельствует об ослаблении антропогенного пресса, обусловленного речным стоком, на приглубую часть Северного Каспия, а также о высокой экологической валентности бактерий этого рода. В восточной части Северного Каспия псевдомонадный комплекс был более разнообразным по сравнению с западной. Это определено разными значениями гидрохимического режима в западной и восточной частях Северного Каспия (рН среды, биологическое потребление кислорода и т.д.), а также генотипическими и фенотипическими особенностями этих микроорганизмов. В районе дагестанского побережья высокая встречаемость бактерий рр. *Pseudomonas* и *Aeromonas* была обусловлена их присутствием в микробиоценозе мнемииописа *Mnemiopsis leidyi*.

Основными биотопами псевдомонад в организме рыб были жабры (28,7±0,3% проб), желудочно-кишечный тракт (31,4±0,4%) и печень (15,0±0,2%). Высокая обсемененность различных рыб Волго-Каспия этими бактериями была отмечена нами и ранее. Контаминация жаберного аппарата обследованных гидробионтов обусловлена почти одинаковым удельным весом псевдомонад в воде и рыбе (табл. 4). Их локализация в печени рыб свидетельствовала об значительной политропности, что дает возможность рассматривать бактерии р. *Pseudomonas* в качестве одного из индикаторов в санитарной гидробиологии.

Ацинетобактерии и моракселлы сем. *Nesseriaceae* в анализируемом материале представлены 4-мя и 5-ю видами, соответственно. Доминантами среди них были

ацинетобактеры, в «морском» микробном пейзаже - *Acinetobacter sp*, *A haemolyticus*, в «речном» – *A calcoaceticus*. Эти микробы были постоянными составляющими микробиоценоза Волго-Каспийского бассейна, их достаточно часто изолировали от разных промысловых рыб, а также от нового вселенца Каспийского моря – мнемнопсиса.

В «морском» микробном фоне удельный вес ацинетобактеров и моракселл составил: осетровые – $20,7 \pm 2,8$; бычки – $20,9 \pm 3,5$, вода – $20,9 \pm 4,2\%$ штаммов, в речном - осетровые – $16,9 \pm 2,9$; вода – $26,0 \pm 2,4\%$ штаммов от всей выделенной микрофлоры. Установлено, что в структуре группы выделенных неферментирующих бактерий ацинетобактеры преобладали только в объектах речной биоты, их удельный вес в реке превышал таковой в море в 3-4 раза (табл. 4). Моракселлы в проанализированном материале не отличались видовым разнообразием, их чаще регистрировали в организме бычков, морских осетров и морской воде. В реке процент этих бактерий был ниже в 3,4 раза, чем в море (табл. 4). Это обусловлено саморегуляцией изолированных микроорганизмов в зависимости от условий их обитания. Существенных различий в распределении ацинетобактеров и моракселл по районам исследований в микробных фонах рыб и воды не выявлено, эти грамотрицательные кокки были выявлены на всех обследованных станциях.

Ацинетобактеры и моракселлы были обнаружены в жабрах ($18,2 \pm 0,6\%$), печени ($3,6 \pm 0,2\%$), гонадах (у осетра) ($17,9 \pm 0,5\%$) и кишечнике ($19,5 \pm 0,5\%$) проанализированных рыб, что свидетельствовало о структурно-функциональных нарушениях и защитных реакциях их организма.

Псевдомонады и ацинетобактеры относятся к углеводородокисляющим микроорганизмам, они способны использовать различные составляющие нефти и нефтепродукты в качестве одного из основных источников углерода и энергии. Поэтому в случае загрязнения моря нефтяными углеводородами может произойти усиление бактериального прессинга на акваторию за счет увеличения биомассы этих бактерий.

Флавобактерии были разнообразны по видовому составу, как в морских (10 видов), так и в речных объектах (7 видов). В море доминантой являлся *Fl aquatile*, в реке – *Flavobacterium sp*. Удельный вес флавобактерий в микробиоценозе морских осетров составил $14,5 \pm 0,4$; бычках – $10,1 \pm 2,4$; воды – $9,4 \pm 3,1\%$ штаммов от всей выделенной микрофлоры, что, в среднем в 2,4 раза больше процентного содержания этих бактерий в микробном профиле осетровых в речной период их жизни и среды их обитания. В реке пониженная обсемененность флавобактериями осетра и воды в местах промысла связана с их элиминацией ферментативно активными энтеробактериями и аэромонадами. Ранее, на фоне доминирования энтеробактерий в микробном пейзаже всех промысловых рыб дельты Волги, флавобактерии регистрировали в 3-4 раза реже, чем в настоящий период. Их с одинаковым постоянством изолировали во всех районах исследований. В море эти бактерии в 1,5-2 раза чаще регистрировались в центральной и восточной частях Северного Каспия.

Флавобактерии обсеменяли жабры ($21,8 \pm 0,6\%$), печень ($15,0 \pm 0,2\%$), гонады (осетровых) ($15,0 \pm 0,2\%$) и кишечник ($31,8 \pm 1,2\%$) проанализированных рыб. В связи с тем, что флавобактерии никогда не регистрировали как патогены рыб, они, играют роль транзитной микрофлоры, и их присутствие в воде и рыбе обусловлено сезонной вегетацией и миграционными путями гидробионтов.

Алкалигенесы в исследованных объектах были представлены 2-мя видами: *Alcaligenes sp.*, *Al faecalis*. Их удельный вес был незначителен. В то же время они были отмечены во всех проанализированных органах и тканях гидробионтов, в том числе единичными штаммами в крови у бычковых рыб, что свидетельствует о наличии бактериемии в их организме. Алкалигенесы регистрировались как в дельте р. Волги с резким подъемом развития у осетров, так и на акватории западной и центральной частей Северного Каспия (табл. 4)

Грампозитивная флора в анализируемом материале представлена бациллами, кокками, дрожжами, основными биотопами которых были дыхательный аппарат и желудочно-кишечный тракт анализированных рыб. Всего выделено 1202 штамма, относящиеся к следующим родам: *Bacillus*, *Candida*, *Micrococcus*. При поднятии уровня Каспийского моря происходило подтопление береговой зоны, и за счет этого происходила трансформация почвенной флоры в водную экосистему. Поэтому в исследованных морских гидробионтах и среде их обитания встречаемость грампозитивных бактерий была почти в 10,0 раз ниже, чем у осетров в речной период их жизни. Это обусловлено разной самоочищающей способностью морской и речной воды, ее химическим составом, температурным режимом, а также неодинаковым образом жизни бычков и осетров.

В морских биотопах субдоминантами были бациллы, а в речной экосистеме среди грампозитивной флоры доминировали дрожжи (табл. 5). По районам исследований высеваемость грампозитивных микроорганизмов была мозаичной. В реке и мелководной зоне восточной части Северного Каспия из воды и рыбы микрококки выделялись в 1,8 раза больше по сравнению с другой грампозитивной флорой. На приглубых станциях западной части Северного Каспия, наоборот, бациллы и дрожжи в 1,5 раза больше контаминировали обследованные объекты. Это определено разными биохимическими свойствами грампозитивных бактериальных сообществ, а также их генетической гетерогенностью, обеспечивающей их приспособленность к меняющимся условиям среды обитания.

Таблица 5-Удельный вес грампозитивной флоры, выделенной из воды и рыбы (в структуре группы)

Грампозитивная флора	Процент выделенных штаммов, %				
	бычки	осетры (море)	вода морская	осетры (река)	вода речная
p <i>Bacillus</i>	67,8±0,8	61,5±0,9	70,0±0,9	17,1±0,4	3,0±0,1
p <i>Micrococcus</i>	17,1±0,1	15,4±0,3	10,0±0,2	27,4±0,5	23,5±0,3
p <i>Candida</i>	15,1±0,3	23,1±0,4	20,0±0,3	55,5±0,7	73,5±0,8

Таким образом, фактические материалы, иллюстрирующие динамику гетерогенности микробного пейзажа изучаемых биотопов, демонстрируют довольно сложные и многообразные взаимоотношения между различными группами микроорганизмов, определяющиеся их адаптационными возможностями в системе «паразит-хозяин». Известно, что бычки ведут более локальный образ жизни, в то время, как осетровые совершают длительные миграции в поисках пищи, а в нерестовый период заходят в реки и даже могут оставаться там зимовать (Распопов, 2001). За счет этого в микробном пейзаже русского осетра происходит смена одного комплекса микрофлоры другим, особенно в тех биотопах, которые наиболее тесно связаны со средой обитания – это жабры и желудочно-кишечный тракт гидробионтов. Выживание микрофлоры, обсеменяющей внутренние органы и ткани рыб, обусловлено ее пер-

систентными свойствами, а также физиологическим статусом проанализированных особей

Следовательно, вся условно-патогенная микрофлора, выделенная нами из исследованных объектов, может быть использована в качестве индикатора для объективной оценки экологического и санитарно-эпидемиологического состояния гидроэкосистемы Северного Каспия и дельты Волги в настоящий период и во время промышленной добычи нефтеуглеводородного сырья.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ВОДЫ И РЫБЫ ДЕЛЬТЫ ВОЛГИ И СЕВЕРНОГО КАСПИЯ

4.1 Влияние температурного фактора на развитие микроорганизмов в разные периоды года

Известно, что температурный фактор активизирует или подавляет рост микрофлоры, обуславливая ее сезонную динамику, с периодическим доминированием сменяющих друг друга популяций бактерий. Сезонная сукцессия типична для большинства водоемов и является одним из важных показателей устойчивости микробного сообщества, а также степени его приспособленности к условиям обитания (Черкасский, 1994; Литвин, 1999). В связи с вышеизложенным нами весной и осенью детально были проанализированы доминирующие группы условно патогенных бактерий семейств *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* и *Pseudomonadaceae*.

Энтеробактерии были зарегистрированы весной и осенью в морской экосистеме, в основном, в прибрежной зоне, как результат влияния речного стока, который является основным носителем хозяйственных и фекальных вод. Встречаемость бактерий этой группы в морских биотопах была в прямой корреляционной зависимости ($R^2=0,9984$) от термического режима на обследованной акватории на все этапах проведенных исследований. За период наших исследований группа энтеробактерий, выделенная из осетровых, превалировала над водными штаммами этого семейства в 1,5-2 раза, что связано с их фенотипическими особенностями. В весенний период бактерии кишечной группы обсеменяли рыбу и воду на уровне 9,8 и 5,6% штаммов от всей выделенной микрофлоры (соответственно), а в осенний – в 16,7 и 10,0% случаев. При этом цитробактеры составляли весной 4,8; осенью – 9,5%; протеи весной – 3,7; осенью - 6,8% проб от всей выделенной микрофлоры. В реке весной отмечена повышенная контаминация энтеробактериями рыбы по сравнению с водой, в среднем в 1,8 раза, что определено ослабленным физиологическим статусом осетров после зимнего периода. Рост численности энтеробактерий в объектах речной биоты от весны к осени в 1,8 раза обусловлен температурным режимом воды и региональными особенностями дельты Волги. Симптоматично, что пик инфекций у людей, вызванных этими микроорганизмами, приходился на конец лета и раннюю осень. Индикаторные бактерии – *E. coli* и *Salmonella sp.* в настоящее время выделяются намного реже из окружающей среды, чем цитробактеры и протеи, что свидетельствует о продолжающемся антропогенном воздействии на обследованный водоем.

Аэромонады, вибрионы, плезимонады по мере подъема развития энтеробактерий снижали свою численность от весны к осени в экосистеме дельты Волги в рыбе

- в 1,5; в воде – в 1,6 раза. Полученные данные свидетельствуют о саморегуляции и конкуренции этих микроорганизмов с энтеробактериями, которым они уступают в своем развитии. В реке среди этого семейства доминировали аэромонады, составляя весной 5,7; осенью – 4,8% проб от всей выделенной микрофлоры. В то же время, на акватории Северного Каспия сезонные изменения солености воды характеризуются опреснением водоема от апреля к июню с последующим постепенным ее увеличением к сентябрю. Особенности формирования режима солености в Северном Каспии, наряду с термическими условиями, обусловили интенсивное развитие бактерий семейства *Vibrionaceae* в объектах морской биоты и увеличение их удельного веса от весны к осени почти в 2 раза, что было обусловлено эвтрофикой водоема, температурным режимом и их приуроченностью к солоноватым водам морской экосистемы. В комплексе все это определяет плавное увеличение численности галофильных бактерий семейства *Vibrionaceae* от весны к ранней осени в 1,5-2 раза (в воде и рыбе) и некоторый их спад при понижении температуры поздней осенью, что свидетельствует о постоянной саморегуляции исследованных микробиоценозов, находящихся в корреляционной зависимости друг от друга ($R^2=0,9873$).

Псевдомонады. В речной и морской экосистемах для этих микроорганизмов был характерен только весенний максимум развития. Отмечено преобладание и более разнообразный состав «морских псевдомонад» над «речными» (в 2,5 раза), что еще раз подтверждает приуроченность этих бактерий к морской биоте. Осенью был зарегистрирован спад развития псевдомонад как в реке, так и в море (почти в 2 раза), который был обусловлен повышением температуры, и, следовательно, развитием мезофильных ферментативно-активных энтеробактерий и грампозитивной флоры, у которых при этом также наблюдался осенний максимум развития, особенно в реке, т.е. происходила сезонная элиминация или замена одной популяции бактерий на другую. Увеличение удельного веса вышеперечисленных бактерий в обследованных морских биотопах в начале осени связано с дополнительным биологическим загрязнением от каспийского мнemiопсиса, для которого в этот же период было характерно массовое развитие.

Сравнение полученных данных по морским биотопам с результатами по речным биотопам показало, что все объекты были обсеменены в основном микроорганизмами, типичными для того или иного сезона года. В гидробиологическом аспекте сезонная гетерогенность и цикличность бактериальных сообществ необходима им для саморегуляции своей численности. Наличие синегнойной палочки, вибриофлоры и энтеробактерий в микробном пейзаже гидрозкосистемы определяет ухудшение санитарных показателей, т.е. санитарно-микробиологическое состояние Северного Каспия и дельты Волги следует признать напряженным, что имеет практическую значимость для санитарной гидробиологии.

4.2 Влияние солености воды на развитие выделенных микроорганизмов и их галотолерантность

Соленость северокаспийских вод, наряду с температурой воды, является важнейшей физико-химической характеристикой, определяющей формирование различных комплексов микробных сообществ, которая связана с интенсивностью процессов самоочищения, в том числе разложением нефти. Сезонные изменения солености Северного Каспия характеризовались опреснением водоема от апреля к июню

(максимум опреснения) и последующим ее увеличением от июня к сентябрю (Катунин и др., 2003). В связи с этим, результаты наших исследований показали, что большая часть выделенной микрофлоры обладала галотолерантностью в той или иной степени. Максимальные значения были зарегистрированы в 3,0% и 7,0% растворе с хлоридом натрия у штаммов, выделенных от бычков, морских осетров и морской воды (80,0%, 78,6% и 95,0% проб, соответственно). Морские микроорганизмы были галотолерантнее, чем выделенные в речной экосистеме, в среднем в 1,3 раза. Причем жизнеспособность рыбных штаммов была несколько выше, чем у водных: в реке - в 1,7 раза; в море - в 1,2 раза, что было статистически достоверно ($P < 0,05$). Галотолерантность бактерий речной биоты обусловлена частичной миграцией морских популяций в речную экосистему с проходными рыбами, в частности, осетровыми, что было предположено ранее. Обращает на себя внимание значительная устойчивость к солевым растворам грамположительной флоры (бацилл, микрококков). Так, в 3,0% растворе соли жизнеспособными оставалось 78,2% штаммов. С увеличением концентрации соли до 10,0% выживаемость этих микроорганизмов снижалась в среднем в 1,5 раза. Следовательно, у этой группы микроорганизмов, нежелательной в гигиеническом плане, достаточно много шансов оставаться жизнеспособными вплоть до готовой продукции, особенно икорной, где используются низкие концентрации соли. Галофильные вибрионы, фотобактерии, некоторые виды аэромонад и псевдомонад увеличивали свою численность от весны к осени в морской экосистеме. В реке выявлена такая же закономерность. При этом рыбные штаммы этих микроорганизмов были галотолерантнее в 2,5 раза, чем гидромикрофлора. Морская микрофлора способна адаптироваться в рыбе, совершающей нерестовые миграции, а также попадать в речную экосистему с нагонными морянными ветрами, частично перемешивающих морскую и речную воду. Таким образом, галотолерантность выделенной микрофлоры может быть индикатором популяционной структуры исследованных бактериальных сообществ.

4.3 Влияние различных концентраций нефти на биологические свойства условно-патогенных бактерий

Одним из негативных факторов воздействия на водную среду и биологические ресурсы является широкомасштабное освоение нефтяных месторождений в морях, имеющих важное рыбохозяйственное значение, каковым является Северный Каспий. Нефтяные углеводороды в силу своей биологической активности относятся к наиболее опасным загрязняющим веществам, длительное воздействие которых может нарушать сложившееся равновесие экосистем. Усиливающееся антропогенное воздействие на дельту р. Волги и Северный Каспий, которое проявляется в загрязнении нефтепродуктами, хлорорганическими пестицидами, фенолами и тяжелыми металлами, нередко приводит к исчезновению видов из флоры и фауны водоемов, появлению чужеродных растений и животных, а также микроорганизмов с новыми адаптационными возможностями (Салманов, 1999, Катунин и др., 2005). В связи с этим нами была проведена экспериментальная работа по изучению влияния различных концентраций каспийской сырой нефти (0,05; 0,25, 0,50 и 10,0 мг/л) на факторы патогенности микрофлоры, выделенной от каспийских гидробионтов. В результате было установлено, что все используемые концентрации не оказывали ингибирующего действия на рост испытуемых штаммов: *C freundii*, *A. hydrophila*,

Ps aeruginosa. Однако при этом были выявлены существенные различия между контролем и испытуемыми штаммами в факторах патогенности, ростовой реакции бактерий и усиленного образования пигмента (табл. 6).

Таблица 6 – Изменение патогенных свойств бактерий под влиянием различных концентраций нефти

Используемые концентрации нефти, мг/л	<i>C freundii</i>			<i>Ps aeruginosa</i>			<i>A hydrophila</i>			
	Зоны деполимеризации на средах, мм									
	протеаза	лецитиназа	гемолизин	протеаза	лецитиназа	гемолизин	протеаза	лецитиназа	гемолизин	ДНКаза
контроль	0,5	1,5	-	2,0	1,5	2,0	1,0	2,0	3,0	1,0
0,05	3,0	-	1,0	6,5	1,0	2,5	8,0	3,0	5,0	3,0
0,25	7,0	-	3,5	29,0	1,5	5,0	8,8	3,3	5,0	2,5
0,5	3,3	-	4,0	14,5	15,0	15,0	4,0	8,3	7,5	-
10,0	-	-	5,5	7,3	18,0	15,0	4,0	15,0	7,5	-

C freundii – у анализируемого штамма частично повысились некоторые факторы патогенности, и значительно увеличилась подвижность (по типу роения протеев).

A hydrophila – при экспериментальном превышении ПДК в 2 раза маркеры патогенности этого штамма увеличивались, в 5 и 10 раз – повышалась лецитиназа и гемолизин, это свидетельствует о высоком патогенном потенциале данного микроорганизма для гидробионтов и человека.

Ps aeruginosa – все испытуемые концентрации нефти у этого штамма в максимальных значениях активизировали лецитиназную активность и усиливали его пигментацию.

Таким образом, при превышении ПДК (0,05 мг/л) экстрагируемых нефтяных углеводов (Перечень рыбохозяйственных нормативов..., 1999) в 5, 10 и 20 раз в естественном водоеме может образоваться популяция микроорганизмов с политропностью, стадиями переадаптации и мощным патогенным потенциалом, который они могут негативно проявить не только на различные гидробионты, но и на теплокровных животных, что уже имело место в случае заболевания тюленя в 2000г. на Каспии.

4.4 Факторы патогенности выделенной микрофлоры (протеаза, лецитиназа, гемолизин и ДНКаза аэромонад)

Общим принципом организации и жизнедеятельности любых живых организмов, в том числе бактерий, является их способность адаптироваться к изменяющимся абиотическим и биотическим факторам, что обеспечивает устойчивость биосистемы (Козинец и др., 2001; Извекова, 2004; Бузолева и др., 2006). По И. В. Домарадскому (1997) – комплекс абиотических и биотических факторов обуславливает неизбежность изменчивости ряда важнейших свойств микроорганизмов – вирулентности, ферментативной активности и т.д. Следовательно, изучение у бактерий их патогенных свойств, играющих роль адаптивных факторов, – неотъемлемая часть микробиологического анализа в санитарной гидробиологии.

Результаты наших исследований показали, что микрофлора бычков обладала комплексом факторов патогенности (гемолитическая, лецитиназная и протеолитиче-

ская активность), создающих предпосылки для формирования резидентного бактерионосительства. Симптоматично, что в печени и крови рыб, регистрировали преимущественно бактерии, активно продуцировавшие протеазу, лецитиназу и гемолизин. В здоровом организме, защитные механизмы которого препятствуют диссимиляции бактерий, способны закрепиться и выжить в основном микроорганизмы с выраженными патогенными свойствами.

Вся изолированная гидромикрофлора (в реке и море) обладала более высокими значениями протеолитической и лецитиназной активности (в 1,5 и 1,3 раза, соответственно), чем выделенная от рыб. С помощью ферментов протеиназ и лецитиназ бактерии преодолевают тканевые барьеры, расщепляют белковые молекулы и при интенсивном размножении в рыбе определяют ее автолиз, порчу и различные патологические процессы.

Гемолитическая активность – способность микроорганизмов разрушать эритроциты теплокровных животных и человека, является свидетельством эпидемиологической опасности выделенных бактерий. Микроорганизмы, выделенные из воды и рыбы, обладали гемолизинем на одном уровне, соответственно в 22,3±0,5 и 21,5±0,3% случаев, в отличие от протеазы и лецитиназы, чаще выявленных у водных штаммов. Следовательно, независимо от биотопа, микрофлора, циркулирующая в экосистеме Северного Каспия и дельты Волги, имеет определенную эпидемиологическую значимость.

ДНКазная активность аэромонад близко коррелирует со способностью вызывать патологические процессы у гидробионтов и человека. Анализ полученных данных показал, что ДНК-аза была характерна для 77,0% выделенных аэромонад, независимо от их экотипической принадлежности. Благодаря ДНК-азе аэромонады способны быстро и эффективно адаптироваться в организме рыб.

Результаты сезонной динамики маркеров патогенности свидетельствовали об их нарастании у рыбных (в море и реке) штаммов от весны к осени (в среднем в 1,3 раза). При этом гидромикрофлора (в море и реке) посезонно практически не изменяла своих показателей патогенности, что обеспечивает устойчивость систем. Нами было установлено, что протеаза микрофлоры, выделенной от рыб, возрастала от весны к осени в 1,5; лецитиназа, гемолизин и ДНК-аза – в 1,3 раза. Здесь наглядно прослеживается связь увеличения этих маркеров с улучшением физиологического статуса рыб, обусловленного их летним и осенним нагулом. В соответствии с этим микроорганизмам следует «строить такой баланс вирулентности», какой необходим для выживания в здоровом организме рыб. В тоже время высокая патогенность бактерий в осенний период обуславливает их эпидемиологическую значимость.

Основными патогенными свойствами у энтеробактерий была лецитиназа, за исключением группы протей, которые лидировали по протеазе. Псевдомонады в большей степени обладали протеазой. Аэромонады больше проявляли ДНКазную, гемолитическую и лецитиназную активности. Вибрионы обладали только гемолизинем и лецитиназой.

Таким образом, маркеры патогенности и/или персистенции условно-патогенной микрофлоры, обсеменявшей внутренние органы и ткани бычков и осетров, позволяли ей стабилизировать свое состояние в избранной экологической нише и влиять на формирование бактериальных сообществ. Учет набора факторов патогенности или персистенции позволяет отнести конкретный штамм микроорганизма

к способности образовывать паразитарные системы и тестировать экологическое и эпидемиологическое благополучие водоемов.

4.5 Антибиотикорезистентность выделенной микрофлоры

Результаты наших исследований показали, что микрофлора, обсеменяющая бычков, осетровых и среду их обитания, обладала множественной антибиотикорезистентностью. При этом на всех обследованных участках регистрировали близкие показатели, т.е. в лекарственной устойчивости существенных различий между речной и морской бактериофлорой не выявлено, что обусловлено мощным влиянием речного стока на гидрозокосистему Северного Каспия. Выделенные нами микроорганизмы проявляли наибольшую устойчивость к бензилпенициллину (86,0% устойчивых штаммов) и ампициллину (69,0%), наименьшую – к левомицетину (15,0%), стрептомицину (18,0%). К фурадонину было устойчиво 50,0%, к тетрациклину 20,0% изолированных бактерий.

Таким образом, сезонная направленность факторов патогенности выделенных бактерий и отсутствие существенных различий по их антибиотикорезистентности на протяжении всего периода исследований свидетельствовало об относительной устойчивости экосистемных процессов и соответственно сообществ данных микроорганизмов в гидробионтах и среде их обитания. Однако в случае ухудшения экологической ситуации микроорганизмы, обладающие маркерами патогенности и множественной антибиотикорезистентностью, могут проявить себя как патогены в отношении бычковых и осетровых рыб и вызвать у них вспышки заболеваний инфекционной природы, что немаловажно при использовании последних в аквакультуре в качестве производителей. В искусственных условиях содержания и выращивания при заболеваниях бактериальной природы от производителей осетровых очень часто высеваются возбудители, обладающие множественной лекарственной устойчивостью, что влечет за собой такие трудности, как правильная постановка диагноза и правильное назначение лечения инфекций у этих видов рыб. Вода и рыба в данном случае являются природным резервуаром и переносчиком антибиотикоустойчивой микрофлоры.

4.6 Результаты биопроб на представителях каспийской ихтиофауны и белых мышцах

Рыбы

Опыт с *Pr. mirabilis* и *C. freundii*

Особь, инфицированная протеей, погибла через 6-18 час., цитробактерами – через 20-30 час. после заражения. Патологоанатомическое вскрытие показало существенные патологические изменения во всех внутренних органах, лизис мышц и папулу на месте инъекции. Из органов и тканей, экспериментально зараженных особей были реизолированы исходные штаммы бактерий. Группа контрольных рыб до конца наблюдения оставалась в норме.

Опыт с *A. hydrophila* и *V. fischeri*

Все рыбы, зараженные аэромонадами и вибрионами, через 5 час. после инъекции стали вести себя неадекватно: у них наблюдали нарушение координации движений, обильное отделение слизи, судороги. На месте укола образовались гематома

и папула. Через 20-24 час. особи, инфицированные этими микроорганизмами, погибли. При вскрытии рыбы визуально обнаружены патологические изменения ее внутренних органов: печень рыхлая землистого цвета; почки кровенаполнены, увеличены; кишечник гиперемирован, наполнен газовыми пузырьками; на месте укола лизис мышечной ткани. Из пораженных органов погибающей рыбы реизолированы исходные штаммы. Группа контрольных рыб до конца наблюдения оставалась в норме.

Опыт с *Ps aeruginosa*

Рыба, инфицированная синегнойной палочкой, в течение 2-х сут. оставалась жива. У всех опытных рыб на месте инъекции отмечена гиперемия, небольшая папула, ерошение чешуи и лизис мышечной ткани, кровоизлияния на коже, плавниках. На 3-е сут. 90,0% особей, зараженных исследуемыми штаммами, погибли. Патологоанатомическое вскрытие этих рыб показало незначительное количество серозного экссудата в полости тела; печень рыхлая желто-зеленого цвета; почки увеличены, с многочисленными петехиями. Из пораженной мышечной ткани, экссудата и паренхиматозных органов повторно были выделены исходные штаммы синегнойной палочки.

У контрольных рыб на месте укола отмечена небольшая местная реакция. Их поведение было спокойным, координация движений не нарушена, мышечная ткань и внутренние органы в норме.

Теплокровные животные (нелинейные белые мыши)

Анализ материала по установлению вирулентности выделенной микрофлоры для белых мышей показал следующее: через 6 час. после заражения у мышей опытных групп наблюдали повышенную возбудимость, нарушение координации движения, взъерошенность шерсти, вздутие брюшка. На 2-е сутки эксперимента особи, инфицированные штаммами *A hydrophila* и *Ps aeruginosa*, погибли. При вскрытии павших животных зарегистрировали следующие патологические изменения внутренних органов: лимфатические узлы увеличены, печень рыхлой консистенции неравномерной окраски, селезенка дряблая, увеличена, сердце кровенаполнено, кишечник вздут, стенки его гиперемированы. При посеве печени и кишечника мышей повторно выделили исследуемые штаммы синегнойной палочки и аэромонады. У контрольной группы мышей и особей, зараженных изолятом *V. fischeri*, в течение 8-ми сут. наблюдения при визуальном осмотре клинические признаки заболевания отсутствовали.

Следовательно, проведенная биопроба, в соответствии с ветеринарным законодательством, считается положительной, так как больше 80,0% рыб и 66,6% подопытных белых мышей погибло при наличии у них клинических признаков заболевания и патологических изменений внутренних органов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о патогенности для гидробионтов и теплокровных животных некоторых микроорганизмов, населяющих гидроэкосистему Волго-Каспия. Это подтверждает тот факт, что мониторинг условно-патогенной микрофлоры является одним из самых объективных критериев оценки санитарного состояния Волго-Каспийского бассейна в условиях поиска и добычи газонефтеуглеводородного сырья.

ВЫВОДЫ

1. Бактериальные сообщества воды и рыбы Волго-Каспия представлены 83 видами из 25 родов. Доминантами являлись условно-патогенные бактерии из сем. *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* и *Pseudomonadaceae*, которые персистировали по трофическим звеньям: вода-бычки-осетровые-вода. Бактерии рр. *Lucibacterium* и *Photobacterium* были зарегистрированы только в экосистеме Северного Каспия. Из воды Северного Каспия были изолированы единичные штаммы *Ps aeruginosa*, что свидетельствует о неблагоприятной санитарной обстановке в период исследований на Северном Каспии, имеющим наиболее рыбопродуктивный потенциал.

2. В дельте Волги и прибрежной зоне Северного Каспия преобладали энтеробактерии (25,5±4,3% штаммов); в восточной и глубоководной акватории моря они отсутствовали. Псевдомонады были доминантным комплексом в морской биоте (30,1±7,4%). Аэромонады чаще регистрировали в реке (9,1±1,6%), чем в море (6,2±0,8%); вибрионы, наоборот, чаще в море (12,0±3,9%). Наличие псевдомонад и аэромонад в районе дагестанского побережья Каспия обусловлено их частой встречаемостью в микробном фоне мнемниопсиса - одного из резервентов этой микрофлоры.

3. Структура бактериальных сообществ воды и рыбы дельты Волги и шельфа Северного Каспия определена совокупным эффектом комбинированного воздействия абиотических и биотических факторов. Она обусловлена различными стадиями переадаптации выделенных бактерий, а также образом жизни рыб, типом их питания, миграционными путями и состоянием естественной резистентности их организма под давлением антропогенного пресса, о чем свидетельствует микробное инфицирование внутренних органов рыб, в частности, печени и крови.

4. Большая часть выделенной микрофлоры обладала галотолерантностью. Морские бактерии были галотолерантнее речных (80,6% против 61,2% штаммов). Солеустойчивость бактерий речной биоты обусловлена их частичной миграцией из моря с проходными рыбами, в частности, осетровыми. Высокая галотолерантность изолированных микроорганизмов обеспечивает им выживаемость вплоть до готовой рыбной продукции.

5. Экспериментально установлено, что доминирующие в микробном пейзаже аэромонады, цитробактеры и псевдомонады способны сохранять, увеличивать, а также приобретать новые морфологические, физиологические и патогенные свойства при превышении ПДК (0,05 мг/л) нефтяных углеводородов. Однако при превышении ПДК в 5, 10 и 20 раз отмечена потеря некоторых маркеров: протеазы у цитробактеров и псевдомонад, ДНК-азы – у аэромонад, что требует дальнейшего и более детального изучения этого явления на генетическом уровне.

6. Более высокие значения маркеров патогенности были у гидромикрофлоры - 53,4% против 43,2% рыбных штаммов. Возрастание патогенных свойств бактерий происходило от весны к осени. Все это позволило выделенной микрофлоре стабилизировать свое состояние в избранной экологической нише и влиять на формирование устойчивого бактериоценоза.

7. Микрофлора бычков, осетров и среды их обитания обладала множественной антибиотикорезистентностью. Наибольшую устойчивость изолированные бактерии проявили к бензилпенициллину (85,5% штаммов), наименьшую – к левомицетину

(15,0% штаммов). Вода и рыба в данном случае являются природным резервуаром и переносчиком антибиотикоустойчивых микроорганизмов.

8. В результате проведенных биопроб показана патогенность *A. hydrophila*, *Pr. mirabilis*, *C. freundii*, *Ps. aeruginosa* и *V. fischeri* для морской икhtiофауны, а также *A. hydrophila* и *Ps. aeruginosa* – для мышей, что свидетельствует о целесообразности использования этих бактерий в качестве индикаторных организмов для оценки санитарного состояния Волго-Каспийского региона в современный период до начала промышленного добывания нефтеуглеводородного сырья в Северном Каспии.

Практические предложения:

- Результаты данной работы могут являться составной частью экологического мониторинга водной среды при проведении нефтеразведочных и нефтедобывающих работ в Северном Каспии.
- Экспериментальные данные по изменению патогенности бактерий под воздействием нефтяного загрязнения могут быть использованы при моделировании предотвращения аварийных ситуаций во время промышленной добычи нефтеуглеводородного сырья в Северном Каспии.
- Результаты работы могут быть использованы в аквакультуре для санитарно-микробиологической оценки осетровых-производителей, в частности для коррекции их микробного фона при использовании лекарственных препаратов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Ларцева Л. В., Вьюшкова Л. А., Проскурина В. В., Нестерова Л. А., Болдырева Я. М., Лисицкая И. А., Митрофанова Е. С. Санитарно-эпизоотологическая обстановка Волго-Каспийского региона // Рыбохоз исследования на Каспии. Результаты НИР КаспНИРХ за 2000 год – Астрахань, 2001. – С. 411
2. Ларцева Л. В., Лисицкая И. А., Болдырева Я. М. Эколого-микробиологический скрининг бычковых рыб Северного Каспия // Современные проблемы океанологии шельфовых морей России. Материалы междунар конференции. – Мурманск, 2002 – с. 138-140
3. Ларцева Л. В., Лисицкая И. А., Болдырева Я. М. Микробиологические исследования осетровых рыб Нижней Волги // Проблемы аквакультуры и функционирования водных экосистем. Материалы междунар. конф. молодых ученых – Киев, 2002. – с. 38-39
4. Ларцева Л. В., Проскурина В. В., Вьюшкова Л. В., Нестерова Л. А., Болдырева Я. М., Лисицкая И. А. Санитарно-эпизоотическая ситуация Волго-Каспийского региона на рубеже XXI века // Рыбн. хоз-во. Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре. Обзорная информация / ВНИЭРХ, в 1. – Москва, 2002. – 50 с.
5. Ларцева Л. В., Болдырева Я. М., Лисицкая И. А. Рыбы и гидробионты – переносчики возбудителей инфекционных болезней человека // Материалы Международной научно-практической конференции – М. Изд-во ВНИРО, 2002 – С. 226-231
6. Ларцева Л. В., Лисицкая И. А. Проблемы микробной обсемененности молоди осетровых и среды их обитания при искусственном разведении в дельте Волги // Проблемы воспроизводства, кормления и борьбы с болезнями рыб при выращивании в искусственных условиях. Материалы науч. конф. – Петрозаводск, 2002 - С. 145-147
7. Lubov V. Lartseva. Integrated Research Into Species Of The *Ctenophora* Family *Beroe ovata* and *Mnemiopsis leidyi* // Lubov V. Lartseva, Irina A. Lisitskaya, Igor S. Shchelkunov, and Svetlana Yu. Kasaeva // Proceedings of the Second Bilateral Conference between Russia and United States - Shepherdstown, West Virginia, 2003 – P. 359.

- 8 Проскурина В В, Югай Т В, Лисицкая И А, Вошеникина Н С, Воронина Е А, Солохина Т А, Володина В В Мониторинг инфекций и инвазий промысловых видов рыб. Оценка санитарного состояния водосма // Рыбохоз исследования на Каспии Результаты НИР КаспНИРХ за 2004г – Астрахань, 2005 – с 467-480.
- 9 Лисицкая И А Условно патогенные бактерии как показатель экологического и санитарного состояния гидрозкосистемы Северного Каспия // Человек и животные: Материалы III Международн научно-практ конференции – Изд дом «Астр ун-т» – Астрахань, 2005 – с. 44-46
10. Лисицкая И А Качественный состав микрофлоры бычковых рыб и воды Северного Каспия как один из критериев оценки санитарно-экологического состояния водосма // Современные проблемы адаптации и биоразнообразия. Труды международной научной конференции - Махачкала, 2006 – с 34-35
- 11 Ларцева Л В, Артемова А.В, Лисицкая И А, Евдокимова М И Микробные популяции гребневиков Черного и Каспийского морей // Научно-техн журн «Южно-Каспийский вестник геологии, географии и глобальной энергии». – Изд дом «Астр ун-т» – Астрахань, 2006 – №1(14) – с. 247-254.
- 12 Проскурина В.В., Лисицкая И А Паразиты и микрофлора промысловых рыб дельты Волги и их патогенное влияние на представителей ихтиофауны // Журнал «Рыбное хозяйство». – №3. – 2007 – с 69-71
13. Воронина Е. А, Лисицкая И А, Ларцева Л. В Ихтиопатологические исследования морских рыб Каспийского моря // Экология биосистем: проблемы изучения, индикации и прогнозирования Мат-лы Международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию Астраханского Государственного университета – Изд. Дом Астраханского гос Ун-та – 2007 – с. 268-272.
- 14 Лисицкая И А, Артемова А В. Бактериологические исследования бычков // Экологические мониторинговые исследования на лицензионном участке «Северный» ООО «Лукойл-Нижневолжскнефть» (1997-2006 гг) Глава 6 Экология, распределение и запасы рыб и нерыбных объектов, их качественное состояние и трофология – Астрахань: Изд-во КаспНИРХ, 2007. – с. 321-327.
- 15 Лисицкая И А. Биологическая опасность условно-патогенных бактерий, связанная с нефтяным загрязнением водосмов // Экологические проблемы природных и урбанизированных территорий. Мат-лы Второй научно-практической конференции студентов, аспирантов, преподавателей и научных сотрудников, посвященной 10-летию кафедры экологии и безопасности жизнедеятельности Астраханского Государственного Университета – Изд дом «Астраханский университет» – 2008. – С 129-130.

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК, выделены курсивом

Подписано в печать 16.09.08 г. Тираж 100 экз. Заказ 574
Типография ФГОУ ВПО «АГТУ», тел. 61-45-23
г. Астрахань, Тагищева 16ж.