

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И МЕТОДОЛОГИЯ
ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА В УСЛОВИЯХ
ВОДОЕМА И В АКВАКУЛЬТУРЕ

© 2009 Е.В. Дзюба¹, Н.Л. Белькова^{1,2}, Н.В. Деникина¹,
Е.В. Суханова¹, Л.В. Суханова¹, В.П. Саловарова², Н.Г. Мельник¹

¹ Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск

² Иркутский государственный университет

Предложена методология оценки возможного социального ущерба от изменения экологического состояния водоемов путем мониторинга сообществ микроорганизмов и рыбного населения, как ключевых индикаторных групп, с использованием достижений современной молекулярной биологии. Отработаны методики детекции бактерий и эукариотических микроорганизмов, вызывающих инфекционные заболевания рыб. Разработана система анализа генетического полиморфизма искусственно воспроизводимых и естественных популяций байкальских рыб сем. Coregonidae с целью контроля состояния их генофонда. Возможности предложенных методов апробированы в условиях водоема и аквакультуры. Представленная методология мониторинга станет основой создания технологии повышения эффективности и контроля результативности рыбоводных мероприятий в аквакультуре и в условиях водоема.

Ключевые слова: экологический мониторинг, аквакультура, инфекционные заболевания рыб

Промышленное освоение, связанное с разведкой и последующей разработкой месторождений полезных ископаемых, а также развивающиеся технологии воспроизводства рыб в аквакультуре в значительной

степени влияют на водные растения, животных и среду их обитания. В результате хозяйственной деятельности человека происходит угнетение отдельных видов в водных биоценозах вследствие деградации их местообитания, что в ряде случаев приводит к необратимым последствиям. Отрицательные последствия нерационального проведения рыбоводных мероприятий проявляются в виде изменений в генетическом составе природного пула генов, которые можно обнаружить только в процессе генетического мониторинга (анализа состояния популяционных генофондов, их динамики во времени и пространстве). Контроль состояния экосистемы включает нормирование значимых для живых организмов факторов среды и дифференциацию их по степени опасности с последующим мониторингом; выбор биоиндикаторов и определение экологического состояния системы с их помощью. Биоиндикация – это обнаружение и определение экологически значимых природных и антропогенных нагрузок на основе реакций на них живых организмов непосредственно в среде

Дзюба Елена Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник.

E-mail: e_dzuba@lin.irk.ru

Белькова Наталья Леонидовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник.

E-mail: belkovan@mail.ru

Деникина Наталья Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник.

E-mail: denikina@lin.irk.ru

Суханова Елена Викторовна, аспирант. E-mail: sukhanova@lin.irk.ru

Суханова Любовь Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник.

E-mail: Isukhanova@yandex.ru

Саловарова Валентина Петровна, доктор биологических наук, заведующая кафедрой физико-химической биологии. E-mail: vsalovarova@yandex.ru

Мельник Наталья Григорьевна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биологии рыб и водных млекопитающих. E-mail: melnik@lin.irk.ru

их обитания [5]. Основной задачей при этом является разработка методов комплексного мониторинга состояния *ключевых* биоиндикационных групп организмов в соответствии с предполагаемым воздействием на водоем [4]. Существует несколько классификаций биоиндикаторов: например, они подразделяются на экосистемные и факторные индикаторы здоровья (с соответствующими подразделениями), на экологические, оценочные, индикаторы исполнения и т.п. [13]. Однако во всех целевых классификациях присутствуют те или иные меры биологического разнообразия, поскольку его нарушение является одним из наиболее важных последствий антропогенного пресса, в результате чего снижается устойчивость водных экосистем и их способность к самоочищению. Биоиндикаторы – организмы, наличие, количество или особенности развития которых служат показателями естественных процессов, условий или антропогенных изменений среды обитания [5].

Для оценки возможного социального ущерба от изменения экологического состояния водоемов мы предлагаем мониторинг сообществ микроорганизмов и рыбного населения как ключевых индикаторных групп с использованием современных молекулярно-генетических методов.

Микроорганизмы (одноклеточные про- и эукариоты, вирусы) – наиболее распространенные обитатели пресноводных водоемов. Развитие свободно живущих микроорганизмов и их активность находятся в прямой связи с составом органических и неорганических веществ в водной среде, т.к. они способны разрушать соединения естественного и антропогенного происхождения. С другой стороны, микроорганизмы, ассоциированные с высшими эукариотами, оказывают существенное влияние на динамику численности и структуру популяции своих хозяев, прямо или косвенно регулируя их численность. Поскольку водные микробные сообщества, также как и симбиотические ассоциации микроорганизмов с водной растительностью и с промысловыми водными объектами – рыбами наиболее быстро реагируют на изменение окружающей среды, они являются

самыми чувствительными биоиндикаторами, и их мониторинг будет способствовать эффективному учету возрастающей антропогенной нагрузки.

Пригодность рыб как биоиндикаторов определяется рядом критериев: принадлежностью к разным звеньям трофической цепи, отсутствием дальних миграций (наличием местных популяций), широким ареалом распространения, принадлежностью к естественным сообществам (несинантропные виды), численностью вида обеспечивающей достаточный материал для анализа и доступными простыми методами сбора материала. Байкальские сиговые рыбы (сем. *Coregonidae*) – сложный комплекс близкородственных видов и популяций, современное генетическое разнообразие которых формировалось непосредственно в озере на протяжении не менее миллиона лет. Как объект интенсивной хозяйственной деятельности человека они особенно нуждаются в генетическом мониторинге. В то же время, будучи хорошо изученными морфо-экологическими методами, эти виды рыб могут быть использованы для апробирования самих методов мониторинга.

Методы и технические средства проведения мониторинга (биоиндикации) растений, животных и микроорганизмов приведены в сводках и специализированных обзорах и сборниках [1, 2, 4-6, 12, 14, 17]. Молекулярно-биологический подход в настоящее время широко используется не только для изучения генетического разнообразия природных микробных сообществ, диагностики бактериальных инфекций объектов мари- и аквакультуры, но и является единственно возможным методом, позволяющим осуществлять эффективный контроль состояния генофонда рыб в условиях активного рыбозаведения и промысла [18, 19]. Преимущество подхода для мониторинга микробных сообществ заключается в возможности: 1) фиксации биологического материала в полевых условиях; 2) анализа всего разнообразия микроорганизмов, включая виды, культивирование или длительная транспортировка которых по тем или иным причинам затруднительна.

Апробацию методов мониторинга проводили на водотоках Иркутской области, принадлежащих к бассейнам крупных сибирских рек – Ангара, Лена и Енисей. Объектами для работы послужили пробы воды, ила, макрофитов и лососевидные рыбы (*Salmonoidei*). Для разработки диагностического подхода бактериальных инфекций в аквакультуре использовали лососевидных рыб из карантинного и экспозиционного аквариумов Байкальского музея ИНЦ СО РАН.

Пробы речной воды для проведения микробиолого-вирусологического мониторинга фильтровали через бактериальные фильтры и проводили молекулярно-генетический анализ микробного разнообразия из ДНК, выделенной с фильтров, а наличие вирусных частиц определяли в фильтрате. Проведенная нами серия экспериментов показала, что после оптимизации количественного отбора водных проб из рек возможен анализ разнообразия водных микроорганизмов на консервативных и групп-специфичных бактериальных праймерах. Микроорганизмы, ассоциированные с кожными покровами рыб, имеют такой же состав таксономических групп, как и в водных пробах олиготрофных водных экосистем (отмечены представители альфа- и бета-подгрупп протеобактерий) [10]. Среди представителей этих таксономических групп, известны широко распространенные в водной среде бактерии, которые могут быть использованы в качестве индикаторных при мониторинге симбиотических ассоциаций. Оработаны методы микробиологической оценки состояния водной растительности. Для анализа использовали препараты ДНК, выделенные разными методами, проведены и адаптированы условия ПЦР как с универсальными, так и групп-специфичными праймерами.

Для изучения сообществ микроорганизмов ценных промысловых видов лососевидных рыб, являющихся перспективными объектами искусственного воспроизводства методы молекулярно-генетического анализа нами адаптированы ранее [3, 9, 15]. Получены первые результаты по генетическому разнообразию кишечной микрофлоры. В целом следует отметить

невысокую гомологию полученных последовательностей с известными культивируемыми штаммами, невысокое разнообразие и преимущественное доминирование двух генотипов некультивируемых спирохет и *Mycoplasma* sp. В качестве сопутствующих получены генотипы представителей рода *Pseudomonas*, некультивируемых грамположительных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и эукариотического микроорганизма *Spironucleus barkhanus*.

Диагностика бактериальных инфекций на основе видо-специфичной амплификации проведена для бактерий *Aeromonas hydrophila* и *Pseudomonas anguilliseptica* в условиях аквариумной экспозиции. Эти микроорганизмы широко распространены в воде естественных водоемов. В нормальных условиях водные организмы обладают устойчивостью и вырабатывают вещества, предупреждающие развитие инфекций. Для апробации метода проводили анализ соскобов с кожных покровов рыб с явными признаками заболеваний, внешне здоровых рыб и проб воды из аквариумов. Условия видо-специфичной амплификации подобраны для анализа соскобов с кожных покровов рыб. Произведен подбор условий детекции ДНК *A. hydrophila* и *P. anguilliseptica* в воде, учитывая необходимость в наиболее простом и не травматичном для рыб отборе проб для регулярного мониторинга их численности. Регулярные обработки дезинфицирующими средствами, по видимому, приводят к стерилизации воды в аквариуме, таким образом, более информативной становится ранняя диагностика бактериальных инфекций непосредственно с кожных покровов рыб, а также анализ осадка (фекалии рыб, остатки кормов) на дне аквариума.

В связи с тем, что активное развитие грибковых инфекций рыб является одним из признаков экологического неблагополучия, существует необходимость выявления инфекционных агентов, вызывающих эти заболевания. Этиологическими агентами микозов рыб являются виды, принадлежащие родам *Achlya*, *Dictyuchus* и *Saprolegnia*. Это условно-патогенные организмы, которые вызывают заболевание «сапролегниоз» у всех искусственно вос-

производимых видов рыб. Сапролегниозом обычно поражается травмированная или ослабленная рыба и икра во время ее инкубации. Заболевание широко распространено в рыбоводных хозяйствах разного профиля, когда плотность рыбного населения слишком высока или когда диета рыб недостаточно сбалансирована. Нам удалось отработать методику детекции эукариотических микроорганизмов, принадлежащих к сем. *Saprolegniaceae*, являющихся возбудителями микозов рыб. При анализе банка данных последовательностей генов рибосомной РНК были подобраны и проверены наиболее перспективные для диагностики праймеры на ген 18S рРНК и на второй внутренней транскрибируемый район. Эта система позволяет получить специфический фрагмент гена рибосомной РНК в один этап. В спорных случаях для подтверждения положительного результата необходимо дополнительно проводить второй раунд ПЦР с полученного ампликона на внутренних праймерах [8].

В геноме байкальского омуля (*Coregonus migratorius*) осуществлен поиск микросателлитных локусов, пригодных для анализа популяционной структуры сиговых рыб. Проведен дизайн праймеров для их амплификации и тестирование на популяциях байкальских сиговых. Полностью охарактеризованы на больших популяционных выборках локусы (Vom22b, Cam1, Cam5) [7]. В дополнение к найденным, протестированы и отобраны для дальнейшей работы локусы (Wwf1, Wwf2, Soc123), известные ранее для близких видов рыб. По двум локусам (Vom22b и Wwf1) проведен анализ полиморфизма байкальских омуля, озерного (*Coregonus baicalensis*) и озерно-речного (*C. pidschian*) сигов, на естественных и используемых человеком (промысел, искусственное воспроизводство, браконьерский лов) популяциях рыб [16]. Определены популяционно-генетические параметры популяций, позволяющие косвенно судить о тенденциях изменения генетического разнообразия. Полученные результаты согласуются с особенностями исследуемых популяций и интерпретируемы в контексте влияния на них хозяйственной деятельности человека.

Использование ранней и эффективной диагностики бактериальных, протозойных и вирусных инфекций необходимо не только на разных технологических этапах в современной аквакультуре, но и при оценке негативных последствий для биоты водоема с целью сохранения флоры и фауны как хозяйственных объектов и как носителей генетической информации. Методика сравнительного анализа генетического полиморфизма позволит контролировать состояние промыслового стада и своевременно корректировать планы рыбоводных мероприятий с целью минимизации отрицательных последствий для естественных популяций рыб и экосистемы в целом.

Внедрение разработанных методов должно быть предусмотрено при реконструкции и модернизации рыбоводных заводов как один из обязательных этапов технологического процесса (контроль состояния производителей, икры, личинок, молоди, кормов, среды обитания и нагульного стада). Это значительно сократит риск возникновения эпизоотий в аквакультуре и в условиях водоема и, следовательно, повысит эффективность рыбоводных мероприятий. Разработка вышеуказанных методов в комплексе с дистанционным учетом акустико-траловым методом [11] обеспечит точную информацию о текущем состоянии популяций рыб в водоеме, необходимую для экологического мониторинга и разработки правильной стратегии (структуры) промысла. Кроме того, предложенная методология может стать основой для создания технологии повышения эффективности и контроля результативности рыбоводных мероприятий в аквакультуре и в условиях водоема.

Работа поддержана инновационным проектом «Тест-системы для диагностики бактериальных инфекций рыб» 2008 г. ИНЦ СО РАН и грантами РФФИ № 01-04-97202-р2001байкал, 03-04-48856-а, 07-04-00883-а, выполнена в рамках программы РАН №23, подпрограммы 1, проект 23.13 (2009-2010 гг.) и интеграционного проекта СО РАН № 6 (рук. Н.Г. Мельник).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Баканов, А.И.* Использование зообентоса для мониторинга пресноводных водоемов (обзор) // Биология внутренних вод. – 2000. – № 1. – С. 68-82.
2. *Балушкина, Е.В.* Критерии и методы оценки уровня антропогенной нагрузки и качества воды // Малые реки: современное экологическое состояние, актуальные проблемы. – Тольятти, 2001. – С. 19.
3. *Белькова, Н.Л.* Адаптация методов молекулярно-генетического анализа для изучения микроорганизмов, ассоциированных с рыбами / *Н.Л. Белькова, Е.В. Дзюба, Е.В. Суханова, Т.А. Ханаева* // Биология внутренних вод. – 2008. – №2. – С. 91–94.
4. Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем. Сборник материалов международной конференции. – Санкт-Петербург: ЛЕМА, 2007. – 338 с.
5. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 288 с.
6. *Булгаков, Н.Г.* Индикация состояния природных экосистем и нормирование факторов окружающей среды. Обзор существующих подходов // Успехи современной биологии. – 2002. – Т. 122. – С. 115-135.
7. *Гайкалов, И.В.* Описание трех микросателлитных локусов байкальского омуля *Coregonus migratorius* (Georgi) / *И.В. Гайкалов, О.В. Ильина, Л.В. Суханова, С.В. Кирильчик* // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 3. – С. 423-426.
8. Деникина, Н.Н. Исследование зараженности рыб зооспоровыми грибами сем. Saprolegniaceae (Oomycetes) / *Н.Н. Деникина, Н.Л. Белькова, Е.В. Суханова* и др. // Тезисы научно-практической конференции «Высокие технологии в экономике Иркутской области», 2009. – С. 37-39.
9. *Дзюба, Е.В.* Генетическое разнообразие кишечной микрофлоры черного байкальского хариуса (*Thymallus arcticus baikalensis* Dybowski, 1874) / *Е.В. Дзюба, Е.В. Суханова, Н.Л. Белькова* // Международная научная конференция: «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии»: Материалы конференции. – Минск, Белоруссия, 2008. – С. 85–87.
10. *Дзюба, Е.В.* Молекулярно-генетические методы в экологическом мониторинге пресно-водных экосистем / *Е.В. Дзюба, Н.Л. Белькова, Е.В. Суханова* и др. // Тезисы научно-практической конференции «Высокие технологии в экономике Иркутской области», 2009. – С. 33-35.
11. *Мельник, Н.Г.* Создание научно-методического комплекса тралово-акустического учета байкальского омуля / *Н.Г. Мельник, Н.С. Смирнова-Залуми, П.Н. Аношко* и др. // Первая международная научно-практическая конференция «Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов»: материалы конференции, 1-2 ноября 2006 г., Москва. – М.: Изд-во ВНИРО, 2006. – С. 154-156.
12. Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов. – М.: Наука, 1975. – 240 с.
13. *Неверова, О.А.* Опыт использования биоиндикаторов в оценке загрязнения окружающей среды / *О.А. Неверова, Н.И. Еремеева* // Новосибирск, 2006. – 88 с.
14. *Семенченко, В.П.* Принципы и системы биоиндикации текучих вод. – Минск: Орех, 2004. – 124 с.
15. *Суханова, Е.В.* Молекулярно-генетические методы в изучении симбионтной и паразитической микрофлоры байкальских рыб / *Е.В. Суханова, Н.Л. Белькова, Е.В. Дзюба, Т.А. Ханаева* // 2-ой Байкальский Микробиологический Симпозиум «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек, водохранилищ»: Материалы Симпозиума. – Иркутск, 2007. – С. 221-222.
16. *Суханова, Л.В.* Анализ полиморфизма микросателлитных локусов в популяциях байкальских сиговых рыб / *Л.В. Суханова, И.В. Гайкалов, В.В. Смирнов* и др. // Международная конференция "Проблемы популяционной экологии животных": Материалы конференции. – Томск, 2006. – С. 254-256.
17. *Шутиков, В.К.* Количественная гидроэкология: методы, критерии, решения / *В.К. Шутиков, Г.С. Розенберг, Т.Д. Зинченко* // М.: Наука, 2005. – 281 с.
18. *Buller, N.B.* Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. – Oxfordshire: CABI publishing, 2004. – 361 p.
19. *Spanggaard, B.* The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification / *B. Spanggaard, I. Huber, J. Nielsen* et al. // Aquaculture, 2000. – V. 182. – P. 1-15.

MODERN APPROACHES AND METHODOLOGY OF ECOLOGICAL MONITORING IN NATURAL ENVIRONMENTS AND AQUICULTURE

© 2009 E.V. Dzyuba¹, N.L. Belkova^{1,2}, N.N. Denikina¹, E.V. Sukhanova¹,
L.V. Sukhanova¹, V.P. Salovarova², N.G. Melnik¹
¹ Limnological Institute SB RAS, Irkutsk
² Irkutsk State University

We propose a methodology for the assessment of potential social damage caused by ecological state change in water bodies by monitoring of microorganisms and fishes communities as of key indicators using achievements in modern molecular biology. Methods of detection of bacteria and eukaryotic microorganisms causing fishes inflectional diseases are tested. A systematic approach for analysis of genetic polymorphism of artificially reproduced and of natural populations of Baikalian fishes of family Coregonidae is developed to control their gene pool situation. The profits of the methods proposed are tested in water bodies and in aquiculture. The methodology of monitoring presented will serve as a basis for creating of a technology for increase of efficiency and control of results of fishery in aquiculture and in water bodies.

Key words: ecological monitoring, aquaculture, fishes inflectional diseases

Elena Dzyuba, Candidate of Biology, Senior Research Fellow. E-mail: e_dzyuba@lin.irk.ru

Natalya Belkova, Candidate of Biology, Senior Research Fellow. E-mail: belkovan@mail.ru

Natalya Denikina, Candidate of Biology, Senior Research Fellow. E-mail: denikina@lin.irk.ru

Elena Sukhanova, Graduate Student. E-mail: sukhanova@lin.irk.ru

Lyubov Sukhanova, Candidate of Biology, Senior Research Fellow. E-mail: Isukhanova@yandex.ru

Valentina Salovarova, Doctor of Biology, Head of the Physical and Chemical Biology Department. E-mail: vsalovarova@yandex.ru

Natakya Melnik, Candidate of Biology, Head of the Fish and Small Water Mammals Biology Laboratory. E-mail: melnik@lin.irk.ru