

М. В. ЛЕБЕДОВСКАЯ, Н. А. АНДРЕЕВА

**МИКРОФЛОРА ТИХООКЕАНСКОЙ УСТРИЦЫ (*CRASSOSTREA GIGAS*),
КУЛЬТИВИРУЕМОЙ В БУХТЕ КАЗАЧЬЯ В ЧЁРНОМ МОРЕ
(предварительные данные)**

Представлены результаты предварительного исследования микрофлоры тихоокеанской устрицы из марихозияства, расположенного в бухте Казачья (Севастополь, Чёрное море). Показана неоднородность обсеменённости внутренних органов и мантийной жидкости устриц.

Широкое распространение марикультуры и связанный с этим опыт по предотвращению вспышек инфекционных заболеваний показывают необходимость изучения болезней культивируемых гидробионтов с целью разработки методов диагностики, лечения и профилактики. Моллюски-фильтраторы способны поглощать из окружающей среды и накапливать в организме различную, в том числе и патогенную, микрофлору. Так, микробиологические исследования мидий, культивируемых на коллекторах, и «диких» мидий показали, что их обсеменённость на 1 – 2 порядка выше таковой морской воды соответствующих районов [3]. Моллюски-фильтраторы, выращенные в загрязнённых морских водах, могут стать источником заражения человека. Это особенно актуально при культивировании устриц, которых употребляют в пищу в основном в сыром виде. Многие микроорганизмы могут сосуществовать с устрицей и входить в состав её нормальной микрофлоры. Биологическая роль микроорганизмов в таких комплексах недостаточно изучена. Известно, что грамотрицательные бактерии семейства *Vibrionaceae*, которые относятся к условно патогенным, при соответствующих условиях окружающей среды и пониженной резистентности организма моллюсков могут вызывать инфекционные заболевания [12].

Тихоокеанская устрица (*Crassostrea gigas*) была завезена в Чёрное море в 1980 г. [8]. С тех пор ведутся работы по совершенствованию биотехнологии культивирования этого вида, позволяющей увеличить выживаемость личинок, спата, молоди и взрослых моллюсков в условиях Чёрного моря [5, 7, 9, 10, 11]. В акватории бухты Казачья (Севастополь), где расположено ихозияство по культивированию тихоокеанской устрицы (*Crassostrea gigas*) были проведены санитарно-микробиологические исследования морской воды, которые позволили охарактеризовать этот район как малозагрязнённый [1]. Общее микробное число мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в течение года колебалось в пределах 129 – 299 кл/мл, достигая наибольшего значения при температуре морской воды 24 – 26°C. Численность гетеротрофных бактерий здесь не превышала $1,34 \times 10^3$ кл/мл. Однако исследования микрофлоры выращиваемых устриц ранее не проводились.

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы являлось изучение количественного и качественного состава микроорганизмов тихоокеанской устрицы, культивируемой в условиях марихозияства в бухте Казачья в Чёрном море.

Материал и методы. Исследование устриц, выращиваемых в бухте Казачья, проводилось в зимне-весенний период 2007 г. Устрицы содержались в садках, обшитых хамсерозом и подвешенных на глубине 2 м на устричном носителе. Носитель располагался в центральной части бухты на расстоянии 80 м от берега. Пробы отбирались с поверхности раковин, из мантийной жидкости и из внутренних органов (мантии, печени). Исследовано 12 устриц. Обработано 60 проб и проведено 120 анализов в трёхкратной повторности. Для исследования микрофлоры раковины соскобы брали с внешней поверхности створок с участков площадью 2 см². Перед отбором проб устриц обмывали стерильной морской водой для предотвращения попадания в пробу случайной водной микрофлоры. Полученный материал помещали в пробирку с 10 мл стерильной морской воды, затем пробирку тщательно взбалтывали.

Посев из полученной взвеси производился поверхностно на плотные среды: мясопептонный агар (МПА) – для определения общего микробного числа и среду Сабуро – для выделения грибов и дрожжей. В каждую чашку Петри высевали по 0,1 см³ взвеси. Повторность опыта трёхкратная. Культивирование осуществлялось при 28°С 3 – 4 сут. для бактерий и 4 – 5 сут. для грибов. Количество микроорганизмов рассчитывали на 1 см² поверхности раковины.

Мантийную жидкость исследовали без разведения и в десятикратном разведении в стерильной морской воде. На плотные среды МПА и среду Сабуро высевали по 0,1 мл жидкости. Культивирование проводили аналогично посевам с поверхности раковин. Количество микроорганизмов рассчитывали на 1 мл мантийной жидкости. Пробы мантии и печени погружали в спирт, обжигали, с поверхности стерильно вырезали кусочки и засевали путём размазывания или прикладывания их к поверхности питательной среды в чашках Петри с МПА и средой Сабуро. Посевы инкубировались в термостате при температуре 28°С, подсчет колоний осуществлялся через сутки.

Для выделения чистых культур использовали метод истощающего штриха [2].

Морфологию клеток микроорганизмов (бактерий, актиномицетов, дрожжей, мицелиальных грибов) изучали с помощью световой микроскопии, используя микроскоп Микмед-1 с бинокулярной насадкой. Бактериальные культуры, актиномицеты и дрожжи предварительно фиксировались и окрашивались по Грамму, их исследование осуществлялось при x1000. Прижизненные препараты мицелиальных грибов исследовались под микроскопом при x200 и x400.

При анализе численности микрофлоры вычислялись значения среднего арифметического и ошибки среднего (4).

Результаты и обсуждение. В результате предварительных исследований микрофлоры поверхности раковины, мантийной жидкости и внутренних органов устриц выделено 5 групп микроорганизмов. Установлено, что обсемененность внутренних органов и мантийной жидкости неоднородна. Микрофлора устриц включала как грамотрицательные (76 %), так и грамположительные (24 %) бактерии.

При исследовании мантийной жидкости тихоокеанских устриц выяснилось, что большинство микроорганизмов – Гр⁻ палочки. Кроме того, здесь присутствовали актиномицеты, дрожжеподобные микроорганизмы и мицелиальные грибы (табл.1).

Таблица 1. Результаты микробиологических исследований мантийной жидкости устриц
Table 1. Results of microbiologic researches of oyster mantle liquid

Среда	Возраст устриц (год нереста)	Численность микрофлоры, кл/мл	Число видов в бактериальной ассоциации	Процентное соотношение групп в ассоциации, %
МПА	2004	5926	3	Гр ⁻ палочки – 68 дрожжеподобные орг. – 32
	2005	3940	3	Гр ⁻ палочки – 81 дрожжеподобные орг. – 19
	2006	4940	4	Гр ⁻ палочки – 87 актиномицеты – 12
Сабуро	2004	1190	3	Гр ⁻ палочки – 88 актиномицеты – 7 мицелиальные грибы – 5
	2005	2020	4	Гр ⁻ палочки – 92 актиномицеты – 5 дрожжеподобные орг. – 3
	2006	3640	5	Гр ⁻ палочки – 98 дрожжеподобные орг. – 2

◀ Микрофлора соскоба поверхности раковин, как показали наши исследования, в основном была представлена Гр⁺ палочками и коринеформными бактериями, а также дрожжеподобными организмами (табл. 2).

Таблица 2 Результаты микробиологических исследований поверхности раковины устриц
Table 1. Results of microbiologic researches of oysters shell surface

Среда	Возраст устриц (год нереста)	Численность микрофлоры, кл/см ²	Число видов в бактериальной ассоциации	Процентное соотношение групп в ассоциации, %
МПА	2004	4650	2	Гр ⁺ палочки – 53 коринеформные бак. – 47
	2005	2900	1	Гр ⁺ палочки – 100
	2006	950	1	Гр ⁺ палочки – 100
Сабуро	2004	1050	2	дрожжеподобные орг. – 100
	2005	-	-	-
	2006	-	-	-

Исследования внутренних органов устриц (мантии и печени) выявило отсутствие роста микроорганизмов на среде Сабуро. На среде МПА в мантии были обнаружены колонии микроорганизмов 5 видов, относящихся к 3 систематическим группам. Доля Гр⁺ палочек составляла 56 %, коринеформных бактерий и актиномицетов по 22 %. В печени присутствовали колонии 4 видов микроорганизмов, относящихся к 4 систематическим группам. Преобладающими микроорганизмами были актиномицеты – 45 % от общей численности, а также коринеформные бактерии (34%) и Гр⁺ палочки (19 %), в незначительном количестве обнаруживались дрожжеподобные организмы (1%). В целом максимальная численность микроорганизмов в мантийной жидкости устриц в период исследований была в 4 раза больше численности гетеротрофных бактерий в морской воде в районе хозяйства.

Выводы. 1. Предварительные исследования микрофлоры тихоокеанской устрицы тихоокеанской устрицы (*Crassostrea gigas*), культивируемой в бухте Казачья в Чёрном море, показали присутствие микроорганизмов 5 систематических групп. Микрофлора мантийной жидкости была представлена в основном (на 85%) Гр⁺ палочками, присутствовали также дрожжеподобные организмы, актиномицеты и мицелиальные грибы. На поверхности раковин повсеместно были выделены Гр⁺ палочки, кроме того у устриц старшей возрастной группы (нерест 2004 г) обнаружены коринеформные бактерии и дрожжеподобные организмы. Исследования внутренних органов устриц (мантии и печени) показало отсутствие роста микроорганизмов на среде Сабуро. На среде МПА в печени выявлены актиномицеты и коринеформные бактерии, в мантии большая часть микроорганизмов была представлена Гр⁺ палочками, присутствовали также актиномицеты и коринеформные бактерии.

1. Андреева Н. А., Смирнова Л. Л., Хомич Т. В. Оценка состояния морской среды в прибрежных вольерах с дельфинами. // Экология моря. – 2002. – Вып. 62. – С. 73 – 75.
2. Герхард Ф. Методы общей бактериологии. – М.: Мир, 1983. – 334 с.
3. Давыдович С. Г., Дубина В. Р. Санитарно-микробиологическая характеристика Керченского пролива при выращивании мидий // Состояние, перспективы улучшения и использования морской экологической системы прибрежной части Крыма: Тез. научно-практ. лонф., посвященной 200-летию города-героя Севастополя. – Севастополь, 1983. – С. 147 – 148.
4. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с
5. Золотницкий А. П., Моница О. Б. Рост и продукция японской устрицы (*Crassostrea gigas*), акклиматизированной в Чёрном море // Экология моря. – 1992. - Вып. 41 – С. 77 – 79.

6. Коваленко Л. М. Изучение микрофлоры гребешков и среды обитания на донной плантации о. Попова // Научно-технические проблемы марикультуры в стране: Тез. докл. Всесоюзн. конф. (Владивосток, 23-28 октября 1989 г.). – Владивосток, 1989. – С. 175-176.
7. Лебедовская М. В. Особенности роста спата тихоокеанской устрицы (*Crassostrea gigas*) в контролируемых условиях // Рыбное хозяйство Украины. – 2005. – Спец. вып. по материалам научно-практич. конф.: Морские технологии: проблемы и решения (Керчь, 2005 г.). – С. 100 -102.
8. Моница О. Б. Интродукция тихоокеанской устрицы в Чёрном море // Рыбное хозяйство. – 1983. – № 1. – С. 189 – 190.
9. Орленко А. Н., Золотницкий А. П. Размножение тихоокеанской устрицы в Чёрном море // Рыбное хозяйство Украины. – 2003. – 3, 4. – С. 23 – 26.
10. Пиркова А. В., Ладыгина Л. В. Определение оптимальных условий роста и выживаемости личинок устрицы *Crassostrea gigas* на разных стадиях развития // Рыбное хозяйство Украины. – 2004. – Спец. вып. по материалам научно-практич. конф.: Морские технологии: проблемы и решения (Керчь, 2004 г.). – С. 173-177.
11. Пиркова А. В., Попов М. А. Динамика линейного и весового роста устриц *Crassostrea gigas*, культивируемых в бухте Карантинная // Рыбное хозяйство Украины. – 2005.- Спец. выпуск по материалам научно-практич. конф: Морские технологии: проблемы и решения (Керчь, 2004 г.). – С. 115 – 116.
12. Потиевский Э. Г., Царева Л. А., Бурлин В. В. Инфекционные заболевания объектов марикультуры на советском Дальнем Востоке // Мат. симп. по паразитологии и патологии морских организмов (Ленинград, 13 – 16 октября 1981 г.). - Ленинград, 1981. – С.81-82.

НИЦ «Государственный Океанариум»,
г. Севастополь

Поступила 01.03.2007

M. V. LEBEDOVSKAYA, N. A. ANDREEVA

**MICROFLORA OF PACIFIC OYSTER (*CRASSOSTREA GIGAS*),
CULTIVATED IN KAZACHYA BAY (THE BLACK SEA)
(PRELIMINARY DATA)**

Summary

Preliminary data on the microflora of the Pacific oysters cultivated in marine farm in Kazachya Bay (the Black Sea) are shown. Heterogeneous microorganisms colonization of internal organs and mantle liquid of oysters is revealed.