

УДК 579.68:57.063

ВИБРИОФЛОРА ГИДРОБИОНТОВ И ВОДЫ ЗАЛИВОВ ПЕТРА ВЕЛИКОГО (ЯПОНСКОЕ МОРЕ) И НЯЧАНГ (ЮЖНО-КИТАЙСКОЕ МОРЕ)

© 2020 г. И. А. Беленева*

Национальный научный центр морской биологии (ННЦМБ) им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток 690041, Россия

*e-mail: beleneva.vl@mail.ru

Поступила в редакцию 10.06.2019 г.

После доработки 02.10.2019 г.

Принята к публикации 03.10.2019 г.

Из проб воды и гидробионтов умеренной и тропической климатических зон выделено и фенотипически охарактеризовано 173 и 124 штамма *Vibrio* spp. соответственно. Идентификация проведена на основе расширенного анализа фенотипических свойств, что позволило выявить ранее не диагностированные виды. В зал. Петра Великого преобладали *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* и *V. splendidus*. Впервые сообщается о выделении *V. harveyi* из гидробионта умеренных вод зал. Петра Великого. Установлено более высокое видовое разнообразие вибрионов в тропической зоне по сравнению с таковым в умеренной зоне. Вибрионы из зал. Петра Великого были менее устойчивы к исследованному спектру антибиотиков, чем вибрионы из тропической зоны. Вьетнамский изолят *V. vulnificus* показал устойчивость к максимальному числу антибиотиков (к 12 из 15).

Ключевые слова: *Vibrio*, Японское море, залив Нячанг, устойчивость к антибиотикам

DOI: 10.31857/S0134347520050034

Ви́брионы, принадлежащие к классу Gammaproteobacteria семейства Vibrionaceae согласно анализу генов 16S rRNA, являются одними из самых распространенных в морской среде бактерий. Они обитают во всех районах Мирового океана как в свободноживущей форме, так и в ассоциациях с планктонными организмами, рыбами, моллюсками, иглокожими, водорослями, губками, кораллами и другими гидробионтами, населяя их органы и ткани (Thompson et al., 2004; Gomes-Gil et al., 2014). Известны симбиотические ассоциации между *Vibrio fischeri*, *V. logei* и кальмарами *Sepiolla* spp. Установлено, что *V. rotiferianus*, выделенный из культуры коловраток, положительно влияет на здоровье этих животных (Gomez-Gil et al., 2003). Существуют прочные симбиотические взаимоотношения между *V. haliotocoli* и брюхоногими моллюсками (Sawabe, 2006). Бактерии синтезируют большое количество органических кислот, которые используются морскими ушками в качестве источника энергии или предшественника для синтеза белка. Наблюдается прямая зависимость между ассоциированной микрофлорой и состоянием культивируемых устриц (Clerissi et al., 2018): чем стабильнее и разнообразнее состав микрофлоры, тем благополучнее их состояние.

Ви́брионы *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. vulnificus* и *V. parahaemolyticus* представляют бóльшую опасность для человека по сравнению с вибрионами *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnisii*, *V. harveyi* и *V. metschnikovii* (Gomes-Gil et al., 2014). Основными патогенами в аквакультуре являются *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *V. vulnificus* и *V. harveyi* (см.: Thompson et al., 2004). Ви́брионы вызывают заболевания у диких и культивируемых гидробионтов во всех регионах Мирового океана, нанося огромный экономический ущерб (Rivera-Posada et al., 2011; Gomes-Gil et al., 2014).

В организме здоровых креветок было обнаружено около 30 видов вибрионов, в том числе патогенные *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* и *V. damsela*, однако в заболевших особях преобладали лишь один-два вида (Gomez-Gil et al., 1998). Наличие патогенных видов вибрионов в здоровых кораллах, а также снижение разнообразия вибриофлоры в заболевших колониях были выявлены при анализе микрофлоры склерактиний в Средиземном море (Rubio-Portillo et al., 2018). Это позволяет заключить, что не всегда выделение патогенного или условно-патогенного вида (видов) вибрионов из гидробионта представляет опасность. Мутации генов, кодирующих факторы патогенности, приводят к появлению

авирулентных штаммов. Кроме этого, многие важные факторы патогенности, как и лекарственная резистентность, ассоциированы с мобильными генетическими элементами, участвующими в горизонтальном переносе генов. Их потеря приводит к потере устойчивости к антибиотикам и способности вызывать заболевание (Hazen et al., 2010). В отличие от клинических изолятов, большинство природных штаммов *V. parahaemolyticus* не являются патогенными (Su, Liu, 2007). В последнее время антибиотикоустойчивость у микроорганизмов приняла глобальный характер, что влечет за собой рост неблагоприятных последствий для человека. Широкое использование антибиотиков способствует распространению генов лекарственной резистентности. Однако устойчивость вибрионов к антибиотикам не всегда является следствием их широкого использования в аквакультуре, а может быть реакцией естественного отбора (Тео et al., 2000). Поэтому чрезвычайно важен постоянный контроль за циркулирующими в природной среде штаммами микроорганизмов, в частности вибрионов, которые способны нести гены множественной лекарственной резистентности и по сути являются их естественным резервуаром.

Распространению вибрионов в морской среде посвящено много работ (Thompson et al., 2004; Igbiosa, Okoh, 2008; Cano-Gomez et al., 2009; García-Aljaro et al., 2014). Однако информация о видовом разнообразии вибрионов в прибрежных водах российского Дальнего Востока, в частности в зал. Петра Великого, крайне скудна. Сведения о вибриофлоре в зал. Нячанг (Вьетнам) также весьма ограничены, хотя опубликованы данные о патогенных вибрионах, наносящих большой экономический ущерб аквакультуре в разных районах страны (Oanh et al., 2002; Dang et al., 2016).

Цель настоящего исследования — оценить видовое разнообразие и устойчивость к антибиотикам вибрионов в морской воде, а также ассоциированных с различными гидробионтами в зал. Петра Великого Японского моря и в зал. Нячанг Южно-Китайского моря.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Пробы воды в зал. Петра Великого (зал. Восток) Японского моря отбирали из поверхностного слоя (30–40 см) в июне–августе 2017 и 2018 гг., а в бухте Балка на Базе изучения морских млекопитающих (БИММ) и на акватории Приморского океанариума — один раз в месяц с 27.02.2013 г. по 14.01.2014 г. В зал. Восток образцы гидробионтов отбирали водолазы с глубины 3–10 м. Высевы на вибриофлору проводили из двусторчатых моллюсков *Crassostrea gigas*, *Crenomytilus grayanus*, *Spisula sachalinensis*, *Modiolus kurilensis*, *Mytilus trossulus* и *Mizuhopecten yessoensis*, голотурии *Apostichopus japonicus*, морских ежей *Strongylocentrotus interme-*

dus и *Mesocentrotus nudus*, морских звезд *Patiria pectinifera* и *Asterias amurensis*, асцидии *Halocynthia aurantium*, водорослей *Saccharina japonica*, *Desmarestia viridis*, *Fucus distichus* subsp. *evanescens*, *Ulva lactuca* и *Mazzaella japonica*, а также из морской травы *Zostera marina*. Всего в зал. Петра Великого было отобрано 20 проб воды и 66 образцов гидробионтов.

В Южно-Китайском море у берегов Вьетнама пробы воды отбирали из поверхностного слоя в ноябре и декабре 2017 г. в зал. Нячанг в бухте Дам Бай, в порту Кауда, а также на пяти станциях у южного побережья залива в районе Камрани и на пяти станциях у северного побережья в районе Нинь Хоа. Образцы гидробионтов в бухте Дам Бай отбирали на глубине до 4 м. Это были водоросли *Caulerpa lentillifera*, *Padina boryana*, *Sargassum* sp. и *Gracilaria salicornia*, устрицы *Magallana bilineata*, *Pinctada margaritifera*, *Saccostrea cucullata* и *Ostrea* sp., колониальная асцидия *Didemnum molle*, губка *Niphates olemda*, усоногие раки *Amphibalanus* spp., брюхоногие моллюски *Ergalatax* sp. и *Bursa granularis*, морская звезда *Culcita novaeguineae*, а также морской еж *Salmacis bicolor*. Всего в зал. Нячанг отобрано 14 проб воды и 55 образцов гидробионтов.

Содержание растворенного кислорода в воде оценивали с помощью портативного измерителя HI 9142 (Hanna Instruments, Italy), а соленость — ручного рефрактометра S/Mill-E 2442-W10 (Japan).

Бактерий выделяли в соответствии с описанными ранее методиками (Беленева и др., 2014). Культуры хранятся при температуре –85°C в криопробирках в морской воде с добавлением глицерина (30%), пептона (1%) и MgSO₄ (3–5 г/л) (среда “Difco”, США) в Музее гетеротрофных бактерий ННЦМБ ДВО РАН, а также в автоматической системе биобанкирования LiCONiC STC Compact ULT при –80°C в Морском биобанке ННЦМБ ДВО РАН. Фенотипическую характеристику изолятов проводили, как описано ранее (Беленева, Кухлевский, 2010; Беленева и др., 2014) и с применением тест-систем API 20E (“bioMérieux”, Франция) согласно Буллера (Buller, 2004). Штаммы идентифицировали с использованием дихотомических ключей (Noguerola, Blanch, 2008), а также дополнительных данных, приведенных в руководствах по определению бактерий (Buller, 2004; Gomes-Gil et al., 2014). Люминесценцию определяли визуально в темноте по свечению культуры бактерий, выращенных на среде Marine Broth 2216 (“Difco”, США), обогащенной 10% глицерина, в течение 12 ч при встряхивании на шейкере Excella E5 (США) при 130 об/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика мест отбора проб воды и гидробионтов

В зал. Восток температура и соленость поверхностного слоя воды изменялись в пределах 15.8–24.6°C и 26.1–33.5‰, на глубине 5 м – 15.0–23.8°C и 29.7–33.9‰.

В зал. Нячанг в бухте Дам Бай в 20 м от берега соленость воды составляла 32‰, концентрация растворенного кислорода – 5.8 мг/л. В порту Кауда на таком же расстоянии от берега эти показатели составляли соответственно 32‰ и 5.3 мг/л. В южной части залива на станции (далее – ст.) 1 (район впадения реки в море) соленость воды составляла 14‰, а концентрация растворенного кислорода – 3.2 мг/л; на ст. 2 (хозяйство марикультуры) – соответственно 26‰ и 4.3 мг/л; на ст. 3 (морской пруд с рыбой в танках) – 28‰ и 3.7 мг/л; на ст. 4 (порт Камрань) – 32‰ и 2.6 мг/л; на ст. 5 (устье реки) – 6‰ и 3.6 мг/л. В северной части залива в районе Нинь Хоа на ст. 6 при отсутствии признаков хозяйственной деятельности соленость воды составляла 20‰, концентрация растворенного кислорода – 10.3 мг/л; на ст. 7 (у пирса) – соответственно 32‰ и 10.4 мг/л; на ст. 8 (кутовая часть залива, рыбацкий затон) – 4.0‰ и 6.2 мг/л; на ст. 9 (устье реки у моста) – 15‰ и 8.3 мг/л; на ст. 10 (пляж Зоклет) – 30‰ и 9.1 мг/л.

Видовое разнообразие и устойчивость к антибиотикам

Всего нами выделено и охарактеризовано 297 штаммов вибрионов, принадлежащих к 11 видам (табл. 1). Из проб воды и гидробионтов зал. Петра Великого выделено 173 штамма вибрионов (табл. 2). Наиболее распространенными были *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* и *V. splendidus* I биотипа, выявленные во всех видах исследованных гидробионтов и в морской воде. Штаммы *V. pomeroiyi*, входящего в группу *V. splendidus*, и *V. fluvialis* также были обнаружены в беспозвоночных животных и в воде. Из воды вибрионы выделяли с мая по ноябрь с пиком численности в июле и августе. Патогенные для человека вибрионы *V. harveyi* и *V. furnissii* были выявлены только в двусторчатых моллюсках и трепанге.

В зал. Нячанг из проб воды и гидробионтов выделено и фенотипически охарактеризовано 124 штамма вибрионов (табл. 3). В вибриофлоре, как и в зал. Петра Великого, преобладали *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus*, однако видовое разнообразие вибрионов в тропической зоне было выше, чем в умеренной зоне. Здесь были отмечены виды, не встречавшиеся в зал. Петра Великого: *V. vulnificus*, *V. anguillarum*, *V. mimicus*, *V. agarivorans* и *V. splendidus* II биотипа. Патогенные вибрионы обнаружены как в воде, так и в гидробионтах. *V. anguillarum*

и *V. furnissii* были выявлены в пробах воды, отобранных в районе станций 2 и 3, расположенных в хозяйствах марикультуры у побережья Камрани, а *V. vulnificus* и *V. mimicus* – в пробах воды со ст. 8 у побережья Нинь Хоа. По одному штамму *V. harveyi* было выделено из проб воды, отобранных в бухте Дам Бай на станциях 1, 5, 8 и 9.

Сравнительный анализ антибиотикочувствительности показал, что в зал. Петра Великого вибрионы были менее устойчивы к исследованному спектру антибиотиков, чем в тропической зоне (табл. 4, 5). Так, к тетрациклину, ципрофлоксацину и гентамицину в зал. Петра Великого было устойчиво 24.9, 16.8 и 14.5% штаммов соответственно; устойчивость вьетнамских изолятов составляла 62.1, 50.0 и 46.0% штаммов соответственно. В умеренной зоне *V. parahaemolyticus* был устойчив к максимальному числу антибиотиков – к 8 из 15. В зал. Нячанг парагемолитические вибрионы, наряду с *V. fluvialis* и *V. vulnificus* были устойчивы к 10, 10 и 12 антибиотикам из 15 соответственно. В умеренной зоне все виды вибрионов были устойчивы к оксациллину, олеандомицину, а в тропиках – к ампициллину, оксациллину и карбенициллину. Вибрионы из зал. Петра Великого были чувствительны к цефтазидиму, ципрофлоксацину, хлорамфениколу, рифампицину и вибриостатическому агенту 0–129/150 мкг; вибрионы из зал. Нячанг – к хлорамфениколу, рифампицину и 0–129 /150 мкг.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на огромную значимость вибрионов в патологии гидробионтов и человека, экологический контроль за их распространением в морской среде и устойчивостью к антимикробным факторам недостаточен. Идентификация вибрионов осложняется тем, что некоторые виды имеют почти идентичные последовательности 16S рРНК и сходные фенотипические признаки (Thompson et al., 2004; Rivera-Posada et al., 2011; Gomez-Gil et al., 2014). Например, *V. furnissii* трудно дифференцировать от *V. fluvialis* с помощью 16S рРНК, так как сравнение этих последовательностей показало их 100% сходство (Hashimoto et al., 2018). *V. cholerae* и *V. mimicus* фенотипически различаются только по отношению к сахарозе и по реакции Фогес–Проскауэра (West et al., 1986; Gomez-Gil et al., 2014). Методы идентификации вибрионов постоянно совершенствуются. Из-за схожести фенотипов близкородственных видов общепринятые короткие схемы дифференциации имеют серьезные недостатки. Кроме того, некоторые подвижные генетические элементы являются причиной фенотипической гетерогенности, так как несут дополнительные фенотипические характеристики (Hazen et al., 2010).

Таблица 1. Фенотипические свойства изолятов

Характеристика	V. alg	V. para	V. vuln	V. harv	V. furn	V. fluv	V. spl		V. pom	V. agar	V. ang	V. mim
							I	II				
β-галактозидаза	—	—	+	v	+	+	+	—	+	+	+	+
Аргининдигидролаза	—	—	—	—	+	+	+	—	+	—	+	—
Лизиндекарбоксилаза	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+
Орнитиндекарбоксилаза	v*	+	v	+	—	—	—	—	—	—	—	+
Утилизация цитратов	—	v	v	—	+	+	v	v	—	—	+	—
H ₂ S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Уреаза	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Триптофандеаминаза	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Продукция индола	v	+	+	+	—	v	+	—	+	—	+	+
Фогес—Проскауэр	v	v	—	—	—	—	v	—	v	—	+	—
Желатиназа	v	v	+	+	+	v	+	v	+	—	+	+
Глюкоза	+	+	+	+	+газ	+	+	+	+	+	+	+
Маннит	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+
Инозит	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
Сорбит	—	—	—	v	—	v	—	—	+	—	+	—
Рамноза	—	—	—	—	v	—	—	—	—	—	—	—
Сахароза	+	—	—	+	+	+	+	—	—	—	+	—
Мелибиоза	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	—	—
Амигдалин	—	+	+	+	—	+	—	—	—	—	+	—
Арабиноза	—	v	—	—	+	+	—	—	—	—	v	—
Цитохромоксидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TCBS агар**	ж	зел	зел	ж	ж	ж	ж	зел	зел	зел	ж	зел
NO ₃ [−] редукция	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Кислота из арбутина	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—	+
Утилизация:												
лейцин	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
путресцин	v	+	—	—	+	v	—	—	—	—	—	—
этанол	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Рост на NaCl:												
0%	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+
6%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
8%	+	+	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
10%	+	v	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Агараза	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
Амилаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	—

*Признак варьирующ у разных штаммов.

**Бактерии при росте на этой среде формируют желтые (ж) или зеленые (зел) колонии.

Примечание. Первые 21 характеристики даны по результатам тест-системы API 20 E; V. alg — *V. alginolyticus*, V. para — *V. parahaemolyticus*, V. vuln — *V. vulnificus*, V. harv — *V. harveyi*, V. furn — *V. furnissii*, V. fluv — *V. fluvialis*, V. spl — *V. splendidus*, V. pom — *V. pomeroyi*, V. agar — *V. agarivorans*, V. ang — *V. anguillarum*, V. mim — *V. mimicus*.

Для дифференциации видов вибрионов рекомендовано включить следующие тесты: продукция кислоты из арбутина и салицина, а также использование L-лейцина, путресцина и этанола, являющегося источником углерода (West et al., 1986). В то же время применение слишком боль-

шого числа дополнительных тестов не всегда эффективно, трудозатратно и дорого (Alcaide, 2003). В руководстве Буллера (Buller, 2004) подтверждена адекватность использования тест-системы API-20E для идентификации вибрионов. Применение усовершенствованных схем и методик

Таблица 2. Источник выделения штаммов *Vibrio* spp. в зал. Петра Великого

Объект	N	<i>V. alginolyticus</i> (110)	<i>V. parahaemolyticus</i> (29)	<i>V. harveyi</i> (2)	<i>V. furnissii</i> (1)	<i>V. fluvialis</i> (8)	<i>V. splendidus</i> (20)	<i>V. pomeroyi</i> (3)
Двустворчатые моллюски:								
<i>Crassostrea gigas</i>	5	5	2	—	1	2	3	—
<i>Crenomytilus grayanus</i>	5	4	3	—	—	1	5	—
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	5	5	2	—	—	2	—	—
<i>Modiolus kurilensis</i>	5	4	1	—	—	—	—	—
<i>Mytilus trossulus</i>	5	5	1	—	—	—	—	—
<i>Spisula sachalinensis</i>	5	3	1	—	—	—	2	—
Голотурии:								
<i>Apostichopus japonicus</i>	3	7	2	2	—	—	—	1
Морские ежи:								
<i>Mesocentrotus nudus</i>	3	4	2	—	—	—	3	1
<i>Strongylocentrotus intermedius</i>	3	3	1	—	—	—	—	—
Морские звезды:								
<i>Asterias amurensis</i>	3	3	2	—	—	—	—	—
<i>Patiria pectinifera</i>	3	3	2	—	—	—	—	—
Асцидии:								
<i>Halocynthia aurantium</i>	3	5	1	—	—	—	—	—
Водоросли:								
<i>Desmarestia viridis</i>	3	3	—	—	—	—	—	—
<i>Fucus distichus</i>	3	5	—	—	—	—	—	—
<i>Gracilaria verrucosa</i>	3	4	—	—	—	—	4	—
<i>Saccharina japonica</i>	3	4	—	—	—	—	—	—
<i>Mazzaella japonica</i>	3	2	—	—	—	—	—	—
Морская трава:								
<i>Zostera marina</i>	3	7	3	—	—	—	—	—
Морская вода	20	34	6	—	—	3	3	1

Примечание. Здесь и в табл. 3: в скобках — количество выделенных штаммов; N — количество экземпляров и проб воды.

идентификации на основе характеристики фенотипа позволило нам расширить спектр видов вибрионов, обитающих в умеренных водах зал. Петра Великого, а также выявить не обнаруженные ранее виды (*V. harveyi*). Дифференцировали виды *V. harveyi* и *V. alginolyticus* по ряду признаков: по наличию уреазы, способности к росту при 10% NaCl в среде и по реакции Фогес—Проскауэра (Buller, 2004). Кроме этого, из 11 штаммов *V. harveyi* 9 обладали люминесценцией.

В опубликованных работах, посвященных изучению вибриофлоры дальневосточных морей, идентификация вибрионов проведена, как правило, до уровня рода; авторы ограничиваются данными о численности вибриофлоры в разных морских объектах и о ее сезонных колебаниях (Богатыренко, Бузолева, 2016). Известно о широком распространении *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus* (см.: Лаженцева, 2012). При этом информация о других видах вибрионов отсутствует либо вызывает сомнение. Так, анализ патогенной микрофлоры камчатского краба выявил наличие

V. vulnificus (см.: Пугаева и др., 2002), однако диагностика патогена, на наш взгляд, была проведена не в полной мере, чтобы определить его до уровня вида. Наши данные о преобладании *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus* в зал. Петра Великого совпадают с результатами изучения распространения галофильных вибрионов (Лаженцева, 2012) и подтверждают предыдущие результаты (Беленева и др., 2004). Следует отметить, что *V. alginolyticus* в воде обнаруживали чаще, чем *V. parahaemolyticus* (30.6 и 20.6% штаммов соответственно), последний вид обычно находили в гидробионтах.

Установлено, что *V. splendidus* I биотипа является третьим по распространению видом вибрионов в зал. Петра Великого, при этом в зал. Нячанг выделяли *V. splendidus* II биотипа и не выделяли *V. splendidus* I биотипа. Из дальневосточного тропанга *A. japonicus* нами выделен *V. harveyi*. Ранее о его находках в зал. Петра Великого не сообщалось. Обычно *V. harveyi* выделялся в тропических и субтропических водах; считают, что этот вид

Таблица 3. Источник выделения штаммов *Vibrio* spp. в зал. Нячанг, Вьетнам

Объект	N	<i>V. alginolyticus</i> (57)	<i>V. parahaemolyticus</i> (23)	<i>V. vulnificus</i> (5)	<i>V. harveyi</i> (9)	<i>V. furnissii</i> (7)	<i>V. fluvialis</i> (7)	<i>V. splendidus</i> (5)	<i>V. agarrivorans</i> (4)	<i>V. anguillarum</i> (5)	<i>V. minicus</i> (2)
Двустворчатые моллюски:											
<i>Ostrea</i> sp.	5	3	3	1	—	1	2	—	—	—	—
<i>Magallana bilineata</i>	5	2	1	—1	—	2	2	—	—	—	—
<i>Pinctada margaritifera</i>	5	4	2	—	—	—	2	—	—	—	—
<i>Saccostrea cucullata</i>	5	2	1			—	—	—			—
Брюхоногие моллюски:											
<i>Ergalatax</i> sp.	3	3	2	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Bursa granularis</i>	3	2	1		—	—	—	—	—	—	—
Морские ежи:											
<i>Salmaeis bicolor</i>	3	3	3	—	4	—	—	—	—	—	—
Морские звезды:											
<i>Calappa novaeguineae</i>	1	2	—	—	—	—	—	—	—	1	—
Асцидии:											
<i>Didemnum molle</i>	3	5	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Губки:											
<i>Niphates olemda</i>	2	4	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Усоногие раки:											
<i>Amphibalanus</i> spp.	5	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Водоросли:											
<i>Caulerpa lentillifera</i>	3	3	—	—	—	1	1	—	—	—	—
<i>Fucus distichus</i>	3	3	2	—	—	—	—	—	2	—	—
<i>Gracilaria salicornia</i>	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Padina boryana</i>	3	3			—	—	—	—	2	—	—
<i>Sargassum</i> sp.	3	2			—	—	—	—	—	—	—
Морская вода	14	24	8	2	5	2	—	5	—	4	2

Примечание. Условные обозначения, как в табл. 2.

Таблица 4. Резистентность к антибиотикам изолятов из зал. Петра Великого

Антибиотик	R*/R**	V. fluv/8***	V. alg/110	V. harv/2	V. para/29	V. furn/1	V. spl 1/20	V. pom/3
Пенициллин	131/75.7	S	R (90)	R	R (26)	S	R (10)	R
Ампициллин	110/63.6	R (6)	R (73)	R	S (13)	R	R (12)	R
Оксациллин	173/100	R	R	R	R	R	R	R
Карбенициллин	119/68.8	R (6)	R (84)	R	R (19)	S	S (5)	S
Цефтазидим	16/9.25	S	S (12)	S	S (4)	S	S (3)	S
Стрептомицин	21/12.1	S	S (5)	R	S (13)	S	S (3)	S
Гентамицин	25/14.5	R	S (21)	S	S (4)	S	S	S
Ципрофлоксацин	29/16.8	S	S (16)	S	S (13)	S	S	S
Олеандомицин	173/100	R	R	R	R	R	R	R
Тетрациклин	43/24.9	S (3)	S (19)	S	R (18)	R	S (2)	S
Линкомицин	173/100	R	R	R	R	R	R	R
Левомецетин	3/1.7	S	S	S	S (3)	S	S	S
Рифампицин	0	S	S	S	S	S	S	S
Полимиксин В	44/25.4	S	S (24)	S	R (20)	S	S	S
0–129/10 мкг	112/64.7	R	R (74)	S	R (21)	R	S (8)	S
0–129/150 мкг	11/6.4	S	S (8)	S	S (3)	S	S	S

*Количество резистентных штаммов; **процент резистентных штаммов; ***вид и количество выделенных штаммов.

Примечание. Названия видов вибрионов, как в табл. 1; R – резистентный штамм, S – чувствительный к данному антибиотику штамм; в скобках указано количество резистентных штаммов.

предпочитает высокие температуры (Austin, Zhang, 2006). Однако показано, что температура не оказывает значительного влияния на вибриофлору; более значимый лимитирующий фактор – наличие органического вещества (Eiler et al., 2007). Появляется все больше свидетельств того, что многие патогенные бактерии, в том числе *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* и *V. vulnificus*, могут выживать в суровых условиях окружающей среды в течение продолжительного периода времени в “жизнеспособном, но не культурабельном” состоянии (Igbinosa, Okoh, 2008). Исследователи также полагают, что рост числа инфекций у морских позвоночных и беспозвоночных и даже у людей связан с повышением температуры морской воды и распространением патогенных микроорганизмов в более высокие широты.

Помимо *V. harveyi* из дальневосточного тропанга нами выделен штамм *V. pomeroi*. Этот вид также считается патогеном для иглокожих и ранее в зал. Петра Великого был выявлен из морского ежа *Mesocentrotus nudus* (см.: Беленева, Кухлевский, 2010). Приуроченность *V. harveyi* и *V. pomeroi* к иглокожим дает основание рассматривать этих животных в качестве экологической ниши для патогенов. В двустворчатых моллюсках нами обнаружены патогенные *V. furnissii* и *V. fluvialis*. Все виды анализируемых моллюсков съедобны и очень популярны у любителей морепродуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормы (СанПиН, 2002) в качестве контроля про-

дуктов из гидробионтов предусматривают выявление только *V. parahaemolyticus*, а другие многочисленные виды морских вибрионов остаются без внимания. Возможно, поэтому в прибрежных зонах Дальневосточного федерального округа в теплое время года часто регистрируются случаи острых кишечных инфекций неустановленной этиологии.

В зал. Нячанг, как и в зал. Петра Великого, преобладающими были *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus*, причем последний вид встречался здесь значительно чаще, чем в умеренной зоне. Третье место по встречаемости занимал *V. harveyi*. В литературе сообщается, что на вьетнамских рынках в креветке *V. parahaemolyticus* встречается чаще, чем *V. alginolyticus* (см.: Tra et al., 2016). Парагемолитические вибрионы вызывают массовую гибель креветок (Dang et al., 2018). В 1997 и 1999 гг. во время обследования пациентов с диареей в провинции Кхань Хоа (Вьетнам) было выявлено 523 штамма *V. parahaemolyticus* (см.: Chowdhury et al., 2004). Авторы полагают, что 49% штаммов относятся к пандемическим штаммам, возникшим в 1996 г. и распространившимся во многих странах. Исследование заболеваний культивируемого морского конька *Hippocampus* spp. во Вьетнаме выявило преобладание в больных животных *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* и *V. harveyi* (см.: Dang et al., 2016). *V. harveyi* является причиной массовых вспышек заболеваний культивируемых гидробионтов во Вьетнаме и в Таиланде, а также в ряде

Таблица 5. Резистентность к антибиотикам изолятов из зал. Нячанг

Антибиотик	R*/R**	V. fluv/7	V. alg /57	V. harv/9	V. para/23	V. furn/7	V. spl 2/5	V. agar /4	V. vuln/5	V. ang/5	V. mim/2
Пенициллин	113/91.1	R	R	R	R	R	M	R	R	S	R (1)
Ампициллин	112/90.3	R	R(48)	R	R	R	R	R (2)	R	R	R (1)
Оксациллин	124/100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Карбенициллин	124/100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Цефтазидим	26/21.0	S (2)	S (11)	S (2)	S (5)	S (1)	S (1)	S	R (3)	S (1)	S
Стрептомицин	41/33.1	R (5)	S (5)	R	R (14)	S (2)	R (3)	S	R (3)	R	R
Гентамицин	53/43.1	R	S (26)	S (2)	S (5)	S (2)	S (1)	S	R	R	S
Ципрофлоксацин	58/46.8	R (5)	R (29)	S (2)	R (13)	S (2)	S (1)	S	R (3)	R (3)	S
Олеандомицин	124/100	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
Тетрациклин	74/59.7	R (4)	R (31)	S (4)	R (20)	R (5)	R (3)	S (1)	R	R (4)	R
Линкомицин	124/100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Левомецетин	21/16.9	S (2)	S (3)	S (2)	S (8)	S (3)	S (1)	S	S (1)	S (1)	S
Рифампицин	7/5.6	S (2)	S	S (1)	S (2)	S (1)	S	S	S (1)	S	S
Полимиксин В	47/37.9	S (3)	S (18)	S (2)	R (14)	S (3)	S	S	R	S (2)	S
0–129/10 мкг	104/83.8	R	R	R	R (18)	R (6)	S (2)	S	S	R	S
0–129/150 мкг	12/9.7	S	S (6)	S	S (4)	S (2)	S	S	S	S	S

Примечание. Обозначения, как в табл. 1, 4.

стран Юго-Восточной Азии и Латинской Америки (Buller, 2004; Austin, Zhang, 2006).

Следует отметить, что в тропической зоне нами были выделены штаммы *V. splendidus* II биотипа, которые считаются патогенными для некоторых гидробионтов (Gomes-Gil et al., 2014), и не обнаружены *V. splendidus* I биотипа, распространенные в зал. Петра Великого. Штаммы *V. anguillarum*, *V. furnissii* и *V. vulnificus* были выделены нами из воды только в местах расположения хозяйств марикультуры. Неблагополучное состояние объектов можно было оценить даже визуально: вода была очень мутной, на поверхности плавало много мусора (ст. 2 и 8). В танках с рыбой (ст. 3) концентрация кислорода была низкой, встречалась даже погибшая рыба. Томпсон с коллегами (Thompson et al., 2004) отмечают, что в условиях искусственного культивирования при высокой плотности гидробионтов, концентрации органического вещества и массовом применении антибиотиков патогенный потенциал конкретных штаммов вибрионов имеет решающее значение.

Ранее продуценты антибиотиков — актиномицеты считались источником генов лекарственной резистентности. Однако в настоящее время установлено, что любые природные бактерии являются естественным резервуаром генов устойчивости к антибиотикам, которые затем могут быть переданы клинически значимым бактериям с помощью мобильных генетических элементов (García-Aljaro et al., 2014).

Вибрионы, выявленные в зал. Петра Великого, были устойчивы к 5–8 из 15 тестированных антибиотиков (табл. 4). При этом максимальную резистентность изоляты обеих климатических зон показали к β -лактамам. Устойчивость к пенициллину, ампициллину и карбенициллину широко распространена; нередки случаи, когда все выделенные изоляты устойчивы к ним (Thompson et al., 2004). Устойчивость к тетрациклину неуклонно растет, он популярен в практике аквакультуры до настоящего времени, а ранее был одним из первых антибиотиков, активных в отношении грамотрицательных бактерий (Tra et al., 2016). Устойчивость к гентамицину и стрептомицину проявляют от 4 до 100% изолятов *Vibrio*; эти препараты также распространены в аквакультуре. Фторхинолоны в аквакультуре не используются, как правило, вибрионы к ним чувствительны, а встречающаяся устойчивость обусловлена генными мутациями (Gomes-Gil et al., 2014).

При сравнении чувствительности изолятов *Vibrio* из природных и искусственных экосистем в разных частях Мирового океана наблюдается пестрая картина. Относительно невысокая лекарственная устойчивость вибрионов характерна для хозяйств аквакультуры, где менеджмент обеспечивает оптимальные условия содержания гидро-

бионтов, а плохие условия диктуют применение антибиотиков в качестве профилактической и терапевтической меры. Подобная практика способствует селекции устойчивых клонов, так как изменяет структуру микробных популяций и за пределами марихозайств (García-Aljaro et al., 2014). В мире регистрируются как фатально высокие уровни устойчивости вибрионов к лекарственным препаратам, когда до 70% изолятов показывают мультирезистентность (Thompson et al., 2004) к 10 и более препаратам (Baker-Austin et al., 2008), так и очень низкие (Blanch et al., 2009). В нашем исследовании устойчивость к наибольшему числу антибиотиков (10–12) продемонстрировали изоляты из зал. Нячанг. Этот результат, очевидно, обусловлен широким применением антимикробных препаратов в марикультуре тропической зоны, а также отсутствием очистных сооружений в населенных пунктах, окружающих залив (Nguyen et al., 2013). Наши данные подчеркивают важность рутинного скрининга большого количества штаммов *Vibrio*, содержащихся в окружающей среде, на наличие устойчивости к широкому набору антимикробных препаратов для обеспечения, в частности, базы данных для клинических целей.

На фоне широкого использования метагеномного анализа и изучения популяционной структуры патогенных бактерий ученые все более склоняются к выводу, что при неблагоприятных условиях определенный гипервирулентный штамм или клон получает преимущества и становится доминантным в любом бактериальном сообществе (Rubio-Portillo et al., 2018) — в организме человека, гидробионта или системе культивирования гидробионтов. Именно штамм, а не вид в целом, является возбудителем заболевания. Данная точка зрения еще раз подтверждает предположение о том, что многие виды *Vibrio* являются оппортунистическими патогенами. Обычно вибриозами поражаются люди с низким иммунным статусом. Плохая экологическая обстановка в зонах обитания или культивирования гидробионтов также способствует возникновению у них спорадических заболеваний или вспышек инфекций, вызванных вибрионами. Безусловно, контроль за распространением вибрионов в морской среде является необходимым инструментом для предотвращения вспышек заболеваний у человека и животных. Информация о их разнообразии и биологических свойствах поможет прогнозировать сценарии модификации микробоценозов, появления патогенов, усиления устойчивости к антибиотикам, а также расширит наши возможности в поиске пробиотиков и других эффективных продуцентов, перспективных для биотехнологии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке проекта Дальний Восток 18-4-050.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность д. б. н. заместителю директора по науке Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (г. Москва) В.А. Карпову за предоставленную возможность проводить исследования на базе Приморского отделения российско-вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра (ТЦ), Нячанг, Вьетнам; Nguyen Van Trieu, сотруднику отдела тропикостойкости ТЦ за помощь в отборе проб и Л.Д. Куличковой за данные по гидрологической характеристике вод зал. Восток. Экспериментальная часть работы была частично выполнена на базе НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова согласно Договору оказания научно-технических услуг между ННЦМБ ДВО РАН и НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова от 17.04.2018 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беленева И.А., Кухлевский А.Д. Характеристика *Vibrio gigantis* и *V. rotteroyi*, выделенных из беспозвоночных животных залива Петра Великого, Японское море // Микробиология. 2010. Т. 79. № 3. Р. 422–427.
- Беленева И.А., Магарламов Т.Ю., Кухлевский А.Д. Характеристика, идентификация и скрининг на продукцию тетродотоксина бактерий, ассоциированных с немертиной *Cephalotrix simulans* (Ivata, 1952) // Микробиология. 2014. Т. 83. № 3. С. 312–319.
- Беленева И.А., Масленникова Э.Ф., Магарламов Т.Ю. Физиолого-биохимические свойства галофильных вибрионов *Vibrio parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*, изолированных из гидробионтов залива Петра Великого Японского моря // Биол. моря. 2004. Т. 30. № 2. С. 114–119.
- Богатыренко Е.А., Бузолева Л.С. Характеристика бактериального сообщества кишечника дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* // Микробиология. 2016. Т. 85. № 1. С. 92–99.
- Лаженцева Л.Ю. Распространенность галофильных вибрионов в морских промысловых объектах и продуктах из них. Обзор // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. 2012. Вып. 26. С. 34–52.
- Пугаева В.П., Устименко У.Ф., Сергеев Н.В. К вопросу о бактериальных патогенах камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* западного побережья Камчатки // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. 2002. Вып. 6. С. 318–322.
- СанПиН 2.3.2.1078-01 “Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов” (с изменениями на 6 июля 2011 г.). М.: Минздрав, Россия. 2002.
- Alcaide E. Numerical taxonomy of Vibrionaceae isolated from cultured Amberjack (*Seriola dumerili*) and surrounding water // Curr. Microbiol. 2003. V. 46. P. 184–189.
- Austin B., Zhang X.-H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates // Letters Appl. Microb. 2006. V. 43. № 2. P. 119–124.
- Baker-Austin C., McArthur J.V., Tuckfield R.C. et al. Antibiotic resistance in the shellfish pathogen *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the coastal water and sediment of Georgia and South Carolina, USA // J. Food Prot. 2008. V. 71. P. 2552–2558.
- Blanch A.R., C. Hispano, P. Bulto et al. Comparison of *Vibrio* spp. populations found in seawater, in exhibition aquaria, in fish intestine and in fish feed // J. Appl. Microbiol. 2009. V. 106. P. 57–65.
- Buller N.B. Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual. CABI Publishing. 2004. P. 394.
- Cano-Gomez A., Bourne D.G., Hall M.R. et al. Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: Current methods and future prospects // Aquaculture. 2009. V. 287. P. 1–10.
- Chowdhury A., Ishibashi M., Vu D.T. et al. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999 // Microbiol. Immunol. 2004. V. 48. № 4. P. 319–327.
- Clerissi C., Lorgeril J., Petton B. et al. Diversity and stability of microbiota are key factors associated to healthy and diseased *Crassostrea gigas* oysters // <https://t.co/VFp9hoX-lq5>. 2018.
- Dang T.B., Vu D.H.Q., Tran Q.S., Truong T.O. Vibriosis in cultured seahorse (*Hippocampus* spp.) in Khanh Hoa Province, Vietnam // Int. J. Innov. Stud. Aquat. Biol. Fish. (IJISABF). 2016. V. 2. № 2. P. 43–50.
- Dang T.H.O., Nguyen T.N., Tran V.T., Bondad-Reantaso M.G. Identification and characterization of *Vibrio* bacteria isolated from shrimp infected with early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis syndrome (EMS/AHPNS) in Viet Nam // Asian Fish. Sci. 2018. V. 31S. P. 283–292.
- Eiler A., Gonzalez-Rey C., Allen S., Bertilsson S. Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio* spp. to cyanobacterial dissolved organic matter and temperature in brackish water // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 60. № 3. P. 411–418.
- García-Aljaro C., Riera-Heredia J., Blanch A.R. Antimicrobial resistance and presence of the SXT mobile element in *Vibrio* spp. isolated from aquaculture facilities // New Microbiol. 2014. V. 37. № 3. P. 339–346.

- Gomez-Gil B., Roque A., Turnbull J. F., Tron-Mayen L. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei* // Aquaculture. 1998. V. 163. P. 1–9.
- Gomez-Gil B., Thompson F.L., Thompson C.C., Swings J. *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. № 1. P. 239–243.
- Gomez-Gil B., Thompson C.C., Matsumura Y. et al. Family Vibrionaceae (Chapter 225) // The Prokaryotes / Eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Thompson F.L., Lory S., Stackebrandt E. 4th Edn. New York: Springer. 2014. P. 659–747.
- Hashimoto T., Takaya S., Kutsuna S. et al. A case report of *Vibrio furnissii* bacteremia and cellulitis in a malnourished patient without an apparent site of entry // J. Infect. Chemother. 2018. V. 24. № 1. P. 65–67.
- Hazen T.H., Pan L., Gu J.-D., Sobecky P.A. The contribution of mobile genetic elements to the evolution and ecology of Vibrios // FEMS Microbiol. Ecol. 2010. V. 74. № 3. P. 485–499.
- Igbinsola E.O., Okoh A.I. Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries // Res. Microbiol. 2008. V. 159. № 7–8. P. 495–506.
- Nguyen A.D., Zhao J.-X., Feng Y.-X. et al. Impact of recent coastal development and human activities on Nha Trang Bay, Vietnam: evidence from a *Porites lutea* geochemical record // Coral Reefs. 2013. V. 32. № 1. P. 181–193.
- Noguerola I., Blanch A.R. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys // J. Appl. Microbiol. 2008. V. 105. P. 175–185.
- Oanh D.T., Pedersen K., Larsen J.L. Identification and characterization of *Vibrio* bacteria isolated from fish and shellfish in Vietnam // Diseases in Asian Aquaculture IV. Asian Fish. Soc., Manila. 2002. P. 73–85.
- Rivera-Posada J.A., Pratchett M., Cano-Gomez A. et al. Refined identification of *Vibrio* bacterial flora from *Acanthaster planci* based on biochemical profiling and analysis of housekeeping genes // Dis. of Aquat. Org. 2011. V. 96. P. 113–123.
- Rubio-Portillo E., Gago J.F., Martínez-García M. et al. *Vibrio* communities in scleractinian corals differ according to health status and geographic location in the Mediterranean Sea // Syst. Appl. Microbiol. 2018. V. 41. № 2. P. 131–138.
- Sawabe T. The mutual partnership between *Vibrio haliotocoli* and abalones // The Biology of Vibrios / Eds. F.L. Thompson et al. Washington, D.C. ASM Press. 2006. P. 219–230.
- Su Y.-C., Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety // Food Microbiol. 2007. V. 24. P. 549–558.
- Teo J.W.P., Suwanto A., Poh C.L. Novel β -lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi* // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. P. 1309–1314.
- Thompson F.L., Iida T., Swings J. Biodiversity of Vibrios // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004. V. 68. № 3. P. 403–431.
- Tra V.T., Meng L., Pichpol D. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Vibrio* spp. in retail shrimps in Vietnam // Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 2016. V. 129. № 1–2. P. 48–51.
- West P.A., Brayton T.P.R., Briant T.N., Colwell R.R. Numerical taxonomy of Vibrios isolated from aquatic environments // Int. J. Syst. Bacteriol. 1986. V. 36. № 4. P. 531–543.

Vibrioflora of Hydrobionts and Waters of the Sea of Japan (Peter the Great Bay) and the South China Sea (Nha Trang Bay)

I. A. Beleneva

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

Strains of *Vibrio* spp. isolated from samples of water and aquatic organisms of the temperate (173 strains) and tropical (124 strains) climatic zones were phenotypically characterized. Identification was carried out on the basis of an extended analysis of phenotypic properties made it possible to identify previously undiagnosed species. *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, and *V. splendidus* prevailed in Peter the Great Bay. It is the first report on isolation of *V. harveyi* from a hydrobiont of the temperate waters of Peter the Great Bay. Compared to the temperate zone, the tropical zone has a higher species diversity of vibrios. Vibrios from Peter the Great Bay were less resistant to the studied spectrum of antibiotics in comparison to the resistance of vibrios in the tropical zone. A *V. vulnificus* isolate from the Vietnamese waters was resistant to the maximum number of antibiotics (12 from 15).

Keywords: *Vibrio*, Sea of Japan, Nha Trang Bay, antibiotic resistance