

БИОЛОГИЯ

МРНТИ 34.27.51; 69.09.41

Г.Ж. Абишева¹, Ж.Б. Текебаева¹, Г.Н. Бисенова¹, М.С. Уразова¹,
А.С. Абилхадиров¹, Г.К. Абитаева¹, З.С. Сармурзина¹

¹Республиканская коллекция микроорганизмов,
г. Нур-Султан, Казахстан

ОЦЕНКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БИОПРЕПАРАТА ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЯ АЭРОМОНОЗА РЫБ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

Аннотация. В статье представлены результаты исследований по использованию биопрепарата молочнокислых бактерий против возбудителя аэромоноза у рыб. Цель работы – провести терапевтическую оценку влияния биопрепарата против возбудителя аэромоноза рыб в лабораторных условиях. Для определения антибиотических свойств разработанного биопрепарата на основе молочнокислых бактерий (*Lactobacillus fermentum* 24с, *Pediococcus pentosaceus* 10/9к, *Lactobacillus paracasei* 9с) была создана лабораторная модель, где в качестве инфекционного агента был взят штамм *Aeromonas punctata*, известный как возбудитель аэромоноза рыб. В качестве основного объекта экспериментов по изучению антимикробной эффективности биопрепарата выступили годовики карпов и сазанов. В результате влияния биопрепарата против возбудителя аэромоноза рыб было выявлено снижение смертности рыб на 40% по сравнению с группой, где не вводился биопрепарат.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, аэромоноз рыб, аквакультура, биопрепарат, антибиотик

•••

Түйіндеме. Мақалада сүтқышқылды бактериялардың консорциумынан құралған балықтарда кездесетін аэромоноз қоздырғыштарына қарсы зерттеу жұмыстарының нәтижелері көрсетілген. Жұмыстың мақсаты – аэромоноз қоздырғыштарына қарсы биопрепараттың әсерін лабораториялық жағдайда бағалау. Сүтқышқылды бактериялар (*Lactobacillus fermentum* 24с, *Pediococcus pentosaceus* 10/9к, *Lactobacillus paracasei* 9с) негізінде жасалынған биопрепараттың антибиотикалық құрамын анықтау барысында лабораториялық үлгісі жасалынды. Тәжірибиелік жұмыста биопрепараттың әсерін зерттеу кезінде карп және сазан балықтары алынды. Нәтижесінде аэромоноз қоздырғышына қарсы биопрепараттың әсерінен балықтар өлімі биопрепарат қолданылмаған топтағы балықтарға қарағанда 40 пайызға дейін азайды.

Түйінді сөздер: сүтқышқылды бактериялар, балықтардың аэромонозы, аквамәдениет, биопрепарат, антибиотик.

• • •

Abstract. The article presents the results of research on the use of a biological product of lactic acid bacteria against the aeromonas pathogen in fish. The purpose of the work is to conduct a therapeutic assessment of the effect of a biological product against the pathogen of fish aeromonosis in laboratory conditions. To determine the antibiotic properties of the developed biological product based on lactic acid bacteria (*Lactobacillus fermentum* 24c, *Pediococcus pentosaceus* 10/9k, *Lactobacillus paracasei* 9c), a laboratory model was created, where the *Aeromonas punctata* strain known as the causative agent of aeromonosis was taken as an infectious agent. The main object of experiments on the study of the antimicrobial effectiveness of a biological product were carp and carp yearlings. As a result of the influence of a biological preparation against the pathogen of fish aeromonosis, fish mortality was reduced by 40% compared with the group where no biological preparation was administered.

Keywords: lactic acid bacteria, aeromonosis, aquaculture, biological product, antibiotic.

Введение. Инфекционные заболевания относятся к наиболее опасным болезням рыб и сопровождаются большими потерями рыбопродукции. Данная проблема актуальна во многих странах, занимающихся аквакультурой, поэтому защита рыб от бактериальных заболеваний является важным вопросом ихтиопатологической науки [1,3,8,9]. Рыбное хозяйство одно из тех отраслей экономики страны, которое находится в постоянном контакте с мировым рынком и различными международными организациями. Продукция, вырабатываемая из рыбы и морских животных, является источником ценных белков, жиров, макро- и микроэлементов, водо- и жирорастворимых витаминов, потребление которых необходимо для нормального развития и функционирования организма человека, укрепления его здоровья, повышения работоспособности, профилактики старения и серьезных заболеваний.

Важный вклад рыбное хозяйство вносит в обеспечение национальной продовольственной безопасности. Масса среднестатистического потребления рыбных продуктов значительна: в общем балансе потребления животных белков, включая мясные, молочные продукты и яйца, рыбные белки сегодня составляют около 10%, а в мясном балансе - не менее 25%. Однако интенсификация рыбоводства и продолжающийся в настоящее время рост уровня загрязнения окружающей среды способствуют резкому увеличению числа бактериальных болезней прудовых рыб - объектов аквакультуры. Если не так давно ихтиопатологи сталкивались с тремя-четырьмя бактери-

альными болезнями, то теперь их количество увеличилось, и список этот далеко не окончательный. Сейчас актуальной на современном этапе интенсивного рыбоводства является профилактика заболеваний, вызываемых граммотрицательными и другими микроорганизмами и аэромонадами. Нередко пораженная рыба является источником серьезных заболеваний человека и животных. У пораженной рыбы резко снижаются вкусовые качества, товарный вид, питательная ценность, что приводит к ее порче, и тем самым наносится большой экономический ущерб. Аэромоноз является частью общемировой экологической проблемы, опосредованно связанной с деятельностью человека, всевозрастающим использованием в пище пресноводных рыб и других гидробионтов, контаминированных этим возбудителем. Рыба и рыбопродукты, содержащие возбудитель аэромоноза, представляют серьезную опасность для человека и животных .

Факторами, сдерживающими успешное развитие пресноводного рыбоводства, являются заболевания различной этиологии, наносящие существенный ущерб отрасли. Наибольшую опасность, бесспорно, представляют инфекционные заболевания, в число которых входит аэромоноз. В связи со сложившейся в стране ситуацией, уровень ихтиопатологических исследований оказался недостаточно высоким, что обусловлено сокращением численности ветврачей-ихтиопатологов, отсутствием диагностической техники на местах. Ошибки в постановке диагноза нередко приводят к неправильному выбору лекарственных средств и как следствие - ухудшению эпизоотической ситуации. Касаясь непосредственно бактериальных болезней рыб, данные исследования были направлены на совершенствование лечения и профилактики самого распространенного заболевания, которым является аэромоноз . Основным возбудителем при данной болезни признан микроорганизм *Aeromonas hydrophila*. Эту бактерию в различные годы обозначали: *Bast. cyprinidae*, *Achromobacter punctatum*, *Aerom.punctat* .

Аэромоноз – болезнь, вызываемая вирулентными микроорганизмами рода *Aeromonas*: *A.hydrophila*, *A.caviae*, *A.sobria* в сочетании с неблагоприятными условиями окружающей среды и нарушениями зооигиенических норм содержания и кормления рыб. Данное заболевание встречается повсеместно, нанося рыбоводческим хозяйствам значительный экономический ущерб. При возникновении указанного

заболевания карпов, на неблагополучное рыбоводческое хозяйство и естественные рыбохозяйственные водоемы накладывают карантин; проводят мероприятия направленные на ликвидацию болезни. Чаще всего применяется комплексный метод: проводят летование прудов и одновременно выполняют ветеринарно-санитарные и рыбоводно-мелиоративные мероприятия согласно действующей инструкции [5-7, 10]. При этом проводят мероприятия по выявлению и уничтожению источника инфицирования, разрыву цепи передачи возбудителя, повышению устойчивости рыб к заболеванию и созданию условий, препятствующих возникновению и развитию заболевания, применяют лечебно-профилактические средства [11-13]. Для лечения и профилактики аэромоноза карпов в рыбоводческих хозяйствах применяют антибиотики широкого спектра действия и другие антисептические средства: левомицетин, хлортетрациклин, тетрациклин, фуразолидон которые проявляют антимикробное действие на *A. hydrophila*. Далее в порядке убывающей активности следуют фурациллин, стрептомицин, метиленовый синий [18-21]. В настоящее время неуклонное развитие аквакультуры обеспечивается внедрением высокоинтенсивных методов выращивания рыб. При этом они обуславливают резкий рост эпизоотической значимости условно-патогенных возбудителей, появление ранее неописанных инфекционных и инвазионных агентов. Кроме того, в последние годы возникли проблемы, связанные с интенсивным трансграничным обменом гидробионтами. Он приводит к контакту паразитов с ранее несвойственными им хозяевами и формированию паразитарных систем, нехарактерных для данного региона и конкретного рыбоводного предприятия. Поэтому закономерно повышение требований к пониманию механизмов возникновения и развития заболеваний культивируемых гидробионтов и обеспечению их контроля [14-17].

С этой точки зрения ассоциативные заболевания относятся к актуальным, но малоизученным аспектам охраны здоровья рыб. Контроль этих опасных патологий связан с рядом принципиальных трудностей. Слабо изучены механизмы формирования и развития ассоциативных инвазий и инфекций. Имеются сложности в диагностике этих заболеваний. Они объясняются необходимостью комплексного использования паразитологических и микробиологических методов исследований. Терапия ассоциативных заболеваний затруднена раз-

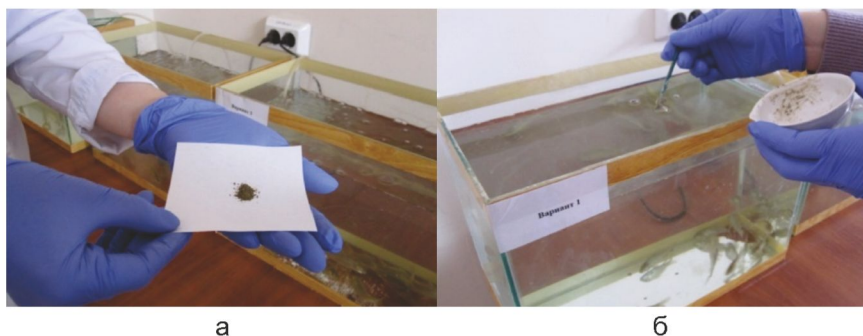
личным уровнем чувствительности к лекарственным препаратам филогенетически удаленных друг от друга групп паразитов.

Основой рыбного промысла пресных водоемов Казахстана являются различные карповые виды. Лишь в Каспийском море на западе Казахстана карп по значимости уступает место ценным осетровым видам рыб. Большинство водоемов Северного Казахстана замкнутые и мелкие, в зимнее время в них нередки заморные явления. С целью поддержания рыбного промысла данные водоемы нуждаются в ежегодном зарыблении. И здесь предпочтительным видом в силу непривередливости и большой скорости роста является сазан. В регионе действуют несколько прудовых хозяйств, ориентированных на выращивание и поддержание маточного поголовья сазана. Одним из таких хозяйств является Майбалыкский рыбапитомник, предоставляющий безвозмездно в рамках Меморандума на протяжении уже двух лет для исследований карпов и сазанов различных возрастных групп. В этом году в начале марта были вывезены из прудхоза годовики сазана и карпа, которые относятся к одному виду *Cyprinus carpio*.

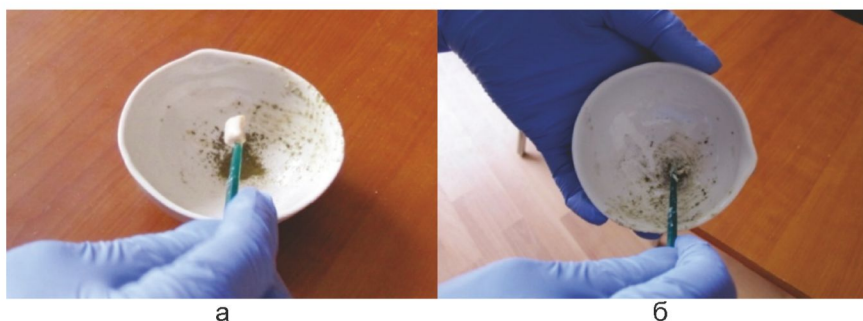
Цель работы – провести оценку влияния биопрепарата против возбудителя аэромоноза рыб в лабораторных условиях.

Методы исследований. Для определения антибиотических свойств разработанного биопрепарата на основе молочнокислых бактерий (*Lactobacillus fermentum* 24с, *Pediococcus pentosaceus* 10/9к, *Lactobacillus paracasei* 9с) была создана лабораторная модель, где в качестве инфекционного агента был взят штамм *Aeromonas punctata*, находящийся на хранении в музее Республиканской коллекции микроорганизмов и известный как возбудитель аэромоноза рыб. В качестве основного объекта экспериментов по получению модели заболевания и изучению антимикробной эффективности биопрепарата выступили годовики карпов и сазанов (один вид *Cyprinus carpio*), безвозмездно предоставленные специально для исследований Майбалыкским рыбапитомником. Общая продолжительность эксперимента составила 34 дн.

В эксперименте были задействованы три опытные и одна контрольная группа. Здоровые годовики сазанов и карпов были размещены в аквариумах, оснащенных системами фильтрации и аэрации, объемом 20 л, по 10 экз. в каждом. В начале эксперимента производили замер основных параметров рыбы (размер, вес) с вычислением средних значений [1,2] (рисунок 1,2).



а – суточная доза корма на один аквариум, б – внесение биопрепарата
Рисунок 1 – Аквариумы с годовиками *Cyprinus carpio*



а – подготовка биопрепарата перед введением в аквариум.
б

Описание групп:

1. Опытная группа (1-й аквариум) – биопрепарат в виде кормовой добавки, в концентрации $1,0 \times 10^7$ КОЕ/мл, доставлялся рыбам в течение 10 дн. до заражения, а также после заражения бактериальным агентом на протяжении всего срока эксперимента;

2. Опытная группа (2-й аквариум) – пробиотик не вводился рыбам, ни до, ни после заражения болезнетворным агентом. На 3-й день после заражения разово ввели антибиотик на основе амоксициллина в концентрации 125 мкг;

3. Опытная группа (3-й аквариум) – в данной группе не производили введение ни пробиотика, ни антибиотика, ни до, ни после заражения болезнетворным агентом, в целях получения сравнительных данных по терапевтическому эффекту и общей гибели рыб при аэромонозе в лабораторных условиях;

4. Контрольная группа (4-й аквариум) – эта группа была взята для получения сравнительных данных по набору веса и размеров рыбы. В данной группе на протяжении всего эксперимента проводили кормление коммерческим кормом Color Scale (Китай), заражение не производилось [3,4].

В течение всего срока проведения эксперимента велось наблюдение за сеголетками карпа, регистрировали отклонения в поведении, появление клинических признаков заболеваний, а также производился учет гибели рыб. После заражения ежедневно производился осмотр кожных покровов, глазных яблок и жабр.

Результаты и обсуждение исследований. Результаты крупномасштабных исследований по микробиому различных представителей ихтиофауны в последнее десятилетие доказали, что лактобактерии являются представителями нормальной микрофлоры кишечника рыб. Более ранние исследования, основанные на простом выделении лактобактерий из кишечника рыб, не давали полного представления об их месте и роли в кишечном микробиоценозе рыб. Использование лактобактерий в производстве пробиотических биопрепаратов всегда предпочтительней вследствие их биобезопасности как для животного организма так и для окружающей среды. Биопрепараты на основе антагонистически активных лактобактерий способны существенно снизить применение химических веществ, используемых для охраны здоровья и увеличения поголовья рыбы в рыбных хозяйствах.

Сеголетки карпа помещали в заранее подготовленные аквариумы, по 10 особей в каждом, при этом был произведен замер их основных биометрических показателей. В течение суток в целях акклиматизации корм рыбам не давали, на вторые сутки была осуществлена первая подкормка, при этом в первый аквариум вводили разработанный биопрепарат в виде кормовой добавки.

Заражение *Aeromonas punctata* осуществлялось на 11 день эксперимента методом *per os*, суточной культурой патогена в концентрации $1,0 \times 10^5$ КОЕ/мл, по 200 мкл на 1 особь. После заражения рыбы возвращались в соответствующий аквариум для дальнейшего наблюдения.



Рисунок 3 – Заражение рыбы возбудителем аэромоназа *Aeromonas punctata*.

Первые случаи гибели годовиков сазана наблюдались уже на 3-й день после заражения во всех трех опытных группах. Кроме того, в поведении большинства рыб были замечены отклонения, которые выражались в малой подвижности рыб. Наблюдалась дезориентация некоторых рыб, которые не сопротивлялись движению воды в аквариуме, заданному фильтром, порой поток воды проносил их по периметру всего аквариума. В основном такие отклонения наблюдались во 2-й и 3-й опытных группах. Погибшие рыбы удалялись из аквариумов сразу после засвидетельствования гибели.

На 3-й день после заражения во второй аквариум в качестве терапевтического средства был введен антибиотик Амоксицилин. И если до его введения смертность рыбы составляла 20% (2 рыбки), то уже после введения антибиотика гибель рыб в данном аквариуме прекратилась. Общая смертность в первом аквариуме, куда вводился разработанный биопрепарат в качестве кормовой добавки, составила 30% к последнему дню эксперимента. Видимых нарушений у рыб в поведении, а также в физиологии к концу эксперимента в данной группе не было выявлено.

В третьем опытном аквариуме, где не проводились внесение терапевтических средств, гибель к концу эксперимента составила 70% рыб. При этом у всех выживших годовичков сазана были видимые отклонения от нормы: выпучивание глаз, разбухание брюшка, деформация позвоночника по типу скручивания. Все эти признаки свидетельствовали о развитии аэромоназа рыб (рисунок 4).



Рисунок 4 – Деформация позвоночника у рыб из 3-й группы, зараженных *Aeromonas punctata*

В контрольном аквариуме не были засвидетельствованы случаи гибели рыбы, а также какие-либо отклонения от нормы в поведении и физиологии.

Ниже приводится сравнительная таблица по биометрическим показателям рыб.

Таблица 1 - Сравнение исходных и конечных значений биометрических показателей годовиков карпа в опытных и контрольной группах

№ группы	Исходные биометрические показатели			Конечные биометрические показатели		
	Вес, г (сред.)	Длина тела, см (сред.)	Ширина груди, см (сред.)	Вес, г (сред)	Длина тела, см (сред)	Ширина груди, см (сред)
1	5,8±0,38	7,6±0,15	2,0±0,05	5,9±0,33	7,7±0,14	2,1±0,09
2	5,8±0,42	7,7±0,21	2,0±0,05	5,8±0,56	7,7±0,32	2,0±0,13
3	5,9±0,37	7,7±0,15	2,1±0,05	5,5±0,60	7,6±0,38	2,0±0,09
4	6,3±0,33	7,8±0,10	2,3±0,04	6,4±0,79	7,9±0,48	2,4±0,14

По исследованиям выявлена небольшая положительная динамика роста массы и размеров рыб в 1, 2 и 4 аквариумах. Явно это прослеживается в 1-й группе, где в качестве кормовой добавки рыбам вводился биопрепарат, рост показателей в среднем равен 0,1 г по массе и 1 мм по размерам, также подобную картину мы видим и в 4-й группе. Во второй группе, где проведена лекарственная терапия антибиотиком, положительную динамику можно наблюдать только в росте показателей стандартного отклонения, также в среднем примерно на 0,1. Отрицательная динамика роста биометрических показателей наблюдается лишь в третьей группе, где показатель смертности составил – 70%.

Выводы. Полученные данные по эксперименту на лабораторной модели аэромоназа годовиков сазана и карпа, свидетельствуют о терапевтическом действии разработанного биопрепарата на основе молочнокислых бактерий, которое выражалось в снижении смертности рыб от заболевания, наряду с действием антибиотика Амоксициллина, на 40% по сравнению с группой, где терапия не проводилась. Кроме того, при внесении биопрепарата не были выявлены патологии у рыб от перенесенного заболевания и прослеживалась положительная динамика роста основных биометрических показателей, что говорит об его профилактическом действии.

Список литературы

1 *Афанасьев В.И.* Источники и факторы, способствующие заболеванию карпа аэромоназом // Тезисы докладов VII Всесоюзн. совещ. по параз. и болезням рыб. - Л.: Зоол. ин-т, Ихтиол. комис., 1979. - С. 4-5.

2 *Гаврилин К.В.* Опыт использования препаратов «Антибак» в борьбе с бактериозами // Рыбоводство. - 2006. - № 3. - С. 50-51.

3 *Скачков Д. П., Борисова М.Н.* Современные методы терапии некоторых гельминтозов карпа // Тезисы докладов международной конференции «Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре». - М., 2000. - С. 117-118.

4 *Скурат Э.К., Сиволицкая В.А., Дегтярик С.М.* Пробиотик - препарат для профилактики бактериальных заболеваний рыб // Тезисы докладов международной конференции «Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре». - М., 2000. - С. 114- 115.

5 *Давыдов О.Н.* Биологические препараты и химические вещества в аквакультуре / О.Н. Давыдов, А.В. Абрамов, Л.Я. Куровская. - К.: Логос, 2009. - 307 с.

6 *Tejpal Dahiya,*, S.K. Gahlawat, Sihag R.C.* Elimination of Pathogenic Bacterium (*Micrococcus* sp.) by the Use of Probiotics // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 12 (2012). - P. 185-187.

7 *Tatsuro HAGI & Takayuki HOSHINO* Screening and Characterization of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria from Cultured Common Carp Intestine // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 73 (7). - 2009. - P.1479-1483.

8 *Давыдов О. Н., Абрамов А. В., Куровская Л.Я.* Биологические препараты и химические вещества в аквакультуре. - К: Логос, 2009. - 307 с.

9 *Панин А.Н., Серых Н.И., Гараев И.М., Малик Е.В.* Формирование кишечного биоценоза у подсосных поросят путем примене-

ния жидкого пробиотического препарата Лактицид //Тез.докл. 2-ой междунар.н.-п.конферен., М., 1997.- С.67-68.

10 Мохнач В.О., Литвинов М.А., Борисов Л.Б., Матыко Н.А., Смирнова-Иконникова М.И. Антибактериальные свойства йодистого крахмала и его компонентов. Микробиология, 1960. - № 29, С.451.

11 Бауер О.Н. Лечение краснухи карпов антибиотиками. Науч.-техн.бюл. ВНИОРХ, 1997, 5, С.68-69.

12 Брагин Н.И. Краснуха карпов и пути ее ликвидации в прудовых хозяйствах Краснодарского края. Науч.труды Краснодар. науч.-иссл.вет.станции, 1971, 4, С.382-385.

13 Бричук П.Ф. Опыт борьбы с краснухой карпов. Тез.докл. на науч. методич. произв.совещ. по болезням рыб, М., 1967.-С.25-27.

14 Сергеев Е.П., Можяев Е.А. Санитарная охрана водоемов. М., Медицина, 1979. Канаев А.И. Ветеринарная санитария в рыбоводстве. М., Колос, 1973.-С.31- 59.

15 Бермант М.В., Подзорова А.А. К вопросу чувствительности *Aeromonas hydrophila*, выделенных от карпов, к некоторым антибактериальным препаратам. V Всесоюзный симпозиум по инфекц. болезням рыб. Тез.докладов, Москва, 1986.-С.12.

16 Мохнач В.О., Литвинов М.А., Борисов Л.Б., Матыко Н.А., Смирнова-Иконникова М.И. Антибактериальные свойства йодистого крахмала и его компонентов. Микробиология, 1960.-№ 29.- С.451.

17 Кирпичников В.С., Факторович К.А., Бабушкин Ю.П., Нонбург Е.А. Селекция карпа на устойчивость к краснухе. Изв. Гос.НИ-ОРХ, 1971.- С.140-153.

18 Сергеев Е.П., Можяев Е.А. Санитарная охрана водоемов. М., Медицина, 1979.

19 Осетров В.С. Аэромоназ карпов. Справочник по болезням рыб, М., Колос, 1989.- С.88-90.

20 Радбиль О.С. Фармакотерапия в гастроэнтерологии. Медицина, М., 1991.С.398- 402.

21 Скурат Э.К., Куликова А.Н., Сиволицкая В.А., Папкиаури А.А., Ремко Л.Н. Комбинированные лечебные препараты рыбоводству. V Всесоюз.симпоз. по инф.бол.рыб.; Тез.докл. М., 1986.-С.93-94.

Абишев Г.Ж. - магистр технологических наук, e-mail: g.galiya@list.ru

Текебаева Ж.Б. - магистр технических наук, e-mail: j.tekebaeva@mail.ru

Бисенова Г.Н. - кандидат сельскохозяйственных наук,
e-mail: bisenovova84@mail.ru

Уразова М.С. - кандидат биологических наук, e-mail: maira_01@mail.ru

Абилхадиров А.С. - магистр ветеринарных наук, e-mail: Good_alien@mail.ru

Абитаева Г.К. - PhD по биологии, e-mail: j.tekebaeva@mail.ru

Сармурзина З.С. - кандидат биологических наук, e-mail: sarmurzina@list.ru