

фактор солености в значительной мере оказывает влияние на структуру популяцию тарани в процессе ее адаптации к градиенту солености.

Мы проанализировали три вида гидробионтов, обитающих в Азовском море с целью выявить закономерности внутривидовой изменчивости индексов генетического сходства и расстояния М. Нея в зависимости от градиента солености в Азовском море. Из двух видов рыб пиленгас распространен практически по всему морю, а тарань – в его восточной и северо-восточной части. Мидия – прикрепленный моллюск, ее миграция осуществляется переносом свободно плавающей личинки. При различной биологии этих видов в нашем случае общим для них является то, что на их ареалах в Азовском море наблюдается градиент солености, и все они способны свободно обмениваться мигрантами на своих ареалах. Индексы генетического сходства и расстояния М. Нея основаны на различии в частотах аллелей белковых локусов, изменения которых как элементарное эволюционное событие отражает генетическую дифференциацию популяции. При отсутствии географических преград для обмена мигрантами в изучаемых видах наблюдается зависимая от солености генетическая дифференциация субпопуляций на уровне близком к локальным популяциям. Этот уровень по F. Ayala (1975) для беспозвоночных и рыб определяется величиной генетических расстояний М. Нея 0,016 и 0,020, соответственно. В нашем случае максимальные генетические расстояния составляют 0,010 для мидии, а для пиленгаса и тарани - 0,013 и 0,021.

При этом мы обнаруживаем существенную связь между градиентом солености и индексами генетического расстояния, а также морфометрическими характеристиками субпопуляций. Все это может свидетельствовать о том, что соленость является главным экологическим фактором водной среды, определяющим популяционно-генетические адаптации видов в Азовском море.

### **Санитарно-микробиологическое состояние рыбы в Азовском и Черном морях в 2007 г.**

*М.А. Сазыкина, М.А. Коленко, В.А. Чистяков, Г.А. Низова*

Бактерии, грибы и вирусы - один из важных факторов, влияющих на заболеваемость и смертность рыб. Большая часть инфекционных болезней рыб - это результат оппортунистической инвазии ихтиофауны патогенными микроорганизмами, которые обычно сосуществуют с ними.

Анализ многочисленных работ свидетельствует о том, что свежельовленная рыба может быть в значительной степени обсеменена различными микроорганизмами. Уровень контаминации и микробная характеристика рыбы зависят от ряда условий: температуры воды, глубины обитания рыбы, степени загрязнения воды и планктона. Наиболее высокий уровень обсеменения обычно отмечается на кожных покровах, наружной поверхности жаберных дуг и в содержимом кишечника рыб (Zuberi, Quadri, 1980).

К основным патогенным микроорганизмам, представляющим опасность для рыб, можно отнести бактерии следующих родов: *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Cytophaga*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Edwardsiella*, *Streptococcus* и др. Они являются причиной различных заболеваний, таких как почечная болезнь, вибриоз, туберкулез рыб, жаберная гниль, кишечный сепсис, стрептококкоз и т.д.

Использование современных методов диагностики заболеваний рыб бактериальной и вирусной этиологии может способствовать своевременному выявлению источника болезни и ее профилактике.

#### *Материалы и методы исследования*

Для микробиологического исследования из Азовского моря в апреле 2007 г. были отобраны следующие виды рыб: бычок-кругляк (*Neogobius melanostomus melanostomus*), судак (*Stizostedion lucioperca*), пиленгас (*Mugil soiuu*), сельдь черноморско-азовская (*Alosa kessleri pontica*). Из Черного моря в июне 2007 г. были отобраны такие виды рыбы, как барабулька (*Mullus barbatus ponticus*), пиленгас (*Mugil soiuu*), ставрида черноморская (*Trachurus mediterraneus ponticus*), хамса (*Engraulis encrasicolus*), калкан черноморский (*Scophthalmus maeoticus maeoticus*), а также моллюски – черноморская мидия (*Mytilus galloprovincialis*) и черноморская устрица (*Ostrea taurica*).

Отбор, подготовку проб рыбы, моллюсков и микробиологические исследования (выделение, накопление чистых культур микроорганизмов) проводили согласно ГОСТ Р 51446–99 и стандартным микробиологическим методикам (Биргер, 1973; Лабинская, 1978).

Идентификацию микроорганизмов проводили согласно ГОСТ 10444.11-89; ГОСТ 10444.12-88; ГОСТ 10444.15-94; ГОСТ 10444.2-94; ГОСТ 30518-97 (ГОСТ Р 50474-93); ГОСТ 30519-97 (ГОСТ Р 50480-93); Методическим указаниям..., 1991.

Обработка результатов проведена согласно ГОСТ Р 51446–99.

Для идентификации бактериальных культур помимо стандартных методов, используемых в микробиологии, использовалась ПЦР-

диагностика (Временное наставление..., 1998; Наставление..., 1999; Инструкция..., 2002; Методика...ПЦР, 2002).

#### *Результаты и обсуждение*

Из всех образцов рыбы, выловленной в Азовском море в апреле 2007 г., в частности, с кожи, выделены следующие микроорганизмы: *Klebsiella* sp., *Vibrio alginoliticus*, сульфитредуцирующие кластридии.

Клебсиеллезы с любой локализацией процесса, как правило, характеризуются тяжелым клиническим течением со склонностью к генерализации процесса и частыми летальными исходами, обусловленными эндотоксиновым шоком.

Возбудители анаэробной инфекции, в частности, сульфитредуцирующие кластридии, проникают в мышцы через раны на теле. В зоне первичного травматического некроза кластридии размножаются с выделением альфа-токсина и ферментов, которые расширяют зону некроза, убивая здоровые клетки соседней мышечной ткани (альфа-токсин) и разрушая соединительную ткань (коллагеназа).

За исключением крови, практически из каждого органа или ткани исследованных нами рыб, в том числе даже из мышц судака, выделен штамм *Vibrio alginoliticus*. Бактерии, принадлежащие роду *Vibrio*, вызывают одну из самых распространенных болезней рыбы - вибриоз.

Парагемолитические вибрионы относятся к условно-патогенным микроорганизмам. Их патогенные свойства обусловлены способностью вырабатывать термостабильный экзотоксин – гемолизин, а также энтеротоксин и термолабильный гемолизин (The Procaryotes, 1992). Парагемолитические и альгинолитические вибрионы обладают свойством продуцировать ряд токсинов, в том числе энтеротоксины.

Выделенный нами штамм обладает способностью продуцировать ферменты вирулентности, такие как лецитиназа и каталаза, а также обладает гемолитической активностью.

Вероятно, что в данный период исследования сложилась эколого-биологическая обстановка, благоприятная для размножения популяции *V.alginoliticus*. Аналогичная ситуация была отмечена в 2004 г. в заливе Петра Великого в Японском море (Беленева и др., 2004), когда из морских беспозвоночных животных было выделено 100 штаммов галофильных вибрионов, относящихся к *V.parahaemoliticus* и *V.alginoliticus*, характеризующихся высокой энтеротоксичностью. Массовое выделение энтеротоксикогенных штаммов обычно регистрируется во время вспышек пищевых токсикоинфекций у человека либо эпидемий среди гидробионтов.

И хотя были исследованы преимущественно внешне здоровые рыбы, преобладание данной популяции вибрионов обращает на себя внимание. Вполне вероятно, что такая ситуация отражает неблагоприятную экологическую обстановку в Азовском море, которая способствовала размножению микроорганизмов с выраженными патогенными свойствами. Носительство вибрионов рыбами без выраженных симптомов заболевания вполне может быть следствием развившейся толерантности гидробионтов к населяющей их микрофлоре. Под воздействием стресса, при изменении внешних факторов, организм гидробионтов может стать более восприимчивым к инфекциям бактериальной природы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что выделенный штамм галофильных вибрионов представляет опасность как для самих гидробионтов, так и для человека, и подтверждают факт неблагоприятного санитарного состояния на данном участке моря.

Из язвы с жаберных крышек судака выделен штамм *Staphilococcus saprophyticus* и сульфитредуцирующие клостридии.

Кроме того, с кожи бычка-кругляка и судака, а также из кишечника пиленгаса выделен штамм *Pseudomonas aeruginosa*. Этот вид псевдомонад может вызвать заболевание самостоятельно, а также в ассоциации с другими микроорганизмами. Вирулентные штаммы бактерий рода *Pseudomonas* являются возбудителями псевдомоноза. Псевдомоноз - инфекционная болезнь тепловодных и холодноводных рыб, характеризующаяся развитием общего септического процесса с проявлением общей водянки, ерошения чешуи, пучеглазия и очагового кровоизлияния на коже и плавниках.

Присутствие обнаруженных видов бактерий в рыбе свидетельствует о неблагоприятном санитарном состоянии на данном участке Азовского моря.

Полученные данные обсемененности микроорганизмами различных органов и тканей исследованной рыбы говорят о том, что если количество плесеней, выделенных с кожи исследованных рыб, не вызывает опасений, то количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов представлено довольно внушительными цифрами. Обсемененность кишечника, кожи и жабр у разных видов рыб находится примерно в диапазоне от  $10^3$  до  $10^8$  микробных клеток/г. А обсемененность мышечной ткани колеблется от  $3 \times 10^2$  у бычка до  $2,67 \times 10^7$  - у судака. Высокая обсемененность практически всех органов и тканей судака свидетельствует о вероятной заболеваемости данного вида рыбы.

Исследования на содержание санитарно-показательных микроорганизмов были проведены согласно нормам СанПиН 2.3.2.1078-01. Судак и пиленгас,

отобранные 16.04.07 г., а также судак, пиленгас и сельдь черноморско-азовская, отобранные 24.04.07 г., не соответствуют санитарно-микробиологическим нормам СанПиН 2.3.2.1078-01 по количеству мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов превышая норму в 73, 600, 160, 142 и 1,82 раза, соответственно (табл. 1). Бактерии группы кишечной палочки обнаружены в массе продукта, в которой не допускается их содержание. В судаке, отобранном 16.04.07 г., а также в судаке и пиленгасе, отобранных 24.04.07. *Staphylococcus aureus*, сальмонелла и *V.parahaemoliticus* в исследованных образцах рыбы не обнаружены.

Таблица 1

Содержание санитарно-показательных микроорганизмов в рыбе, отобранной в Азовском море в апреле 2007 г.

Вид рыбы	Микробиологические показатели				
	КМАФАММ, КОЕ/г, не более	Масса продукта, г			
		БКПП	<i>S. aureus</i>	Патогенные, в том числе сальмонеллы	<i>Vibrio</i> <i>parahaemoliticus</i>
Допустимый уровень	$5,0 \times 10^4$	0,01	0,01	25	не более 100 КОЕ/г
16.04.07					
1. Бычок-кругляк	$2,6 \times 10^4$	н/о	н/о	н/о	н/о
2. Судак	$368\ 000 \times 10^4$	обн.	н/о	н/о	н/о
3. Пиленгас	$800 \times 10^4$	н/о	н/о	н/о	н/о
24.04.07					
4. Бычок-кругляк	$3,7 \times 10^4$	н/о	н/о	н/о	н/о
5. Судак	$710 \times 10^4$	обн.	н/о	н/о	н/о
6. Пиленгас	$12 \times 10^4$	обн.	н/о	н/о	н/о
7. Сельдь	$9,1 \times 10^4$	н/о	н/о	н/о	н/о

Таким образом, судак и пиленгас, отобранные 16.04.07 г., а также судак, пиленгас и сельдь черноморско-азовская, отобранные 24.04.07 г., не соответствуют санитарно-микробиологическим нормам СанПиН 2.3.2.1078-01. Бычок-кругляк, отобранный как 16.04.07, так и 24.04.07, соответствует нормам СанПиН 2.3.2.1078-01 по всем микробиологическим показателям.

В результате проведения исследования рыбы и моллюсков, отобранных в Черном море в июне 2007 г., практически из всех образцов выделена *Klebsiella* sp. Как известно, из энтеробактерий особую опасность представляют микроорганизмы родов *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Proteus*. У больных рыб в результате инфицированности

этимими микроорганизмами наблюдаются поверхностный дерматонекроз, геморрагии, отек внутренних органов, тимпания и т.д.

С кожи хамсы и из устриц выделен штамм *Pseudomonas aeruginosa*. Вирулентные штаммы бактерий рода *Pseudomonas* часто являются возбудителями инфекционного заболевания - псевдомоноза.

В пиленгасе обнаружена *Yersinia enterocolitica*. Бактерии рода *Yersinia* вызывают болезнь «красный рот» у рыб. Присутствие *Yersinia enterocolitica* подтвердилось ПЦР-диагностикой (рис. 1). Визуализация ПЦР-продуктов показала присутствие в пробе № 7 из тканей пиленгаса ДНК *Yersinia enterocolitica*.

Из кишечника хамсы выделен штамм дрожжей. Наиболее распространенные грибковые инфекции (кандидозы) вызывает *Candida albicans*. Дрожжи рода *Candida* могут вызвать септические процессы, кандидозы.

Практически во всех исследованных видах рыб и моллюсков присутствуют бактерии, относящиеся к роду *Aeromonas*. Представители этого рода часто вызывают инфекционные болезни, характеризующиеся септициемией, образованием фурункулов в мышечной ткани с последующим разрывом их и переходом в красноватые язвы, а также значительными изменениями во внутренних органах, быстрым развитием патологических процессов и массовой гибелью рыб. Так, например, штамм *Aeromonas* sp., выделенный из язв с тела калкана, также может быть причиной их появления.

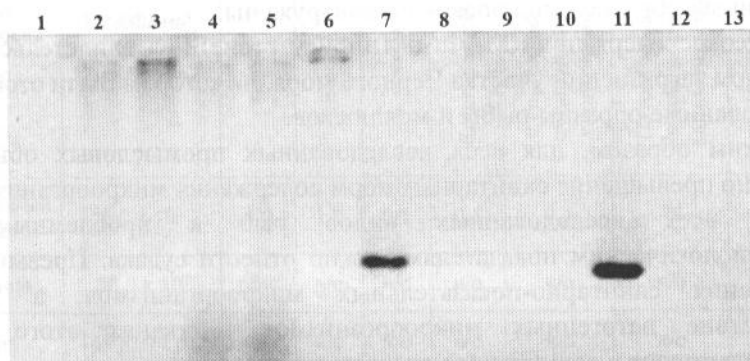


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов штаммов *Yersinia enterocolitica*

1 - отрицательный контроль ПЦР; 2-10, 12-13 - пробы; 11 - положительный контроль ПЦР.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о неблагоприятном санитарном состоянии на исследованном участке Черного моря.

Получены данные по обсемененности различных органов и тканей исследованной рыбы мезофильными аэробными и факультативно-анаэробными микроорганизмами и плесневыми грибами. Если плесневые грибы обнаружены только в образцах пиленгаса, то количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов во всех образцах рыб и моллюсков представлено значениями в диапазоне от  $10^3$  до  $10^7$  микробных клеток в грамме.

Также получены данные по содержанию в исследованной рыбе санитарно-показательных микроорганизмов (табл. 2). Согласно полученным результатам пиленгас и хамса не соответствуют санитарно-микробиологическим нормам СанПиН 2.3.2.1078-01 по количеству мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, которое превышает норму в 122 и 16 раз, соответственно. Исследование рыбы на содержание бактерий группы кишечной палочки выявило их присутствие в массе продукта, в которой не допускается их содержание, во всех видах исследованной рыбы. *Staphylococcus aureus*, сальмонелла и *V.parahaemolyticus* в отобранных образцах рыбы не обнаружены.

Таким образом, исследованные виды рыбы не соответствуют санитарно-микробиологическим нормам СанПиН 2.3.2.1078-01.

Все виды исследованных моллюсков также не соответствуют нормам СанПиН 2.3.2.1078-01 по аналогичным микробиологическим показателям (табл. 3). *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Enterococcus*, сульфитредуцирующие клостридии, сальмонелла и *V.parahaemolyticus* в отобранных образцах моллюсков не обнаружены.

Высокое содержание КМАФАнМ и присутствие БГКП свидетельствуют о сильном загрязнении участка Черного моря, на котором были отобраны исследованные образцы рыбы и моллюсков.

Таким образом, для всех исследованных промысловых объектов выявлено превышение санитарных норм содержания микроорганизмов.

Из всех исследованных видов рыб к проблемным по микробиологическим показателям можно отнести судака. Превышение содержания санитарно-показательных микроорганизмов, а также присутствие патогенных микроорганизмов в тканях этого вида свидетельствуют о возможном массовом заболевании.

Полученные данные указывают на необходимость учета микробиологических показателей при оценке запасов рыбы и моллюсков, для чего должна быть использована корректная научная методика, разработка которой является важнейшей рыбохозяйственной задачей.

Таблица 2

Содержание санитарно-показательных микроорганизмов в рыбе, отобранной в Черном море в июне 2007 г.

Вид рыбы	Микробиологические показатели				
	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта, г			
		БКГП	<i>S. aureus</i>	Патогенные, в том числе сальмонеллы	<i>Vibrio</i> <i>parahaemoliticus</i>
Допустимый уровень	$5,0 \times 10^4$	0,01	0,01	25	не более 100 КОЕ/г
1. Барабулька	$0,8 \times 10^4$	обн.	н/о	н/о	н/о
2. Пиленгас	$610 \times 10^4$	обн.	н/о	н/о	н/о
3. Ставрида	$5,0 \times 10^4$	обн.	н/о	н/о	н/о
4. Хамса	$80,0 \times 10^4$	обн.	н/о	н/о	н/о

Таблица 3

Содержание санитарно-показательных микроорганизмов в моллюсках, отобранных в Черном море в июне 2007 г.

Вид моллюска	Микробиологические показатели							
	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта, г						
		БКГП	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Enterococcus</i>	Сульфитредуцирующие клубридии	Патогенные, в том числе сальмонеллы	<i>Vibrio</i> <i>parahaemoliticus</i>
Допустимый уровень	$5,0 \times 10^3$	1,0	1,0	0,1	0,1	0,1	25	25
1. Устрица	$36,0 \times 10^3$	обн.	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
2. Мидия	$14900,0 \times 10^3$	обн.	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
3. Устрица (молодь)	$13500,0 \times 10^3$	обн.	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о