

БОЛЕЗНИ ВОДНЫХ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 597.553.2:597-12

**ВОЗБУДИТЕЛЬ ФУРУНКУЛЕЗА *AEROMONAS SALMONICIDA* У
ПОЛОВОЗРЕЛОЙ НЕРКИ *ONCORHYNCHUS NERKA* ИЗ ОЗ. АЗАБАЧЬЕ**

© 2011 г. Е.А. Устименко, Н.В. Сергеев

ФГУП «Камчатский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства
и океанографии», Петропавловск-Камчатский 683600

Поступила в редакцию 14.04.2010 г.

Окончательный вариант получен 05.03.2011 г.

Представлены результаты бактериологического обследования половозрелой нерки из оз. Азабачье в 2004-2009 гг. Ежегодно, кроме 2007 г., у 6,7-33,3% рыб только поздней расы выявляли возбудитель фурункулеза – *Aeromonas salmonicida*. При изучении бактерий нами выявлены: различия с типичными штаммами *A. salmonicida*; наличие общих свойств с микроорганизмами данного вида, ранее выделенными от рыб из водоемов азиатского побережья Тихого океана, а также установлены особенности, присущие только штаммам *A. salmonicida*, выделенным от нерки из оз. Азабачье. Патогенность изолированных бактерий *A. salmonicida* свидетельствует о потенциальной опасности для популяций лососей.

Ключевые слова: нерка, *Aeromonas salmonicida*, биохимические свойства, патогенность, болезнь.

ВВЕДЕНИЕ

Aeromonas salmonicida — возбудитель фурункулеза — одного из наиболее распространенных бактериальных заболеваний лососевых рыб. Особенно он опасен при проникновении в рыбоводные хозяйства, где может вызвать значительную гибель молоди лососей. В настоящее время фурункулез широко распространен в лососевых хозяйствах Западной Европы, Северной Америки, Японии и других странах, как в пресных, так и в солоноватых и морских водах (Post, 1987; Austin, Austin, 1993). В России описан лишь один случай вспышки фурункулеза в форелевом хозяйстве (Зозуля и др., 1967). На Дальнем Востоке Российской Федерации патоген зарегистрирован в естественных популяциях лососей на Камчатке (Сазонов и др., 1993; Sergeenko, Ustimenko, 2003), Курильских островах, в Хабаровском крае (Заплетникова, Малетина, 1987) и на Сахалине (Вялова, Шкурина, 2005).

Многолетние исследования возбудителя фурункулеза у нерки из оз. Азабачье, являющегося нагульно-нерестовым водоемом одного из крупнейших стад нерки на Камчатке, помогут определить роль *A. salmonicida* в бактериоценозе рыб и оценить потенциальную опасность патогена для популяций лососей в данном водоеме.

Цель работы — выявление и изучение возбудителя фурункулеза *A. salmonicida* у нерки из оз. Азабачье.

Задачи:

1. Провести бактериологическое обследование половозрелой нерки из оз. Азабачье на наличие патогенов, опасных для здоровья рыб.
2. Провести сравнительное биохимическое тестирование выделенных изолятов *A. salmonicida*.

3. Определить вирулентность бактериальных патогенов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для бактериологических исследований послужили пробы от половозрелой нерки *Oncorhynchus nerka*, отловленной в оз. Азабачье (бассейн р. Камчатки) в 2004-2009 гг. Отбор проб по возможности проводили дважды в год, поскольку нерка оз. Азабачье представлена двумя сезонными расами – ранней и поздней (Бугаев, 2003). Нерест ранней нерки начинается в конце июня-начале июля. Наиболее интенсивный нерест наблюдается в начале второй половины июля, заканчивается – в начале августа. Приблизительно с середины первой декады августа и до половины сентября нерестится поздняя нерка, иногда ее нерест заканчивается в начале-середине октября (Бугаев, 1995). Первый раз пробы отбирали в июле или первой половине августа, второй – во второй половине августа или в сентябре. Всего обследовали 311 экз. Единовременная выборка рыб составляла 30 экз., за исключением 2006 г. – 41 экз. Отмечали внешние патологические изменения и состояние внутренних органов лососей. Вскрытие рыб проводили по методам, рекомендованным отечественными и зарубежными исследователями (Лабораторный практикум..., 1983; Methods..., 1989). Пробы от рыб для бактериологических исследований отбирали непосредственно на месте вылова. От каждой особи проводили посев из почки на универсальную питательную среду Tryptone Soya Agar (TSA) и Coomassie Brilliant Blue (CBB) агар (TSA с добавлением 0,1% бриллиантового синего). Coomassie Brilliant Blue – белково-специфичный краситель, с помощью которого устанавливали наличие на поверхности клетки *A. salmonicida* белкового А-слоя (Cipriano, Bertolini, 1988). Ферментативные свойства и подвижность бактерий определяли на среде Хью-Лейфсона с глюкозой. Посевы инкубировали 24-48 ч. в термостате Yamato-42EG при 25 °С. Для дифференциации *A. salmonicida* и подвижных аэромонад проводили инкубацию при 37 °С. Морфологические свойства бактерий исследовали после окраски препаратов по Граму и просматривали мазки в световой микроскоп «Olimpus BH-2». Биохимическое тестирование бактерий проводили с помощью тест-системы API 20NE (BioMérieux, Франция) и на средах Гисса. Определение ДНКазы использовали как косвенный метод определения вирулентности бактерий (Сборник инструкций..., 1998). Для изучения ДНКазной активности аэромонад применяли DNase agar (Oxoid, England). Таксономическую принадлежность микроорганизмов устанавливали по Определителю бактерий Берджи (Holt et al., 1994).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пробы отбирали у преднерестовых или отнерестившихся рыб, поэтому внешние изменения, свойственные лососям в этот период, мы не относили к признакам заболевания. При обследовании у некоторых особей отмечали зарубцевавшиеся поражения кожи (рис. 1), асцит в полости тела, отечность заднего отдела почек. Встречаемость рыб с такими признаками варьировала от 0 до 26,7% в разные годы.

Проводили морфологическое исследование и определение наличия цитохромоксидазы у всех бактериальных культур, выросших на среде TSA через 48 ч. инкубации при 25 °С. В некоторых случаях на 4-14 сутки отмечали появление коричневого, диффундирующего пигмента на средах TSA и CBB агаре (рис. 2, табл. 1). Для дальнейшего бактериологического тестирования отбирали

грамотрицательные, оксидазоположительные палочки. На среде Хью-Лейфсона дифференцировали аэробов от факультативных анаэробов, подвижных от неподвижных микроорганизмов.

Грамотрицательные, неподвижные, оксидазоположительные палочки, имеющие ферментивный тип дыхания и дающие рост на СВВ агаре в виде мелких, темно-синих колоний, предположительно, определили как *A. salmonicida*. После постановки идентификационных тестов подтвердили таксономическую принадлежность выделенных бактерий к виду *A. salmonicida*. Остальные бактерии идентифицировали как *A. hydrophila*, *A. caviae* и *Pseudomonas fluorescens*.

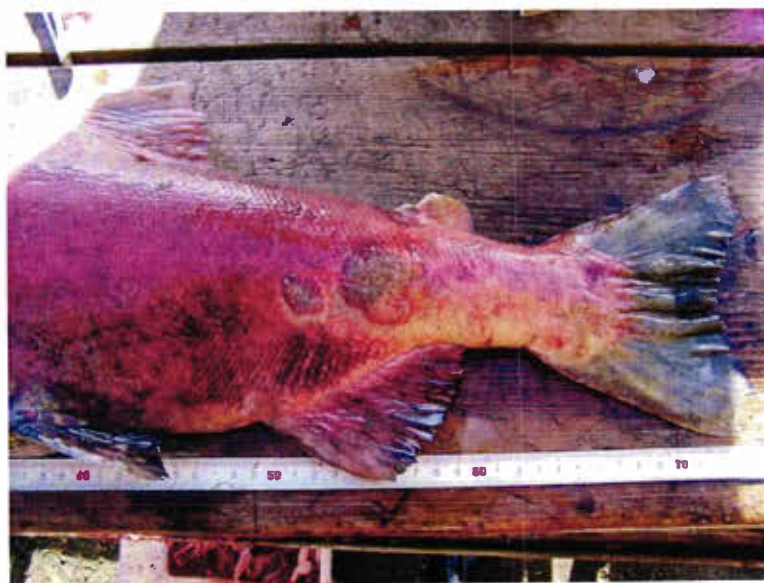


Рис. 1. Зарубцевавшиеся поражения кожи у преднерестовой нерки из оз. Азабачье.
Fig. 1. Scars on the skin of a spawning sockeye salmon in Azabachye lake.

При сравнении биохимических признаков изолятов *A. salmonicida*, выделенных в разные годы от нерки из оз. Азабачье, выявили, что все штаммы были оксидазо- и каталазоположительные, ферментировали сахарозу, но отличались способностью продуцировать пигмент, индол, β -галактозидазу, ассимилировать глюкозу и N-ацетил-глюкозамин (табл. 1). По этим же показателям, а также по сахарозолитическим свойствам и отсутствию фермента аргинин дегидролазы, изоляты от нерки из оз. Азабачье отличались от типичного штамма *A. salmonicida* (Holt et al., 1994).

В 2004 и 2005 гг. бактериями *A. salmonicida* было загрязнено 30,0 и 33,3%, в 2006, 2008 и 2009 гг. – 9,8, 16,7 и 6,7% рыб из выборки соответственно. В 2007 г. патоген от лососей не выделили.

Кроме возбудителя фурункулеза от нерки ежегодно изолировали подвижные аэромонады: *A. hydrophila* и *A. caviae* (в разные годы от 3,3 до 43,9%). В 25-100% случаев их выделяли в ассоциации с *A. salmonicida*. За период исследования от 10 до 30% рыб были носителями псевдомонад *Pseudomonas fluorescens* (рис. 3), но их ни разу не изолировали одновременно с *A. salmonicida* от одной и той же особи. Процентное соотношение подвижных, неподвижных аэромонад и псевдомонад, изолированных от рыб в разные годы исследований, было неодинаковым. В 2004-2006 гг. нерку загрязняли преимущественно аэромонады, при относительно

невысокой доле псевдомонад. С 2007 г. роль последних в бактериоценозах рыб увеличивалась при стабильно высоком уровне подвижных аэромонад и снижении встречаемости *A. salmonicida*.

При проверке ДНК-азной активности подвижных аэромонад зона деполимеризации составила 3-10 мм, что соответствует средней и высокой степени вирулентности, а неподвижные аэромонады были вирулентные и слабовирулентные (зона деполимеризации 1-4 мм). Кроме этого, рост бактерий *A. salmonicida* на СВВ в виде темно-синих колоний указывает на наличие у них А-слоя и, соответственно, вирулентности (Cipriano, Bertolini, 1988).

Таблица 1. Доля (%) штаммов *A. salmonicida* с положительной реакцией в идентификационных тестах в разные годы.

Table 1. Percentage (%) of strains *A. salmonicida* with a positive reaction in identification tests in different years.

Тест	2004	2005	2006	2008	2009	Типичная <i>A. salmonicida</i> (Holt et al., 1994)
Подвижность	0	0	0	0	0	0
Ферментация сахарозы	100	100	100	100	100	0
Восстановление нитратов	100	100	100	100	100	100
индола	50	0	100	100	50	0
Дегидролизация аргинина	0	0	0	0	0	36
Уреаза	0	0	0	0	0	0
Гидролиз: эскулина	100	100	100	100	100	100
желатина	100	100	100	100	100	99
β-галактозидаза	50	100	100	100	50	18
Ассимиляция: глюкозы	100	0	100	100	100	84
арабинозы	0	0	0	0	0	1
маннозы	0	0	0	0	0	0
маннитола	100	100	100	100	100	96
N-ацетил-глюкозамина	0	100	0	50	100	84
мальтозы	100	100	100	100	100	99
глюконата	100	100	100	100	100	99
капрата	0	0	0	0	0	0
адипата	0	0	0	0	0	1
малата	100	100	100	100	100	99
цитрата	0	0	0	0	0	1
Образование пигмента	62,5	80	0	20	100	100
Рост при 37 °С	0	0	0	0	0	0



Рис. 2. Коричневый пигмент вокруг колоний *A. salmonicida* на агаре с добавлением бриллиантового синего (СВВ).

Fig. 2. Brown pigment around colonies *A. salmonicida* in Coomassie Brilliant Blue (CBB) agar.

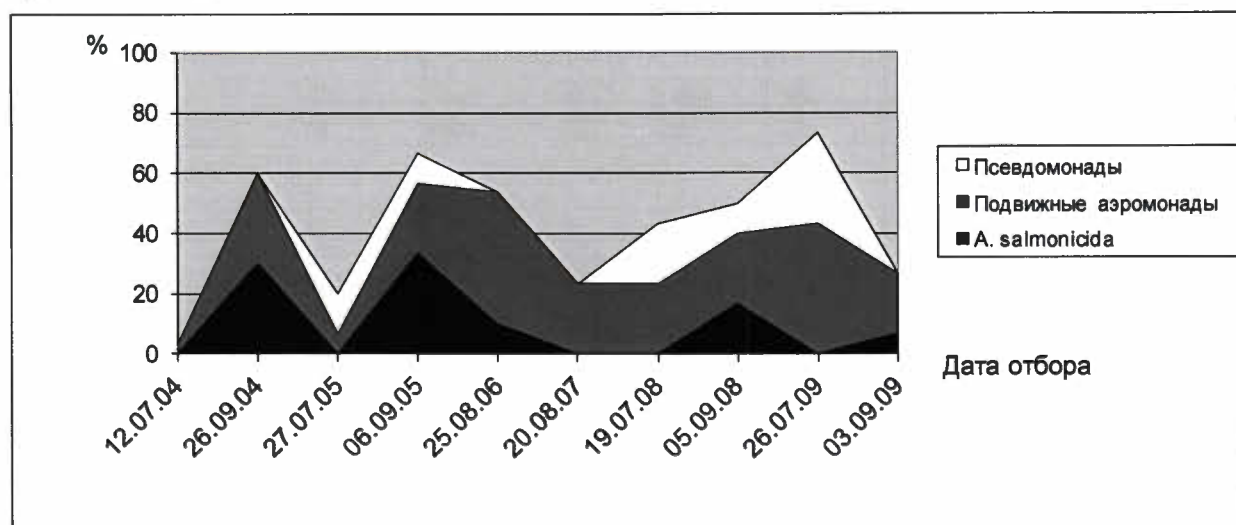


Рис. 3. Встречаемость (%) бактериальных патогенов у половозрелой нерки из оз. Азабачье в 2004-2009 гг.

Fig. 3. Prevalence (%) of the bacterial pathogens in spawning sockeye salmon in Azabachye lake in 2004-2009.

ОБСУЖДЕНИЕ

В период исследований 2004-2009 гг. у нерки из оз. Азабачье ежегодно (за исключением 2007 г.) регистрировали патоген *A. salmonicida*. На Камчатке бактерии этого вида впервые изолировали от половозрелой кеты с язвенными поражениями кожи из Берингова моря в 1989 г., и позже, в 1990 г. у кижуча из р. Быстрая (западное побережье Камчатки) (Wiklund et al., 1992). Также в незначительном количестве *A. salmonicida* выделяли от лососей, используемых в качестве производителей на лососевых рыболовных заводах Камчатки (Sergeenko, Ustimenko, 2003).

Морфологические особенности оз. Азабачье – большая площадь (62 км²) при относительно небольшой, по сравнению с другими озерами Камчатки, глубине (до

33 м) способствуют быстрому теплообмену (Крохин, 1972), поэтому в августе-сентябре здесь отмечают максимальные значения температуры воды (Базаркина, 2007) – на литорали до 20 °С. Вероятно, повышение температуры к августу и прогрев воды озера в течение двух летних месяцев ведет к быстрому накоплению органических веществ и интенсивному развитию микрофлоры, в частности аэромонад. Как известно, богатая питательными веществами эвтрофическая окружающая среда способствует выживанию бактерий в природе, и, следовательно, их распространению (Wiklund, 1995).

Бактерии *A. salmonicida* изолировали у рыб только при повторных отборах, то есть у поздней расы нерки (в конце августа-сентябре) (рис. 3). Причину этой закономерности мы пока не установили. Необходимы мониторинговые микробиологические исследования воды и рыб в разные периоды нереста.

Доля возбудителя фурункулеза, в сравнении с аэромонадами и псевдомонадами, была невысока, что, вероятно, объясняется подавляющим действием подвижных бактерий на размножение неподвижных *A. salmonicida*. Кроме этого, существуют данные об ингибировании роста последних на агаровой поверхности и в жидкой среде в присутствии *P. fluorescens* (Smith, Davey, 1993). Это может снижать вероятность изоляции *A. salmonicida* от рыб.

Известно, что патоген способен выживать до нескольких недель вне организма хозяина в зависимости от солености, pH, температуры и уровня загрязнения воды органическими веществами (McCarthy, Roberts, 1980). Пути передачи инфекции окончательно не определены. Установлено, что заболевание распространяется горизонтально через контаминированную бактериями воду, при контакте инфицированных рыб между собой и через желудочно-кишечный тракт при поедании зараженных гидробионтов (Allen, 1982). Так, живые, размножающиеся клетки *A. salmonicida* изолировали из пищеварительной системы ресничных инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (King, Shotts, 1988). Результаты экспериментов с вертикальной передачей фурункулеза противоречивы. По мнению Мак Карти (McCarthy, 1980), этот путь не имеет большого значения в распространении заболевания.

Возбудитель фурункулеза можно выделить как от больных, так и от визуально здоровых рыб. При внешнем осмотре у нерки характерных признаков заболевания не наблюдали. У преднерестовых рыб часто встречается подострая или хроническая форма фурункулеза (McCarthy, 1980), которая характеризуется низким уровнем смертности и часто не сопровождается развитием клинических признаков. Такие рыбы становятся источником инфекции, поэтому асимптоматическое носительство *A. salmonicida* имеет большое значение в эпидемиологии фурункулеза (Austin, Austin, 1993). Если заболевание протекает с развитием внешней симптоматики (язвы, фурункулы), то у выживших рыб на теле остаются шрамы (McCarthy, 1975). Зарубцевавшиеся поражения кожи у некоторых обследованных особей нерки из оз. Азабачье могут указывать на перенесенное заболевание (рис. 1).

В природных популяциях лососей установить асимптоматическое носительство патогена крайне сложно. Добавление к питательной среде Coomassie Brilliant Blue (СВВ) позволяет достаточно эффективно идентифицировать *A. salmonicida* в смешанных бактериальных культурах, выделенных при исследовании внешне здоровых рыб (Udey, 1982). Кроме этого, существует очень

чувствительный и точный, но дорогостоящий метод выявления патогена с использованием полимеразо-цепной реакции (ПЦР) и выявление фрагментов ДНК, специфичных для *A. salmonicida*. Известны факты, когда жизнеспособная, типичная *A. salmonicida* переходит в некультивируемое или покоящееся состояние, при этом живые клетки присутствуют в пробах, но не растут на бактериологических средах (Morgan et al., 1991; Austin, Austin, 1993; Mooney et al., 1995). В таких случаях без высокочувствительных методов исследований обойтись сложно. В то же время, обнаружение методом ПЦР генетического материала патогена при невозможности его изоляции на питательной среде, вероятно, свидетельствует о незначительном количестве бактерий, что может не представлять особой опасности для гидробионтов.

Несмотря на то, что все изоляты *A. salmonicida* были выделены нами от нерки без клинических признаков заболевания, они обладали потенциальной патогенностью, т.к. у них установили наличие ДНКазы и присутствие А-слоя, характерного для вирулентных штаммов (Wilson, Horne, 1986). Этот слой обеспечивает защиту бактериальной клетки от фагоцитоза и разрушения ее макрофагами. Такие штаммы более устойчивы к действию защитных сил организма хозяина (Austin, Austin, 1993). Американские исследователи установили, что авирулентные изоляты не имеют А-слоя (Udey, Fryer, 1978).

В настоящее время известно четыре подвида *A. salmonicida*: *A. s. salmonicida*, *A. s. achromogenes*, *A. s. masoucida* и *A. s. smithia* (Popoff, 1984; Holt et al., 1994). Подвид *A. salmonicida salmonicida* вызывает фурункулез у лососевых рыб и его считают типичным, а подвиды *A. s. achromogenes* и *A. s. masoucida* — нетипичными, вызывающими атипичный фурункулез или язвенное воспаление кожи и мускулатуры (Gudmundsdottir et al., 1990; Austin, Austin, 1993). Для внутривидовой дифференциации *A. salmonicida* учитывают следующие биохимические показатели: образование индола и ацетона, гидролиз эскулина и ферментацию маннитола (Hirvela-Koski et al., 1994), однако до настоящего времени единых критериев для подвидов не существует.

Типичные изоляты *A. salmonicida*, в большинстве своем, образуют коричневый, водорастворимый пигмент, хотя в некоторых случаях он может не проявляться до 10 дней. Нетипичные штаммы чаще беспигментные. Установлено, что *A. salmonicida* теряет способность к образованию пигмента при длительном хранении на агаровой среде, а также при неблагоприятных условиях инкубации (Post, 1987). Ранее полагали, что основными критериями при определении типичных штаммов *A. salmonicida* являются: отсутствие сахарозолитических свойств и образование газа при ассимиляции глюкозы и мальтозы. Однако некоторые исследователи относили сахарозоположительные штаммы *A. salmonicida* к типичным (Toranzo et al., 1991). Такой особенностью обладали изоляты, выделенные от лососей из водоемов азиатского побережья Тихого океана: Японии (Nomura et al., 1991), Кореи (Fryer et al., 1988), Сахалина (Вялова, Шкурина, 2005) и Камчатки (Wiklund et al., 1992; Sergeenko, Ustimenko, 2003).

Выявленные различия наших изолятов с типичной *A. salmonicida* (табл. 1) по способности образовывать индол, β -галактозидазу, ассимилировать сахарозу, глюкозу, аргинин и N-ацетил-глюкозамин, возможно, являются их внутривидовой особенностью. В то же время, гидролиз эскулина, ассимиляция глюконата и

Nomura T., Yoshimizu M., Kimura T. Prevalence of *Aeromonas salmonicida* in the chum salmon (*Oncorhynchus keta*), pink salmon (*O. gorbuscha*), and masu salmon (*O. masou*) returning to rivers in Hokkaido // Gyoby Kenkyu. 1991. V. 26. №3. Pp. 139-147.

Popoff M. Genus III. *Aeromonas* Kluver and van Niel 1936. 398 p. In: Krieg N.R., Holt J.G. (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, V. 1. Baltimore, Williams and Wilkins. 1984. Pp. 545-548.

Post G. Textbook of fish health // USA T.F.H. Publ., 1987. 287 p.

Sergeenko N.V., Ustimenko E.A. Characterization of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* isolated from salmon spawned in hatcheries on Kamchatka // II Bilateral conference «Aquatic and marine animal health». Shepherdstown. West Virginia. USA. 2003. P. 49.

Smith P., Davey S. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad // J. Fish Diseases. 1993. №16. Pp. 521-524.

Toranzo A.E., Santos Y., Nunez S., Barja J.L. Biochemical and serological characteristics, drug resistance and plasmid profiles of Spanish isolates of *Aeromonas salmonicida* // Gyoby Kenkyu. 1991. V. 26. №2. Pp. 55-60.

Udey L.R. A differential medium for distinguishing A/r⁺ from A/r⁻ phenotypes in *Aeromonas salmonicida* // Proceedings of the 13th Annual Conference and Workshop and 7th Eastern Fish Health Workshop. Baltimore. Inter. Assoc. Aquatic Animal Medicine. 1982. P. 41.

Udey L.R., Fryer J.L. Immunization of fish with bacterins of *Aeromonas salmonicida* // Marine Fisheries Review. 1978. V. 40. Pp. 12-17.

Wiklund T., Sazonov A.A., Liniova G.P., Pugaewa V.P., Zoobaha S.V., Bylund G. Characteristics of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* isolated from wild pacific salmonids in Kamchatka, Russia // Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 1992. V. 12. №3. Pp. 76-80.

Wiklund T. Survival of «atypical» *Aeromonas salmonicida* in water and sediment microcosms of different salinities and temperatures // J. Diseases of Aquatic Organisms. 1995. V. 21. Pp. 137-143.

Wilson A., Horne M.T. Detection of A-protein in *Aeromonas salmonicida* and some effects of temperature on A-layer assembly // Aquaculture. 1986. V. 56. Pp. 23-27.

CAUSE OF FURUNCULOSIS *AEROMONAS SALMONICIDA* IN SPAWNING SOCKEYE SALMON *ONCORHYNCHUS NERKA* IN AZABACHYE LAKE

© 2011 y. E.A. Ustimenko, N.V. Sergeenko

FGUP «Kamchatka Research Institute of Fisheries and Oceanography»,

Petropavlovsk-Kamchatsky

The following are the results of a bacteriological investigation of spawning sockeye salmon from Azabachye lake in 2004-2009. Every year, except 2007, we isolated the causative agent of furunculosis – *Aeromonas salmonicida* in 6,7% to 33,3% of late-spawning fish only. During the testing of bacteria we exposed some differences between our isolates and the typical *A. salmonicida*. The *A. salmonicida* that we isolated in Azabachye lake shared some of the peculiarities inherent to the bacteria of this species isolated from fish in reservoirs of the Asian coast of the Pacific Ocean before. However, some of the characteristics of the bacteria we isolated from fish in Azabachye lake are

unique to this lake. Pathogenesity of the isolated bacteria *A. salmonicida* shows their potential danger for salmon populations.

Key words: sockeye salmon, *Aeromonas salmonicida*, biochemical properties, pathogenicity, disease.