

С. М. Никитина, О. В. Казимирченко

**СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ
В МИКРОФЛОРЕ ГРУНТОВ, ВОДЫ И ОРГАНИЗМЕ
ЕВРОПЕЙСКОГО УГРЯ (*ANGUILLA ANGUILLA L.*)
ВИСЛИНСКОГО ЗАЛИВА**

*Исследован видовой состав и проведен корреляционный анализ сезонной динамики граммотрицательной микрофлоры европейского угря (*Anguilla anguilla L.*), воды и грунтов Калининградского залива. Установлены эпизоотически значимые для угря виды бактерий. Сезонная динамика индексов видового разнообразия бактерий в микрофлоре органов угря выявила пути проникновения бактерий в организм хозяина (весной), выноса их во внешнюю среду (осенью) и существование у рыбы «органов-депо» микрофлоры.*

*This article considers the species composition of the opportunistic pathogenic microbial flora and offers a correlation analysis of the seasonal dynamics of the gram-negative microflora in the European eel (*Anguilla anguilla L.*) and the water and soil of the Russian part of the Vistula Lagoon. The authors determine the epizootic bacteria species pathogenic for the eel. The seasonal dynamics of species diversity of bacteria in the eel's microflora helps to determine how bacteria penetrate the organism of the eel (in spring) and are forced into external environment (in autumn) and to prove the existence of microflora "depot-organs" in the organism of the fish.*

Ключевые слова: микробиоценоз, европейский угорь, граммотрицательные бактерии, Вислинский залив.

Key words: microbiocenose, European eel, gram-negative bacteria, Vistula lagoon.

Европейский угорь (*Anguilla anguilla L.*) – один из основных промысловых и экономически важных видов рыб в Вислинском заливе, в котором ему обеспечены хорошая кормовая база и илистые грунты, благоприятные для обитания [1; 2; 3].

Увеличение органической нагрузки на водоем, сопровождаемое ростом численности микрофлоры в воде и грунтах, способствует значительному обсеменению рыбы граммотрицательными бактериями, проникновению их во внутренние органы и, при определенных условиях, возникновению бактериального заболевания [4; 5].

В отдельные годы в промысловых уловах европейского угря Вислинского залива до 90 % рыб были с патологическими изменениями: язвенные поражения на коже, плавниках, изменения внутренних органов [3–9].

Цель работы – анализ сезонной динамики граммотрицательных бактерий в системе «грунт-вода-европейский угорь» в российской части Вислинского залива.

Методика и объекты исследования

Исследования проводили с 2001 по 2006 г. (весна – лето – осень) в российской части Вислинского залива. Объект исследований – граммотрицательные бактерии, выделенные из органов европейского угря и среды его обитания – воды и грунтов. Выделено и изучено 5508 штаммов бактерий из органов европейского угря, 2505 штаммов бактерий – из микрофлоры воды, 2016 штаммов бактерий – из грунта.

Бактериологические исследования рыбы, воды и грунтов выполнены методами, принятыми в ихтиопатологии и санитарной микробиологии. Родовую и видовую идентификации выделенных штаммов бактерий проводили по Определителю бактерий Берджи [10] и идентификационным таблицам [11; 12]. Видовое разнообразие граммотрицательных бактерий в органах угря оценивалось по индексу Шеннона [13]. Данные обработаны с использованием t-критерия Стьюдента, и вычисления доверительного интервала для среднего выполнены с вероятностью 0,95. Сравнение двух совокупностей проводилось методом регрессионно-корреляционного анализа с вычислением коэффициента корреляции Пирсона, составлением уравнений регрессии и построением теоретических линий регрессии [14]. Полученные результаты обработаны в пакете программ Microsoft Office Excel 2003 (Корпорация Майкрософт, 2003).

Результаты исследования и их обсуждение

В микробиоценозе угря и среде его обитания в Вислинском заливе во все сезоны доминировали условно-патогенные грамотрицательные бактерии родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*. Незначительную долю во все сезоны в микробном пейзаже рыбы, воды и грунтов составляли галофильные бактерии рода *Vibrio* и бактерии семейства *Enterobacteriaceae*.

Весной в микрофлоре грунтов среди 10 выделенных видов грамотрицательных бактерий по количеству штаммов доминировали *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas putrefaciens* и *Citrobacter freundii*. Летом в микрофлоре грунтов обнаружено 13 видов бактерий (доминировали *Aeromonas caviae* и *Pseudomonas stutzeri*), осенью – 14 видов (доминировали *Pseudomonas solanacearum* и *Aeromonas veronii*).

В микрофлоре воды Вислинского залива весной было встречено 14 видов грамотрицательных бактерий, среди которых преобладали *A. veronii*, *P. putrefaciens* и *Enterobacter agglomerans*. Летом количество видов бактерий в микробном пейзаже воды увеличивалось. Среди обнаруженных 20 видов бактерий доминирующими в этот сезон были *A. hydrophila*, *P. putrefaciens* и *Vibrio fluvialis*. Осенью количество грамотрицательных бактерий в микрофлоре воды понижалось до 11 видов с преобладанием *A. caviae* и *P. putrefaciens*.

Видовой состав грамотрицательных бактерий в микробиоценозе угря в весенний и летний сезоны года практически не изменялся. Весной в микрофлоре различных органов угря отметили 28 видов бактерий, среди которых доминировали *A. hydrophila*, *Pseudomonas putida*, *P. putrefaciens* и *C. freundii*. Летом в микробиоценозе рыбы выделили 29 видов грамотрицательных бактерий, преобладали *Aeromonas schubertii*, *P. putida*, *C. freundii*. Осенью количество видов бактерий в микрофлоре угря понижалось до 23, и вновь доминировали аэромонады (*A. schubertii*, *A. veronii*), псевдомонады (*P. putrefaciens*) и энтеробактерии (*E. agglomerans*).

Существует три пути проникновения грамотрицательных бактерий в организм угря – с водой через жаберные капилляры в кровь, с водой и пищей через кишечник и при проникновении бактерий через кожные покровы, особенно при их повреждении и язвах. Формирование состава грамотрицательной микрофлоры кожи весной зависит прежде всего от содержания этих групп бактерий в грунте, и только потом в воде, что подтверждается высокими значениями коэффициентов корреляции Пирсона между видовым составом микрофлоры грунтов и кожи рыбы ($r = 0,84$, $P < 0,05$) и видовым составом микрофлоры воды и кожи ($r = 0,5$, $P < 0,05$). Тесная связь микрофлоры грунтов и микрофлоры кожи весной объясняется экологическими особенностями зимовки угря в зимовальных ямах и придонным образом жизни. Весной индексы видового разнообразия (ИВ) микрофлоры органов, и особенно кожных покровов (рис. 1), были достаточно низкими, возможно, из-за бактерицидных свойств «кожной слизи» в сочетании с низкими температурами воды в заливе.

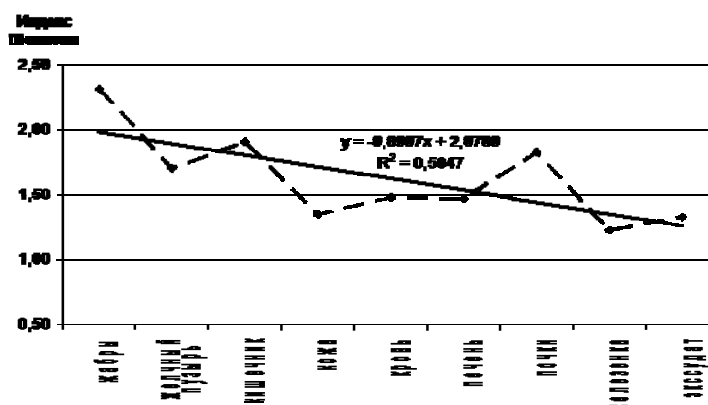


Рис. 1. Изменение видового разнообразия бактерий в органах угря в весенний сезон

Весной корреляционный анализ показал линейную зависимость как между видовым составом грунтов и кишечника рыбы, так и между видовым составом воды и кишечника угря ($r = 0,89$ и $r = 0,81$ соответственно, $P < 0,05$). Вымывание бактерий из грунтов в воду приводит к обсеменению ими жабр, которые весной были «воротами» проникновения бактерий во внутренние органы угря, что подтверждается и высоким индексом видового разнообразия бактерий на жабрах рыбы весной (рис. 1).

Сходство видового состава микрофлоры воды и жабр также подтверждается линейной зависимостью ($r = 0,65$, $P < 0,05$). Таким образом, в весенний сезон бактерии, проникая через стенки кишечника и жаберные капилляры, по кровяному руслу в малых количествах расселялись во внутренних органах угрей.

Летом низкие значения коэффициентов корреляции между количеством штаммов видов бактерий, населяющих грунт и воду, и видовым составом кожи, жабр и кишечника угрей свидетельствуют о том, что среда обитания не участвует в формировании видового состава грамотрицательной микрофлоры угря, что подтверждается стабильным и достаточно высоким индексом видового разнообразия грамотрицательных бактерий во всех органах (рис. 2).

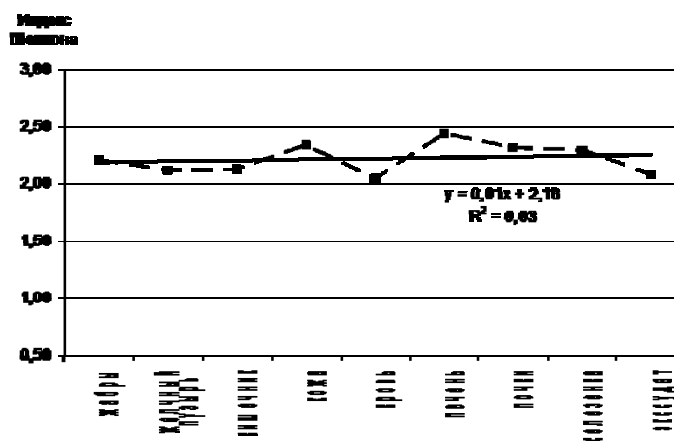


Рис. 2. Изменение видового разнообразия бактерий в органах угря в летний сезон

Корреляционный анализ обсемененности жабр и крови угрей летом выявил, что уменьшение количества видов бактерий в микрофлоре жабр приводит к увеличению их в микрофлоре крови, то есть кровь является транспортной системой для расселения бактерий по внутренним органам угря, в том числе и при появлении бактерий в микрофлоре почек ($r = 0,48$, $P < 0,05$). Высокая достоверная корреляция между показателями видового состава печени и экссудата ($r = 0,78$, $P < 0,05$) свидетельствует о достаточно тесной связи формирования микрофлоры этих структур.

Летом благоприятные условия в заливе (повышение температуры воды, увеличение количества взвешенного органического вещества, усиление интенсивности питания угрей) способствуют усиленному размножению микрофлоры, попавшей на рыбу весной, и для каждого органа рыбы формируется комплекс видов бактерий. В результате как на поверхности, так и во внутренних органах рыбы летом идет развитие инфекционного процесса, регистрируемого в популяции угря Вислинского залива. Учитывая данные корреляционного анализа зависимости видового состава микрофлоры угря и среды его обитания, можно предположить, что накопление основных видов патогенных бактерий (*A. hydrophila*, *P. cepacia*) и сопутствующих (*E. coli* и *S. freundii*) происходит весной в грунте, которые летом вызывают кожные патологии (язвы и геморрагии).

Осенью низкие значения корреляции между видовым составом бактерий грунтов и кожи, воды и кожи (при $r = -0,13$ и $r = 0,31$ соответственно, $P < 0,05$), указывают на то, что часть бактерий, попавших на кожу рыбы весной, активно размножаются летом и остаются на поверхности угрей осенью. Часть бактериальной грамотрицательной флоры уходит с поверхности угря через воду в грунт.

Кишечник угря в осенний сезон вновь становится ведущей структурой, через которую осуществляется обмен бактериальной флорой между угрем и грунтом ($r = 0,89$, $P < 0,05$). Виды бактерий, обсеменяющие воду залива осенью, практически не влияли на формирование микрофлоры угря ($r = 0,43$, $P < 0,05$).

Осенью существует тесная зависимость между видовым составом микрофлоры печени и кишечника ($r = 0,99$, $P < 0,05$). Кроме того, отмеченное нами воспаление слизистой кишечника угрей, скопление в полости тела экссудата, вызванное воздействием ферментоактивных бактерий, подтверждается корреляционной зависимостью между видовым составом микрофлоры экссудата и кишечника ($r = 0,48$, $P < 0,05$). В осенний сезон выявлено, что индексы видового разнообразия грамотрицательной микрофлоры, обсеменяющей органы угрей, существенно ниже, чем летом (рис. 3).

Однако индексы видового разнообразия микрофлоры кожи, жабр и селезенки осенью оставались достаточно высокими (близкие к летним показателям).

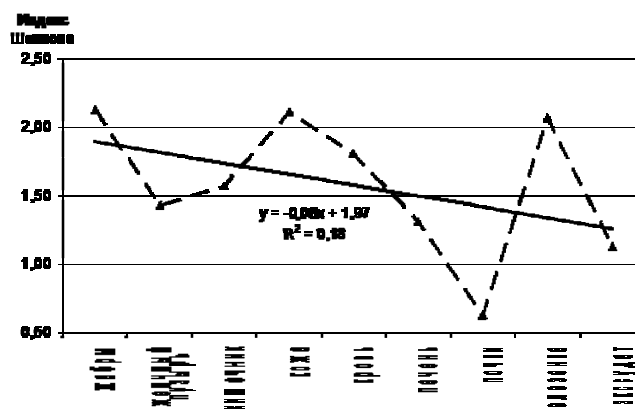


Рис. 3. Изменение видового разнообразия бактерий в органах угря в осенний сезон

В целом пути проникновения, перемещения и выноса бактериальной флоры из организма угря можно представить в виде схемы (рис. 4), с выделением органов, имеющих патологические изменения, в которых бактерии проявляли высокую ферментативную активность. Детализации и пониманию схемы также способствовал сравнительный анализ индексов видового разнообразия по сезонам года.

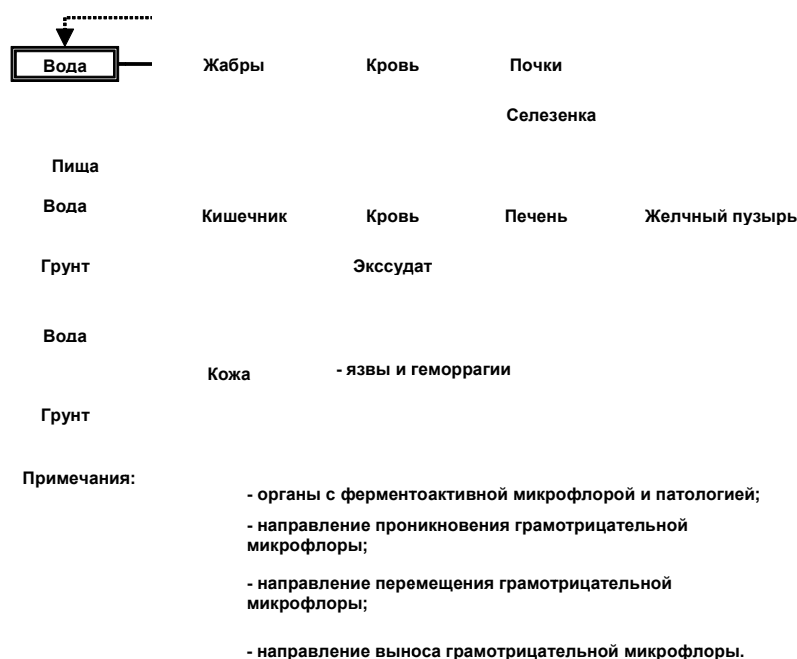


Рис. 4. Пути проникновения, перемещения и выноса грамотрицательной микрофлоры европейского угря Вислинского залива

Анализ схемы и индексов видового разнообразия свидетельствует о том, что в течение всего вегетационного периода с током воды постоянно происходит обсеменение жабр грамотрицательной микрофлорой, что имеет следствием высокие индексы видового разнообразия бактерий (весна $ИВ_{\text{жабры}}=2,32$; лето $ИВ_{\text{жабры}}=2,21$; осень $ИВ_{\text{жабры}}=2,13$). Обилие кровеносных сосудов жабр позволяет бактериям, обладающим протеолитическими, гемолитическими ферментами и лецитиназной активностью, проникать через стенки капилляров в кровь рыбы. Селезенка — кроветворный орган и «депо» крови. Индексы видового разнообразия бактерий, обсеменяющих кровь и селезенку, в течение летнего и осеннего сезонов остаются высокими (лето $ИВ_{\text{кровь}} = 2,05$, $ИВ_{\text{селезенка}} = 2,30$; осень $ИВ_{\text{кровь}} = 1,81$, $ИВ_{\text{селезенка}} = 2,07$). В то же время численность отдельных видов грамотрицательных бактерий в микрофлоре селезенки резко снижается. Это позволяет предположить, что селезенка угрей может быть внутренним «резерватом» бактериальной флоры в течение всей зимы.

В микрофлоре желчного пузыря, не имеющего признаков патологии, весной видовое разнообразие грамотрицательных бактерий достаточно высокое ($ИВ_{\text{желчный пузырь}} = 1,71$) при относительно низкой численности бактерий. Однако индекс видового разнообразия бактерий микрофлоры желчного пузыря весной незначительно отличается от индекса видового разнообразия бактерий, обсеменяющих кишечник рыбы ($ИВ_{\text{кишечник}} = 1,91$). В микрофлоре печени видовое разнообразие бактерий весной значительно ниже ($ИВ_{\text{печень}} = 1,47$), чем в микрофлоре кишечника и желчного пузыря. Вероятно, проникновение бактерий в печень происходит в основном по кровеносной системе и частично через протоки желчного пузыря.

Численность бактерий в микрофлоре кишечника у угря на протяжении всех сезонов года постоянно высокая, что связано с питанием угря бентосом, с которым в кишечник попадает большое количество бактерий из микрофлоры грунтов залива. Индексы видового разнообразия грамотрицательной микрофлоры кишечника весной и летом остаются высокими. Максимальное проявление патологических изменений в стенках кишечника и печени у угря Вислинского залива отмечается летом, когда видовое разнообразие грамотрицательных бактерий в этих органах является наибольшим по сравнению с индексами видового разнообразия бактерий в микробиоценозе остальных органов рыбы.

Снижение видового разнообразия грамотрицательных бактерий в микрофлоре печени, желчного пузыря и кишечника осенью можно объяснить временным накоплением бактерий в экссудате, переносом бактерий из экссудата через стенку кишечника и интенсивным выносом бактериальной флоры кишечника во внешнюю среду.

Анализ видового разнообразия грамотрицательных бактерий в микрофлоре почек весной показал их роль как «накопителя» бактериальной флоры до конца лета (весна $ИВ_{\text{почки}} = 1,83$; лето $ИВ_{\text{почки}} = 2,32$). К осени индекс видового разнообразия бактерий в микрофлоре почек резко снижается ($ИВ_{\text{почки}} = 0,63$), так как происходит выброс бактерий через выделительную систему угря в воду.

Кожа — обособленный (третий путь) обсеменения грамотрицательными бактериями. Индексы видового разнообразия грамотрицательных бактерий микрофлоры кожных покровов угрей повышаются к лету (весна $ИВ_{\text{кожа}} = 1,35$; лето $ИВ_{\text{кожа}} = 2,34$). В этот период в Вислинском заливе отмечается большое количество экземпляров с кожными язвами. К осени индексы видового разнообразия грамотрицательных бактерий несколько снижаются ($ИВ_{\text{кожа}} = 2,11$), но остаются на высоком уровне, так как язвенные проявления на коже угрей имеют хронический характер.

Заключение

Изучение сезонной динамики грамотрицательных бактерий в системе «грунт-вода-угорь» в Вислинском заливе показало, что активное обсеменение угря микрофлорой из среды его обитания — воды и грунта — происходит только весной. Это подтверждается как индексами видового разнообразия грамотрицательных бактерий, так и корреляционным анализом численности видового состава бактерий.

Анализ путей проникновения микрофлоры в организм угря и выведения бактерий во внешнюю среду свидетельствует о том, что основными «воротами проникновения» являются жабры и кишечник, а выноса — кишечник и почки рыбы. Кроме того, возможно обсеменение внутренних органов угря за счет бактерий, накопленных в селезенке осенью и сохраняемых до весны. Обращает на себя внимание, что органы, выполняющие функцию «ворот» (жабры, кишечник, кожа), обладают набором бактерий с наибольшей ферментативной активностью. Кроме того, для этих органов характерны достаточно высокие индексы видового разнообразия бактерий в течение года. Это приводит к развитию патологий на коже, в кишечнике и связанной с ним печени.

Высокую ферментативную активность имеют отдельные виды бактерий, которые вызывают патологические процессы у угрей только на кожных покровах и в желудочно-кишечном тракте. Для органов угря, в которых не наблюдается патологий (селезенка, почки, желчный пузырь), также характерны высокие значения индексов видового разнообразия бактерий, но бактерии, обсеменяющие эти органы, лишены «ферментов агрессии», способствующих развитию инфекционного процесса. Это возможно только в том случае, если в иммунной системе угря хорошо развиты первая линия защиты (барьерная функция кожи и ее слизистых оболочек), неспецифические факторы второй линии защиты (воспаление, фагоцитоз, антибактериальные свойства белков плазмы крови и ферментов) и нельзя исключить возможную способность угря вырабатывать антитела (третья линия защиты).

Список литературы

1. Хлопников М.М. Кормовая емкость Вислинского залива для бентосоядных рыб: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1990.
2. Чечко В.А. Процессы современного осадкообразования в Вислинском заливе Балтийского моря: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Калининград, 2006.
3. Аполова Т.А. Биология и промысел угря Куршского и Вислинского заливов Балтийского моря: дис. ... канд. биол. наук. Калининград, 1968.
4. Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н., Можарова А.И. Микробиоценоз как индикатор экологического состояния водной среды и рыбы // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре: тез. докл. науч.-практич. конф., 21–22 нояб. 2000 г. М., 2000. С. 42–43.
5. Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И. Этиологическая структура возбудителей бактериальной геморрагической септицемии // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов – 2. Расширенные материалы междунар. науч.-практической конф.-семинара. М., 2007. С. 95–98.
6. Jensen N.J., Larsen J.L., Christensen N.O. Spring ulcer disease in eel, *Anguilla anguilla* // Rapp. P.-V. Reun. Cons. Perm. Int. Expor. 1983. Mer 182. P. 106–110.
7. Dalsgaard J. Spring ulcer disease in eels // Identif. Leaflet. Diseases and Parasites Fish and Shellfish. Int. Council. Explor. Sea. 1987. №39. P. 1–6.
8. Ларцева Л.В. Рыбы и гидробионты – резервенты грамотрицательной неферментирующей микрофлоры. Ее санитарно-эпизоотическая и эпидемиологическая значимость // Рыбное хозяйство. Сер. Аквакультура. Информ. пакет. 1997. Вып. 1. С. 1–16.
9. Einszporn-Orecka T. Cytological evaluation of the peripheral blood cell and hemopoietic organs in pestis anguillarum of eels // Acta Ichthyologica et Piscatoria. 1976. Vol. 6, fasc. 1. P. 67–81.
10. Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта. М., 1997. Т. 1.
11. Elliot E.L., Kaysner Ch.A. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. // Bacteriological Analytical Manual. 2001. Ch. 9.
12. Schleifer K.H., Kloos W.E. Identification schemes // J. Clinical Microbiology. 1975. № 1. P. 345–369.
13. Одум Ю. Экология. Т. 2. М., 1986.
14. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск, 1973.

Об авторах

С.М. Никитина – д-р биол. наук, проф., РГУ им. И. Канта, Swetmih@Gmail.com
О.В. Казимирченко – канд. биол. наук, доц., КГТУ, okbar@mail.ru

Authors

Professor S.M. Nikitina, IKSUR, Swetmih@Gmail.com
Dr. O.V. Kazimirchenko, Associate Professor, Kaliningrad State Technical University, okbar@mail.ru