

УДК 616-036.22

С.Ю.Водяницкая¹, В.И.Прометной¹, Н.Р.Телесманич¹, Ю.В.Рыжков², О.В.Лях², И.В.Трут²,
Н.Г.Иванова¹, В.Д.Кругликов¹, О.С.Чемисова¹

РЕЗУЛЬТАТЫ ТРЕХЛЕТНЕГО МОНИТОРИНГА СУДОВЫХ БАЛЛАСТНЫХ ВОД В ПОРТАХ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

¹ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация; ²Управление Роспотребнадзора по Ростовской области, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Представлены результаты микробиологического мониторинга судовых балластных вод в морских портах Ростовской области. Материалом для исследования на наличие *Vibrio cholerae* служили пробы балластной воды судов, отобранные в мае–сентябре 2010–2012 гг. Исследовано 179 проб, отобранных на 127 судах. Из 30 выделенных в 2010–2011 гг. штаммов *V. cholerae* non O1/ non O139, серологическая принадлежность установлена у 13 штаммов. Применение в 2012 г. MALDI-TOF масс-спектрометрии повысило информативность исследований, расширило спектр и частоту бактериологических находок. Обнаружение вибрионов свидетельствует о реальной возможности заноса возбудителя холеры в акваторию Азовского моря.

Ключевые слова: холера, водяной балласт, морские суда, Азовское море.

S.Yu.Vodyanitskaya¹, V.I.Prometnoy¹, N.R.Telesmanich¹, Yu.V.Ryzhkov², O.V.Lyakh², I.V.Trut², N.G.Ivanova¹,
V.D.Kruglikov¹, O.S.Chemisova¹

Results of the Triennial Monitoring over the Ship's Ballast Water at the Ports of the Rostov-Region

¹Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation; ²Rospotrebnadzor Administration in the Rostov Region, Rostov-on-Don, Russian Federation

Demonstrated are the results of microbiological monitoring over the ship's ballast water at the sea ports of the Rostov region. Analyzed for the presence of *Vibrio cholerae* are the samples of the ship's ballast water collected within the period of May-September 2010-2012, a total of 179 samples collected from 127 ships. Among 30 *V. cholerae* non O1/ non O139 strains isolated in 2010-2011 only 13 have been identified serologically. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in 2012 has enhanced informational capacity of the investigations. It has expanded the range and increased the frequency of bacteriological findings. The detection of vibrios implies possibility of *V. cholerae* importation into the aquatic area of Azov Sea.

Key words: cholera, water ballast, sea ships, Azov Sea.

Как известно, одной из актуальных опасных инфекционных болезней человека является холера, вспышки и эпидемии которой и сегодня регистрируются на всех континентах. Существенное значение в распространении холеры принадлежит различным видам транспорта, в том числе водному, причем холерные вибрионы могут быть занесены не только больными и носителями, но и с балластными и сточными водами судов. Так, занос возбудителя холеры в страны Южной Америки в 1991 г. эксперты ВОЗ полностью связывают с морскими судами.

На территории Ростовской области действуют три пункта пропуска через Государственную границу Российской Федерации для водного транспорта – в портах Ростова-на-Дону, Азова и Таганрога. По данным специалистов Управления Роспотребнадзора по Ростовской области, в эти порты ежегодно заходит свыше 8 тыс. судов, а сбрасываемый ими балласт достигает около 1 млн тонн воды в год.

Операции по смене балласта, производимые в акваториях портов, являются в настоящее время закономерными процессами судоходства, приводящи-

ми к важнейшей экологической проблеме – заносу различных видов морских обитателей, в том числе бактерий, патогенных для человека [2]. В связи с этим Международной морской организацией в 2004 г. принята Международная конвенция по контролю и управлению судовыми балластными водами и осадками. В «Стандарт качества балластной воды» включены показатели отсутствия токсигенных холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп.

В настоящий момент ряд государств уже предъявляют требования к судам, заходящим в их порты, по контролю и управлению судовыми балластными водами для предотвращения заноса патогенных микроорганизмов. Российской Федерацией Конвенция одобрена в 2007 г. В соответствии с требованиями Конвенции РФ необходимо начать управление балластными водами уже с 2014 г., поэтому для подготовки к выполнению стандартов по управлению качеством балластных вод осталось не так много времени.

В России и за рубежом активно ведутся исследования по обеспечению экологической безопасности балластной воды судов [1, 2, 3, 5, 7], а также исследо-

вания морской воды с имитацией условий нахождения ее в балластных танках [6, 8].

В порты Ростовской области заходят сухогрузные суда смешанного (река–море) плавания, предназначенные для перевозки насыпных и тарно-штучных грузов, а также танкеры, перевозящие сырую нефть и нефтепродукты.

Целью данной работы явилось изучение возможности заноса холерных вибрионов в бассейн Азовского моря балластными водами судов с учетом особенностей их конструкции, а также поиск в судовом балласте других представителей рода *Vibrio*.

Материалом для исследования служили пробы балластных вод, отобранные в мае–сентябре 2010–2012 гг. на судах, прибывающих из-за рубежа в порты Ростовской области: Таганрог (2010–2012 гг.) и Азов (2011–2012 гг.). Пробы отбирали специалисты санитарно-карантинных пунктов портов и направляли в Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт – Референс-центр по мониторингу за холерой. Лабораторное исследование водяного балласта на наличие холерных и других вибрионов проводили в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры», МУК 4.2.1793-03 «Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых паразитическими и другими патогенными для человека вибрионами».

Чистые культуры и подозрительные колонии холерных вибрионов, выделенные в 2012 г. бактериологическим методом, исследовали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа в автоматическом режиме с программным обеспечением Biotyper. При исследовании использовали прямое нанесение чистой культуры одноразовой бактериологической петлей в виде мазка на MSP-чип с последующим наслаиванием на образец 1 мкл насыщенного раствора матрицы (α -Циано-4-гидроксикоричная кислота в 50 % ацетонитрила и 2,5 % трифторуксусной кислоты). После нахождения уникального набора масс-спектров анализатором выдавался наиболее вероятный результат в виде значения Score. Учет проводили по шкале показателей Score в диапазоне от 0 до 3. Считали, что значения 2,300–3,000 указывают на высокую вероятность идентификации вида (+++), значения более 2,000–2,2999 – на надежную идентификацию рода бактерий и возможную идентификацию вида (++) , значения 1,700–1,999 – на возможную идентификацию рода (+), менее 1,700 – на отсутствие надежной идентификации.

В 2010–2012 гг. на борту прибывающих в порты Ростовской области судов находилось от 499 до 3131 тонны судового балласта. Из всех обследованных на наличие холерных вибрионов судов в порту Таганрог, по среднемноголетним данным, сухогрузы составили 79,8 %, танкеры – 20,2 %.

Температура балластной воды при отборе варьировала в пределах от 15 до 28 °С. При этом смена первого судового балласта проводилась в акватории Черного моря, ограниченной координа-

тами 40° 55' N – 45° 27,6' N и 29° 08' E – 36° 44,7' E. Смена балласта при переходе в Азовское море проводилась в пределах координат 44° 54,7' N – 46° 53,6' N и 36° 30,2' E – 37° 48,4' E. При заходе судов в порт Азов через р. Дон проводилась дополнительная смена балласта на «нулевом километре».

В 2010 г. специалистами института исследовано 55 проб балластной воды, отобранной в порту Таганрог на 43 судах. *V. cholerae* non O1/non O139 обнаружены в 13 пробах. В 2011 г. исследовано 62 пробы судового балласта, из них 41 проба доставлена из порта Таганрог, 21 проба – из порта Азов. *V. cholerae* non O1/non O139 в 2011 г. обнаружены в 16 пробах, отобранных на судах в порту Таганрог, и в одной пробе, отобранной на судне в порту Азов. Из 30 выделенных штаммов *V. cholerae* non O1/non O139 в 2010–2011 гг. серологическая принадлежность установлена у 13 штаммов, относящихся к семи серогруппам (O2, O3, O13, O16, O18, O67, O81).

В 2012 г. исследовано 62 пробы, отобранные на 54 судах, из них 40 – в порту Таганрог, 22 – в порту Азов. Исследования проводили двумя методами: классическим бактериологическим и с применением MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа. При традиционном микробиологическом исследовании *V. cholerae* non O1/non O139 обнаружены в 12 пробах. Одновременно с этим при параллельном исследовании образцов на MALDI-TOF спектрометре ежемесячно в течение всего сезона (май–сентябрь) нами была выявлена 31 культура, идентифицированная масс-спектрометром как *V. albensis* со значением Score (средняя величина) – 1,862, свидетельствующем о надежной идентификации рода и возможной идентификации вида.

В соответствии с современной таксономией *V. albensis* отнесен к виду *V. cholerae* в качестве биовара *albensis* [5]. В нашем исследовании все культуры вибрионов, первоначально выданные в автоматическом режиме как *V. albensis*, по фенотипическим признакам были идентифицированы как *V. cholerae* non O1/non O139 и не агглютинировались холерными сыворотками O1 и O139. Следует отметить, что протеомные профили *V. cholerae* не содержатся в базе данных MALDI Biotyper. Частота обнаружения *V. cholerae* non O1/non O139 серогрупп в исследуемой балластной воде в 2010 г. составила 23,6 %, в 2011 г. – 27,6 %. При использовании в 2012 г. классического метода и MALDI-TOF спектрометрии она достигла 69,4 %.

При анализе полученных результатов обращает внимание обнаружение *V. cholerae* non O1/non O139 в течение трех лет подряд в пробах балластной воды судов, прибывших из Турции и Украины, в течение двух лет – в пробах балластной воды судов, прибывших из Израиля, Румынии, Италии, Испании.

При исследовании балластной воды на наличие галофильных вибрионов классическим бактериологическим методом специалистами института в 2011 г. обнаружены в пробах следующие микроор-

ганизмы: *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*. В 2012 г. с помощью масс-спектрометрии были идентифицированы патогенные и непатогенные вибрионы. Впервые нами обнаружены редкие виды непатогенных вибрионов, ранее не выделявшиеся в акваториях морских портов Ростовской области, в том числе *V. brasiliensis* и *V. rotiferianus*, отсутствующие в Руководстве по систематике бактерий Берджи (2005 г.).

Таким образом, нами показана реальная возможность заноса патогенных и непатогенных вибрионов в бассейн Азовского моря с балластными водами грузовых судов класса река–море, прибывающих в порты Ростовской области, что может способствовать развитию неблагоприятной эпидемиологической ситуации, аналогичной событиям в странах Южной Америки в 1991 г. Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии повысило информативность наших исследований, расширило спектр и частоту бактериологических находок. Полученные результаты определяют дальнейшую перспективу исследований – поиск наиболее эффективных средств деkontaminации балласта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Водяницкая С.Ю., Лях О.В., Рыжков Ю.В., Ломов Ю.М., Прометной В.И., Кругликов В.Д. Проблемы водного балласта: современные аспекты. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2011; 5:18–22.
2. Звягинцев А.Ю., Селифонова Ж.П. Исследования балластных вод коммерческих судов в морских портах России. *Рос. журн. биол. инвазий.* 2008; 2:22–33.
3. Altug G., Gurun S., Cardak M., Ciftci P.S., Kalkan S. The occurrence of pathogenic bacteria in some ships' ballast water incoming from various marine regions to the Sea of Marmara, Turkey. *Mar. Environ. Res.* 2012; 81:35–42.
4. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Gammaproteobacteria. Garrity G.M., editor. 2nd ed. New York: Springer; 2005. Vol. 2B. P. 1108.
5. Cohen N.J., Slaten D.D., Marano N., Tappero J.W., Wellman M., Albert R.J., Hill V.R., Espey D., Handzel T., Henry A., Tauxe R.V. Preventing maritime transfer of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(10):1680–2.
6. Emami K., Askari V., Ullrich M., Mohinudeen K., Anil A.C., Khandeparker L., Burgess J.G., Mesbahi E. Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *PLoS*

One. 2012; 7(6):e38515.

7. Lovell S.J., Drake L.A. Tiny stowaways: analyzing the economic benefits of a US Environmental Protection Agency permit regulating ballast water discharges. *Environ. Manage.* 2009; 43:546–55.

8. Wennberg A.C., Tryland I., Ostensvik O., Monshaugen M., Liltved H. Effect of water treatment on the growth potential of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* in seawater. *Mar. Environ. Res.* 2013; 83:10–5.

References

1. Vodyanitskaya S.Yu., Lyakh O.V., Ryzhkov Yu.V., Lomov Yu.M., Prometnoy V.I., Kruglikov V.D. [Water ballast issues: modern aspects]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2011; 5:18–22.
2. Zvyagintsev A.Yu., Selifonova Zh.P. [Investigations of commercial ships' ballast water at the ports of Russia]. *Ros. Zh. Biol. Invazii.* 2008; 2:22–33.
3. Altug G., Gurun S., Cardak M., Ciftci P.S., Kalkan S. The occurrence of pathogenic bacteria in some ships' ballast water incoming from various marine regions to the Sea of Marmara, Turkey. *Mar. Environ. Res.* 2012; 81:35–42.
3. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Gammaproteobacteria. Garrity G.M., editor. 2nd ed. New York: Springer; 2005. Vol. 2B. P. 1108.
3. Cohen N.J., Slaten D.D., Marano N., Tappero J.W., Wellman M., Albert R.J., Hill V.R., Espey D., Handzel T., Henry A., Tauxe R.V. Preventing maritime transfer of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(10):1680–2.
6. Emami K., Askari V., Ullrich M., Mohinudeen K., Anil A.C., Khandeparker L., Burgess J.G., Mesbahi E. Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *PLoS One.* 2012; 7(6):e38515.
7. Lovell S.J., Drake L.A. Tiny stowaways: analyzing the economic benefits of a US Environmental Protection Agency permit regulating ballast water discharges. *Environ. Manage.* 2009; 43:546–55.
8. Wennberg A.C., Tryland I., Ostensvik O., Monshaugen M., Liltved H. Effect of water treatment on the growth potential of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* in seawater. *Mar. Environ. Res.* 2013; 83:10–5.

Authors:

Vodyanitskaya S.Yu., Prometnoy V.I., Telesmanich N.R., Ivanova N.G., Kruglikov V.D., Chemisova O.S. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru

Ryzhkov Yu.V., Lyakh O.V., Trut I.V. Rospotrebnadzor Administration in the Rostov Region. 17, 18th Line, Rostov-on-Don, 344109, Russian Federation.

Об авторах:

Водяницкая С.Ю., Прометной В.И., Телесманич Н.Р., Иванова Н.Г., Кругликов В.Д., Чемисова О.С. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Рыжков Ю.В., Лях О.В., Трут И.В. Управление Роспотребнадзора по Ростовской области. Российская Федерация, 344109, Ростов-на-Дону, ул. 18 линия, 17. E-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru

Поступила 13.03.14.