

## ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПОСТУПАЮЩИХ В ПОРТ ВЛАДИВОСТОКА С БАЛЛАСТНЫМИ ВОДАМИ СУДОВ

© 2012 Бузолева Л.С.<sup>1</sup>, Летягина А.В.<sup>2</sup>, Звягинцев А.Ю.<sup>3</sup>, Кашин И.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Россия, Владивосток, ул. Сельская; [buzoleva@mail.ru](mailto:buzoleva@mail.ru)

<sup>2</sup> Дальневосточный федеральный университет, Россия, Владивосток, ул. Октябрьская; [ajrisha.1988@mail.ru](mailto:ajrisha.1988@mail.ru)

<sup>3</sup> Институт биологии моря ДВО РАН, Россия, Владивосток, ул. Пальчевского, 17; [ayzvyagin@gmail.com](mailto:ayzvyagin@gmail.com)

Поступила в редакцию 22.11.10

Проведены исследования состава и обилия гетеротрофных и санитарно-показательных бактерий в балластных водах танкеров «Minotaug» и «Sunrise Wisteria», выполняющих рейсы из портов Китая и Японии. Установлено, что балластные воды, поступающие в порт Владивостока из японских портов, менее загрязнены, чем воды из китайских портов, которые в летний сезон относятся к категории «грязные» и «очень грязные». По степени патогенности микрофлоры порты-доноры могут быть выстроены в следующий ряд: Наньтун > Лункоу > Янчжоу > Лайчжоу > Мизушима > Ивакуни > Кавасаки. В балластных водах из танкера «Minotaug» (из китайских портов) выделены энтеробактерии, численность, которых превышала санитарные нормы (в 40 и более раз), и грамотрицательные подвижные палочковидные бактерии с ферментативным типом метаболизма, устойчивые к тяжелым металлам и антибиотикам, что характеризует места их обитания как недостаточно насыщенные кислородом, загрязненные промышленными и канализационно-бытовыми стоками. Санитарно-показательные микроорганизмы были представлены преимущественно энтеробактериями р. *Hafnia* (37%), *Enterobacter liqueface* (22%), *Citrobacter* (15%), *Shigella* (7%). В соответствии с показателями цитолитического теста наибольшая степень патогенности бактерий выражена у представителей родов *Shigella*, *Hafnia*, *Citrobacter* и *Salmonella*.

**Ключевые слова:** балластные воды, порт Владивостока, гетеротрофные микроорганизмы, энтеробактерии, патогенная и условно-патогенная микрофлора.

### Введение

Одной из самых больших угроз океанам в мире, наряду с другими проблемами (наземные источники морского загрязнения, чрезмерное использование морских ресурсов, физическое изменение/разрушение морской среды обитания), является вселение в новую окружающую среду несвойственных данной акватории организмов. Биологическая инвазия является одной из серьезных экологических проблем – привнесенные виды потенциально способны вызывать крупные экологические изменения в

среде, что влечет за собой и экономические последствия [Carlton, 1990; Mills et al., 1993]. Одним из путей попадания чужеродных морских организмов в акватории портов является транспортировка их с балластными водами.

Фундаментальные исследования населения балластных вод во всех основных морских портах России [Звягинцев и др., 2009а; Селифонова, 2009] и опыт контроля балластных вод в Новороссийском порту [Селифонова, 2010] послужили научно-практической основой для возможного присоединения

России к международной конвенции «О контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими 2004 г.» [Проект постановления..., 2011]. Следовательно в ближайшее время в России могут быть приняты международные правила по контролю за переносом и внесением вредных водных и патогенных организмов посредством водяного балласта судов.

Среди водных организмов в изобилии находятся бактерии и вирусы. Благодаря достаточно высокой численности, репродуктивной способности и широкому диапазону устойчивости к физическим факторам среды эти микроорганизмы активно заселяют прибрежные экосистемы [Wommack, Colwell, 2000]. Исследования микроорганизмов в балластных водах до 2000 г. были фрагментарны и ограничивались главным образом холерным вибрионом *Vibrio cholerae* [McCarthy, Khambaty, 1994], динофитовыми водорослями [Hallegraeff, 1993] и протистами [Galil, Hulsmann, 1997]. В настоящее время многие исследователи [Knight et al., 1999; Dobbs et al., 2003; Drake et al., 2003; Ivanov, 2006; Burkholder et al., 2007] в пробах из балластных вод отмечают высокую выживаемость патогенных и условно-патогенных бактерий, в частности, энтерококков, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas* spp., *Providencia rettgeri*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* и других представителей сем. *Enterobacteriaceae*, *Mycobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio* spp.

Однако до сих пор методы отбора и анализа микрофлоры в балластных водах недостаточно разработаны, остается очевидной проблемой оценка количества и степени патогенности микроорганизмов. В Приморье, где функционируют несколько крупных портов, деятельность которых связана с экспортом грузов, изучение переноса микроорганизмов с водным транспортом не проводилось. В связи с этим

актуальным является проведение поисковых исследований для анализа ситуации с переносом микроорганизмов в балластных танках судов и подбор методик для выполнения последующих масштабных мониторинговых исследований.

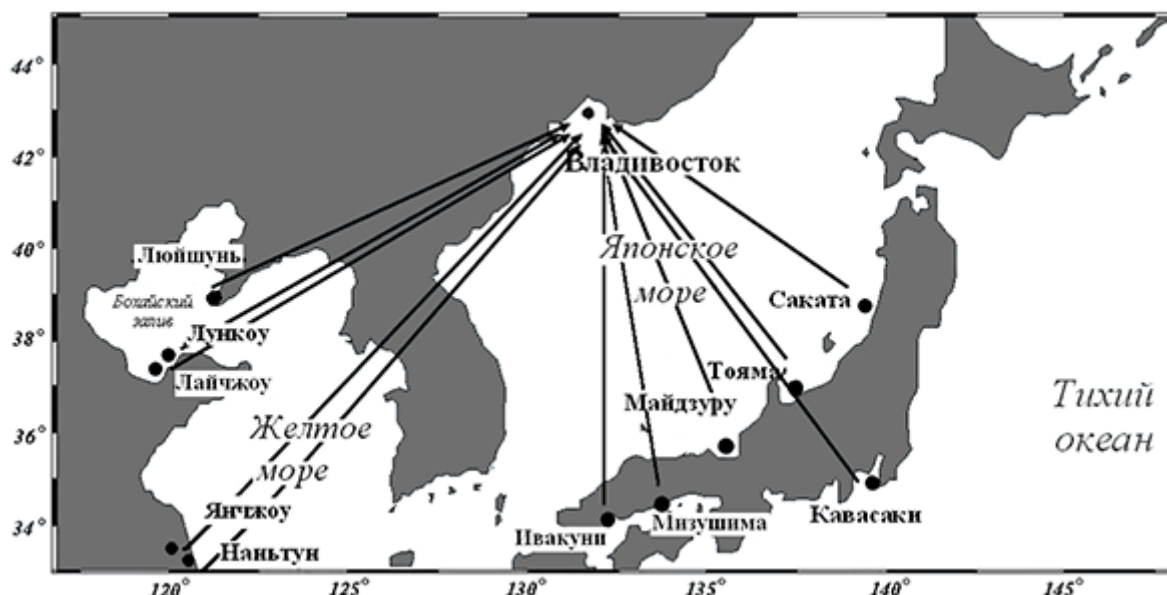
Цель работы – изучение состава, обилия и степени патогенности микроорганизмов, поступающих с судовыми балластными водами в порт Владивостока.

### Материал и методика

Микрофлору балластных вод (БВ) анализировали на танкере «Minotaur», который выполнял рейсы из китайских портов: Лункоу, Лайчжоу (залив Лайжоувань Жёлтого моря), Наньтун, Янчжоу (р. Янцзы) и танкере «Sunrise Wisteria» – из японских портов: Кавасаки, Мизушима и Ивакуни (рис. 1). Отбор проб производили в соответствии с методикой, используемой специалистами Института биологии моря ДВО РАН [Звягинцев и др., 2009б]. Пробы воды на микрофлору отбирали с помощью одноразовых шприцев (V 20 мл), соблюдая стерильность, транспортировали в пластиковых пакетах и производили посевы в день отбора материала.

Учет общей численности гетеротрофных бактерий выполняли методом последовательных разведений [Методы общей бактериологии, 1983]. С этой целью использовали среду для культивирования морских микроорганизмов – СММ [Youchimizu, Kimura, 1976]:  $MgSO_4$  – 1 г, пептон – 5 г, дрожжевой экстракт – 5 г, глюкоза – 1 г,  $CaCO_3$  – 1 г,  $K_2HPO_4$  – 0.2 г, морская вода – 500 мл, дистиллированная вода – 500 мл, агар-агар – 15 г, pH = 7.8.

Учет численности бактерий группы кишечной палочки (БГКП) выполняли на среде Эндо с определением лактозоположительных колоний. Для выявления *Enterococcus faecalis* использовали энтерококкагар, который содержит азид натрия и относится к дифференциально-



**Рис. 1.** Основные маршруты судов, прибывающих в порт Владивостока из портов Китая и Японии.

диагностическим средам [Общая и санитарная..., 2004]. Энтеробактерии, выросшие на среде Эндо, выделяли в чистую культуру и идентифицировали по диагностическим ключам [Краткий определитель..., 1980], а также на основе использования системы API-20 E и API-20 NE (Biomerieux, Франция).

Для характеристики биологических свойств выделенных штаммов изучали:

- гидролитическую активность – способность микроорганизмов использовать в качестве питательных субстратов белки, жиры и углеводы (рис. 2) [Методы общей бактериологии, 1983];

- устойчивость бактерий к действию тяжелых металлов, которую определяли методом отпечатков на поверхности агаровой среды с помощью аппликатора. В качестве основы использовали среду СММ, куда добавляли соли металлов, в следующих концентрациях:  $\text{CdCl}_2$ : 80; 90; 100; 110 мг/л;  $\text{CuCl}_2$ : 300; 400; 500; 600 мг/л;  $\text{CoCl}_2$ : 200; 300; 400; 500 мг/л;  $\text{ZnCl}_2$ : 300; 400; 500; 600 мг/л;  $\text{NiCl}_2$ : 800; 1000; 1200; 1400 мг/л. [Lambert, Pearson, 2000].

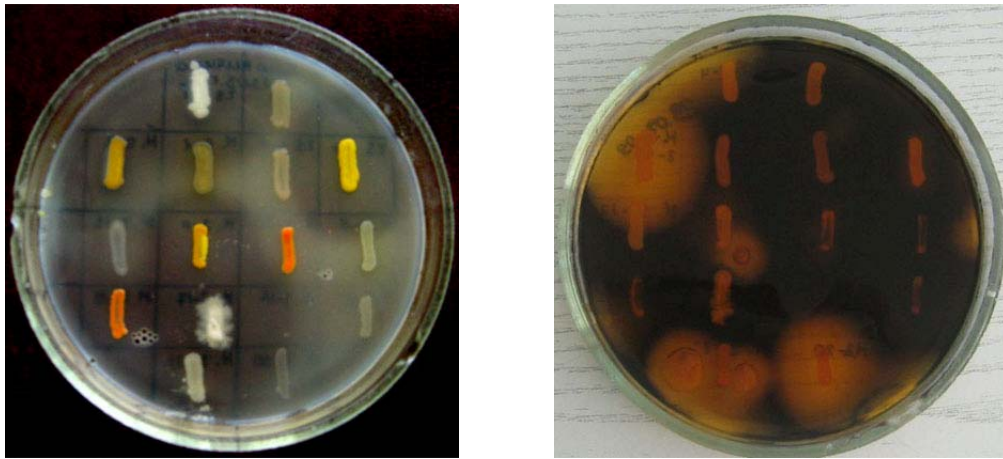
- чувствительность микроорганизмов на антибиотики определяли по зоне задержки роста культур при воздействии противомикробного препарата соответствующего наименования [Поляк, 1997].

- тип метаболизма изолятов определяли по способности окислять или ферментировать углеводы на среде Хью-Лейфсона [Методы общей бактериологии, 1984].

Патогенные свойства бактерий изучали с помощью определения цитолиза на культуре клеток Hella, которые выращивали в специальных иммунологических планшетах с плоским дном. Разведения испытуемой культуры (от цельного до – 4) вносили в культуру клеток. Инкубировали сутки во влажной водяной бане при температуре 37°C. С помощью инверти-руемого микроскопа (LSM-510 META «Carl Zeiss») проводили оценку теста. По разрушению клеток судили о степени патогенности штамма [Цыбань и др., 1992].

### Результаты

В БВ танкера «Minotaur» из китайских портов Лунгоу и Лайчжоу (залив Лайжоувань, Жёлтое море) отмечена достаточно стабильная общая численность гетеротрофных бактерий (ОЧГБ) – в пределах  $10^3$ – $10^4$  КОЕ/мл, что соответствует умеренному уровню бактериального загрязнения вод [Гидрохимические показатели..., 2007].



**Рис. 2.** Тест на проявление лецитиназной (а) и амилолитической (б) активности исследуемых штаммов.

Средняя численность гетеротрофных бактерий в БВ из порта Лункоу изменялась в зависимости от сезона года (табл. 1). В теплые месяцы БВ по показателям органического загрязнения характеризовались как грязные (июль, август 2008 г. –  $10^4$ – $10^5$  КОЕ/мл) или очень грязные (сентябрь 2009 г. –  $10^6$  КОЕ/мл). В более холодные месяцы (январь, февраль, октябрь) значения общей численности гетеротрофных бактерий были низки. Следует отметить, что в теплые сезоны года в БВ регистрировали бактерии группы кишечной палочки (БГКП), которые являются индикаторами санитарного состояния вод и могут указывать на загрязнение коммунально-бытовыми стоками. Особенно высокая их численность наблюдалась в сентябре 2009 г.; она значительно превышала установленные нормативы для сточных вод, сбрасываемых в водные объекты [Санитарные правила..., 2000], и в 40 раз – установленные нормативы для судовых балластных вод [Международная конвенция..., 2005]. При этом бактерии *Enterococcus faecalis*, показательные для свежего фекального загрязнения, не были обнаружены ни в одной из исследуемых проб.

В БВ из порта Лайчжоу общая численность гетеротрофных бактерий была в среднем на один-два порядка ниже по сравнению с БВ из порта Лункоу (табл. 2). Такие БВ можно характеризовать как «умеренно

загрязненные» в теплый сезон и «чистые» в остальные периоды года. На фоне невысокой численности БГКП в БВ большую долю из всех изолятов составили энтерококки, а не *E. coli*, что свидетельствует о свежем фекальном загрязнении исследуемых вод [Экология..., 2004].

В пробах БВ из китайских портов на р. Янцзы в июле-августе 2008 г. выявлена более высокая численность гетеротрофных бактерий –  $10^5$ – $10^6$  КОЕ/мл (табл. 3). По показателям ОЧГБ такие БВ можно характеризовать как «грязные» (июль-август 2008 г.) или «умеренно загрязненные» (сентябрь 2008, май 2009 гг.). Кроме того, они были высоко инфицированы БГКП ( $10^2$ – $10^3$  КОЕ/мл) с численностью значительно превышающей санитарные нормы. При этом такие санитарно-показательные микроорганизмы, как кишечная палочка и энтерококки не доминировали в пробах. В БВ, отобранных в сентябре, количество энтеробактерий было также стабильно высоким –  $10^2$ – $10^3$  кл/мл при общем снижении численности КОЕ гетеротрофных бактерий до уровня, соответствующего умеренному загрязнению вод.

В БВ танкера «Sunrise Wisteria» из японских портов, численность гетеротрофных бактерий была на 1–2 порядка ниже, чем в аналогичных пробах танкера «Minotaug» (из китайских портов) и изменялась в диапазоне  $10^2$ – $10^3$  кл/мл (табл. 4.).

**Таблица 1.** Численность гетеротрофных и санитарно-показательных микроорганизмов (БГКП, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*), КОЕ/мл, в БВ танкера «Minotaur», прибывшего из китайского порта Лункоу (2008–2009 гг.)

Дата забора проб / КОЕ/мл	ОЧГБ (поверхн. слой/дно)	БГКП	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. faecalis</i>
29.05.2008	$(3.5 \pm 0.2) \times 10^3$ $(2.0 \pm 0.4) \times 10^4$	0	0	0
10.06.2008	$(1.7 \pm 0.3) \times 10^4$ $(3.4 \pm 0.5) \times 10^4$	0	0	0
29.07.2008	$(3.8 \pm 0.4) \times 10^5$ $(4.5 \pm 0.5) \times 10^5$	$(3.2 \pm 0.1) \times 10$ $(5.1 \pm 0.1) \times 10$	0	0
23.08.2008	$(3.2 \pm 0.3) \times 10^3$ $(2.2 \pm 0.3) \times 10^4$	$(1.2 \pm 0.1) \times 10$ $(0.9 \pm 0.1) \times 10$	0	0
12.01.2009	0	0	0	0
22.02.2009	0	0	0	0
24.04.2009	$(4.0 \pm 0.1) \times 10^2$ $(2.5 \pm 0.2) \times 10^2$	$10 \pm 1$ 0	0	0
02.06.2009	$(2.1 \pm 0.1) \times 10^2$ $(4.1 \pm 0.5) \times 10^2$	$5 \pm 1$ $10 \pm 3$	0	0
24.09.2009	$(5.8 \pm 0.1) \times 10^6$ $(6.1 \pm 0.4) \times 10^6$	$(2.2 \pm 0.3) \times 10^6$ $(2.0 \pm 0.2) \times 10^6$	0	0
18.10.2009	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^2$ $(1.4 \pm 0.2) \times 10$	0 $(1.0 \pm 0.1)$	0	0

**Таблица 2.** Численность гетеротрофных и санитарно-показательных микроорганизмов (БГКП, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*), КОЕ/мл, в БВ танкера «Minotaur», прибывшего из китайского порта Лайчжоу (2008–2009 гг.)

Дата забора проб / КОЕ/мл	ОЧГБ (поверхн. слой/дно)	БГКП	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. faecalis</i>
19.07.2008	$(8.9 \pm 0.2) \times 10^3$ $(9.2 \pm 0.3) \times 10^4$	$(5.0 \pm 0.1) \times 10$ $(7.1 \pm 0.2) \times 10$	5	0
08.03.2009	0 32 ± 4 в 100 мл*	0	0	0
06.05.2009	$(6.0 \pm 0.4) \times 10$ $(1.0 \pm 0.2) \times 10^2$	0 20 ± 3	0	$\frac{0}{10 \pm 0}$
29.08.2009	$(6.8 \pm 0.2) \times 10^2$ $(2.3 \pm 0.1) \times 10^3$	$4.0 \pm 0.1$ $7.0 \pm 0.1$	0	0
11.09.2009	$(3.2 \pm 0.2) \times 10^3$ $(0.8 \pm 0.1) \times 10^2$	0	0	$\frac{6 \pm 0.1}{0}$

ОЧГБ в БВ из порта Кавасаки (Япония) в период с августа по ноябрь была достаточно устойчивой и находилась в пределах  $10^2$  кл/мл. В БВ, взятых из других японских портов, этот показатель был на один порядок выше: порт Мизушима –  $(2.9 \pm 0.4) \times 10^3$  кл/мл (поверхностный слой),  $(4.8 \pm 0.3) \times 10^2$  кл/мл (придонный); порт Ивакуни –  $(1.8 \pm 0.1) \times 10^3$  кл/мл (поверхностный слой),

$(7.4 \pm 0.2) \times 10^2$  кл/мл (придонный). Следует отметить, что бактерии группы кишечной палочки и фекальные стрептококки не обнаружены ни в одной пробе БВ из портов Японии. Практически во всех пробах БВ, за исключением зимних, обнаружены БГКП, но, при этом, численность энтерококков и кишечной палочки была в пределах единичных значений.

**Таблица 3.** Численность гетеротрофных и санитарно-показательных микроорганизмов (БГКП, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*), КОЕ/мл, в БВ танкера «Minotaur», прибывшего из китайских портов Наньтун, Янчжоу (р. Янцзы), 2008–2009 гг.

Дата забора проб / КОЕ/мл	ОЧГБ (поверхн. слой/дно)	БГКП	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. faecalis</i>
04.07.2008	$(8.8 \pm 0.5) \times 10^4$ $(1.2 \pm 0.2) \times 10^5$	$(4.2 \pm 0.3) \times 10^3$ $(9.1 \pm 0.3) \times 10^2$	20	0
11.08.2008	$(4.2 \pm 0.3) \times 10^6$ $(4.5 \pm 0.5) \times 10^5$	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^3$ $(8.0 \pm 0.3) \times 10^2$	0	0
05.09.2008	$(3.7 \pm 0.5) \times 10^3$ $(5.2 \pm 0.4) \times 10^3$	$(2.2 \pm 0.1) \times 10^3$ $(3.1 \pm 0.3) \times 10^3$	0	0
02.12.2008	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^3$ $(8.1 \pm 0.2) \times 10^2$	0	0	0
19.12.2008	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^3$ $(3.0 \pm 0.12) \times 10^3$	0	0	0
12.04.2009	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^3$ $(1.5 \pm 0.3) \times 10^3$	$(1.04 \pm 0.12) \times 10^3$ $(1.47 \pm 0.2) \times 10^3$	0	0
20.05.2009	$(4.5 \pm 0.3) \times 10^2$ $(3.3 \pm 0.2) \times 10^3$	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^2$ $(2.3 \pm 0.4) \times 10^2$	0	0

**Таблица 4.** Численность гетеротрофных и санитарно-показательных микроорганизмов (БГКП, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*), КОЕ/мл, в БВ танкера «Sunrise Wisteria», прибывшего из портов Японии

Дата забора проб, порт / КОЕ/мл	ОЧГБ (поверхн. слой/дно)	БГКП	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. faecalis</i>
17.08.2008 Кавасаки	$(3.7 \pm 0.3) \times 10^2$ $(2.5 \pm 0.4) \times 10^2$	0	0	0
05.09.2008 Мизушима	$(2.9 \pm 0.4) \times 10^3$ $(4.8 \pm 0.3) \times 10^2$	0	0	0
12.09.2008 Ивакуни	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^3$ $(7.4 \pm 0.2) \times 10^2$	0	0	0
17.11.2008 Кавасаки	$(2.7 \pm 0.1) \times 10^2$ $(3.6 \pm 0.3) \times 10^2$	0	0	0
02.12.2008 Кавасаки	$(3.0 \pm 0.3) \times 10^3$ $(8.1 \pm 0.2) \times 10^3$	0	0	0

Следует отметить, что численность бактерий, в том числе и условно-патогенных, в поверхностных слоях по сравнению с донными как правило была на порядок ниже либо сравнима. Поэтому при дальнейшем мониторинге очевидно можно использовать для анализа только поверхностные воды.

Мониторинг гетеротрофных бактерий в акватории «Первой речки» Амурского залива (район сброса балластных вод), показал, что в 2008–2009 гг. их численность варьировала от  $10^2$  до  $10^6$  КОЕ/мл в зависимости от сезона года

(табл. 5). При этом в зимние месяцы при обычном посеве микрофлора в пробах воды не обнаружена. Однако фильтрацией определенного объема воды (100 мл) с последующим высевом бактерий, осевших на поверхности фильтра, выделены колониеобразующие клетки. БВ несомненно вносят определенный вклад в численность и патогенность сообществ аборигенной микрофлоры прибрежных вод Владивостока. При этом японские порты нельзя считать источниками распространения инфекционных заболеваний, так как с БВ

**Таблица 5.** Численность КОЕ гетеротрофных и санитарно-показательных микроорганизмов в акватории Амурского залива (БГКП, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*), кл/мл

Дата забора проб / КОЕ/мл	ОЧГБ (поверхн. слой/дно)	БГКП	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. faecalis</i>
12.01.2009	–	–	–	
22.02.2009	–	–	–	
24.04.2009	$\frac{(1.54 \pm 0.32) \times 10^3}{(1.35 \pm 0.18) \times 10^3}$	$\frac{0}{30 \pm 5}$	$\frac{20 \pm 2}{0}$	$\frac{0}{20 \pm 0}$
20.05.2009	$\frac{(2.0 \pm 0.3) \times 10^3}{(5.5 \pm 0.2) \times 10^3}$	$\frac{200 \pm 5}{50 \pm 7}$	0	$\frac{40 \pm 3}{0}$
02.06.2009	$\frac{(1.7 \pm 0.2) \times 10^3}{(5.1 \pm 0.4) \times 10^2}$	$\frac{80 \pm 7}{120 \pm 10}$	$\frac{0}{120 \pm 10}$	0
29.08.2009	$\frac{(8.2 \pm 0.1) \times 10^4}{(9.0 \pm 0.2) \times 10^3}$	$\frac{(1.3 \pm 0.1) \times 10}{(2.4 \pm 0.2) \times 10^2}$	0	$\frac{0}{(4.3 \pm 0.1) \times 10}$
24.09.2009	$\frac{(3.4 \pm 0.1) \times 10^6}{(1.5 \pm 0.4) \times 10^5}$	$\frac{(2.4 \pm 0.2) \times 10^6}{(1.1 \pm 0.2) \times 10^5}$	$\frac{(7.0 \pm 0.2)}{0}$	0
18.10.2009	$\frac{(3.8 \pm 0.1) \times 10^2}{(2.3 \pm 0.2) \times 10}$	$\frac{(1.8 \pm 0.1) \times 10^2}{(1.4 \pm 0.3) \times 10}$	$\frac{(1.5 \pm 0.2) \times 10}{0}$	0

из этого региона в Амурский залив поступает такое количество гетеротрофных микроорганизмов, которое не превышает численность собственной микрофлоры этой акватории. Гораздо большую проблему создают БВ, поступающие из китайских портов. В этих водах (главным образом из портов р. Янцзы и Лункоу) БГКП превалируют над кишечной палочкой и энтерококками, что характеризует эти воды как хронически загрязненные. В БВ порта Лайчжоу главным образом присутствует свежее фекальное загрязнение, о котором можно судить по наличию в изолятах энтерококков.

Характеристика физиолого-биохимических и морфологических свойств штаммов, выделенных из БВ, позволяет судить об экологическом состоянии водоема, из которого был произведен забор. Всего в культуру из БВ выделено 43 морфотипа, из которых по типу клеточной стенки 23 – грамположительные, остальные – грамотрицательные. Среди грамотрицательной микрофлоры большую часть (94%) составляли энтеробактерии. До 84% изолятов имели ферментативный тип метаболизма.

Гидролитическая активность бактерий характеризует их способность

расщеплять простые органические соединения, используемые в качестве субстрата. Установлено, что штаммы коллекции обладали слабой гидролитической активностью: 28% составили бактерии амилолитики (синтезируют и выделяют в среду амилазу – фермент, который гидролизует крахмал); 26% – липолитики (синтезируют и выделяют в среду фермент липазу); 14% – протеолитики (расщепляют белковые субстраты). Анализ металлоустойчивости бактерий БВ показал, что из наиболее толерантных практически ко всему списку металлов выделено девять штаммов (21%). В исследуемых концентрациях все изоляты были устойчивы к Pb. Устойчивыми к антибиотикам оказались 25% изолятов. При этом половина изолятов не проявляла чувствительность к олеандомицину, полимиксину и практически все – к цефтазидиму.

Присутствие санитарно-показательных микроорганизмов в морской воде представляет реальную опасность для здоровья населения, так как многие из них могут проявлять патогенные свойства. Энтеробактерии, поступающие с БВ в прибрежные воды г. Владивостока, фактически составляют 50% от общей численности микроорга-

низмов, поэтому была проведена их идентификация и изучены патогенные свойства. Было выявлено, что среди изолятов наиболее часто встречались представители рода *Hafnia* (37%). Остальные энтеробактерии по встречаемости в БВ можно представить в следующем порядке: 22% – *Enterobacter liqueface*; 15% – *Citrobacter*; 7% – *Shigella*; 7% – *Enterobacter aerogenece*; 4% – *Salmonella*; 4% – *Escherihia*; 4% – *Serracia*. Изучение патогенных свойств бактерий на культуре клеток Hella показало, что положительный результат цитолиза был практически у всех штаммов коллекции, за исключением всего лишь двух. При этом полному (100%) разрушению чувствительных клеток способствовали все штаммы представителей родов *Shigella* и *Hafnia*. Штаммы бактерий рода *Citrobacter* и *Salmonella* разрушали 75% культуры клеток.

#### Обсуждение результатов

Как показали результаты исследования, максимальная численность гетеротрофных бактерий в БВ, сбрасываемых в прибрежные воды г. Владивостока, достигала значений не более  $10^6$  КОЕ/мл, что, возможно, характерно для этой географической зоны с ее климатическими и гидрологическими особенностями. Объемы переноса бактерий и степень их выживаемости в новой среде могут быть значительными. Так, например, анализ результатов микробиологических исследований БВ и осадков 69 судов, прибывающих в Чесапикский залив (США), показали, что в заливе ежегодно выживает до  $10^{18}$ – $10^{19}$  клеток бактерий, перенесенных с балластом [Drake et al., 2007].

В нашем случае наибольшую эпидемическую опасность представляют летние перевозки БВ. В зимнее время практически не было обнаружено высокой численности гетеротрофных микроорганизмов и, в частности, условно патогенных бактерий.

Применение бактериального фильтра позволило повысить эффективность высеваемости колоний из проб, отобранных зимой, которая могла быть снижена за счет перехода клеток в некультивируемое состояние или образования биопленок. Известно, что микроорганизмы обладают уникальной способностью к адаптации. Для них характерна высокая экологическая пластичность, они сохраняют свою жизнеспособность в широком диапазоне различных абиотических факторов – влажность, температура, органический состав, pH и др. [Сомов, Бузолева, 2004]. В зимний период, сохраняясь в некультивируемой форме, L-форме, в биопленках, микроорганизмы, в частности некоторые энтеробактерии и листерии, способны в более благоприятных условиях активно делиться и повышать свои вирулентные свойства [Бузолева, Терехова, 2002]. В связи с этим важно учитывать численность микроорганизмов и в более холодные сезоны года.

В целом, в БВ из китайских портов доминировали грамтрицательные подвижные палочковидные бактерии с ферментативным типом метаболизма, что характеризует места их обитания как недостаточно насыщенные кислородом (что возможно при загрязнении вод канализационными стоками) [Бузолева и др., 2006]. Слабая гидролитическая активность и высокая устойчивость к антибиотикам и металлам свидетельствует о толерантности этих штаммов к высоким концентрациям поллютантов и дает им возможность длительно существовать в загрязненных прибрежных водах г. Владивостока [Вашенко, 2000]. Вполне очевидна опасность загрязнения аллохтонными бактериями нативных морских сообществ [Thomson et al., 2003], благодаря чему риск микробиологического инфицирования акваторий портов возрастает.

По показателям численности и биологическим свойствам гетеротрофных микроорганизмов БВ из китайских



портов можно отнести к категории «грязные» и «очень грязные». При этом риск наибольшего инфицирования для вод Амурского залива представляют БВ из порта Лункоу и портов р. Янцзы, несмотря на то, что воды порта Лайчжоу были сильно заражены санитарно-показательными микроорганизмами, характерными для высокого уровня фекального загрязнения. Особый интерес представляют БВ, отобранные из портов р. Янцзы с достаточно высокой численностью гетеротрофных бактерий –  $10^5$ – $10^6$  КОЕ/мл. В отличие от БВ портов Лункоу и Лайчжоу эти воды были высоко инфицированы БГКП с численностью значительно превышающей санитарные нормы. Данный факт может указывать на выживаемость и сохранение штаммов этих бактерий в БВ либо на их поступление при перебалластировке танкера (принятие дополнительного балласта по ходу следования). Наиболее вероятным может представляться первый вариант. Известно, что замена балласта в открытом море не является полностью эффективной процедурой, так как осадок в балластных резервуарах судов не может быть полностью удален во время операции по перебалластировке [Williams et al., 1988].

Следует также отметить, что среди условно патогенных бактерий нами обнаружены ранее не упоминавшиеся в литературе бактерии рода *Hafnia* и *Shigella*, которые считаются достаточно опасными в эпидемическом отношении, так как являются возбудителями кишечных инфекций и пневмоний [Поздеев, 2002]. Цитолитические тесты доказали их высокую патогенную способность: 100% разрушение живых клеток даже в больших разведениях культуры. Такие высоковирулентные штаммы представляют опасность не только для человека, но и для морских организмов, входящих в состав планктонных и донных сообществ.

## Выводы

- Установлено, что БВ, поступающие в акваторию порта Владивостока из японских портов, менее загрязнены, чем воды из китайских портов, которые в летний сезон относятся к категории «грязные» и «очень грязные». Они высокоинфицированы БГКП, а их численность значительно превышает санитарные нормы (в 40 и более раз).

- В БВ танкера «Minotaug» (из китайских портов) выделены грамотрицательные подвижные палочковидные бактерии с ферментативным типом метаболизма, устойчивые к тяжелым металлам и антибиотикам, что характеризует места их обитания как недостаточно насыщенные кислородом, загрязненные промышленными и канализационно-бытовыми стоками.

- Наибольшее количество микроорганизмов поступает в прибрежные воды Амурского залива вместе с балластными водами в летние месяцы, включая сентябрь – от  $10^4$  до  $10^6$  КОЕ/мл.

- По степени патогенности микрофлоры порты-доноры могут быть выстроены в следующий ряд: Наньтун > Лункоу > Янчжоу > Лайчжоу > Мизушима > Ивакуни > Кавасаки.

- Санитарно-показательные микроорганизмы были представлены преимущественно энтеробактериями р. *Hafnia* (37%), *Enterobacter liqueface* (22%), *Citrobacter* (15%), *Shigella* (7%). В соответствии с показателями цитолитического теста наибольшая степень патогенности бактерий выражена у представителей родов *Shigella*, *Hafnia*, *Citrobacter* и *Salmonella*.

В заключение следует отметить, что для корректного проведения мониторинговых исследований санитарно-показательной микрофлоры в БВ в летний сезон следует применять метод последовательных разведений, а в зимний – метод мембранных фильтров.

### Благодарности

Авторы признательны сотрудникам ИБМ ДВО РАН А.Н. Городкову и А.А. Бегуну за помощь в сборе материала. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ФЦП «Мировой океан» на 2008–2012 гг. госконтракт № 01.420.1.2.0003 от 07 ноября 2008 г.; гранта РФФИ 11-04-00618-а «Мониторинг морских биоинвазий и роль судовых балластных вод в расселении видов» на 2011–2012 гг.; целевой комплексной программы ДВО РАН «Биологическая безопасность дальневосточных морей Российской федерации»; гранта фонда ARN ARCP2006-FP14-Adrianov, грантов ДВО РАН 09-I-П15-03, 09-I-П16-04, 09-I-П23-01; грантов Мин. образования и науки: 1.2.09; АВЦП 2.1.1./4793; гранта Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, договор № 11.G34.31.0010

### Литература

- Бузолева Л.С., Безвербная И.П., Журавель Е.В., Калитина Е.Г. Микробиологический анализ загрязнения окраинных морей северо-западной части Тихого океана // *Океанология*. 2006. Т. 46. № 1. С. 55–62.
- Бузолева Л.С., Терехова В.Е. Выживаемость штаммов бактерий *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* в морской и речной воде // *Биология моря*. 2002. Т. 28. № 4. С. 286–290.
- Ващенко М.А. Загрязнение залива Петра Великого Японского моря и его биологические последствия // *Биология моря*. 2000. Т. 26. № 3. С. 149–159.
- Гидрохимические показатели состояния окружающей среды / Под ред. Т.В. Гусевой. М.: Форум ИНФРА-М, 2007. 192 с.
- Звягинцев А.Ю., Ивин В.В., Кашин И.А., Орлова Т.Ю., Селина М.С., Касьян В.В., Корн О.М., Куликова В.А., Корниенко Е.С., Безвербная И.П., Зверева Л.В., Радашевский В.И., Белогурова Л.С., Бегун А.А., Городков А.Н. Население балластных вод в порту Владивосток // *Биология моря*. 2009а. Т. 35. № 1. С. 29–40.
- Звягинцев А.Ю., Ивин В.В., Кашин И.А. Методические рекомендации по исследованию судовых балластных вод при мониторинге морских биоинвазий. Владивосток: Дальнаука, 2009б. 120 с.
- Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Дж. Хоулта и др. М.: Мир, 1980. 444 с.
- Международная Конвенция о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими 2004 года. СПб.: ЦНИИМФ, 2005. 120 с.
- Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др. М.: Мир, 1983. Т. 1. 536 с.
- Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др. М.: Мир, 1984. Т. 3. 264 с.
- Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / Под ред. А.С. Лабинской. Татарстан: Медицина, 2004. 575 с.
- Поздеев О.К. Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. 768 с.
- Поляк М.С. Определение чувствительности микроорганизмов к противомикробным препаратам «методом дисков». СПб.: НИЦФ, 1997. 20 с.
- Проект постановления правительства РФ от 08.09.11 г. // режим доступа: ([http://www.mintrans.ru/documents/detail.php?ELEMENT\\_ID=16864](http://www.mintrans.ru/documents/detail.php?ELEMENT_ID=16864))
- Санитарные правила и нормы: СанПиН 2.1.5.980-00. Водоотведение населенных мест, санитарная охрана водных объектов. Гигиенические требования к охране поверхностных вод / Утв. Гл. гос. сан. врачом РФ 22.07.2000. М.: Минздрав РФ, 2000.

- Селифонова Ж.П. Морские биоинвазии в водах Новороссийского порта Черного моря // Биология моря. 2009. Т. 35. № 3. С. 212–219.
- Селифонова Ж.П. Контроль судовых балластных вод как метод предотвращения биологического загрязнения морской среды: Метод. пособие. Апатиты: Кольск. научн. центр РАН, 2010. 87 с
- Сомов Г.П., Бузолева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. Владивосток: ОАО «Примполиграфкомбинат», 2004. 167 с.
- Цыбань А.В., Иваница В.А., Худченко Г.И. Биологические характеристики морских микроорганизмов // Исследование экосистем Берингова и Чукотского морей. СПб.: Гидрометеиздат, 1992. Вып. 3. С. 193–212.
- Экология микроорганизмов / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: «Академия», 2004. 272 с.
- Burkholder J.M., Hallegraeff G.M., Melia G., Cohen A. Phytoplankton and bacterial assemblages in ballast water of U.S. military ships as a function of port of origin, voyage time, and ocean exchange practices // Harmful Algae. 2007. Vol. 6. № 4. P. 486–518.
- Carlton J.T. Man's role in changing the face of ocean: Biological invasions and implications for conservation of near-shore environments. // Conserv. Biol. 1990. № 3. P. 265–273.
- Dobbs F.C., Diallo A.A., Doblin M.A., Drake L.A. et al. Pathogens in Ships' Ballast Water and Sediment Residuals // Proceedings of the Third International Conference on Marine Bioinvasions. March 16–19. 2003. La Jolla. California, 2003. P. 29.
- Drake L.A., Baier R.E., Dobbs F.C., Doblin M.A. et al. Potential Invasion of Microorganisms and Pathogens Via 'Interior Hull Fouling': Biofilms Inside Ballast-Water Tanks // Proceedings of the Third International Conference on Marine Bioinvasions. March 16–19. 2003. La Jolla. California, 2003. P. 35.
- Drake L.A., Doblin M.A., Dobbs F.C. Potential microbial bioinvasions via ships' ballast water, sediment, and biofilm // Marine Pollution Bulletin. 2007. Vol. 55. Is. 7–9. P. 333–341.
- Galil B., Hulsmann N. Protist transport via ballast water – biological classification of ballast tanks by food web interactions // Eur. J. Potistol. 1997. № 33. P. 244–253.
- Hallegraeff G.M. A revive of harmful algal blooms and their apparent global increase // Phycologia. 1993. Vol. 32. № 2. P. 77–99.
- Ivanov V. Bacteriological monitoring of ships' ballast water in Singapore and its potential importance for the management of coastal ecosystems // WIT Transactions on Biomedicine and Health. 2006. Vol. 10. P. 59–63.
- Knight I.T., Wells C.S., Wiggins B., Russell H. et al. Detection and enumeration of fecal indicators and pathogens in the ballast water of transoceanic cargo vessels entering the Great Lakes // Proceedings of the General Meeting of the ASM. Chicago. IL. 1999. P. 546.
- Lambert R.J.W., Pearson J. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC), values // J. Appl. Microbiol. 2000. Vol. 88. P. 784–790.
- McCarthy S.A., Khambaty F.M. International dissemination of epidemic *Vibrio cholerae* by cargo ship ballast and other nonpotable waters // Applied and Environmental Microbiology. 1994. Vol. 60. Is. 7. P. 2597–2601.
- Mills E.L., Leach J.H., Carlton J.T., Secor C.L. Exotic species in the Great Lakes: A history of biotic crises and anthropogenic introductions // J. Great Lakes Res. 1993. № 19. P. 1–57.
- Thomson F.K., Heinemann S.A., Dobbs F.C. Patterns of Antibiotic Resistance in

Cholera Bacteria Isolated From Ships' Ballast Water // Proceedings of the Third International Conference on Marine Bioinvasions. March 16–19. 2003. La Jolla. California, 2003. P. 118.

Williams R.J., Griffiths F.B., Van der Wal E.J., Kelly J. Cargo vessel ballast water as a vector for the transport of non-indigenous marine species // Est. Coast. Shelf Sci. 1988. № 26. P. 409–420.

Wommack K.E., Colwell R.R. Virioplankton: viruses in aquatic ecocistems // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. Vol. 64. № 1. P. 69–114.

Youchimizu M., Kimura T. Study of intestinal microflora of Salmonids // Fish. Pathol. 1976. Vol. 10. № 2. P. 243.

# STUDY OF MICROORGANISMS COMING INTO THE PORT OF VLADIVOSTOK WITH SHIPS' BALLAST WATER

© 2012 Buzoleva L.S.<sup>1</sup>, Letyagina A.V.<sup>2</sup>, Zvyaginцев A.U.<sup>3</sup>, Kashin I.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Scientific Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, 690087, Vladivostok, Selskaya st., 1, Russia; e-mail: [buzoleva@mail.ru](mailto:buzoleva@mail.ru)

<sup>2</sup> Far Eastern Federal University, 690950, Oktyabrskaya st., 27, Vladivostok, Russia;  
e-mail: [ajrisha.1988@mail.ru](mailto:ajrisha.1988@mail.ru)

<sup>3</sup> Institute of Marine Biology FEB RAS, 690059, Vladivostok, Palchevskogo st., 17, Russia;  
e-mail: [ayzvyagin@gmail.com](mailto:ayzvyagin@gmail.com)

Study of heterotrophic and sanitary indicative bacteria number and variety were conducted in ballast waters of the tankers "Minotaur" and «Sunrise Wisteria» arrived from China and Japan. It was established that the ballast waters incoming into the port of Vladivostok from Japanese ports, were less polluted, than waters from the Chinese ports which during the summer were defined as "dirty" and "very dirty". Depending on degree of pathogenicity of microflora the ports-donors can be represented in the following row: Nantong > Lunkou > Yangchou > Lajchzhou > Mizushima > Iwakuni > Kawasaki. In ballast waters from tanker "Minotaur" enterobacteria, which number exceeded the sanitary code (in 40 and more times), and gram-negative mobile rod-shaped bacteria with enzymatic type of metabolism, resistant to heavy metals and antibiotics that characterizes places of their inhabitancy as insufficiently sated with the oxygen, polluted by industrial and household water wastes were isolated. Sanitary indicative microorganisms have been presented mainly by enterobacteria *Hafnia* (37 %), *Enterobacter liqueface* (22 %), *Citrobacter* (15 %), *Shigella* (7 %). According to indicators of the cytolytic test representatives of *Shigella*, *Hafnia*, *Citrobacter* and *Salmonella* genera have the highest level of pathogenicity of bacteria.

**Key words:** ballast waters, port of Vladivostok, heterotrophic bacteria, enterobacteria, pathogenic and opportunistic microflora.