

Обухова О.В.¹, Ларцева Л.В.²

Галотолерантность псевдомонад, выделенных из водной среды и рыбы (*Sander lucioperca*) в дельте реки Волги

¹ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет», 414056, Астрахань, Россия;²ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет», 414056, Астрахань, Россия

Введение. Представленные материалы свидетельствуют о галофильности бактерий рода *Pseudomonas*, которые доминировали в микробиоценозе воды и судака весной и осенью в дельте реки Волга. Приуроченности псевдомонад, выделенных из этих биотопов, к определённым дельтовым акваториям не выявлено.

Материалы и методы. Экспериментальным путём протестировано 190 «водных» штаммов и 720 — изолированных от рыбы. В мясо-пептонный бульон (МПБ) с 3; 7 и 10% содержанием NaCl высевали суточные культуры анализируемых бактерий, инкубацию которых проводили при 37 °С, а учёт результатов — через 24 и 48 ч.

Результаты. Существенных различий в показателях галофильности у анализируемых штаммов не выявлено, за исключением осеннего сезона, особенно в 10% растворе соли. Среди выделенных псевдомонад максимальная галотолерантность в обоих биотопах отмечена у штаммов *P. fluorescens* и *P. alcaligenes*; минимальная — у *P. putida*.

Галофильность штаммов псевдомонад, инфицирующих воду и рыбу, обладала сезонной цикличностью. Установлено незначительное снижение показателей галофильности псевдомонад, персистирующих в воде и рыбе только в концентрациях 3 и 10 мг/л от весны к лету (в 1, 1–1,2 раза), и их значительный подъём осенью (в 1,5 и 1,4 раза) в концентрации соли 3 мг/л. У тестируемых штаммов весной и осенью отмечены повышенные значения солеустойчивости, что определено гидролого-гидрохимическими особенностями дельтовых акваторий, а также «переносом» бактерий в организме судака во время его миграции из моря в реку.

Заключение. Анализ многолетнего материала показал высокую галофильность исследуемых штаммов псевдомонад, что свидетельствует об их санитарно-гигиенической и эпидемиологической опасности, а также способности оставаться жизнеспособными в солёной рыбной продукции.

Ключевые слова: псевдомонады; галофильность; сезонная цикличность; рыба; вода

Для цитирования: Обухова О.В., Ларцева Л.В. Галотолерантность псевдомонад, выделенных из водной среды и рыбы (*Sander lucioperca*) в дельте реки Волги. *Гигиена и санитария*. 2021; 100 (3): 204–207. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-3-204-207>

Для корреспонденции: Обухова Ольга Валентиновна, канд. биол. наук, доцент кафедры гидробиологии и общей экологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет», 414056, Астрахань. E-mail: obuhova-ov@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Благодарность. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Участие авторов: Обухова О.В. — сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; Ларцева Л.В. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста, редактирование. *Все соавторы* — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Поступила 09.12.2019 / Принята к печати 10.03.2021 / Опубликовано 16.04.2021

Olga V. Obukhova¹, Lubov V. Lartseva²

Halotolerance of pseudomonads isolated from aquatic environment and fish (*Sander lucioperca*) in the Volga River delta

¹Astrakhan State Technical University, Astrakhan, 414056, Russian Federation;²Astrakhan State University, Astrakhan, 414056, Russian Federation

Introduction. The material shows halophiles bacteria *R. Pseudomonas* the water's microbiota and the pikeperch in spring and autumn. The attachment of *Pseudomonas* isolated from these habitats, certain Delta areas has not been identified.

Materials and methods. 190 "water" strains and 720 ones isolated from fish were experimentally tested. In meat-peptone broth (MPB) with 3.0, 7.0, and 10.0% NaCl content, daily cultures of analyzed bacteria were sown, incubation of which was carried out at 37 °C, and the results were taken into account after 24 and 48 hours.

Results. There were no significant differences in halophilicity in the analyzed strains, except for the autumn season, especially in 10.0% salt solution. Among the isolated pseudomonads, the maximum halotolerance in both biotopes was observed in *P. fluorescens* and *P. alcaligenes* in *P. putida*.

Halophiles strains of *Pseudomonas* that infect the water and fish had seasonal cycles. A slight decrease in the halophilicity of pseudomonades persistent in water and fish only at concentrations of 3.0 and 10.0 mg/l from spring to summer (1.1–1.2 times), and their significant rise in autumn (1.5 and 1.4 times) in the salt concentration of 3.0 mg/l. In the tested strains in spring and autumn, increased salt tolerance values were noted, which was determined by the hydrological and hydrochemical features of Delta waters and the "transfer" of bacteria in the body of walleye during its migration from the sea to the river.

Conclusion. Analysis of long-term material showed high halophiles studied strains of pseudomonad, indicating that their sanitary and epidemiologic danger, and the ability to remain viable in salted fish products

Keywords: *Pseudomonas*; halophilicity; seasonal cyclicality; fish; water

For citation: Obukhova O.V., Lartseva L.V. Halotolerance of pseudomonads isolated from aquatic environment and fish (*Sander lucioperca*) in the Volga River delta. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2021; 100 (3): 204–207. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-3-204-207> (In Russ.)

For correspondence: Olga V. Obukhova, MD, Ph.D., associate professor of the Department of Hydrobiology and general ecology of the Astrakhan State Technical University, Astrakhan, 414056, Russian Federation. E-mail: obuhova-ov@yandex.ru

Information about the authors: Obukhova O.V., <https://orcid.org/0000-0002-2883-2963>; Lartseva L.V., <https://orcid.org/0000-0003-3165-2143>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Contribution of the authors: Obukhova O.V. — the collection and processing of the material, statistical analysis, writing the text; Lartseva L.V. — the concept and design of the study, the collection and processing of the material, writing the text, editing. *All co-authors* — approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Received: December 9, 2019 / Accepted: March 10, 2021 / Published: April 16, 2021

Введение

При оценке микробного риска возникновения у населения острых кишечных инфекций (ОКИ), связанного с потреблением рыбы и рыбных продуктов, необходимо при проведении санитарно-микробиологического анализа рыбы и рыбных продуктов, а также воды водоёмов, в которых была выловлена рыба, учитывать условно-патогенные бактерии. Особое внимание необходимо уделить микроорганизмам рода *Pseudomonas*, обладающим высокой устойчивостью к низким температурам и высокой галофильностью, что позволяет им активно развиваться в пресноводных и морских экосистемах [1].

При этом псевдомонады, вызывающие у людей септицемию и различные инфекции, способны оставаться жизнеспособными в готовой солёной продукции, снижая её качество [2–4]. При длительном хранении пищевых продуктов в условиях холодильника они могут превалять над другой микрофлорой [5, 6]. Поэтому изначальное присутствие этих бактерий в воде и рыбном сырье можно рассматривать как серьёзную санитарно-гигиеническую проблему.

Материалы и методы

На тоневых участках Гандуринского, Главного и Белинского банков дельты р. Волги в 1995–2010 гг. собран материал от 447 экз. свежельвоненного судака и 375 проб воды с соблюдением правил асептики. У рыб анализировали жабры, кишечник, кровь и паренхиматозные органы. Из них выделено и дифференцировано 720, из воды – 190 штаммов псевдомонад. Чистоту выделенных культур контролировали микроскопированием мазков, окрашенных по Грамму. Их видовую принадлежность осуществляли по Берджи и Ю.М. Пивоварову с соавт. [7, 8].

Показатели галофильности исследовали методом посева суточных культур, выделенных из воды и рыбы, в мясо-пептонный бульон (МПБ), содержащий 3; 7 и 10% NaCl; инкубировали при 37 °С. Учёт результатов осуществляли визуально по мутности бульона через 24 и 48 ч.

Статистическую обработку проводили с использованием компьютерной программы Statistica for Windows с учётом значимости $p < 0,05$.

Результаты

Данные многолетнего мониторинга речной воды и рыбы позволили выявить частоту встречаемости бактерий рода *Pseudomonas* в анализируемом материале, в воде они составляли $30,4 \pm 0,6\%$; в рыбе – $20,8 \pm 0,6\%$ проб. При этом в структуре рода в них доминировали штаммы *P. fluorescens* $41 \pm 0,7$ и $36,5 \pm 0,6\%$ проб соответственно. Изоляты *P. alcaligenes* в структуре рода отмечали несколько реже: в воде в $33,2 \pm 0,9\%$ и в рыбе – в $36,1 \pm 0,7\%$ проб. При этом *P. aeruginosa* в единичных случаях выделяли аномально жарким летом 2010 г. в воде и кишечнике рыб. В более ранних исследованиях при анализе материала она не была отмечена. В дельтовых акваториях у исследуемого судака не отмечено заметных и достоверных отличий качественных характеристик популяции псевдомонад.

Однако в морской экосистеме они встречались в 2–3 раза чаще, чем в речной, причём чаще в мелководной зоне Северного Каспия, чем в средней, более солоноватоводной акватории моря, где условия функционирования для псевдомонад являются более оптимальными. В то же время в опреснённых районах Северного Каспия доминировали ферментативно-активные энтеробактерии и аэромонады, весьма активные в «речной» биоте. По мнению авторов, они ингибировали рост и развитие неферментирующей микрофлоры, в частности псевдомонады. В северной и средней акваториях моря среди микроорганизмов этого рода отмечено преваляние *Pseudomonas* spp. и *P. fluorescens* [9, 10].

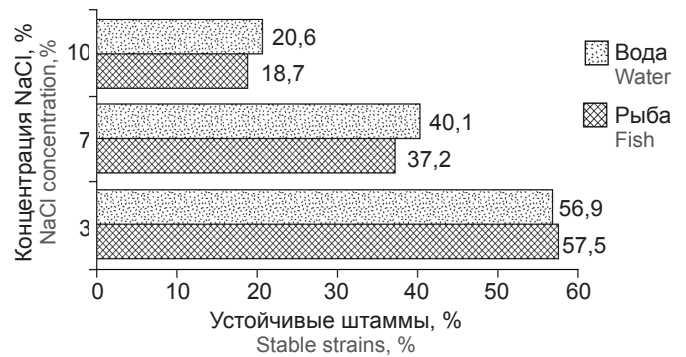


Рис. 1. Средние показатели галотолерантности псевдомонад, выделенных из водной среды и рыбы.

Fig. 1. Average indices of halotolerance of pseudomonads isolated from aquatic environment and fish.

Штаммы этих бактерий, выделенные из воды и рыбы, имели существенную галотолерантность (рис. 1). В концентрации соли 10 мг/л её показатели были выше, чем у аэромонад и энтеробактерий [11].

Установлены несущественные различия в галофильности «водных» и «рыбных» штаммов. Небольшое преваляние в 1,1 раза отмечено у «водных» и «рыбных» изолятов в концентрациях соли в 7 и 10 мг/л. Среди выделенных псевдомонад максимальная галотолерантность в обоих биотопах отмечена у изолятов *P. fluorescens* и *P. alcaligenes*, минимальная – у *P. putida*. У единичных штаммов *P. aeruginosa* выявлена жизнеспособность в 10% растворе NaCl.

Галотолерантность выделенных псевдомонад обоих биотипов имела сезонную специфичность. Фактические материалы, приведённые на рис. 2, демонстрируют динамичное, но незначительное снижение показателей галофильности псевдомонад, персистирующих в воде и рыбе только в

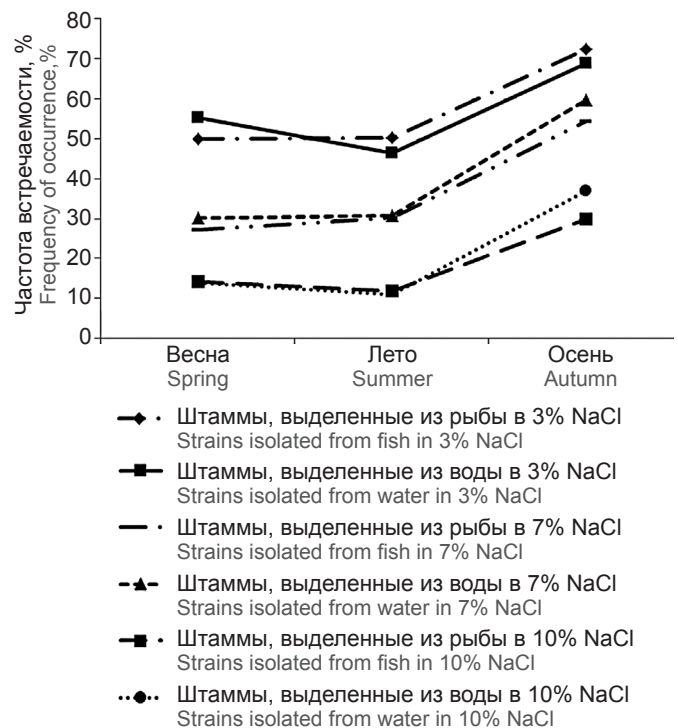


Рис. 2. Сезонная динамика галотолерантности псевдомонад, выделенных из воды и рыбы.

Fig. 2. Seasonal dynamics of halotolerance of pseudomonads isolated from aquatic environment water and fish.

концентрациях 3 и 10 мг/л от весны к лету (в 1,1–1,2 раза). Осенью зарегистрирован значительный подъём значений устойчивости к солевым растворам у штаммов, выделенных из воды и судака. В концентрации 3% с NaCl показатели их галофильности были в 1,5 и 1,4 раза соответственно выше, чем в летний сезон. В 7% растворе с NaCl штаммы псевдомонад осеннего анализа были солеустойчивее летних «водных» в 1,98 и «рыбных» – в 1,8 раза ($p < 0,05$; $r = 81$).

Установлено, что в 10% растворе с солью штаммы этих бактерий, выделенные осенью, были галофильнее «летних» «водных» в 3,4 и 2,5 раза «рыбных» изолятов ($p < 0,05$; $r = 0,81$). Во всех случаях максимальные показатели галотолерантности псевдомонад зарегистрированы только в осенний сезон. Следует указать, что пики развития неферментирующих бактерий этого рода в анализируемой гидроэкосистеме всегда приходились на весну и осень [2, 9]. Значительная галотолерантность псевдомонад в этот сезон обусловлена как абиотическими факторами – это перемешивание морских и пресноводных вод «морянными нагонными» ветрами, особенно частыми осенью, так и биотическими – физиологически-адаптационными особенностями судака, связанными с его продолжающимся заходом в дельту р. Волги из акватории Северного Каспия. По-видимому, при смене мест обитания судака из морской в речную экосистему часть штаммов псевдомонад обладает галотолерантностью, то есть механизмом приспособления к другому осмотическому состоянию среды.

Широкое распространение псевдомонад в морских экосистемах хорошо известно [2, 9, 10, 12, 13]. Показано, что в море бактерии этого рода встречались чаще в 2,5 раза, чем в реке. В микробиоценозе морских акваторий грамотрицательные неферментирующие бактерии – псевдомонады субдоминировали, встречаясь в воде в 48%; в рыбе – от 43 до 48% проб. Их удельный вес в микробном пейзаже всей микрофлоры увеличивался в районе Среднего Каспия по сравнению с их встречаемостью в дельте; авандельте и прибрежной зоне моря. При этом биофиль псевдомонад, выделенных на востоке Северного Каспия, был более разнообразным по сравнению с их встречаемостью в западной части моря, что определялось различием абиотических факторов среды, то есть гидрохимическим и гидрологическим режимами этих акваторий моря, а также фенотипическими особенностями самих бактерий. В районе Северного Каспия они инфицировали внутренние органы и кровь тюленя [9, 13]. У дагестанского побережья зарегистрированы в морской воде и желетельных гребневиках. При этом следует заметить, что из воды Чёрного моря и желетельных *Beroe ovata* с высокой частотой встречаемости изолировали галофильную синегнойную палочку *Ps. aeruginosa*. В Среднем и Южном Каспии различные виды псевдомонад инфицировали воду, жабры и кишечник анчоусовидных килек. Летом они зарегистрированы в указанных биотопах в среднем в 12,9%, к осени увеличивали свои показатели почти в 3 раза ($p < 0,05$; $r = 0,87$).

Обсуждение

Анализ материала проведённых натуральных исследований позволил установить, что при исследовании микробиоценоза речной воды и рыбы бактерии рода *Pseudomonas* обнаружены в воде $30,4 \pm 0,6\%$, в рыбе – $20,8 \pm 0,6\%$ проб. Штаммы *P. fluorescens* преобладали в исследуемых биотопах над другими видами псевдомонад, а синегнойная палочка *P. aeruginosa* зарегистрирована в воде и кишечнике рыб в единичных случаях anomalно жарким летом 2010 г.

Среди выделенных псевдомонад наиболее галофильными в обоих биотопах оказались штаммы *P. fluorescens* и *P. alcaligenes*, а галофобными – *P. putida*. При этом значительных различий в галофильности водных и рыбных штаммов не выявлено.

Установлены сезонные изменения галотолерантности выделенных микроорганизмов: незначительное снижение показателей галофильности псевдомонад только в концентрациях 3 и 10 мг/л от весны к лету (в 1,1–1,2 раза), но значительный их подъём осенью – в 1,5 раза. В 7% растворе с NaCl «осенние» штаммы псевдомонад солеустойчивее «водных» в 1,98 раза и «рыбных», выделенных летом, – в 1,8 раза ($P < 0,05$; $r = 0,81$).

Весной и осенью отмечен подъём показателей галофильности у штаммов, обсеменяющих воду. В эти сезоны в дельте и авандельте р. Волги происходит перемешивание морских и пресных вод, что обусловлено «морянными» ветрами и согласуется с литературными данными [14]. В эти же сезоны отмечен подъём значений толерантности к NaCl у штаммов, выделенных из рыбы, что, по-видимому, определено «морским происхождением» части популяции псевдомонад.

Заключение

В микробиоценозе воды дельты р. Волги и полупроходной рыбы отмечена частая встречаемость бактерий рода *Pseudomonas*, среди которых доминировали изоляты *P. fluorescens* и *P. alcaligenes*.

Для этих микроорганизмов установлена толерантность к солевым растворам в концентрации 3; 7 и 10 мг/л. Весной и осенью зарегистрированы подъёмы показателей галофильности у изолятов, выделенных из воды и рыбы. Это объясняется природными факторами и повышением солёности воды в эти сезоны, а также биологическими особенностями полупроходного судака, совершающего миграции (из морской в речную экосистему). Полученные результаты санитарно-гигиенического мониторинга, проводимого в дельте реки Волги, свидетельствуют о напряжённости обстановки исследуемой экосистемы и прогнозирования сохранения условно-патогенных бактерий рода *Pseudomonas* в готовой солёной рыбопродукции.

Литература

(п.п. 2–4, 6 см. References)

- Обухова О.В., Ларцева Л.В. Микробиоценоз воды и судака (*Sander lusciorerca*) в дельте р. Волги. СПб.: Проспект Науки; 2015.
- Дараселия Г.Я. Биологическая безопасность продуктов питания. Астрахань: АГТУ; 2006.
- Пивоваров Ю.П., Королик В.В. Санитарно-значимые микроорганизмы. М.: ИКАР; 2000.
- Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи. М.: Мир; 1997.
- Ларцева Л.В., Проскурина В.В., Вьюшкова Л.А. Санитарно-эпизоотическая ситуация Волго-Каспийского региона на рубеже XXI в. Рыбное хозяйство. Болезни рыб в аквакультуре: обзорная информация. 2002; (1): 50.
- Лисицкая И.А. Бактериальные сообщества некоторых компонентов экосистемы дельты Волги и Северного Каспия: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Астрахань; 2008.
- Обухова О.В., Ларцева Л.В. Галотолерантность энтеробактерий, выделенных из воды и рыбы в дельте реки Волги. Гигиена и санитария. 2015; 94(5): 28–30.
- Дьякова С.А., Рубан Е.А., Шокашева Д.И. Санитарно-микробиологические исследования акватории лицензионного участка «Центрально-Каспийский». В кн.: Сборник научных трудов «Рыбохозяйственные исследования в Каспийском море в условиях освоения нефтегазовых месторождений». Астрахань; 2015: 58–62.
- Володина В.В., Дьякова С.А. Условно-патогенная микрофлора каспийского тюленя (*Phoca caspica*) и среды его обитания в условиях антропогенного прессинга. Труды ВНИРО. 2016; 162: 87–96.
- Катунин Д.Н. Гидроэкологические основы формирования экосистемных процессов в Каспийском море и дельте реки Волги. Астрахань; 2014.

References

1. Obukhova O.V., Lartseva L.V. *Mikrobiotsenoz of Water and a Pike Perch (Sander lucioperca) in the Delta of the Volga River [Mikrobiotsenoz vody i sudaka (Sander lucioperca) v del'te r. Volgi]*. St. Petersburg: Prospekt Nauki; 2015. (in Russian)
2. Vaz-Moreira I., Nunes O.C., Manaia C.M. Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Sci. Total Environ.* 2012; (426): 366–47. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.046>
3. Smith P., Alday-Sanz V., Matysczak J., et al. Monitoring and surveillance of antimicrobial resistance in microorganisms associated with aquatic animals. *Rev. Sci. Tech.* 2013; 32(2): 583–94. <https://doi.org/10.20506/rst.32.2.2237>
4. Werkman M., Murray A.G. et al. Seasonality in live fish movements and its effects on epidemic dynamics. *Aquaculture.* 2014: 418–9.
5. Daraseliya G.Ya. *Biological Safety of Food: Studies [Biologicheskaya bezopasnost' produktov pitaniya]*. Astrakhan': AGTU; 2006. (in Russian)
6. Liston J. Microbial hazards of seafood consumption. *Food Technol.* 1990; 44(12): 58–62.
7. Pivovarov Yu.P., Korolik V.V. *Sanitary and Significant Microorganisms [Sanitarno-znachimye mikroorganizmy]*. Moscow: IKAR; 2000. (in Russian)
8. Holt J.G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
9. Lartseva L.V., Proskurina V.V., V'yushkova L.A. Sanitary epizootic situation of the Volga-Caspian region at the turn of the XXI century. *Rybnoe khozyaystvo. Bolezni ryb v akvakul'ture: obzornaya informatsiya.* 2002; (1): 50. (in Russian)
10. Lisitskaya I.A. *Bacterial community of some components of the ecosystem of the delta of the Volga and Northern Caspian*: Diss. Astrakhan'; 2008. (in Russian)
11. Obukhova O.V., Lartseva L.V. Halotolerance of enterobacteria isolated from water and fish in the delta of the Volga River. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal).* 2015; 94(5): 28–30. (in Russian)
12. D'yakova S.A., Ruban E.A., Shokasheva D.I. Sanitary-microbiological research of water area of the licensed area «Central Caspian». In: *Collection of Scientific Papers «Fisheries Research in the Caspian Sea in the Conditions of Development of Oil and Gas Fields» [Sbornik nauchnykh trudov «Rybnokhozyaystvennyye issledovaniya v Kaspiyskom more v usloviyakh osvoeniya neftegazovykh mestorozhdeniy»]*. Astrakhan'; 2015: 58–62. (in Russian)
13. Volodina V.V., D'yakova S.A. Conditionally pathogenic microflora of the Caspian seal (*Phoca caspica*) and its habitat under anthropogenic pressure. *Trudy VNIRO.* 2016; 162: 87–96. (in Russian)
14. Katunin D.N. *Hydro-Geological Basis for the Formation of Ecosystem Processes in the Caspian Sea and the Delta of the Volga River [Gidroekologicheskie osnovy formirovaniya ekosistemnykh protsessov v Kaspiyskom more i del'te reki Volgi]*. Astrakhan'; 2014. (in Russian)