

## **РОЛЬ ПАТОГЕННОЙ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННОЙ МИКРОБИОТЫ В ФОРМИРОВАНИИ СТРУКТУРЫ МИКРОБИОЦЕНОЗА ИКРЫ АФРИКАНСКОГО КЛАРИЕВОГО СОМА**

**Мухитова Минзифа Эминовна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Биология, ветеринарная генетика, паразитология и экология»

**Романова Елена Михайловна**, доктор биологических наук, профессор кафедры «Биология, ветеринарная генетика, паразитология и экология»

**Романов Василий Васильевич**, кандидат технических наук, доцент кафедры «Информатика» ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1, тел.: 8(8422) 55-95-38,

E-mail: vvr-emr@yandex.ru

**Ключевые слова:** африканский клариевый сом, адаптогены, пробиотики, микробиоценоз, икра, семеники, личинки

При инкубации оплодотворенной икры африканских клариевых сомов определенная доля эмбрионов через несколько часов после оплодотворения останавливается в развитии. Погибшая икра или оболочки икры подвергаются процессам разложения. Патогенные бактерии, заселяя оболочку других эмбрионов, в последующем колонизируют кишечник личинок. У личинок в кишечнике нарушается структура естественного микробиоценоза за счет смещения в сторону патогенной и условно-патогенной микрофлоры. На этом фоне у личинок рыб, начиная с раннего постэмбрионального онтогенеза, развиваются инфекционные заболевания. Выявление причин массовой гибели оплодотворенной икры в ходе ее инкубации относится к числу актуальных рыбоводных проблем, требующих решения. Наша работа посвящена исследованию микробиоценоза оплодотворенной икры и роли патогенной и условно-патогенной микрофлоры в формировании его структуры. Результаты бактериологических исследований выявили в микробиоценозе оплодотворенной икры самок клариевого сома условно-патогенных бактерий *Citrobacter freundii* и *Enterococcus faecalis*, входящих в семейство *Enterobacteriaceae*. При посеве с половых клеток на питательных средах наблюдали их сливной рост (до  $10^8$  клеток). Чтобы сформировать кишечный нормоценоз, повысить иммунитет и, в конечном счете, добиться повышения жизнеспособности и сохранности рыбы в процессе выращивания, используют биологически активные вещества. Для повышения сохранности эмбрионов и личинок африканского клариевого сома при инкубации оплодотворенной икры использовали адаптоген трекрезан - производное феноксиуксусной кислоты, синтетический аналог природных адаптогенов (женьшенья, родиолы розовой). Также использовали пробиотик нового поколения - споротермин как альтернативу антибиотикам. Использование пробиотика споротермина и адаптогена трекрезана значительно снизило бакобсеменность икры и существенно повысило выход и выживаемость личинок. Исследования выполнялись по гранту РФФИ № 18-016-00127.

### **Введение**

Развитие индустриальной аквакультуры африканского клариевого сома предполагает разработку новых, более совершенных подходов в выращивании рыбы, основанных на экологически чистых технологиях. Для этого необходимы микробиологические исследования, направленные на исследование микробного пейзажа среды обитания рыб, закономерностей формирования микробиоценозов и механизмов их функционирования.

Основными факторами передачи инфек-

ции в аквакультуре является вода, контаминированный инвентарь, корма, но главным источником является сама рыба, которая выделяет продукты своего метаболизма в водную среду, формируя высокий уровень органического загрязнения, способствующего развитию патогенной и условно-патогенной микрофлоры [1, 2].

При инкубации оплодотворенной икры африканских клариевых сомов определенная доля эмбрионов через несколько часов после оплодотворения останавливается в развитии. Погибшая икра или оболочки икры подвергаются

процессам разложения. Патогенные бактерии, заселяя оболочку эмбриона, в последующем колонизируют кишечник личинок. У личинок в кишечнике нарушается структура естественного микробиоценоза за счет смещения в сторону патогенной и условно-патогенной микробиоты. На этом фоне у личинок рыб, начиная с раннего постэмбрионального онтогенеза, развиваются инфекционные заболевания. Чтобы сформировать кишечный нормоценоз, повысить иммунитет и, в конечном счете, добиться повышения жизнеспособности и сохранности рыбы в процессе выращивания, используют пробиотики и адаптогены [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9].

Цель работы: исследовать структуру микробиоценоза половых клеток и оценить перспективы использования пробиотика споротермина и адаптогена трекрезана для повышения выживаемости личинок африканского клариевого сома.

#### **Объекты и методы исследований**

Исследования проводились на базе Лаборатории экспериментальной биологии и аквакультуры Ульяновского ГАУ. Объектом исследования являлись половые продукты, полученные от половозрелых самок и самцов африканского клариевого сома весом 1,2-1,7 кг, которые содержатся в условиях бассейновой аквакультуры. У экспериментальных самцов и самок, подвергшихся гормональной стимуляции сурфагоном из расчета 1,0-1,5 мл/кг веса, были получены половые продукты. Сурфагон - синтетический аналог люлиберина, гормональный регулятор, стимулирующий секрецию гипофизарных гонадотропинов лютеинизирующего гормона (ЛГ) и фолликулостимулирующего гормона [10]. Через 11-12 часов после введения сурфагона самки были готовы к отдаче икры. Икру сдаивали в стерильную посуду и орошали смешанной спермой двух самцов из расчета 4 мл спермы на 200-250 г икры; перемешивали в течение одной минуты, после чего добавляли 200-250 мл стерильной воды и перемешивали в течение пяти минут. Сразу после оплодотворения для устранения патогенной и условно-патогенной микробиоты и повышения неспецифической резистентности будущих личинок оплодотворенную икру промывали в течение получаса растворами, содержащими адаптоген трекрезан в дозе 1 мг/л и пробиотик споротермин в дозе 40 мг/л, при температуре 28°C. Инкубацию оплодотворенной икры клариевых сомов проводили в аппарате Вейса при температуре воды 28°C. Среда инкубации также содержала адаптоген трекрезан в дозе 1 мг/л и пробиотик споротермин в дозе 40 мг/л. Содержание кислорода не опускалось ниже 90% [10, 11].

Качество оплодотворения оценивалось как

соотношение в общей массе икры нормально развивающейся, не развивающейся или ложно развивающейся. Морфологический анализ оплодотворенных ооцитов и эмбрионов проводили под бинокляром Микромед-2 при увеличении: 10х, 20х. Учет выживаемости личинок проводили в первую неделю после выклева [11].

Пробиотик споротермин - это препарат, который создан на основе спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, число которых не менее  $3-5 \times 10^9$  КОЕ/г. Он применяется для повышения иммунитета, снижения отрицательного воздействия стресс-факторов, профилактики и лечения инфекционных заболеваний, для нормализации микробного баланса в пищеварительном тракте у рыб. Споротермин является антагонистом патогенов и позиционируется как современная альтернатива антибиотикам. Этот препарат обладает иммуномодулирующим действием. Споротермин разработан производственным объединением ВетСельхоз (г. Москва), представляет собой однородный мелкодисперсный порошок от белого до кремового цвета со слабовыраженным молочным запахом [12].

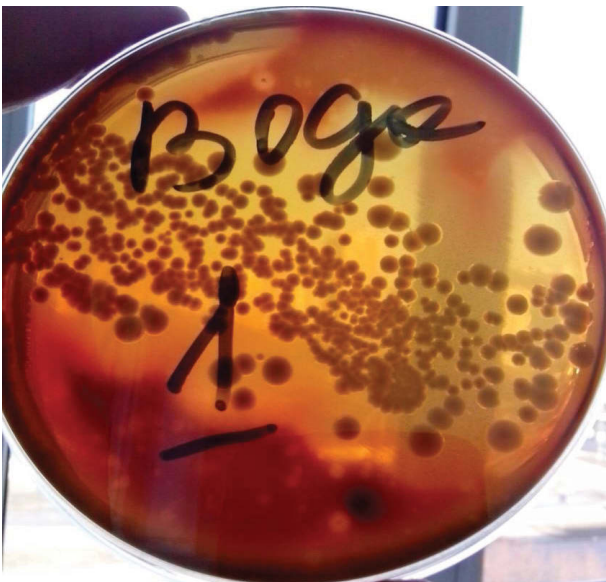
Трекрезан является универсальным адаптогеном широкого спектра действия, повышает устойчивость рыбы на всех стадиях развития к длительному действию различных неблагоприятных факторов. Действующим веществом адаптогена трекрезан является производное феноксиуксусной кислоты, синтетический аналог природных адаптогенов (женьшенья, аралии, элеутерококка, родиолы розовой). Продукт безопасен, не вызывает нежелательных побочных эффектов, не накапливается в организме и получаемой продукции, обладает высокой иммуностимулирующей активностью [7, 13]. Трекрезан выпускается в виде порошка, расфасованного в полиэтиленовые запаянные пакеты по 0,1, 0,5 и 1,0 кг.

Для микробиологических исследований пробы икры и сперматозоидов отбирались у пяти самок и пяти самцов в стерильные емкости стерильными инструментами. Определение численности и выделение патогенных и условно-патогенных бактерий проводили в течение первых двух часов после отбора проб.

Для оценки морфологических, культуральных и биохимических свойств бактерий были проведены посевы на плотные питательные среды общего назначения (МПА). Посевы выполнялись в трехкратной повторности. Для селективного выделения грибов была использована среда Сабуро. Для выделения и дифференциации энтеробактерий использовали селективную среду Эндо. Для выделения патогенной микрофлоры



**Рис. 1 – Посев с интактной икры (сливной рост бактерий  $10^8$  клеток)**



**Рис. 2 – Посев из воды при инкубации икры на фоне пробиотиков и адаптогенов (скудный рост бактерий  $10^4$  клеток)**

использовали среду Плоскирева. Идентификацию микроорганизмов производили при помощи определителя Берджи. При бактериологическом исследовании устанавливали численность микроорганизмов в поле зрения микроскопа методом бактериоскопии и общее количество микрофлоры в 1 г икры. Выделяли следующие градации роста микроорганизмов: сливной рост -  $10^8$  клеток в 1 г материала, массивный рост -  $10^7$  клеток, умеренный рост -  $10^5$  клеток, скудный рост -  $10^4$  клеток [1, 14].

#### **Результаты исследований**

При инкубации оплодотворенной икры через нестерильную поверхность происходит обсеменение эмбрионов условно-патогенной

и патогенной микрофлорой. Обработка икры бактерицидными химическими препаратами, предотвращающими обсеменение, в том числе антибиотиками, способствует снижению естественной резистентности будущих личинок [4].

На первом этапе работы мы исследовали микробный пейзаж свежеполученных интактных половых клеток самок и самцов.

Результаты бактериологических исследований показали присутствие в микробиоценозе свежеполученной интактной икры самок клариевого сома условно-патогенных бактерий *Citrobacter freundii* и *Enterococcus faecalis*, входящих в семейство *Enterobacteriaceae*. На питательных средах наблюдали сливной рост бактерий (до  $10^8$  клеток) (рис. 1).

Вирулентные формы бактерий рода *Citrobacter* - возбудители гастроэнтеритов и пищевых токсикоинфекций у рыб обычно вызывают заболевания в ассоциации с другими бактериями. *C. freundii* - грамотрицательные факультативные анаэробы, характеризующиеся прямыми палочковидными формами, обладают достаточной подвижностью, и спор не образуют [1, 14].

Энтерококки принято считать показателями свежего «фекального загрязнения». *E. faecalis* морфологически характеризуются как округлые, немного вытянутые с заостренными концами кокки. Как правило, они располагаются попарно или в коротких цепочках [1, 14].

В норме для микробиоценоза икры рыб бактерии группы кишечной палочки не характерны. В биотехнологии искусственного размножения африканского клариевого сома в условиях бассейновой аквакультуры икру от самок получают путем сцеживания. По нашему мнению, обсеменение происходит именно на этом этапе [11].

При микробиологической оценке зрелых спермиев, необработанных пробиотическим препаратом и адаптогеном, также была выделена *E. faecalis*. На питательных средах наблюдали сливной рост бактерий ( $10^8$  клеток), как и при посеве с икры. Очевидно обсеменение семенников бактериями *E. faecalis* происходит на этапе их извлечения из брюшной полости.

В икре и в сперме, обработанных пробиотиком и адаптогеном, а также в воде, в которой проходила инкубация икры на фоне пробиотиков и адаптогенов, также были обнаружены бактерии вида *E. faecalis*, но их количество было значительно ниже. На питательных средах наблюдали скудный рост бактерий ( $10^4$  клеток) (рис. 2).

В двух параллельно проведенных экспериментах: при обработке половых продуктов адаптогеном и пробиотическим препаратом и без их использования оплодотворение икры клариевых





**Рис. 3 – Предличинка клариевого сома с желточным мешком, первый час после выклева. Ув. 10х**

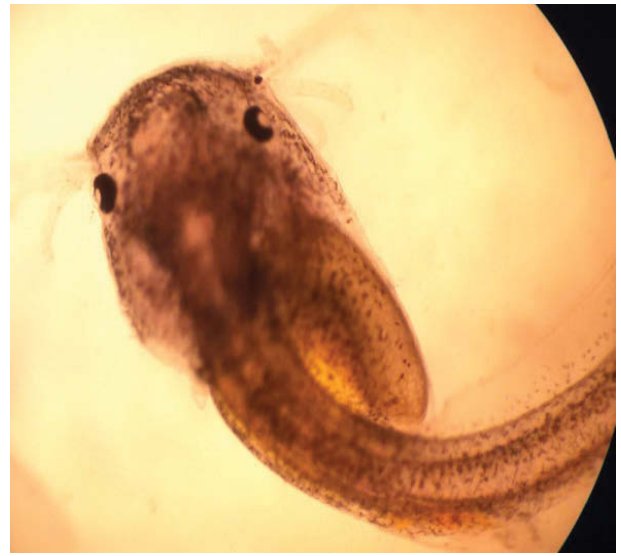
сомов прошло успешно.

Исследование качества оплодотворения на фоне обработки препаратами показало, что показатель выклева предличинок был высоким и составил 75%. При оценке качества оплодотворения икры без использования адаптогена и пробиотика наблюдали, что значительная часть развивающейся икры уже после 8 часов инкубации гибла и выглядела побелевшей. В конечном итоге показатель выклева предличинок в контроле был достоверно ниже на 30-40% по сравнению с оплодотворенной икрой, для инкубации которой использовали и пробиотик, и адаптоген.

Учет выживаемости предличинок (рис.3-4) проводили в первую неделю после выклева. Выживаемость предличинок клариевых сомов, обработанных пробиотиком и адаптогеном, была высокой, на уровне 90 % от числа вылупившихся. Выживаемость личинок, полученных без использования пробиотика и адаптогена, была ниже на 30%.

#### **Выводы**

Пробиотики в современной аквакультуре являются альтернативой антибиотикам. Но, в отличие от антибиотиков, они не оказывают негативного влияния на организм рыб на всех этапах их онтогенеза. В наших исследованиях применение адаптогена трекрезана и пробиотика споротермина повысило выклев предличинок и выживаемость личинок. Применение пробиотика споротермина и адаптогена трекрезана оказало оздоравливающее действие на организм рыб, повысив их неспецифическую резистентность на этапах эмбрионального и раннего постэмбрионального онтогенеза.



**Рис. 4 – Личинка клариевого сома при переходе на экзогенное питание - 72 часа после выклева. Ув. 10х**

В икре, сперме, а также в воде, в которой проходила инкубация икры, после использования пробиотика споротермина количество бактерий вида *E. faecalis* существенно снизилось. На питательных средах отмечался их скудный рост -  $10^4$  клеток. Таким образом, использование пробиотика споротермина снизило уровень патогенной и условно-патогенной микробиоты на четыре порядка. Полученные нами результаты свидетельствовали, что использование пробиотика споротермина изменило структуру микробиоценоза среды обитания рыб, снизив в нем долю патогенной и условно-патогенной микробиоты.

Использование адаптогена трекрезана оказало иммуномодулирующий эффект, что выразилось в повышении выживаемости предличинок и личинок клариевого сома. Очевидно, свой вклад в повышение выживаемости личинок внес и споротермин, который в соответствии со своим прямым назначением оптимизировал структуру кишечного микробиоценоза.

Полученные результаты позволяют заключить, что применение споротермина и трекрезана дает позитивные результаты в условиях индустриальной аквакультуры.

#### **Библиографический список**

1. Ларцева, Л.В. Микрофлора рыб и других гидробионтов / Л.В. Ларцева, О.В. Обухова, И.А. Лисицкая. - Астрахань: ИД «Астраханский университет», 2008. - 108 с.
2. Извекова, Г.И. Симбионтная микрофлора рыб различных экологических групп / Г.И. Извекова, Е.И. Извеков, А.О. Плотников // Известия Российской академии наук. Серия биологиче-

ская. - 2007. - № 6. - С. 728-737.

3. Бурлаченко, И.В. Применение пробиотиков на ранних стадиях развития ленского осетра / И.В. Бурлаченко, Е.В. Малик // Ветеринария. - 2007. - № 3. - С. 47-51.

4. Пробиотики в аквакультуре / Е.А. Котова, Н.А. Пышманцева, Д.В. Осепчук, А.А. Пышманцева, Л.Н. Тхакушинова // Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. - 2012. - Том 3, № 1-1. - С. 100 - 103.

5. Инновационные технологии производства продуктов функционального назначения в индустриальной аквакультуре / Е.М. Романова, В.В. Романов, В.Н. Любомирова, М.Э. Мухитова, Л.А. Шадыева, Т.М. Шленкина, И.С. Галушко // Рыбоводство и рыбное хозяйство. - 2018. - №5(148). - С. 54-59.

6. Ткачева, И.В. Пробиотик как иммуномодулятор / И.В. Ткачева, Н.Н. Тищенко // Труды Кубанского государственного аграрного университета. - 2017. - № 64. - С. 188-191.

7. Тихонова, Е.М. Адаптогены в регуляции обмена веществ / Е.М. Тихонова, И.В. Лунегова, А.Ю. Нечаев // Эффективные и безопасные лекарственные средства в ветеринарии. Материалы IV международного конгресса ветеринарных фармакологов и токсикологов. - 2016. - С. 189 - 191.

8. Effect of Probiotic Bacteria on the Growth rate of Fresh Water Fish, *Catla catla* / M. Abdul Kader Mohideen, T. Mohan, S. Peer Mohamed, M. Hussain // International Journal of Biological Technology. - 2010. - P. 113-117.

9. Chaucheyras, F. Probiotics in animal nutrition and health / F. Chaucheyras, H. Durand // Lallemand Animal Nutrition, Blagnac. - 2010. - № 1. - P. 3-9.

10. Оценка эффективности индукторов гаметогенеза африканского клариевого сома / В.Н. Любомирова, Е.М. Романова, В.В. Романов, М.Э. Мухитова // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2018. - № 2(42). - С. 148-154.

11. Biology of reproduction of catfish (*Clarias Gariepinus*, Burchell, 1822) in high-tech industrial aquaculture / E.M. Romanova, V.N. Lyubomirova, V.V. Romanov, M.E. Mukhitova, T.M. Shlenkina, L.A. Shadyeva, I.S. Galushko // Journal of Fundamental and Applied Sciences. - 2018. - Том 10, № 5. - P. 1116-1129.

12. Использование кормовых добавок «Споротермин» и «Ковелос» в рационах молодняка сельскохозяйственных животных / Н.А. Юрина, З.В. Псхациева, С.И. Кононенко, Н.Н. Есауленко, В.В. Ерохин, В.А. Баранников // Современные технологии сельскохозяйственного производства и приоритетные направления развития аграрной науки. Материалы международной научно-практической конференции. – Ростов – на – Дону, 2014. - С. 263 - 264.

13. <http://www.irkutin.ru/zhivotnye/ryba/>

14. Хоулт, Д. Определитель бактерий Берджи / Д. Хоулт, Н. Криг. - М.: Мир, 1997. - 799 с.

15. МУК 4.2.1 884-04 Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водоемов. – Режим доступа: [https://znaytovar.ru/gost/2/MUK\\_42188404\\_Sanitarnomikrobio.html](https://znaytovar.ru/gost/2/MUK_42188404_Sanitarnomikrobio.html)

16. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Приказ №535 от 22 апреля 1985 г. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/420245293>

## THE ROLE OF POTENTIALLY PATHOGENIC MICROBIOTA, PROBIOTICS AND ADAPTOGENS IN FORMATION OF MICROBIOCOENOSIS STRUCTURE OF AFRICAN CATFISH ROE

**Mukhitova M.E., Romanova E.M., Romanov V.V.,  
FSBEI HE Ulyanovsk SAU**

**432017, Ulyanovsk, Novyi Venets Boulevard, 1, tel. : 8 (8422) 55-95-38, e-mail: vvr-emr@yandex.ru**

*Key words: African catfish, adaptogens, probiotics, microbiocenosis, roe, testicles, larvae*

*When incubating the fertilized eggs of the African catfish, a certain proportion of embryos stops in development several hours after fertilization. Dead roe or roe shells undergo decomposition processes. Potentially pathogenic bacteria, colonizing the membrane of other embryos, subsequently colonize the intestines of the larvae. The structure of the natural microbiocenosis in the intestine of the larvae is disrupted. Consequently, infectious diseases develop in fish larvae, starting from early postembryonic ontogenesis. Identifying the causes of the mass death of fertilized eggs during its incubation is one of the most pressing fish problems that need to be solved. Our work is devoted to the study of the microbiocenosis of fertilized eggs and the role of potentially pathogenic microbiota in the formation of its structure. The results of bacteriological studies revealed potentially pathogenic bacteria *Citrobacter freundii* (Enterobacteriaceae family) and *Enterococcus faecalis* (Enterococcaceae family) in the microbiocenosis of fertilized eggs of female catfish. When seeding from germ cells on nutrient media, their growth was revealed (up to 10<sup>8</sup> cells). In order to form intestinal normocenosis, to increase immunity and, ultimately, to achieve an increase in the viability and survivability of fish in the process of growing, biologically active substances are used. To enhance the survivability of embryos and larvae of the African catfish, *Trecrestan* adaptogen, a derivative of phenoxyacetic acid, a synthetic analogue of natural adaptogens (*ginseng*, *Rhodiola rosea*) was used when incubating fertilized eggs. Also, new generation probiotic - *sporothermin* as an alternative to antibiotics was used. The use of probiotic *sporothermin* and the adaptogen *Trecrestan* significantly reduced the bacterial content of roe and significantly increased the yield and survivability of the larvae.*

#### Bibliography

1. Lartseva, L.V. Microflora of fish and other hydrobionts / L.V. Lartseva, O.V. Obukhova, I.A. Lisitskaya. - Astrakhan: Astrakhan University Publishing House, 2008. - 108 p.
2. Izvekova, G.I. Symbiotic microflora of various ecological groups / G.I. Izvekova, E.I. Izvekov, A.O. Plotnikov // *Izvestiya of the Russian Academy of Sciences. Biological series.* - 2007. - № 6. - P. 728-737.
3. Burlachenko, I.V. The use of probiotics at the early stages of development of the Lena sturgeon / I.V. Burlachenko, E.V. Malik // *Veterinary Medicine.* - 2007. - № 3. - P. 47-51.
4. Probiotics in aquaculture / E.A. Kotova, N.A. Pyshmantseva, D.V. Osepchuk, A.A. Pyshmantseva, L.N. Tkhakushinova // *Collection of Scientific Works of the All-Russian Research Institute for Sheep and Goat Breeding.* - 2012. - Volume 3, No. 1-1. - P. 100 - 103.
5. Innovative technologies for production of functional products in industrial aquaculture / E.M. Romanova, V.V. Romanov, V.N. Lyubomirova, M.E. Mukhitova, L.A. Shadyeva, T.M. Shlenkina, I.S. Galushko // *Fish farming and fisheries.* - 2018. - №5 (148). - P. 54-59.
6. Tkacheva, I.V. Probiotic as an immunomodulator / I.V. Tkacheva, N.N. Tishchenko // *Works of Kuban State Agrarian University.* - 2017. - № 64. - P. 188-191.
7. Tikhonova, E.M. Adaptogens in the regulation of metabolism / E.M. Tikhonova, I.V. Lunegova, A.Yu. Nechaev // *Effective and safe medicines in veterinary medicine. Proceedings of the IV International Congress of Veterinary Pharmacologists and Toxicologists.* - 2016. - P. 189 - 191.
8. Effect of Probiotic Bacteria on the Growth rate of Fresh Water Fish, *Catla catla* / M. Abdul Kader Mohideen, T. Mohan, S. Peer Mohamed, M. Hussain // *International Journal of Biological Technology.* - 2010. - № 56 – P. 113-117.
9. Chaucheyras, F. Probiotics in animal nutrition and health / F. Chaucheyras, H. Durand // *Lallemend Animal Nutrition, Blagnac.* - 2010. - № 1. – P. 3-9.
10. Evaluation of the effectiveness of gametogenesis inductors of African catfish / V.N. Lyubomirova, E.M. Romanova, V.V. Romanov, M.E. Mukhitov // *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy.* - 2018. - № 2 (42). - P. 148-154.
11. Biology of reproduction of catfish (*Clarias Gariepinus*, Burchell, 1822) in high-tech industrial aquaculture / E.M. Romanova, V.N. Lyubomirova, V.V. Romanov, M.E. Mukhitova, T.M. Shlenkina, L.A. Shadyeva, I.S. Galushko // *Journal of Fundamental and Applied Sciences.* - 2018. - Том 10, № 5. - P. 1116-1129.
12. The use of feed additives «Sporothermin» and «Covelos» in the rations of young farm animals / N.A. Yurina, Z.V. Pskhatsieva, S.I. Kononenko, N.N. Esaulenko, V.V. Erokhin, V.A. Barannikov // *Modern technologies of agricultural production and priority areas for development of agrarian science. Materials of the international scientific-practical conference.* - 2014. - P. 263 - 264.
13. <http://www.irkutin.ru/zhivotnye/ryba/>
14. Hoult, D. The determinant of Burgi bacteria / D. Hoult, N. Krig. - M.: Mir, 1997. - 799 p.
15. Methodological instructive regulations 4.2.1 884-04 Sanitary-microbiological and sanitary parasitological analysis of water of surface pools. - Access mode: [https://znaytovar.ru/gost/2/MUK\\_42188404\\_Sanitarnomikrobio.html](https://znaytovar.ru/gost/2/MUK_42188404_Sanitarnomikrobio.html)
16. On the unification of microbiological (bacteriological) research methods used in clinical and diagnostic laboratories of medical institutions. Order No. 535 of April 22, 1985 - Access Mode: <http://docs.cntd.ru/document/420245293>