

ФИЛИАЛ ПО ПРЕСНОВОДНОМУ РЫБНОМУ ХОЗЯЙСТВУ  
ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»)

*На правах рукописи*

**ЮХИМЕНКО ЛЮДМИЛА НИКОЛАЕВНА**

**АЭРОМОНОЗ, БАКТЕРИАЛЬНАЯ ГЕМОМРАГИЧЕСКАЯ СЕПТИЦЕМИЯ  
РЫБ И СПОСОБЫ ИХ ПРОФИЛАКТИКИ**

06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология,  
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Диссертация

на соискание учёной степени доктора биологических наук

Москва - 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений.....	7
1. Введение.....	8
1.1. Актуальность проблемы.....	8
1.2. Степень разработанности темы	9
1.3. Цель и задачи исследования.....	10
1.4. Научная новизна	10
1.5. Теоретическая и практическая значимость	11
1.6. Апробация работы.....	12
1.7. Публикации.....	13
1.8. Личный вклад.....	13
1.9. Объём и структура диссертации.....	14
1.10. Положения, выносимые на защиту.....	14
2. Обзор литературы	
Аэромонады и бактериальная геморрагическая септицемия рыб.....	16
2.1. Этиологическая структура подвижных аэромонад и их биологические свойства.....	16
2.2. Бактериальная геморрагическая септицемия рыб, возбудители, их эпизоотологическая и эпидемиологическая значимость.....	27
3. Выбор направления исследований.....	34
4. Материал и методы исследований.....	36
5. Собственные исследования	51
5.1. Эпизоотическая ситуация в рыбоводных хозяйствах.....	51
5.2. Влияние антропогенного воздействия на микробиоценоз воды и рыбы в рыбохозяйственных водоёмах.....	63
5.3. Подвижные аэромонады, выделенные от рыб и из воды, и их биологические свойства.....	68
5.4. Диагностика бактериальной геморрагической септицемии рыб .....	84

5.5. Бактериальные контаминанты комбикормов и их влияние на окружающую среду и организм рыб.....	98
5.6. Профилактика аэромоноза и бактериальной геморрагической септицемии.....	103
5.6.1. Методы специфической профилактики.....	104
5.6.1.1. Цитоплазматическая вакцина ВЮС-2.....	104
<i>Рефтинское тепловодное садковое хозяйство .....</i>	119
<i>Прудовые хозяйства Егорьевское и Осёнка.....</i>	123
<i>Характеристика гаметогенеза по влиянию вакцинации ВЮС-2 на развитие репродуктивной системы карпа</i>	128
<i>Особенности роста и развития яичников у самок .....</i>	128
<i>Особенности роста и развития семенников у самцов ...</i>	129
<i>Испытание Ридостина и Полирибоната с вакциной ВЮС-2</i>	131
5.6.1.2. Бактерин (формолвакцина).....	135
5.6.2. Пробиотики.....	154
5.7. Проблема экологической безопасности лечебных и профилактических мероприятий в рыбоводстве.....	178
6. Заключение.....	181
7. Выводы.....	185
8. Список литературы.....	188
9. Приложения	226
Авторское свидетельство «Штамм бактерий <i>Aeromonas sobria</i> - продуцент протективного антигена».....	226
Патент «Штамм бактерий <i>Aeromonas sobria</i> – продуцент протективного антигена».....	227
Патент «Вакцина для профилактики бактериально-геморрагической септицемии рыб».....	228
Патент «Способ приготовления корма» .....	229

Патент «Способ получения вакцины против аэромоноза рыб» .....	230
Временные рекомендации по выделению и идентификации аэромонад	232
Инструкция о мероприятиях по профилактике и мерам борьбы с фурункулезом лососевых рыб.....	233
Методические указания по диагностике эритродерматита карпа.....	234
Инструкция о мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб .....	235
Методические указания по определению патогенности аэромонад по степени ДНКазной активности.....	236
Методические указания по лабораторной диагностике псевдомоноза рыб .....	237
Временная инструкция о мероприятиях по борьбе с миксобактериозами лососевых рыб.....	238
Временные методические рекомендации по сравнительному анализу штаммов аэромонад методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.....	239
Акт 1/1 по результатам бактериологических исследований на РТСХ 18-22.04.1996.....	240
Акт по результатам бактериологических исследований на РТСХ 09.07.1996 г.....	242
Заключение по результатам бактериологических исследований материала в р/х РТСХ Рефтинской ГРЭС.....	244
Акт проверки результатов обработки рыбы вакциной ВЮС-2, ридостином и полирибонатом 26.09.1996 г. на РТСХ.....	248
Акт производственных испытаний инактивированной формолвакцины против БГС (аэромоноза) рыб в ЗАО «Черепетский рыбхоз» .....	252
Акт о результатах кормления рыбы пробиотическими препаратами Зоонорм и Субалин в 2006 г. 11.09.2006 г.....	254



Акт о результатах проведения вакцинации карпов-двухлеток в садковом тепловодном хозяйстве ЗАО «Черепетский рыбхоз» 07.09.2006 г.	257
Заключение по результатам проверки токсичности инактивированной формолвакциной (бактерином), приготовленной ВНИТИБП. 20.03.2007 ....	259
Акт проведения производственных испытаний пробиотического препарата Зоонорм 09.07.2007 г.....	260
Временное наставление по применению пробиотического препарата Зоонорм в рыбоводстве (в порядке производственных испытаний в 2007 г.). 01.06.2007 г. ....	261
Акт проверки результатов вакцинации на РТСХ 29.09.1993 г. ....	265
Акт проверки результатов вакцинации рыб в р/х Осёнка 18-20 октября 1993 г.....	266
Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации псевдомоноза рыб. 09.1998 г.....	267
Временное наставление по применению сухой вакцины против бактериальной геморрагической септицемии и аэромоноза рыб (в порядке широкого производственного испытания в 1996-1998 гг.) 13.05.1996 г. ....	268
Акт по применению комбикорма с субалином в производственных условиях ЗАО «Рыбхоз Клинский» 28.08.2001 г.....	269
Акт по применению комбикорма с субалином на прудах ЗАО рыбокомбината «Лотошинский» 17.08.2001 г. ....	270
Акт по применению комбикорма с субалином на прудах ЭПО «Якоть» 01.12.2001 г. ....	272
Акт по проверке эффективности применения субалина в «Бисеровском рыбокомбинате» против бактериальной геморрагической септицемии (аэромоза) карпа в 2001 году 27.08.2001 г.....	274
Акт по применению комбикорма с субалином на прудах ЭПО «Якоть» 15.12.2002 г. ....	277

Акт по проверке эффективности применения субалина в «Бисеровском рыбокомбинате» против бактериальной геморрагической септицемии (аэромоза) карпа в 2002 г. 25.09.2002 г. ....	278
РЕКОМЕНДАЦИИ Наставление по применению гранулированного комбикорма с субалином в рыбоводстве. 30.12.2002 г. ....	280

### Список сокращений

**БГС** - бактериальная геморрагическая септицемия.

**БГКП** - бактерии группы кишечной палочки.

**В/Б** - внутрибрюшинно.

**ВВК** - весенняя виремия карпа.

**В/М** - внутримышечно.

**ГИ** - гиперосмотическая инфильтрация.

**ДНК - аза** - дезоксирибонуклеаза.

**ДЭПЛААГ** - диск-электрофорез в полиакриламидном геле.

**ЖКТ** - желудочно-кишечный тракт.

**КОЕ** - колониеобразующая единица.

**КВП** - карп второго поколения.

**кДа** - килодальтон.

**КФР** - карп фресинет рамчатый.

**КФЧ** - карп фресинет чешуйчатый.

**ЛД<sub>50</sub>** - средняя доза вещества, вызывающая гибель 50% испытуемых объектов.

**МПА** - мясо-пептонный агар.

**МПБ** - мясо-пептонный бульон.

**МР** - метиловый красный.

**НФЩ** - неферментирующие щелочеобразователи.

**ОМЧ** - общее микробное число.

**О/Ф** - окисление/ферментация.

**ПВЭНТИ** - поливинилэтинилтриметилпиперидол с йодом.

**ПР** - полирибонат.

**РД** - ридостин.

**ТАА** - титр агглютинирующих антител.

**УЗВ** - установка замкнутого водообеспечения.

**УПМ** - условно-патогенные микроорганизмы.

**УР** - реакция Фогес-Проскауэра.

## 1. ВВЕДЕНИЕ

### *1.1. Актуальность проблемы*

Бактериальные болезни играют значительную роль в патологии рыб. В прошлые годы регистрировали несколько заболеваний, вызываемых определёнными возбудителями, такие как геморрагическая септицемия карпов, фурункулёз, вибриоз, миксобактериоз [9, 10, 27, 133, 134, 135]. В настоящее время официальное признание получили такие заболевания, как фурункулёз, эритродерматит карпа, аэромоноз, псевдомоноз, вибриоз, йерсиниоз, миксобактериозы, эдвардсиеллёз, протеоз, стрептококкоз и бактериальная почечная болезнь (БПБ) [40].

Следует отметить, что при этих заболеваниях в качестве сопутствующей микрофлоры раньше очень редко выделялись 2-3 представителя в небольшом количестве, но в настоящее время очень часто приходится сталкиваться с такими случаями, когда от рыбы выделяются до 9-10 представителей различных родов и видов, когда развивается бактериальная геморрагическая септицемия (БГС) - полиэтиологичное заболевание [138, 139, 141, 143, 57, 58, 146, 147, 159]. Кроме этого, одно из первых мест среди бактериальных болезней рыб занимали аэромонозы, вызываемые подвижными аэромонадами, чаще регистрируемые как краснуха [167]. И аэромоноз, и БГС уже многие десятилетия являются серьёзной проблемой рыбоводства, поскольку к возбудителям болезни чувствительны практически все виды рыб, если они и не вызывают гибель рыбы, то в значительной мере портят её товарный вид, приводя к существенным экономическим потерям, хотя до сих пор некоторые исследователи отводят аэромонадам роль вторичных возбудителей. В связи с этим изучению этиологической роли подвижных аэромонад и возбудителей БГС при патологических процессах у рыб необходимо было уделять большое внимание.

Разработка методов специфической и неспецифической профилактики аэромоноза и БГС, которая проводилась в лаборатории ихтиопатологии

ВНИИПРХ на протяжении многих лет, потребовала знания и критической оценки эпизоотической ситуации в рыбоводных хозяйствах и этиологической структуры аэромонад и других представителей микробиоценоза в этих хозяйствах и их эпизоотической значимости. Иными словами, необходимо было оценить фон, на котором обрабатывались профилактические мероприятия.

### ***1.2. Степень разработанности темы***

Вопросами диагностики заболеваний рыб занимались многие коллективы и специалисты, как у нас, так и за рубежом [3, 5, 9, 19, 27, 30, 65, 97, 128, 135, 208, 212, 287]. Однако, как правило, эти исследования чаще всего касались одного конкретного заболевания. Нам же чаще всего приходилось сталкиваться с заболеваниями смешанной этиологии, с возбудителями, относящимися к нескольким видам, родам и даже семействам. Всё это затрудняло и диагностику и разработку методов борьбы. Возникало много вопросов, на которые не всегда находили ответ в имеющихся руководствах. Даже в учебниках А.К. Щербины [133, 134, 135] речь шла о краснухе или геморрагической септицемии карпов, ксантозисе плотвы, геморрагической септицемии линей, краснухе угрей, при этом вопрос об этиологии этих заболеваний был окончательно не решен. Подвижным аэромонадам чаще всего отводилась роль вторичных возбудителей, многочисленными сопутствующими микроорганизмами не занимались, а как показали наши исследования, их становилось всё больше. Всё это требовало тщательного изучения, в связи с чем, как было выше сказано, мы и приступили к решению этой проблемы: изучению эпизоотической ситуации в рыбоводных хозяйствах различного типа, выяснению роли бактериальных компонентов микробиоценоза рыб, исследованию биологических свойств подвижных аэромонад, определению их эпизоотической значимости.

### ***1.3. Цель и задачи исследования***

**Целью** настоящего исследования была разработка методов диагностики бактериальных болезней рыб, выделения и идентификации возбудителей и методов профилактики заболеваний, установление факторов, влияющих на микробиоценоз воды и рыбы. Для достижения указанной цели были сформулированы следующие **задачи**:

- изучить эпизоотическую ситуацию в рыбоводных хозяйствах и определить влияние антропогенного воздействия на микробиоценоз воды и рыбы в рыбохозяйственных водоёмах;
- определить этиологическую структуру и роль подвижных аэромонад как возбудителей патологических процессов у рыб;
- установить эпидемиологическую значимость возбудителей БГС;
- отработать методы и схемы идентификации возбудителей БГС;
- изучить влияние бактериальных контаминантов комбикормов на окружающую среду и организм рыб;
- разработать способ профилактики аэромоноза и БГС.

### ***1.4. Научная новизна***

- Впервые от белого толстолобика и карпа были выделены подвижные аэромонады *Aeromonas sobria* - облигатные патогены, подтвердившие их роль, как первичных возбудителей патологических процессов у рыб, вызывающих 100%-ную гибель рыбы при постановке биопробы контактным методом.

- Впервые проведено диск-хроматографическое исследование подвижных аэромонад, позволившее разделить их на три группы по биологическим свойствам, а из высоковирулентного штамма *A. sobria* 77-18 выделить вторую фракцию белка, отличающую его от других аэромонад, получить цитоплазматическую вакцину ВЮС-2 и бактерин (формолвакцину) и показать высокую степень их протективного действия.

- Определён видовой спектр возбудителей БГС - ацинетобактеров, моракселл, энтерококков в качестве этиологических агентов патологических

процессов у рыб, что позволило проводить диагностические исследования с большей точностью и полнотой.

. - Впервые при изучении вирулентности аэромонад, выделенных от рыбы и из воды, использована ДНКазная активность, позволившая определять вирулентность аэромонад без проведения биологической пробы, что дало возможность увеличить количество изучаемых культур и повысить достоверность проводимых исследований.

- Применение сокращенной схемы дифференциации подвижных аэромонад, («пёстрый ряд» Гисса, состоящий из глюкозы, салицина, L-арабинозы и эскулина) позволило установить 14 биоваров и оценить их эпизоотическую значимость.

- Предложена схема исследования патологического материала с учётом разнообразия микроорганизмов, что повысило уровень диагностики заболеваний рыб.

- Впервые при обследовании хозяйств стали параллельно изучать микробиоценоз рыбы, воды водоёма, из которого взята рыба, и комбикорма, который она получала. Такой подход облегчил процесс установления причины развития заболевания

- Показана роль комбикормов, как дополнительного источника контаминации воды рыбохозяйственных водоёмов.

### ***1.5. Теоретическая и практическая значимость***

На основании проведённых исследований подготовлены Временные рекомендации по выделению и идентификации аэромонад [1987], подготовлено 7 инструкций и методических указаний, утверждённых в Департаменте ветеринарии и включенных в Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб [1998], утверждены Авторское свидетельство и 4 патента [1993, 1995, 1997, 1999, 2011].

Результаты исследований широко применяются при проведении диагностики заболеваний рыб практическими работниками.

Полученная информация используется в курсе лекций по ихтиопатологии в высших и средних учебных заведениях и на курсах повышения квалификации работников рыбного хозяйства.

Результаты исследований широко применяются при проведении диагностики заболеваний рыб практическими работниками.

Полученная информация используется в курсе лекций по ихтиопатологии в высших и средних учебных заведениях и на курсах повышения квалификации работников рыбного хозяйства.

### ***1.6. Апробация работы***

Материалы диссертации были представлены на отчётных сессиях ФГБНУ «ВНИИПРХ», заседаниях ихтиопатологической комиссии, межлабораторных семинарах ГосНИОРХ, ВНИИПРХ и УкрНИИРХ, VII Всесоюз. совещании по паразитам и болезням рыб, Ленинград, 1979 г.; на Всесоюз. совещании «Организация мероприятий по борьбе с инфекционными болезнями рыб», Москва, 1981г.; на конф. «Биологические основы рыбного хозяйства Средней Азии и Казахстана», Ташкент, 1983 г.; на 4 Всесоюз. совещании по науч.-техн. проблемам марикультуры, Владивосток, 1983; на конф. «Современные задачи изучения бактериальных болезней рыб», Ленинград, 1987 г.; на 1 Симпозиуме по экологической биохимии рыб, Ярославль, 1987; на 9 Всесоюз. совещании по паразитам и болезням рыб, Петрозаводск, 1990 г.; на совещании Состояние и перспективы науч.-практ. разработок в области марикультуры России, Москва, 1996 г.; на 1 Конгрессе ихтиологов России, Астрахань, 1997г.; на 1 Российско-Американском симпозиуме «Aquaculture and fish health», Рыбное, 1998 г.; на междунар. науч.-практ. конф. «Проблемы развития рыбного хозяйства на внутренних водоёмах в условиях перехода к рыночным отношениям», Минск, 1998 г.; на Междунар. Симпозиуме «Итоги тридцатилетнего развития рыбоводства на тёплых водах и перспективы на XXI век», Санкт-Петербург, 1998 г.; на науч.-практ. конф. «Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре», Москва, 2000 г.; на Междунар. конф. «Осетровые на рубеже 21 века», Астрахань, 2000 г.; на науч.-практ. конф. «Марикультура Северо-Запада России», Мурманск, 2000 г.; на науч.-практ. конф. «Проблемы и перспективы развития аквакультуры в России», Адлер, 2001 г.; на науч. конф. «Морфологические и физиологические особенности гидробионтов», Москва, 2001 г.; на II Междунар. науч.-практ. конф. «Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития», Астрахань, 2001 г.; на международной науч.-практ. конф. «Аквакультура начала XXI века: истоки, состояние, стратегия развития», п. Рыбное, 2002 г.; на Междунар.



конгрессе «Ликвидация и элиминация инфекционных болезней - прогресс и проблемы», С.-Пб, 2003 г.; на науч.-практ. конф. «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб», Борок, 2003, 2007, 2011, 2015г.; на Международной науч.-практ. конф. «Пресноводная аквакультура: состояние, тенденции и перспектива развития», Кишинёв, 2005 г.; на Всероссийской науч.-практ. конф.-семинаре «Эпизоотический мониторинг в аквакультуре: состояние и перспективы», Москва, 2005 г.; на Междунар. науч.-практ. конф., посвящённой 60-летию Московской рыбоводно-мелиоративной опытной станции, Москва, 2005 г.; на Междунар. науч.-практ. конф. «Актуальні проблеми аквакультури та раціонального використання водних біоресурсів», Киев, 2005 г.; на Междунар. науч.-практ. конф., посвящённой 35-летию ВНИТИБП «Научные основы производства ветеринарных биопрепаратов», Щелково, 2005г.; на науч.-практ. конф. «Рациональное использование пресноводных экосистем - перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК», Москва, 2007 г.; на X Междунар. науч.-практ. эколог. конф. «Живые объекты в условиях антропогенного пресса», Белгород, 2008 г.; на 2-м съезде Nасее, Кишенёв, 2011 г.; на Всерос. Междунар. конфер., посв.80-летию Татарского отд. ФГБНУ «ГосНИОРХ», Казань, 2011 г.; на US-RUSSIA Workshop, Leetawn, 2012 г.; на Междунар. науч.-практ. конф. «Водные биоресурсы, аквакультура и экология водоёмов», Калининград, 2013 г.; на Всерос. науч.-практ. конф. «Интегрированные технологии аквакультуры в фермерских хозяйствах», Москва, 2016 г.

### ***1.7. Публикации***

По теме диссертации опубликована 151 работа в том числе 23 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК, Авторское свидетельство, 4 патента, 12 научно-технических документов.

### ***1.8. Личный вклад***

Автор с 1978 г. принимала непосредственное участие в обосновании и постановке задач, в разработке методик, проведении научных исследований,

сборе первичных данных, обработке, анализе и интерпретации полученных результатов, их практической реализации, опубликовании основных материалов исследований. В сборе эпизоотических данных участвовали сотрудники лаборатории ихтиопатологии В.Ф. Викторова, Г.С. Койдан, Л.И. Бычкова; аспиранты Е.А. Каховский, Н.В. Гусева, К.В. Гаврилин, Е.С. Трифонова; Е.П. Керекеша, сотрудники ихтиопатологических служб республик и областей. При проведении производственных проверок вакцины ВЮС-2, формолвакцины и пробиотиков активно помогали сотрудники МолдНИРХС Г.Х. Куркубет и В.И. Доманчук, главный рыбовод ЗАО «Черепетский рыбхоз» Ю.А. Пуховский, сотрудники лаборатории ихтиопатологии П.П. Головин, Г.С. Койдан, Л.И. Бычкова, Н.Н. Романова, аспиранты К.В. Гаврилин, А.В. Климов и Н.В. Лукьянова, за что автор выражает всем искреннюю благодарность.

### ***1.9. Объём и структура диссертации***

Диссертация изложена на 283 страницах компьютерного текста и содержит разделы: введение, обзор литературы, выбор направления исследований, материал и методы исследований, собственные исследования, заключение, выводы, список литературы и приложения. В работе представлены: 72 таблицы, 20 рисунков. Список литературы включает 315 источников, из них 192 отечественных, 123 иностранных. Приложения представлены на 55 страницах.

### ***1.10. Положения, выносимые на защиту***

- Определение этиологической структуры подвижных аэромонад, выделяемых из рыбы и воды рыбоводных водоёмов и их биологических свойств.
- Подвижные аэромонады являются не только возбудителями вторичных заболеваний рыб, но и облигатными паразитами.
- Роль условно-патогенной микрофлоры в возбуждении бактериальной геморрагической септицемии (БГС) рыб.
- Эпидемиологическое значение возбудителей БГС.

- Влияние бактериальных контаминантов комбикормов на микробиоценоз воды и рыбы.

-Способы профилактики БГС (вакцины, пробиотики).

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### АЭРОМОНОЗЫ И БАКТЕРИАЛЬНАЯ ГЕМОМРАГИЧЕСКАЯ СЕПТИЦЕМИЯ РЫБ

#### 2.1. Этиологическая структура подвижных аэромонад и их биологические свойства

Одной из проблем инфекционной патологии, наносящий существенный ущерб рыбоводству, является проблема аэромоноза [11, 12,43, 61, 93, 300]. Если раньше это было обусловлено широким применением в прудовом рыбоводстве интенсификационных мероприятий, то сейчас аэромонадная инфекция связывается со снижением резистентности рыб, изменением экологической ситуации и нарушением санитарно-гигиенического режима в прудах, неудовлетворительным качеством комбикормов и их недостаточным количеством [117].

Аэромонады - сложная в таксономическом отношении группа бактерий. Предлагалось множество классификаций, основанных на различных таксономических признаках, каждая имела свои плюсы и минусы, но не получала широкого распространения. В 1981 г. в результате изучения гибридизации ДНК-ДНК 55 штаммов *Aeromonas* на основании полученных данных об их физиологических различиях авторы признали 3 вида: *A. hydrophila*, *A. caviae* и *A. sobria*. Однако внутри каждого вида по данным гибридизации ДНК существовало несколько групп [275]. В 1983 году было сделано сообщение о выделении из речной воды нового вида аэромонад *A. media*, обладающего коричневым пигментом [196]. По данным фенотипических, генотипических и дифференциальных характеристик в 9-м издании Определителя бактерий Берджи (1994) [85] была принята классификация, которая предусматривала разделение подвижных аэромонад на три вида: *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* и *A. caviae*. Однако вариабельность ферментативных характеристик заставила выделить пять биоваров только по ферментации салицина, L-арабинозы и гидролизу эскулина. В последующем издании Определителя бактерий Берджи видовой состав аэромонад был значительно расширен (таблица 1).

Таблица 1 - Дифференциальные признаки подвижных аэромонад

Характеристики	<i>A.caviae</i>	<i>A.eucrophila</i>	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.media</i>	<i>A.schubertii</i>	<i>A.sobria</i>	<i>A.veronii</i>
Сахароза, кислота	+	d	+	+	-	d	+
Трегалоза, кислота	+	+	+	+	+	d	+
Эскулин, гидролиз	+	+	+	d	-	-	+
Коричневый растворимый пигмент	-	-	-	+	-	-	-
Глюкоза (газ)	-	+	+	+	-	+	+

**Примечание:** "+" - реакция положительная, "-" - реакция отрицательная, d - реакция переменная

Некоторые характеристики, не играющие дифференцирующей роли, опущены. Однако и эта классификация не являлась окончательной.

S. Joseph и A. Carnahan (1994) в обзоре, посвящённом выделению, идентификации и систематике подвижных аэромонад, на основании получения генотипических и фенотипических признаков предложили другую классификацию подвижных аэромонад (таблица 2).

Таблица 2- Определяющие признаки мезофильных видов аэромонад

Характеристики	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.veronii</i> bv <i>sobria</i>	<i>A.veronii</i> bv <i>veronii</i>	<i>A.ca-viae</i>	<i>A.schubertii</i>	<i>A.janda</i> <i>daei</i>	<i>A.trotta</i>
Эскулин гидролиз	+	-	+	+	-	-	-
VP	+	+	+	-	v	+	-
L-Арабиноза	v	-	-	+	-	-	-
Маннит	+	+	+	+	-	+	+
Сахароза	+	+	+	-	-	-	-
Индол/H <sub>2</sub> S	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+
Глюкоза (газ)	+	+	+	-	-	+	+

**Примечание:** "+" - положительно более 70% изолятов; "-" - отрицательно менее 30% изолятов; v - р-я переменная

Даже, если судить по этим приведённым материалам, то в вопросе о таксономии подвижных аэромонад ещё никто не поставил окончательную точку.

В 2010 г. J.M. Janda и S.L.Abbot опубликовали статью, в которой приводились характеристики некоторых видов аэромонад (таблица 3).

Таблица 3 - Дифференциальные признаки видов *Aeromonas*  
(Janda, Abbot, 2010)

Вид	В % к числу изученных штаммов								
	VP	Газ	Л-арабиноза	Рамноза	Лактоза	Сахароза	Маннит	Эскулин	Мочевина
<i>A. hydrophila</i>	95	95	58	7	27	97	98	99	26
<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	94	89	91	0	22	100	99	7	1
<i>A. caviae</i>	0	0	100	1	79	100	100	97	96
<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>	83	92	8	0	83	100	100	92	0
<i>A. jandaei</i>	88	100	0	0	18	0	100	0	7
<i>A. trota</i>	6	71	0	0	12	24	71	12	69
<i>A. schubertii</i>	17	0	0	0	25	0	0	0	0
<i>A. popoffii</i>	100	100	57	0	0	0	100	0	71
<i>A. bestiarum</i>	63	75	100	69	13	100	100	94	94
<i>A. media</i>	0	0	100	0	94	100	100	88	100
<i>A. eucrenophila</i>	0	73	82	20	55	64	100	82	9

В данной работе авторы рассматривали только клинические изоляты и не рассматривали те показатели, которыми пользовались мы (нет салицина), поэтому сопоставить полное соответствие некоторых биоваров не представлялось возможным, но в приближенном виде такие биовары нами от рыб не выделялись.

К аэромонадам чувствительны практически все виды рыб. Аэромонады у растительноядных рыб и карпов описали различные авторы [8, 6, 7, 45]. Э.К.Скурат с соавторами [112] сообщили об аэромонаде карпов и сазанов, вызванном *A. hydrophila* и *A. punctata*, в Белоруссии. В Калининградской области в учебно-опытном рыбоводном хозяйстве в микробиоценозе карпа преобладали аэромонады [3].

Аналогичная ситуация отмечалась в рыбоводных хозяйствах восточных районов Украины [70]. Острую септицемию, вызванную патогенными штаммами *A. hydrophila*, наблюдали у больших индийских карпов на двух рыбоводных фермах в округе Западной Годавари в Индии [246]. Массовая гибель рыбы зимой

и весной в естественных водоёмах, вызванная *A. hydrophila*, была описана в Англии [243].

Неоднократно аэромоноз, вызванный подвижными аэромонадами, регистрировался у форели (*Salmo gairdneri* R.), выращиваемой в солоноватых водах [69, 98, 99], у кумжи (*Salmo trutta*) [298, 276] и сёмги, выращиваемой на Княжегубском рыбноводном заводе [49], у тихоокеанских лососей в Приморье [94, 131] и Магаданской области [30, 31], у двухлеток лосося (*Salmo salar* L.) в Швеции [244].

В восточной части Балтийского моря у трески с язвенными поражениями на поверхности тела были выявлены патогенные бактерии *A. punctata*, на основании чего авторы сделали вывод, что Балтийское море может быть источником инфекции для рыб, искусственно выращиваемых на морской воде [89]. У мальков полосатого окуня (*Morone saxatilis* W.), выращиваемого в бассейнах экспериментальной базы ЮгНИРО «Заветное» при покраснении жабр и вздутии брюшка было выделено 8 штаммов аэромонад, пик численности которых наблюдали в морской воде в районе мыса Большой Утриш в июле-августе при повышении температуры воды до 24-28<sup>0</sup>С [98]. Для профилактики заболеваний авторы предложили проводить тщательный микробиологический контроль морской воды с обязательным определением количественного состава аэромонад.

*A. hydrophila* описан в качестве возбудителя краснопятнистой болезни угря в Греции [305] и болезни «красный плавник» в Японии [284]. Этот же возбудитель был выделен на Тайване от культивируемого змееголова *Channa maculata* [293], *A. schubertii*, был выделен при висцеральной белопятнистой болезни у змееголова *Channa masculata cheng* [260] и при вспышке аэромонадной инфекции у обыкновенного змееголова *Ophiocephalus sargus* в прудах Сяньнин в центральном Китае [253], у чёрного амурского леща (*Megalobrama amblycephala*) в Китае [259] и у аю (*Plecoglossus altivelis*) в Японии [264], при эпизоотии язвенной болезни у донно-живущих рыб в озере Бай на Филиппинах [250]. О накоплении аэромонад в летний период у донных промысловых рыб Волго-Каспийского бассейна сообщила Л.В. Ларцева [62].

Об этиологической роли аэромонад в патологии рыб длительное время шли дискуссии. Первоначально регистрировали заболевания рыб под диагнозом «краснуха», с возбудителем не установленной природы, но считавшиеся инфекционными. В 1904 г. М. Plehn [274] предположил бактериальную природу заболевания. Эту точку зрения поддерживал В. Шаперклаус [288, 289] Он считал возбудителем *A. punctata forma ascitae*, сапрофитную форму, которая при определённых условиях могла приобретать вирулентность и вызывать заболевание рыб. В то же время многие авторы отмечали, что часто у рыб с диагнозом «краснуха» *A. punctata* не выделяется, что не укладывалось в бактериальную гипотезу «краснухи». Советские учёные уже в 30-х - 40-х годах на основании гистологических исследований предположили вирусную природу заболевания [41, 42], которая получила подтверждение и у зарубежных исследователей [270, 279, 301]. Длительное время считали, что возбудителями «краснухи» являются вирусы, а бактерии - осложняют течение заболевания [86, 87].

В 1974 году вышла статья К.А. Лобунцова «Краснуха и «краснухоподобные» болезни рыб (этиология и дифференциальная диагностика)» [65], в которой было дано обоснованное разделение «краснухи» на весеннюю виремию карпа, аэромоноз и псевдомоноз, положившая конец многолетним спорам. А в 1991 году в журнале «Рыбное хозяйство» Ю.Л. Волинкин с соавторами привели анализ заболеваемости рыб краснухой в Белгородской области с 1978 года, разделив её на три группы: весеннюю (аэромоноз, псевдомоноз и смешанные инфекции у трёхлетних рыб), осеннюю (аэромоноз у двухлеток, реже псевдомоноз, который может протекать по типу жаберного некроза) и зимние формы псевдомоноза, реже аэромоноза или смешанные инфекции годовиков и двухгодовиков [35]. Для профилактики вспышек применяли негашеную известь в нагульных прудах, лечебное кормление с фуразолидоном, обработку рыб в прудах органическими красителями и на ранних стадиях бактериального поражения жабр - гипохлорит кальция. Получается, что все эти заболевания авторы объединили по наличию одного признака - синдрома



гиперемии, что в настоящее время не допускается. Тем не менее диагноз «краснуха» кое-где ставится до сих пор и роль аэромонад в качестве первичного возбудителя инфекции ставится под сомнение, считают, что аэромонад у карпов является чаще всего вторичной инфекцией [19].

Существенную роль в провоцировании аэромонадоза играют паразиты. При ботриоцефалёзной инвазии карпов развивается эндогенная форма инфекции в результате повреждения стенки кишечника и изменения его микробиоценоза [192]. Экспериментально было показано, что при инфицировании *A. hydrophila* серебряных карасей, зараженных инфузорией *Ichthyophthirius multifiliis* и травмированных, развитие бактериальной инфекции ускоряется и она имеет более продолжительное течение, чем у рыб не зараженных инфузориями. Авторы предположили, что травмирование тела рыбы инфузорией позволяет попадать возбудителю из воды в тело рыбы [251]. Массовая гибель лягушек была отмечена в бассейне одного из колледжей в Индии. При бактериологическом обследовании лягушек, осадка и воды из бассейна были выделены *A. hydrophila* [297]. Этот же возбудитель в сочетании с *Pseudomonas aeruginosa* был выделен из язвы в полости рта при некротическом стоматите у бразильской змеи *Bothrops alternatus*. В связи с чем авторы предложили ужесточить режим асептики и антисептики при получении от змей яда для производства антитоксических сывороток [263]. Патогенные *A. hydrophila* выделили из селезёнки, почек и фекалий мертвого зайца [279], от лебедя *Cygnus olor* [283] и диких птиц [227]. При этом авторы сообщают, что от живых птиц аэромонады чаще выделялись из кишечника, от павших - из лёгкого, и выделялись из кишечника чаще у водоплавающих птиц, чем у обитающих на суше.

При обследовании домашнего скота аэромонады были выделены от коров, свиней, овец и коз [219].

О роли аэромонад в патологии человека в обзоре зарубежной литературы написал Г.П. Калина (1974) [51]. Вспышка кишечной инфекции среди учащихся ГПТУ в Московской области была вызвана употреблением отварной рыбы терпуг, инфицированной *A. sobria* [137]. О частоте выявления аэромонад в пробах

фекалий человека в Болгарии сообщил З. Захариев (1974) [314], была доказана энтеропатогенность штаммов *A. hydrophila*, выделенных от взрослых и детей с диареей [220,287]. С.С. Soussi, F.J. Squinasi и J.L. Duval (1975) [294] из 20 наблюдавшихся человек, описали 12 документированных случаев аэромоназа, которые были отнесены ко вторичной инфекции, развившейся на фоне предшествующих тяжелых соматических заболеваний (злокачественных новообразований, лейкемии, цирроза печени) и развитие вторичной инфекции привело к летальному исходу. В Италии от 21 ребёнка с гастроэнтеритом и 12 здоровых детей было выделено 39 штаммов аэромонад, из которых 6 относились к *A. hydrophila*, 5 - к *A. sobria* и 18 - к *A. caviae* [225], а при диарее у детей в государстве Берег Слоновой кости в 24,4% случаев были выделены аэромонады, из которых в 50,0% были *A. caviae*, в 27,3% - *A. sobria*, в 22,7% - *A. hydrophila* [216]. В Англии при обследовании 2009 детей на наличие аэромонад выделили возбудителя от 89 детей (4,43%). При этом 71 штамм был идентифицирован как *A. caviae*, 11- как *A. sobria*, 7 - как *A. hydrophila* [236], а из 40 штаммов аэромонад, выделенных от 39 больных диареей, 22 штамма были идентифицированы, как *A. caviae*, 10 - как *A. hydrophila*, 5 - как *A. sobria* и 3 - не были определены [243]. В Испании за два года при исследовании 3360 проб фекалий было выделено 47 штаммов *A. hydrophila*, которые занимали 4-е место после сальмонелл, кампилобактеров и шигелл [278].

*A. hydrophila* могут вызывать острые диарейные заболевания, главным образом в летние месяцы [220]. В результате загрязнения повреждённых тканей водой или почвой аэромонады могут вызывать раневые инфекции и флегмону. При хроническом заболевании печени аэромонады могут вызвать септицемию, часто заканчивающуюся летальным исходом. Кроме этого, возможны инфекции глаз, дыхательных путей, мочевого тракта, остеомиелит, септический артрит, отит, эндокардит и менингит. *A. sobria* вызывает тяжелое холероподобное заболевание, сопровождающееся болями в животе, профузным поносом, тошнотой и лихорадкой. Бактерии этого вида вызывают также раневые инфекции, связанные с применением медицинских пиявок [48, 197, 202, 235, 271, 280, 281].

Об этиологической роли аэромонад при патологических процессах у теплокровных сообщали многие исследователи из разных стран [126, 202, 211, 280, 266, 59, 71]. Способность аэромонад вызывать заболевания у животных и человека связывают с их вирулентностью, способностью к токсинообразованию, наличием факторов агрессии. Патогенность многих микроорганизмов связывают с наличием дезоксирибонуклеаз [75, 76, 90, 91]. Было показано, что аэромонады продуцируют два различных энтеротоксина, один из которых не даёт перекрёстных реакций с термолабильным токсином *E.coli* и холерным токсином, второй реагирует с обоими [195, 307]. Показано, что казеиназной активностью обладают как вирулентные, так и авирулентные аэромонады, а 91,9% вирулентных штаммов *A.hydrophila* и 68,6% штаммов *A.sobria* обладали гемолитическими свойствами [273, 281]. У патогенных штаммов *A.hydrophila* выявлены энтеротоксины, гемолизины и цитотоксические протеины [306, 220]. У *A.veronii*, выделенных от больных диареей, выявили гемолизин [296]. Цитотоксический энтеротоксин был выявлен у *A.hydrophila*, выделенного с поверхности кожи и из кишечника у рыб [205, 214, 195, 207, 234]. Высокотоксичными для атлантического лосося оказались очищенные внеклеточные протеазы *A.hydrophila*. После внутримышечного введения рыбам очищенной протеазы наблюдали летальные исходы [288, 289, 290]. Кроме того, у *A.hydrophila* выявлены термостабильный и термолабильный энтеротоксин, фибринолизин и лейкоцидин [258]. Большое внимание уделяется поверхностным структурам бактерий, которые считаются факторами патогенности - белки наружной мембраны, фимбрии, капсульные полисахариды, адгезины [206, 310, 291, 292, 304, 33]. Для изучения вирулентности бактерий было предложено множество методов: постановка биопробы, определение так называемых ферментов патогенности, токсинов, способность к размножению в культуре клеток. Установлена взаимосвязь патогенности бактерий с белковым составом, для определения которой используется метод диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ДЭПААГ) [113а]. Метод выявления у различных микроорганизмов ДНКазы был использован многими исследователями: у

микрোকков, выделенных из клинического материала, у стафилококков [242, 53, 90, 91, 119], у энтеробактерий [46]. ДНКазная активность определялась у стафилококков, выделенных из различных источников - от больных с кишечными расстройствами, с соматическими заболеваниями и с объектов внешней среды (смывы) и установлено, что самые чёткие результаты получаются при изучении штаммов, выделенных из клинического материала. При изучении эпидемиологии заболеваний, вызываемых аэромонадами, было установлено, что эти микроорганизмы выделяются и от больных, и от здоровых, и из окружающей среды. В развивающихся странах это чаще всего связывают с употреблением контаминированной пищи и воды [282]. При исследовании образцов пищевых продуктов, включая рубленую говядину, свинину, цыплят, морепродукты и различные овощи выявили высокий уровень контаминации аэромонадами, что свидетельствовало о том, что инфекции могут быть скорее пищевого, чем водного происхождения. В 70% мясных продуктов преобладали *A. hydrophila* и *A. sobria*, а в морских продуктах, овощах и овощных продуктах - *A. caviae* [271]. Именно с гигиеной пищевых продуктов часто связывают вспышки пищевых отравлений и гастроэнтеритов среди людей. Среди установленных виновников заболеваний птица, мясо, мясные продукты, сырое и пастеризованное молоко, сыры, салаты и др., а среди возбудителей - сальмонеллы, кампилобактеры, йерсинии, стафилококки и аэромонады [203, 211, 227, 233, 272, 238, 287]. Источником загрязнения продуктов, кроме человека, может быть вода. При исследовании 239 образцов городской воды на наличие аэромонад в 78 образцах воды из колодцев и конечных пунктов распределительной системы были выявлены энтеротоксинпродуцирующие аэромонады [261]. В Гааге в восьмидесятые годы было отмечено неожиданное увеличение интенсивности загрязнения аэромонадами воды централизованного водопровода - до 200 КОЕ/мл в распределительной сети [247]. В Испании при исследовании сточных вод центральных коллекторов, сточных вод после физико-химической в сочетании с хлорированием и биологической обработки, образцов речной, морской и водопроводной воды определяли количество мезофильных аэромонад. Было

установлено, что в образцах сточных вод их количество варьировало от  $10^7$  до  $10^8$  КОЕ/100 мл. В 90% образцов обработанных, но не хлорированных сточных вод количество мезофильных аэромонад варьировало от  $10^2$  до  $10^6$  КОЕ/100 мл. Они были обнаружены в 67% образцов хлорированных сточных вод, во всех образцах речной воды, в морской и в 70% образцов водопроводной воды [200]. При круглогодичном обследовании воды в прудах для культивирования тилапии в Саудовской Аравии установили, что во всех сезонах преобладали *A. hydrophila* в сочетании с фекальными колиформными бактериями, в связи с чем было высказано опасение о возможной контаминации патогенами и съедобных частей рыб и создании риска для здоровья человека [303].

Для борьбы с аэромоназом в семидесятых годах и позже широко применяли кротонолактон [7, 41], позже для снижения уровня бактериальной обсеменённости воды стали применять гипохлорит кальция [52], негашеную известь [149, 32], озон [81], перманганат калия [226], перекись водорода [237].

Для предупреждения вспышек аэромоназа, как и любого инфекционного заболевания, необходимо строгое и своевременное выполнение общих профилактических, ветеринарно-санитарных и рыбоводно-мелиоративных мероприятий, обеспечивающих оптимальные зоогигиенические условия окружающей среды. При возникновении заболевания применяли различные препараты. В Германии долгое время при аэромоназе успешно применялся триметоприм-сульфадиметоксин [269]. В Белоруссии использовали вначале антибиотики и некоторые препараты фуранового ряда. Затем перешли на препараты, выпускаемые фармацевтической промышленностью Беларуси, антибиотики рифампициновой группы и сульфаниламиды [112].

В Ростовской области на основании определения чувствительности выделенных аэромонад к антибиотикам, по эффективности и стоимости выбрали нифулин [129]. В Англии при изучении 31 штамма *A. hydrophila*, выделенных при диарее, установили самую высокую чувствительность к гентамицину [283]. В Венгрии изучили чувствительность 300 штаммов *A. hydrophila* и *A. punctata*, выделенных из разных органов рыбы, к 27 антибиотикам. Лучшие результаты

воздействия на бактерии были у препаратов аминоглюкозидной структуры (стрептомицин и хлорамфеникол), а наиболее эффективным в кормах оказался неомицин. Относительно большое количество штаммов бактерий было чувствительно к антибиотикам этой группы - парамомицину и хлорамфениколу [223]. В Китае при тестировании *A. hydrophila*, выделяемых из рыб на протяжении 1997-2000 гг., установили наибольшую эффективность хлорамфеникола, гентамицина, норфлоксацина и ципрфлоксацина [262]. А уже в 2011 г. была показана высокая резистентность аэромонад, выделенных из биоплёнок пруда и кожи выращиваемых там рыб, к хинолонам, флуорохинолонам, стрептомицину, окситетрациклину, хлорамфениколу, флорфениколу, сульфаметоксазолу и триметоприму. На основании чего авторы высказали опасение, что это может создать опасность бактериального поражения рыб [268]. В России для борьбы с аэромонадом и профилактики был предложен препарат ПВЭНТИ - поливинилэтинилтриметил - пиперидол с йодом [82].

## 2.2. Бактериальная геморрагическая септицемия (БГС) рыб, возбудители, их эпизоотическая и эпидемиологическая значимость

Уже в тридцатые годы прошлого тысячелетия появились работы о пёстром микробиоценозе рыб, подвергавшихся обследованию по поводу аэромоноза или «краснухи». Авторы отмечали, кроме истинных бактерий *Eubacteriales*, выделяются *Serratia*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas* [44].

В семидесятые годы многочисленными отечественными и зарубежными исследователями в посевах паренхиматозных органов карпов и амуров из различных рыбоводных хозяйств выявлено большое количество условно - патогенной микрофлоры [125, 97, 295, 313]. При изучении микрофлоры лососёвых в течение их жизненного цикла мигрирующих из пресных вод в море и обратно японские исследователи сделали вывод, что микрофлора здоровых лососей в основном состояла из бактерий рода *Aeromonas* и сем. *Enterobacteriaceae* при жизни в пресных водах, а в морской воде - из различных родов морских вибрионов и галофильных типов. При продвижении к морю или вверх по течению реки их микрофлора претерпевала изменения адекватно адаптации рыбы к условиям окружающей среды [312]. От больных лососей на рыбоводном заводе Мурманска были выделены *Vibrio sp.*, *A. hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. nonliquefaciens*, *P. putida*, *Flexibacter sp.*, *Flavobacter sp.*, *Streptococcus sp.* [108]. При изучении заболеваний карпа и канального сома, выращиваемых в УЗВ, диагностировали БГС, обусловленную бактериями родов *Aeromonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter* и *Plesiomonas*, [45] и бактериями, относящимися к 9 родам - *Aeromonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* и *Streptococcus* [57]. В Болгарии в прудовых хозяйствах у карпов была зарегистрирована БГС, вызванная психрофильными штаммами аэромонад и псевдомонад [302]. Микробиоценоз воды оказывает сильное влияние на формирование микробиоценоза рыбы. Вода Волго-Каспийского региона сильно подвержена антропогенному воздействию и при проведении бактериологических исследований промысловых рыб -

белорыбицы, судака, сазана, карпа, белуги, осетра и севрюги были выделены микроорганизмы 30 видов, относящихся к 13 родам: *Acinetobacter*, *Actinobacillus*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* [4]. На Солзенском лососевом рыбозаводе Архангельской области от погибающих рыб выделяли *Acinetobacter sp.*, *Moraxella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Proteus sp.*, *Aeromonas sp.* Преобладающими были *Acinetobacter* и *Proteus*, в связи с чем автор предложила включить эти бактерии в число индикаторных для этого завода [13]. При язвенном синдроме у карпов в рыбоводных хозяйствах Подмосковья были выделены ассоциации микроорганизмов из родов *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Plesiomonas*, *Flavobacter*, *Enterobacter*. При этом клинические проявления выражались в отсутствии слизи, ерошении чешуи, экзофтальмии, петехиях на брюшке и выпячивании ануса [83]. Прослежена взаимосвязь микрофлоры рыбы с микрофлорой воды и корма в УЗВ и садках на морской воде [58, 74, 298]. От больных производителей кеты и горбуши из рек юго-восточного побережья Сахалина были высеяны бактерии родов *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Xanthomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus* и фикомицеты рода *Saprolegnia* [131]. От молоди южного паралихта, выращиваемого в коммерческих морских садках, были выделены *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Moraxella* и *Pseudomonas* [298]. При бактериологическом исследовании внутренних органов сеголеток бестера были выделены бактерии родов *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Vibrio* и сем. *Enterobacteriaceae* [127], у 25 экз. угря из Приморской бухты Калининградского залива из разных органов было выделено 149 условно-патогенных бактерий, относящихся к сем. *Enterobacteriaceae*, родам *Pseudomonas*, *Aeromonas* и *Alcaligenes* [1]. При проведении эпизоотологического мониторинга на восточном побережье оз. Байкал из организма 82 экз. рыб были выделены *E.coli*, *St. aureus*, *Enterobacter* и *Proteus*, патогенные для рыб [123]. От заводской молоди пресноводного азиатского окуня (*Lates calcarifer*) в Малайзии, были выделены и идентифицированы *Aeromonas spp.*, *Escherichia coli*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.*, и *Vibrio spp.* [309]. В Саудовской Аравии



при изучении микробиоценоза клариевого сома (*Clarias gariepinus*) с жабр и из кишечника было выделено и идентифицировано 11 видов бактерий из 8 родов: *A. hydrophila*, *Shewanella putrefaciens*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus sp.*, *Corynebacterium urealyticum* и *Vibrio vulnificus* [194]. У чавычи (*Chinook salmon*), вернувшейся на нерест в два притока озера Мичиган, описаны бактериальные инфекции, при которых в почках были обнаружены *Renibacterium*, *Aeromonas*, *Carnobacterium*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Hafnia*, *Salmonella*, *Shewanella* и *Morganella* [257], а от радужной форели в штате Айдахо (США) выделили вирулентные штаммы *Flavobacterium columnare* [221].

При проведении бактериологических исследований промысловых видов рыб из естественных водоёмов Калининградской области было выявлено присутствие потенциально опасных бактерий во внутренних органах рыб, что было расценено как бессимптомное хроническое течение бактериальной инфекции, способное при возникновении стрессовой ситуации дать вспышку бактериального заболевания [2, 128].

Относительно эпидемиологического значения различных представителей сем. *Enterobacteriaceae*, в том числе вызывающих заболевания и у рыб, информации более, чем достаточно. Данные об этиологической роли в патологии человека аэромонад уже приведены в обзоре литературы по этой группе микроорганизмов. А на значимости некоторых возбудителей БГС рыб с точки зрения эпидемиологии хотелось бы остановиться подробнее.

***Acinetobacter*** - род аэробных коккобактерий, не ферментирующих глюкозу, и относящиеся к группе неферментирующих грамотрицательных бактерий. Они широко распространены в природе, могут обнаруживаться в воде, почве, сточных водах, больничной среде. Могут быть возбудителями внутрибольничной пневмонии, инфекций мочевого тракта, раневых инфекций, септицемий [95].

***Alcaligenes*** - грамотрицательные палочки, не ферментирующие глюкозу, обычно обнаруживающиеся в воде или почве. Могут вызвать инфекции мочевого тракта, пневмонию, септицемию, поражения желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [48].

*Edwardsiella tarda* - грамотрицательные палочки, по-видимому, представители нормофлоры ЖКТ холоднокровных животных. У человека могут вызывать заболевания похожие на сальмонеллёз, гастроэнтерит, септицемию, остеомиелит, менингит, инфекцию мочевыводящих путей, абсцессы [48].

*Enterococcus* - род грамположительных овальных бактерий, обитатели кишечника различных позвоночных. Могут вызывать поражения мочеполовой системы, эндокардит, бактериемию, менингит, раневые инфекции [95, 48].

*Moraxella* - род аэробных грамотрицательных кокков или коккобактерий. Входят в состав нормофлоры кожи и слизистых оболочек человека и некоторых животных. Могут вызывать бронхолёгочные инфекции, конъюнктивит, бактериемию, перикардит, эндокардит, менингит [245].

*Morganella* - вид грамотрицательных палочек сем. *Enterobacteriaceae*, может вызывать инфекции мочеполового тракта, ран, бактериемию, менингит, пищевые токсикоинфекции [95].

*Plesiomonas* - вид аэробных грамотрицательных бактерий, обычно обитающих в пресной или солоноватой воде, в ЖКТ многих теплокровных и холоднокровных животных. Могут вызывать диарею, раневые инфекции, гастроэнтерит [48].

*Pseudomonas* - род аэробных, грамотрицательных палочек, не ферментирующих глюкозу. Широко распространены в природе, могут инфицировать раны, вызывать гангренозную пневмонию, эмпиему, наружный отит, инфекции глаз, септицемию, эндокардит, менингит, поражения мочевого тракта и ЖКТ [48, 204].

*Shewanella* - род грамотрицательных палочек, не ферментирующих глюкозу, могут вызывать флегмону, абсцессы, инфекции глаз, средний отит, остеомиелит, септицемию [210].

Из всего вышеуказанного становится очевидным, насколько важным является соблюдение техники безопасности и личной гигиены работникам при работе на рыбоводных объектах, в профилактических целях необходимо носить

защитную одежду, дезинфицировать все царапины, порезы и ранки, тщательно мыть руки в дезинфицирующих растворах.

Микробиоценоз рыб во многом зависит от микробиоценоза окружающей среды - воды, от уровня её загрязнённости органическими веществами, от степени её агрессивности, качества комбикормов и их бактериальной загрязнённости, от иммуно-физиологического статуса самой рыбы [24, 208, 110, 96, 29, 34, 36, 62, 84, 267, 224, 21, 22, 23]. При воздействии любых факторов, отрицательно влияющих на организм рыбы, создаются условия для развития БГС - полиэтиологического заболевания, вызываемого комплексом микроорганизмов, относящихся к различным таксонам. При первичном посеве материала от рыб иногда выделяется до 9-10 различных представителей микробиоценоза, определить этиологическую значимость каждого из них бывает довольно трудно. А самое главное чувствительность к антибактериальным препаратам у них бывает очень различной. Применяя препараты против одних микроорганизмов, способствуют росту других и можно спровоцировать развитие суперинфекции [160, 20, 37, 49, 107, 213, 217]. Так же, как и аэромоноз, БГС чаще всего возникает при повышенных плотностях посадки, нарушении технологических процессов, использовании некачественных кормов, несоблюдении санитарно-гигиенического режима, что влияет на условия содержания рыбы, снижает её иммуно-физиологический статус [56, 277, 254]. Для того, чтобы избежать развития подобной ситуации, оптимальным является повышение устойчивости рыбы к неблагоприятным факторам окружающей среды, усиление её иммунитета. Для этого в настоящее время и у нас в стране, и за рубежом широко используются вакцины и пробиотические препараты [198, 199, 201, 230, 231, 232, 249, 255, 299]. В качестве пробиотических препаратов используют различные микроорганизмы, обладающие полезными свойствами. В медицинской практике давно и успешно использовался колибактерин на основе антагонистически активной кишечной палочки *E.coli* M 17, лактобактерин на основе молочнокислых бактерий, Наринэ на основе ацидофильной палочки, бифидумбактерин. Не меньшее количество пробиотических препаратов нашли своё применение в ветеринарии.

В рыбоводстве первое сообщение о применении штамма *Azomonas agilis* 24, обладающего антагонистической активностью против возбудителей аэромоноза карпа, в отечественной литературе появилось в 1986 году [46a]. Об использовании азотфиксирующих бактерий для профилактики аэромоноза сообщили белорусские исследователи [109, 111]. В 1994 г. Т.А. Карасёва сообщила об использовании сухой культуры ацидофильной палочки для профилактики и лечения стрептококкоза и папилломатоза молоди сёмги и радужной форели [53a]. *Streptococcus faecium* M оказал положительное действие на микрофлору кишечника сеголетков карпа, в результате чего значительно ускорился темп его роста. О положительной роли молочнокислых микроорганизмов при выращивании форели, клариевого сома и персидского осетра сообщают отечественные и зарубежные исследователи [82, 248, 194, 203]. Кроме этих микроорганизмов, в качестве пробиотических препаратов были предложены живые дрожжи [276], пробиотические кормовые добавки NUPRO<sup>R</sup> и BIO-MOS<sup>R</sup> [28]. Шире всего используются пробиотики из группы спорообразующих бактерий [181, 30, 34, 60, 116, 24, 63, 269, 45, 18, 222, 256, 311, 214, 36, 262, 252].

В результате применения пробиотических препаратов все авторы отмечают положительное влияние на активность пищеварительных ферментов и усвоение комбикорма, улучшение иммуно-физиологического статуса рыбы, стабилизацию и восстановление желудочно-кишечной микрофлоры, ускорение темпа роста. Однако некоторые исследователи не отметили положительного влияния пробиотика СУБ-ПРО при выращивании молоди кеты на лососевом рыбоводном заводе на Камчатке [120], что по мнению авторов связано с низкой температурой воды на лососевых заводах. В результате проведённых экспериментов был сделан вывод, что на рыбоводных заводах при температуре воды 3-8<sup>0</sup>С этот препарат применять не целесообразно.

Одним из методов стимулирования иммуно-физиологического статуса и профилактики инфекционных заболеваний рыб является кормление артемии (*Artemia salina*) пробиотическими препаратами, а затем кормление ею личинок

рыб [136, 215]. Не меньшее значение в повышении иммуно-физиологического статуса рыб имеют комбикорма [224], в связи с чем в качестве добавок использовали глюкозаны, усиливающие неспецифические иммунные факторы лизоцим и комплементарную активность [79], хитоолигосахариды, благотворно влияющие на рост кишечных бактерий, ингибирующих патогенную микрофлору [209], аскорбилполифосфат, усиливающий темп роста и эффективность питания [252], глутамин, усиливающий рост и некоторые компоненты врождённого иммунитета [235] и другие иммуностимуляторы, что по мнению автора позволит получать здоровую рыбу в «здоровой» окружающей среде, не загрязнённой антибиотиками [32].

### 3. ВЫБОР НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ихтиопатологии большое внимание уделяется изучению бактериальных болезней рыб. Это прежде всего такие, как фурункулёз, вибриоз, йерсиниоз, бактериальная почечная болезнь, эритродерматит карпа, миксобактериозы, которые представляют существенную угрозу рыбоводству. А на такие, как аэромоназ, псевдомоназ и бактериальная геморрагическая септицемия, которые причиняют не меньше неприятностей, обращают меньше внимания. В то же время многие рыбоводные хозяйства находились на карантине по «краснухе», аэромоназу по несколько десятков лет, без проведения настоящих исследований. Не проводилась дифференциальная идентификация аэромонад, не определялись их вирулентность и эпизоотическая значимость различных видов, не учитывали, что аэромонады являются обычными представителями водной нормофлоры, принимающими активное участие в процессах самоочищения водоёмов. Сам факт выделения аэромонад уже давал повод для постановки вопроса о наложении карантина на хозяйство. Доходило дело до абсурда, когда не разобравшись в ситуации, после выделения из воды *Aeromonas hydrophila* на лососевый завод был наложен карантин по фурункулёзу. А на выделяющуюся при бактериологических обследованиях сопутствующую микрофлору вообще не обращали никакого внимания, хотя она приобретает всё большее и большее значение. В рыбоводстве произошло то же самое, что в своё время случилось в медицине, когда увлечшись обилием антибиотических препаратов, врачи забыли завет классической медицины: «Не навреди!» и бесконтрольным их использованием способствовали активизации огромной армии условно-патогенных микроорганизмов, о которых раньше не слышали. Такая же ситуация сложилась в некоторых рыбоводных хозяйствах. Многие рыбоводы в зимний период на кормозаводах или на хлебзаводах заказывали комбикорм с антибактериальными препаратами (чаще всего с фуразолидоном или левомицетином) для того, чтобы после пересадки рыбы из зимовальных прудов провести «профилактическое» кормление рыбы.

Иногда докармливали до того, что у рыбы становились желтыми кости. Но это никак не улучшало ситуацию, а только ухудшало её. Учитывая то, что при конъюгации одни бактерии могут передавать R-фактор множественной лекарственной резистентности другим, то, с одной стороны, может создаться ситуация, что в случае необходимости рыбу будет нечем лечить, а с другой, резистентность могут приобрести бактерии, имеющие эпидемиологическое значение, т.е. становиться опасными для человека. С этой точки зрения диктовалась необходимость тщательного изучения сопутствующей микрофлоры, выделяющейся из воды и от рыбы при проведении бактериологических обследований рыбоводных хозяйств. Это были и неферментирующие щелочеобразователи - моракселлы, ацинетобактеры, различные представители семейства *Enterobacteriaceae*, которые официально не признаны возбудителями бактериальных болезней рыб. Сюда же относились и аэромонады, по поводу которых не было однозначного мнения как о возбудителях болезни. Вопросов было много, а ответов мало. Со всем этим нужно было разбираться, решить вопрос об этиологической роли аэромонад, о диагностике сопутствующей микрофлоры, о влиянии бактериальной обсеменённости комбикормов на микробиоценоз воды и рыбы и отработать методы борьбы с бактериальными болезнями рыб.

#### 4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использованы материалы исследований, проведённых в течение 1980-2014 гг. Основная часть работ осуществлена в лаборатории ихтиопатологии Всесоюзного НИИ пресноводного рыбного хозяйства, затем Всероссийского НИИ пресноводного рыбного хозяйства, затем ФГУП «ВНИИПРХ», в настоящее время - Филиале по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»). Гистологическая обработка гонад вакцинированных и контрольных карпов с тепловодного садкового хозяйства Рефтинское проводилось в том же институте в секторе новых объектов рыбоводства и акклиматизации д.б.н. В.А. Илясовой и дипломницей Дмитровского филиала Астраханского государственного технологического университета Е.Ф. Трямкиной. Биохимические исследования рыбы, получение электрофореграмм штаммов аэромонад и биохимическую наработку вакцины ВЮС-2 проводили в Институте биологии Карельского Научного Центра РАН в г. Петрозаводск к.б.н. Л.П. Смирнов с сотрудниками, сравнительное изучение вирулентности аэромонад, выделенных от пиявок и рыб, на белых мышах проводилось в Государственном Научном Центре Прикладной микробиологии в Оболенске и Московском НИИ Медицинской Экологии в Москве Т.И. Хомяковой.

За указанный период было обследовано 1077 рыбоводных заводов и хозяйств различных типов в РСФСР, Белоруссии, Молдавии, Украине, Армении, Латвии, Узбекистане, Киргизии, Казахстане, Эстонии и Дагестане.

Обследование хозяйств начинали со сбора эпизоотического анамнеза, предварительной оценки эпизоотической ситуации, затем проводили контрольный отлов рыбы сетью, клинический осмотр всего улова и отбор рыбы для бактериологического исследования.

Всего было исследовано 11 235 рыб различных видов: карп - 8656, лососевые - 1162, осетровые - 781, толстолобик - 253, сом - 98, форель - 122, карась - 50, белый амур - 27, плотва - 14, сазан - 30, ротан - 10, треска - 7, линь - 15, лещ - 10.



Так как бактериальные заболевания септические (кроме эритродерматита карпа), поэтому бактериологическому исследованию подвергали прежде всего паренхиматозные органы (печень, почку, селезенку), экссудат, содержимое кожных пузырей. При массовых исследованиях, как показала наша практика, можно ограничиться посевом печени и почки. Отбор проб и посев проводили непосредственно в хозяйстве. Для бактериологического исследования брали только живых больных рыб в количестве 5-6 экземпляров. Рыбу стерильно вскрывали, патологический материал засеивали в зависимости от эпизоотических данных на чашки Петри с плотными питательными дифференциально-диагностическими средами: **мясо-пептонный агар** или **эритритагар** для определения общего микробного числа - ОМЧ, **Эндо** - для выделения энтеробактерий, в том числе бактерий группы кишечной палочки - БГКП, аэромонад, неферментирующих щелочеобразователей - моракселл и ацинетобактеров, псевдомонад, **Риппея-Кабелли** - для выделения аэромонад, **Сабуро** - для выделения дрожжеподобных и плесневых грибов, **энтерококкагар** - для выделения энтерококков, **Анакера-Ордала** - для выделения миксобактерий.

Кусочки паренхиматозных органов стерильно отщипывали с помощью пинцета с изогнутыми браншами (рис. 2) и тщательно растирали их по поверхности среды. Посевы инкубировали в термостате при температуре 25-26°C в течение 48 часов. При отсутствии роста посевы выдерживали до 7 дней при ежедневном просмотре. При посеве на первичные дифференциально-диагностические среды колонии аэромонад имели следующие признаки: на среде Риппея-Кабелли - оранжево-желтые, на среде Эндо - бледно-розовые. Колонии моракселл и ацинетобактера на эритритагаре - белые, блестящие, уплощённые, на среде Эндо - белые или бледно-розовые. Колонии цитробактера, энтеробактера и клебсиелл на среде Эндо - бледно-розовые, полупрозрачные, у двух последних - могут быть выраженные капсулы. Колонии протей на МПА и эритритагаре дают характерный феномен «роения», на среде Эндо - бледно-розовые, слегка расплзающиеся. Отобранные колонии пересеивали на первично-

дифференцирующую среду Клигlera и инкубировали при 26<sup>0</sup>С в течение 18-20 часов.

У выросших культур проверяли тест на цитохромоксидазу, каталазу и способность к расщеплению глюкозы в анаэробных и аэробных условиях на среде Хью-Лейфсона (О/Ф тест).

Для определения оксидазной активности в чашку Петри кладут полоску фильтровальной бумаги, смоченную смесью реактивов на цитохромоксидазу, и платиновой петлей или заплавленным тонким концом пастеровской пипетки переносят часть испытуемой культуры на фильтровальную бумагу. В случае положительной реакции бактериальная масса становится синей, розовой или коричневой (в зависимости от используемого реактива).

Можно также при помощи шприца смесь реактивов нанести сбоку на засеянную скошенную поверхность среды Клигlera. Именно этим методом мы пользовались при проведении исследований (рис.1).



Рис.1. Проведение теста на цитохромоксидазу

Для проверки каталазной активности на поверхность чистого обезжиренного стекла наносили каплю 3%-ого раствора перекиси водорода и эмульгировали с небольшим количеством изучаемой культуры. При положительной реакции происходило вспенивание взвеси.

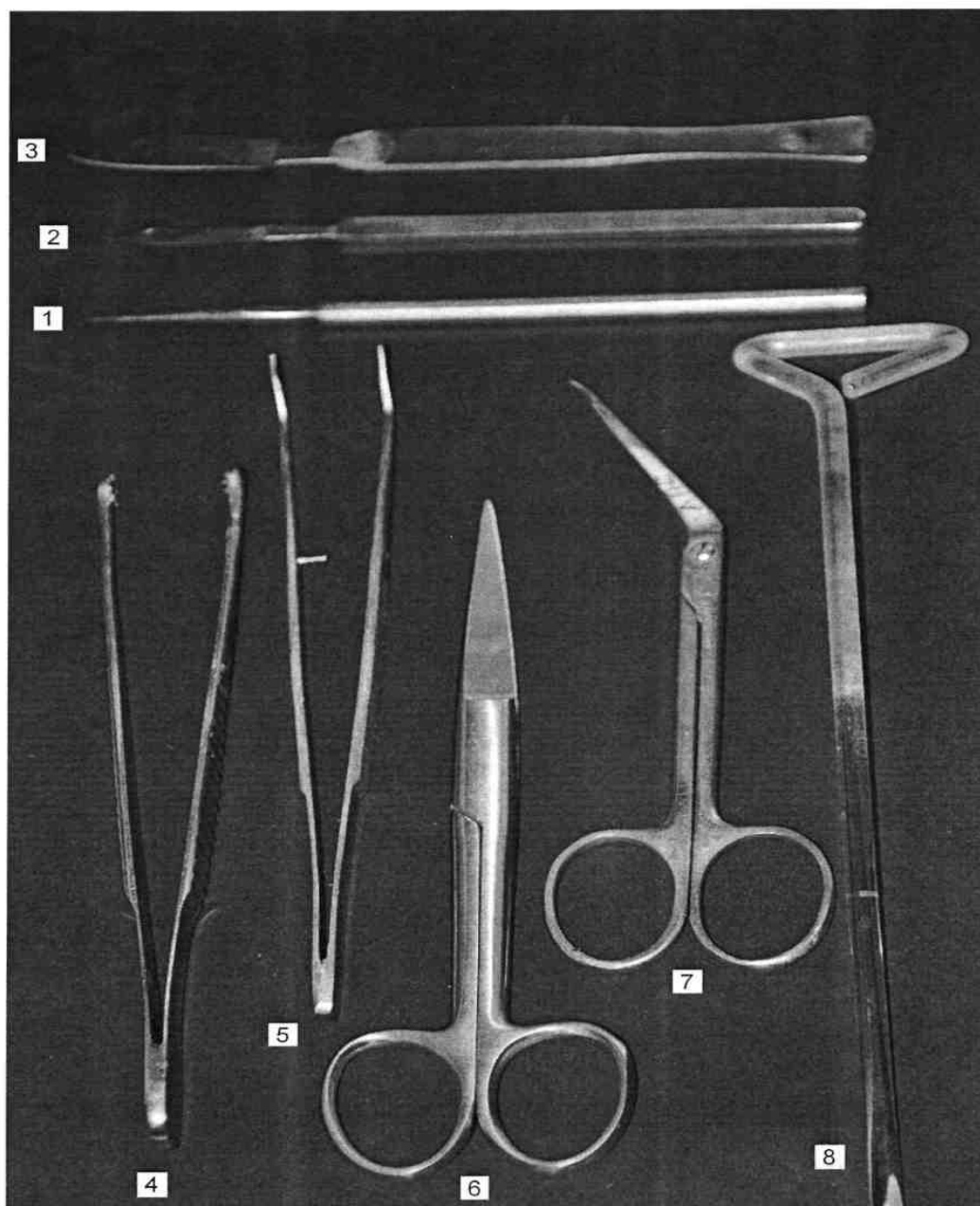
Для определения способности к расщеплению глюкозы в среде Хью-Лейфсона исследуемую культуру засеивали проколом до дна в пробирку с высоким столбиком среды (7-8 см), посеы инкубировали при температуре 25-26°C в течение 24 часов. При таком способе посева не нужна вторая пробирка со средой под вазелиновым маслом. Ферментация начинается в нижних слоях среды, окисление - сверху. Аэромонады расщепляют глюкозу как в аэробных, так и в анаэробных условиях (весь столбик становится соломенно - желтым) с образованием кислоты или кислоты и газа. При росте псевдомонад или неферментирующих щелочеобразователей на поверхности среды первой появляется синяя полоска. В зависимости от характера расщепления глюкозы (О-Ф тест) проводилась первичная дифференциация бактерий до рода (таблица 4) [212].

Для видовой дифференциации аэромонад оксидазоположительные, 0+Ф+ культуры рассеивали на «пестрый ряд» Гисса - салицин, L-арабинозу и эскулин и ежедневно просматривали.

Ферментацию и газообразование глюкозы учитывали на среде Клиглера, подвижность - на среде Хью-Лейфсона (неподвижные культуры растут строго по уколу, слабо подвижные - в виде основного стержня и боковых отростков, подвижные - вызывают помутнение всей среды). Окончательный учет результатов проводили на 4-й день.

При постановке диагноза бактериальной геморрагической септицемии видовую принадлежность выделенных культур определяли по дифференциально-диагностическим таблицам [85].

Вирулентность выделенных аэромонад вначале определяли в биопробе: каждую культуру на 3-х карпах массой 100-200 г из благополучных по аэромонаду водоёмов. Для этого рыбам внутрибрюшинно вводили суточную бульонную культуру аэромонад, выделенных при бактериологическом исследовании, в дозе



Примечание: 1 – шило для обездвиживания рыбы, 2 – глазной скальпель для прокола брюшной стенки, 3 – большой скальпель для снятия чешуи, 4 – пинцет лапчатый для захвата брюшной стенки и внутренних органов, 5 – пинцет стоматологический для отбора и посева проб паренхиматозных органов, 6 – ножницы остроконечные для удаления плавников, 7 – ножницы для вскрытия брюшной полости, 8 – шпатель для растирания экссудата и соскобов.

Рис. 2. Инструменты, используемые при ихтиопатологическом вскрытии рыбы

0,2 мл и наблюдали за ними в течение 10 дней. Контрольным рыбам аналогично вводили тот же объем МПБ.

Таблица 4 -Первично-дифференцирующие признаки для грамотрицательных бактерий (по Cowan, Steel, 1965)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Форма	к	кп	п	п	п	п	п	п	п	п	п	п	п	п
Подвижность	-	-	-	+	+	-	+	-	+	D	-	-	+	-
Аэробный рост	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	* <sup>1</sup>	* <sup>2</sup>	+
Анаэробный рост	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	-	D	-
Оксидаза	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Глюкоза (к-та)	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	D	-	-	+
Углеводы (О/Ф)	O	O	-	O	-	O	O	Ф	Ф	Ф	?	-	-	Ф
<i>Neisseria</i>	+													
<i>Acinetobacter</i>		+												
<i>Moraxella</i>			+											
<i>Chromobacterium lividum</i>				+										
<i>Alcaligenes</i>					+									
<i>Flavobacterium</i>						+								
<i>Pseudomonas</i>							+							
<i>Actinobacillus</i>								+						
<i>Pasteurella</i>								+						
<i>Necromonas</i>								+						
<i>Chromobacterium violaceum</i>									+					
<i>Beneckea</i>									+					
<i>Vibrio</i>									+					
<i>Plesiomonas</i>									+					
<i>Aeromonas</i>									+					
<i>Enterobacteria</i>										+				
<i>Haemophilus</i>											+			
<i>Eikenella</i>												+		
<i>Campylobacter</i>													+	
<i>Streptobacillus</i>														+

Условные обозначения: \*<sup>1</sup>- растёт в воздушной среде + CO<sub>2</sub>; \*<sup>2</sup>- растёт в 5-6% O<sub>2</sub>; к - кокки; п- палочки; "-" - отрицательная реакция; "+" - положительная реакция; D - различные реакции разных видов внутри рода; О/Ф - окисление/ферментация; ? - не исследуется обычными методами

Температура в аквариумах была не ниже 18-20°C. Проба считалась положительной, если после введения бульонной культуры карпы заболевали и гибли в течение 7 суток с признаками аэромоназа и с реизоляцией возбудителя.

Если в первичных посевах был массивный рост ассоциаций микроорганизмов, то биопробу ставили со смешанной культурой, так как при взаимодействии проявляется их вирулентность.

Учитывая, что для постановки биопробы не всегда есть возможность получить рыбу нужного вида и возраста из благополучного хозяйства, при изучении большого количества культур необходимо много рыбы, для определения патогенности аэромонад в качестве косвенного метода использовали метод определения степени активности ДНКазы в соответствии с «Методическими указаниями», утвержденными Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 9Л 2.97 г., № 13-4-2/1116 [77]. Прежде, чем перейти к использованию этого метода, нами параллельно в биопробе и ДНКазной активности было испытано более 2500 культур аэромонад, выделенных из воды и рыбы [150]. Для определения ДНКазной активности дно чашки с ДНК агаром Дифко или Джибко расчерчивали на сектора, в центр которых уколом засеивали изучаемую культуру. После 48-часового инкубирования в термостате на поверхность среды наслаивали 0,1N раствор HCl. При этом вся среда становилась белой, а вокруг колоний аэромонад, вырабатывающих ДНКазу, образовывалась прозрачная зона в результате деполимеризации ДНК. Для определения вирулентности измеряли расстояние от края макроколлонии до края побелевшей среды. В зависимости от размера этой зоны определяли уровень вирулентности изучаемой культуры. Всего на чашку можно засеивать до 16-20 культур (рис.3).

После определения видовой принадлежности выделенного микроорганизма, проверки его вирулентности по степени ДНКазной активности, определяли чувствительность к антибактериальным препаратам с использованием индикаторных дисков или метода серийных разведений при отсутствии дисков и выдавали соответствующие рекомендации хозяйству.

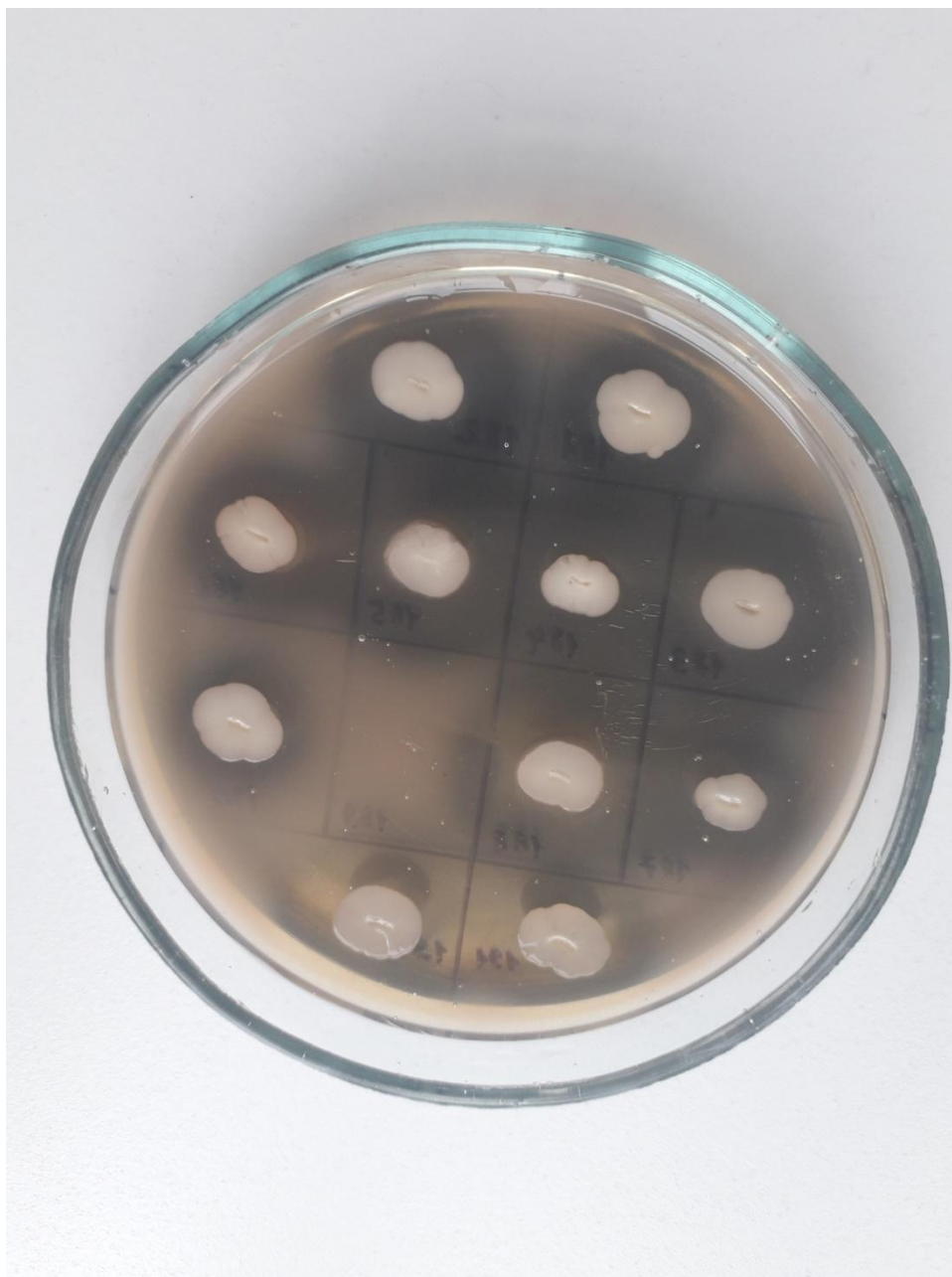


Рис. 3. Изучение вирулентности аэромонад на ДНКазном агаре

Всего с 1980 по 2014 год было выделено и идентифицировано 14 296 культур из рыбы, из них 7993 штамма аэромонад и 6297 штаммов сопутствующей микрофлоры и 27289 - из воды, из них 4437 штаммов аэромонад и 22849 штаммов сопутствующей микрофлоры .

Сначала бактериологическому обследованию подвергали только рыбу, с 1984 г. начали исследовать воду водоёмов, из которых брали рыбу, а с 2002 г. начали смотреть комбикорм, который получала рыба. Всего с 1984 по 2014 год было исследовано 2 727 проб воды, а с 2002 по 2014 г. - 375 проб комбикормов

отечественных и зарубежных производителей. Для посева взвешивали 1 г комбикорма и тщательно растирали его в ступке с 9 мл изотонического раствора хлорида натрия. После 20-минутного отстаивания 0,05 мл надосадочной жидкости засеивали на чашки Петри с эритритагаром, средами Эндо, Сабуро и энтерококкагаром. Посевы в термостате инкубировали при 26<sup>0</sup>С в течение 7 дней при ежедневном просмотре. Число выросших колоний умножали на 20 и узнавали КОЕ/г комбикорма.

Из высоковирулентного штамма *Aeromonas sobria* 77-18, отнесённого к 1-й группе облигатных патогенов, выделенного из белого толстолобика в Молдавии, была получена путём диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия вакцина ВЮС-2, а затем формолвакцина (бактерин), с которыми были проведены экспериментальные испытания, а затем-производственные в рыбоводных хозяйствах различного типа.

При контрольных исследованиях у карпов вакцинированной и контрольной групп визуально была отмечена разница гонад, в связи с чем было принято решение провести сравнительный гистологический анализ.

Материалом для исследования служили различные возрастные группы местного беспородного чешуйчатого карпа, выращенного в Рефтинском тепловодном садковом хозяйстве (РТСХ) в 1992-1993 гг.

Пробы гонад отбирали осенью (22-23.09.93 г.) и летом (7-8.06.94 г.). Всего было отобрано и проанализировано 55 проб гонад, изготовлено 120 гистологических препаратов и 42 микрофотографии половых клеток. Перед отбором проб рыб взвешивали, коэффициент зрелости вычисляли как процентное отношение массы половых желез к общей массе тела рыбы.

Сбор, фиксацию и гистологическую обработку проб проводили по общепринятым методам [102, 50]. В качестве фиксатора использовали 70-80% этиловый спирт, кусочки гонад подвергали уплотнению путём обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации, с экспозицией в каждой концентрации спирта 12 часов. Парафинированные срезы толщиной 7-9 мкм готовили на микротоме МПС-2. Окрашивание срезов проводили гематоксилином по



Генденгайну. Измерения диаметров клеток и ядер выполняли с помощью окуляр-микрометра на микрофоте Д16В. Для измерения выбирали срезы, прошедшие через центральную часть клеток.

При описании стадий зрелости гонад и развития половых клеток у карпа использовали универсальную шкалу [106] с некоторыми дополнениями для других рыб [50, 121, 72, 80]. Полученные результаты подвергали обработке методами вариационной статистики [101]. Среднюю ошибку для  $\bar{x}$  вычисляли по формуле:

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \text{ где}$$

$\sigma$  - среднее квадратическое отклонение,

$n$  - объём выборочной совокупности,

$m$  - средняя ошибка.

Среднее квадратическое отклонение вычисляли по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum/x - \bar{x}/^2}{n-1}}, \text{ где}$$

$\sigma$  - среднее квадратическое отклонение,

$x$  - значение любой варианты,

$\bar{x}$  - средняя арифметическая,

$\sum/x - \bar{x}/^2$  - сумма квадратов отклонений,

$n - 1$  - число степеней свободы.

Определение иммунного статуса рыб является одним из наиболее характерных показателей, позволяющих с наибольшей точностью охарактеризовать эффект проведённой вакцинации. Одними из иммунологических реакций, позволяющих количественно и качественно определить уровень иммунного ответа рыбы на вакцинацию, являются бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК), титр агглютинирующих антител (ТАА) и уровень завершённого фагоцитоза.

Для проведения этих исследований у карпов из каждой обследуемой группы рыб прижизненно из хвостовой артерии стерильным шприцом отбирали пробу крови. Кровь выдерживали 40 минут в термостате при 37<sup>0</sup> С, затем образовавшийся сгусток обводили оттянутым концом пастеровской пипетки и пробы помещали на 24 часа в холодильник для уплотнения сгустка и накопления сыворотки. Далее, с целью дополнительной очистки, её центрифугировали в течение 15 минут при 3000 об/мин. Полученную таким образом сыворотку крови исследуемых рыб использовали для постановки реакции микроагглютинации и определения её бактерицидной активности.

Методика оценки БАСК базируется на способности сыворотки крови рыб ингибировать размножение микроорганизмов за счёт содержащихся в ней гуморальных иммунных факторов.

Для определения БАСК 0,5 мл испытуемой сыворотки смешивали с 9,5 мл стерильного МПА, куда добавляли 0,2 мл одномиллиардной взвеси тест-микроба. В качестве контроля параллельно с каждой серией исследуемых сывороток тест-микроб засеивали в 10 мл бульона, не содержащего сыворотки крови. После тщательного перемешивания из каждой пробирки стерильной пипеткой отбирали половину смеси и определяли её оптическую плотность на колориметре КФК-2 МП. Пробирки с оставшимся в них материалом инкубировали в термостате при 26<sup>0</sup> С в течение 3-х часов. По истечении срока инкубации проводили повторное определение оптической плотности. БАСК вычисляли по формуле:

$$(1 - (ОПо^* - ОПо):(ОПк^* - ОПк)) \times 100\%, \text{ где}$$

ОПо - оптическая плотность испытуемой сыворотки перед началом инкубации;

ОПк - оптическая плотность смеси, не содержащей сыворотку (контроль) перед началом инкубации;

ОПо\* - оптическая плотность смеси испытуемой сыворотки после окончания инкубации;

ОПк\* - оптическая плотность смеси, не содержащей сыворотку (контроль), после завершения инкубации.

Сущность метода микроагглютинации заключается в обнаружении содержащихся в сыворотке крови антител, способных *in vitro* в присутствии электролитов вступать в специфическую реакцию с антигенами, расположенными на поверхности бактериальных клеток, приводя к склеиванию последних и формированию характерного осадка.

Для постановки реакции использовали 96-тилуночные микропанели, в которых при помощи автоматических микропипеток готовили ряд двукратных разведений тестируемой сыворотки изотоническим раствором хлорида натрия с уровнем рН 7,2 (рис. 4).

В каждую лунку с разведением сыворотки вносили одинаковое количество антигена, представляющего собой взвесь формализированных клеток в изотоническом растворе хлорида натрия, с концентрацией  $1 \times 10^9$  микробных тел в мл. После этого панели выдерживали 24 часа при комнатной температуре.

Количество специфических к данному антигену антител в испытуемой сыворотке, выражали в виде их титра, который учитывали по последней лунке ряда разведения сыворотки, в которой наблюдали специфический рыхлый осадок в виде зонтика (полная агглютинация).

Реакция завершеного фагоцитоза служит для определения способности фагоцитов, содержащихся в периферической крови карпов, *in vitro* инактивировать клетки микроорганизма. В качестве тест-микроба использовали тот же штамм подвижных аэромонад, что и при оценке БАСК.

В пробирку, содержащую 0,4 мл стерильного 2%-го раствора цитрата натрия, добавляли 0,2 мл образца свежевзятой крови от обследуемой рыбы и 0,4 мл одномиллиардной взвеси тест-микроба. Параллельно равное количество бактериальной суспензии добавляли в пробирки, содержащие 0,4 мл цитрата натрия и 0,2 мл изотонического раствора хлорида натрия. Смеси тщательно

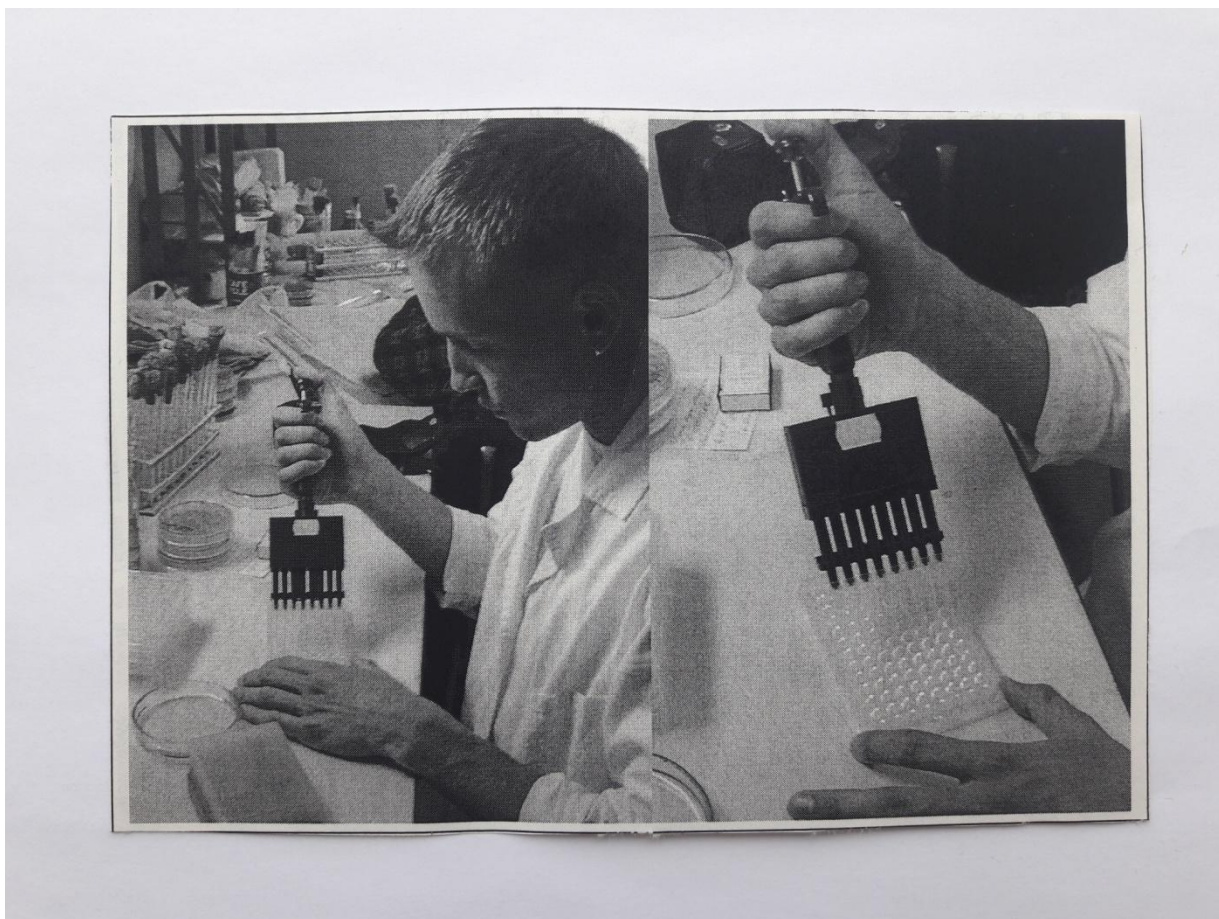


Рис. 4 . Разведение сыворотки с внесением антигена

перемешивали и инкубировали в термостате при  $26^{\circ}\text{C}$  два часа, после чего каждую пробу материала разводили стерильным изотоническим раствором хлорида натрия в соотношении 1: 2000000, делали высев на среду Эндо и тщательно растирали стеклянным шпателем. Посевы инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов, после чего проводили учёт результатов. Количество колоний, выросших в посевах контрольных смесей, демонстрирует нулевой уровень фагоцитоза и служит для более точной оценки начального количества жизнеспособных бактерий в приготовленной суспензии тест-микроба. Активность фагоцитоза (переваривающую способность фагоцитов) учитывали по формуле:

$$(1 - N_o : N_k) \times 100\%,$$

где:  $N_o$  - количество колоний в высеве смеси, содержащей испытуемый образец крови,

$N_k$  - среднеарифметическое количество колоний в посевах контрольной смеси [ 38].

Достоверность различия средних величин оценивали с помощью t-критерия Стьюдента при уровнях значимости 95% и 99%. При обработке статистических материалов использовали компьютерную программу Microsoft EXCEL - 97.

Всего за время проведения работ выполнен следующий объём исследований:

* обследовано рыбоводных хозяйств различного типа -	1077;
* подвергнуто клиническому осмотру разновозрастных рыб различных видов -	110450;
* микробиологический анализ материала от рыб - 22680 проб от 11235 рыб;	
* микробиологический анализ воды -	2727;
* микробиологический анализ комбикормов -	375;
* параллельное исследование вирулентности аэромонад в биопробе и по ДНКазной активности -	2500;
* микробиологическое исследование комбикорма с Субалином -	169;
* проба на приживаемость Субалина в кишечнике карпа -	260;
* всего выделено от рыб и изучено: аэромонад -	7993,
сопутствующей микрофлоры -	6297;
* всего выделено из воды и изучено: аэромонад -	4437,
сопутствующей микрофлоры -	22849;
* приготовлено гистологических препаратов из 55 гонад -	120;
* изучена вирулентность аэромонад на ДНКазаре -	11250;
* определение ТАА -	1304;
* определение интенсивности завершённого фагоцитоза -	222;
* определение БАСК -	212;
* провакцинировано карпов различных возрастных групп вакциной ВЮС-2 -	12442;
* провакцинировано канального сома вакциной ВЮС-2 -	400;

\* провакцинировано карпов различных возрастных групп  
формолвакциной (бактерином) -

5383.

## 5. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 5.1. Эпизоотическая ситуация в рыбоводных хозяйствах

Большинство обследованных хозяйств, согласно ветеринарной информации, были неблагополучны по аэромонозу. Ситуация в некоторых случаях осложнялась наличием производств, сельскохозяйственных или коммунальных стоков в непосредственной близости к водоёмам и загрязняющих их [55, 60, 178, 184, 185, 186]. При большом содержании органических веществ начинали бурно развиваться анаэробные аэромонады, неферментирующие щелочеобразователи - моракселлы и ацинетобактерии, вместе со сточными водами попадают представители семейства *Enterobacteriaceae*, которые могут наносить вред здоровью рыб. В одном из тепловодных хозяйств вместе со сточными водами молокозавода попадало много белковых веществ, которые загнивали и создавали благоприятную среду для размножения протеев, инфицирующих рыбу.

При благоприятных условиях количество микроорганизмов в воде не превышает 3000 КОЕ/мл, когда рыба чувствует себя удовлетворительно и её паренхиматозные органы свободны от бактерий. При нарастании общего микробного числа (ОМЧ) наступает критический момент, когда иммунная система рыбы уже не может противостоять агрессивному воздействию среды, бактерии преодолевают защитные барьеры организма и вызывают его инфицирование. В некоторых хозяйствах ОМЧ в прудах доходило до 38000 КОЕ/мл, в результате чего все паренхиматозные органы находящихся там карпов были контаминированы разнообразной микрофлорой и более ослабленная рыба погибала. В тепловодных хозяйствах, в которых садки были расположены на водоёмах-охладителях ГРЭС, особое загрязнение отмечали позади садковой линии, когда ОМЧ доходило до 68000 КОЕ/мл. В этих случаях особым источником загрязнения служили седименты, накапливающиеся под садками, и размываемые при волнении воды. Следует отметить, что в результате попадания в воду различных ядовитых соединений дополнительно усиливается агрессивность среды, в связи с чем бактериальные клетки вынуждены бороться за своё

выживание и активизировать все свои ферментные системы, в результате чего повышается и их вирулентность со всеми вытекающими отсюда последствиями. Особенно ситуация осложнялась в годы, когда из-за недостаточности финансирования рыбхозы недополучали комбикорма, рыба была в неудовлетворительном состоянии, её иммуно-физиологический статус находился на самом низком уровне и повсеместно регистрировали заболевания.

Очень многое зависит от культуры рыбоводства. При нарушении технологических процессов, при несоблюдении санитарно-гигиенических требований создаются условия для развития заболевания. Особенно ярко это проявляется в случаях, когда рыбоводный инвентарь без дезинфекции используется в разных садках, в том числе и тех, где находится больная рыба, особенно когда погибшая рыба своевременно не удаляется.

Учитывая то обстоятельство, что аэромонады являются обычными обитателями воды и различаются по своей вирулентности, необходимо было выяснить, как часто встречаются в воде прудов и в здоровой рыбе вирулентные формы аэромонад. Параллельно изучали материал, полученный при контрольных исследованиях в карантинированных по поводу «краснухи» хозяйствах южной зоны нашей страны.

В качестве контроля в 1984 г. были взяты пруды 19, 33, 46 и 48 лаборатории товарно-промышленного рыбоводства ВНИИПРХ, различающиеся по плотности посадки, возрасту рыбы, режиму кормления, рецептуре кормов и характеру водообмена (табл. 5). Пруд 33 являлся контрольным для пруда 19, т.к. он был непроточный, с одноразовым кормлением и плотность посадки приближалась к нормативной для 1-й зоны рыбоводства (норма 2.4 тыс. шт./га для трёхлетков).

Пруды 46 и 48 различались только по составу кормов, рН воды в прудах была 7,7 - 8,2, температура воды колебалась в пределах 19 - 23<sup>0</sup>С, кислород - 1,5 - 9,8 мг/л.



Таблица 5 - Характеристика обследуемых прудов лаборатории ТПР

№ пруда	Площадь, га	Вид и возраст рыбы	Посажено		Выловлено		Рецептура кормов	Кормление, раз в сутки	Водообмен
			Тыс.шт./га	Сред. масса, г	Тыс.шт./га	Сред. масса, г			
19	0.64	Карп 3	8.16	246	7.72	747	1/2РГМ-813 1/2 К111	12-24	8-10 сут.
33	0.18	Карп 3	3.55	264	3.14	740	К-111-1/3 РГМ-813	1	Непроточный
46	0.44	Карп 2	25.0	37	24.65	232	2/3 К-111 1/2 РГМ-813	6	8-10 сут.
48	0.45	Карп 2	25.0	37	22.54	253	1/2 К-111	6	8-10 сут.

В 1984 г. при проведении прямых посевов воды и паренхиматозных органов рыб из контрольных прудов аэромонады в воде обнаружены во всех случаях, тогда как в рыбе - нет. В рыбе из 19 и 48 прудов не было ни одной положительной находки. Из 46-го в двух и из 33-го в семи из 16 проб были выявлены патогенные аэромонады.

При исследовании воды и рыбы в карантинированных хозяйствах южной зоны патогенные аэромонады выделяли как из воды, так и из рыбы, за исключением двух прудов в прудовом хозяйстве Киргизии, отличающемся высокой культурой рыбоводства и хорошим состоянием рыбы. При исследовании 10 экз. карпа из каждого пруда этого хозяйства результаты бактериологического исследования были отрицательные.

В 1985 году эта работа была продолжена, был расширен круг обследуемых хозяйств в южной зоне, а в качестве контроля были взяты пруды 18, 19 и 33 лаборатории ТПР (таблица 6). Из этих прудов пробы воды и рыбу брали ежедекадно при контрольных обловах.

Температура воды и содержание аммонийного азота колебались в довольно широких пределах, однако величина рН, близкая к оптимальным показателям, нейтрализовала агрессивное действие аммиака. О высоком содержании органических веществ в воде свидетельствует бихроматная окисляемость: от 8,64 до 48,96 мг О/л в пруду 18, от 23,04 до 111,36 мг О/л в пруду 19 и от 28,8 до 64,64 мг О/л в пруду 33, в то время как в водоисточнике она была от 7,2 до 34,56 мг О/л. С мая по сентябрь воду в прудах известковали 17 раз за вегетационный период. По воде вносили от 126 до 189, от 128 до 192 и от 15 до 36 кг/пруд в 18, 19 и 33 пруды соответственно. При посеве проб из паренхиматозных органов рыбы из прудов лаборатории ТПР аэромонады были выделены только при первом обследовании, проведенном вскоре после пересадки рыбы из зимовальных прудов в нагульные. Все последующие исследования дали отрицательный результат. В то же время исследования воды из этих прудов показали наличие аэромонад во всех пробах, причём количество их, так же, как и ОМЧ, колебалось в широких пределах (рис. 5).

Таблица 6 - Характеристика контрольных прудов лаборатории ТПР

№№ прудов	Площадь, га	Вид рыбы	Посажено		Выловлено		Частота кормления, раз	Водообмен	Аэрация
			Тыс. шт./га	Средняя масса, г	Тыс.шт./га	Средняя масса, г			
18	0.63	К	9.0	236	8.43	671	6	+	-
		Г	2.0	111	1.19	387			
19	0.64	К	9.0	232	8.49	570	6-10	-	+
		Г	2.0	112	1.0	292			
33	0.18	К	4.0	202	3.64	620	1	-	-
		Г	1.1	110	0.10	194			

**Примечание:** К-карп, Г-гибрид белого и пёстрого толстолобиков

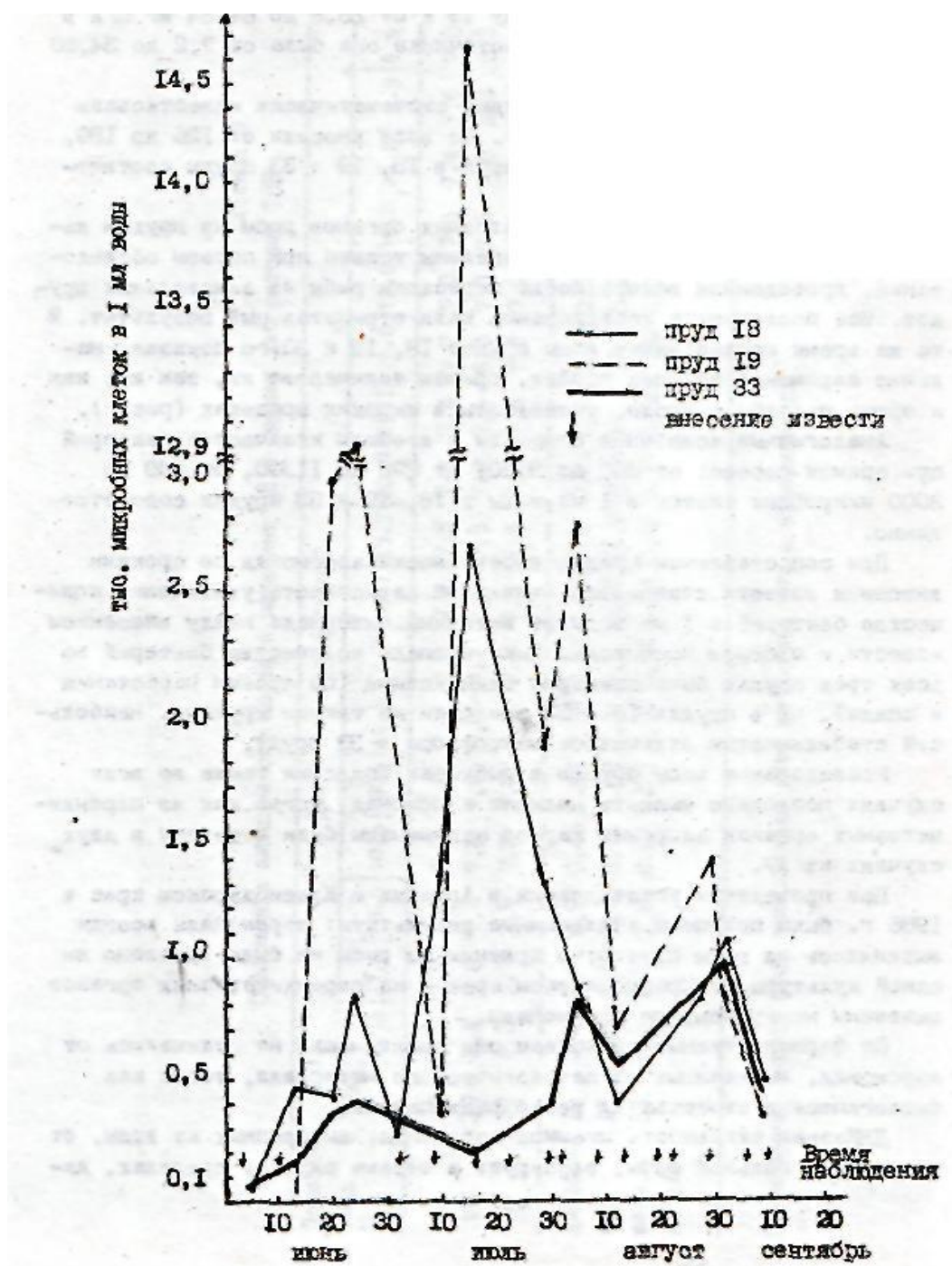


Рис. 5. Динамика сезонного изменения содержания аэромонад в 1 мл воды в прудах лаборатории ТПР

Аналогичные колебания отмечали и в общем количестве бактерий при прямом посеве: от 200 до 3600, от 270 до 11300, от 540 до 2000 КОЕ/мл воды в 18, 19 и 33 прудах соответственно.

При сопоставлении кривых высеваемости аэромонад со сроками внесения извести становится очевидной зависимость увеличения количества бактерий в 1 мл воды от величины интервала между внесением извести и отбором проб воды. Пики и спады количества бактерий во всех трёх прудах были примерно одинаковыми (по срокам нарастания и спада), но в прудах 18 и 33 они были не такими крутыми. Наибольшей стабильностью отличалась микрофлора в 33 пруду [158].

Исследование воды прудов в рыбхозах Молдавии также во всех случаях позволило выявить наличие аэромонад, тогда как из паренхиматозных органов здоровых карпов аэромонады были выделены в двух случаях из 17.

При проведении исследований в Армении и Краснодарском крае в 1986 г. были получены аналогичные результаты: аэромонады всегда выделялись из воды прудов. В Армении из рыбы не было выделено ни одной культуры, в Краснодарском крае - из паренхиматозных органов были выделены не-вирулентные аэромонады. По ферментативным свойствам они практически не отличались от аэромонад, выделенных из патологического материала, тогда как биологические свойства их резко различались. ДНКазная активность штаммов аэромонад, выделенных из воды, от здоровой и больной рыбы, варьирует в весьма широких пределах, образуя зону деполимеризации ДНК от 0 до 7 мм. При этом культуры, дающие зону деполимеризации 5-7 мм, часто обнаруживаются в воде прудов хозяйств благополучных по аэромонадозу, в том числе и в прудах лаборатории ТПР. Параллельное изучение патогенности путём постановки биопробы на карпах в условиях аквариальной позволило выявить некоторые особенности. Было установлено, что культуры, выделенные из воды и от здоровой рыбы, дающие большую зону деполимеризации ДНК, при введении карпам вызывали слабо выраженные клинические признаки, которые быстро проходили. Аналогичные культуры, выделенные от больных рыб, при внутримышечном

введении вызывали обширные поражения мышечной ткани, сепсис и часто гибель опытной рыбы. Проведённые исследования показали, что патогенные аэромонады практически всегда обнаруживаются в воде прудов, а из паренхиматозных органов здоровой рыбы при её удовлетворительном иммунофизиологическом статусе и высокой культуре рыбоводства - не выделяются. Это явление может быть использовано при оценке эпизоотической ситуации в хозяйстве. Обнаружение аэромонад при контрольных обловах в паренхиматозных органах здоровой рыбы может свидетельствовать о потенциальной угрозе возникновения аэромоноза при усилении неблагоприятных факторов. Для ликвидации такой угрозы должны быть приняты соответствующие меры: либо известкование, либо устранение фактора, способствующего возникновению ситуации. Своевременное известкование резко снижало количество аэромонад в воде и не давало вспыхнуть заболеванию. Для принятия своевременных профилактических мер необходимо проводить систематические бактериологические исследования воды (как в санитарной бактериологии), позволяющие следить за динамикой аэромонад в эпизоотически опасные периоды. В целом проведение противоэпизоотических мероприятий рыбоводными хозяйствами Росрыбхоза способствует стабилизации ветеринарно-санитарной и эпизоотической обстановки в естественных водоёмах и рыбоводных хозяйствах Российской Федерации, позволяет избегать массовых эпизоотий [88, 89].

В этом плане показательными могут служить исследования эпизоотической ситуации на Можайском производственно-экспериментальном коллекционном осетровом рыбоводном заводе. С 1999 г. на Можайском ПЭКОРЗ начали отработку технологического процесса по выращиванию осетровых рыб. Рыбу завозили из ВВЦ, Конаковского осетрового завода, из естественного водоёма (р. Ока).

С июня 1999 г. отмечали эпизоотическое неблагополучие выращиваемой на заводе рыбы, у которой при клиническом осмотре наблюдали язвы различной формы и локализации, отёчные ослизнённые жабры, локальные геморрагии на

брюшной поверхности, разрушение жучек. Отмечали патолого-анатомические изменения почти у всех рыб. У единичных экземпляров годовиков ленского осетра и производителей окской стерляди было воспаление кишечника, заполненного кровянистой слизью, без следов корма. У основной массы рыб кишечник был в пределах относительной нормы.

С июня 1999 г. по март 2000 г. провели бактериологические исследования с целью контроля за количественным и качественным составом микрофлоры воды на заводе и влиянием её на рыбу. Были проведены пятикратные бактериологические исследования 30 проб воды (артскважины, вода после биофильтров, вток и выток из бассейнов, вода после механической обработки) и патматериала от 43 рыб разных возрастов и видов (окская стерлядь - ремонт и производители, годовики и молодь сибирского осетра, молодь русского осетра). Посевы воды производили на плотные питательные среды: эритритагар, Эндо, Анакера-Ордала. На эти же среды засеивали патматериал от рыб. Исследованию подвергали соскобы с поверхности жабр, паренхиматозные органы - печень, почки, и экссудат, если обнаруживали.

Уже первые исследования воды и рыбы показали, что количественный и качественный состав микрофлоры водной среды был неблагоприятным для выращивания осетровых рыб. На фоне высокого ОМЧ артскважины №2 после прохождения воды через биофильтр содержание бактерий снижалось до 1880 - 2420 КОЕ/мл. Обращало на себя внимание доминирование БГКП, протей, аэромонад и миксобактерий. После биофильтра, несмотря на снижение ОМЧ, количество миксобактерий продолжало оставаться высоким (3200 КОЕ/мл).

Высокое содержание микроорганизмов в воде приводило к повышенной контаминации внутренних органов рыбы БГКП, капсулообразующими псевдомонадами, обсеменённости жабр миксобактериями, которые особенно хорошо развивались в условиях повышенного загрязнения органическими веществами.

Были проведены работы по подбору оптимальных методов и средств для снижения количества бактериальной флоры в водной среде в условиях замкнутого

цикла. С этой целью провели бактериологические исследования воды после применения раствора хлорной извести в системе и после 15-ти часовой работы бактерицидных ламп на водоподаче и определили толерантность выделенных на заводе из воды и рыбы бактериальных культур *Acinetobacter* (2), *Aeromonas sobria* (2), *A. hydrophila* (2), *A. caviae* (1), *A.sp.3* (5) к NaCl, чтобы выяснить целесообразность применения солевых растворов для снижения уровня бактериальной обсеменённости воды в системе.

Через месяц после обработки водонапорной башни и трубопровода раствором хлорной извести в декабре 1999 г. бактериологические исследования воды и рыбы показали, что полученные результаты в значительной степени отличались от предыдущих. ОМЧ на входе в бассейн №1 6-го цикла составляло 780 КОЕ/мл, на вытоке - 1700 КОЕ/мл, на вытоке из 6-го цикла (после механической очистки) - 1720 КОЕ/мл. Однако, миксобактерии уничтожить не удалось, они обнаруживались в количестве от 60 до 360 КОЕ/мл. При этом из воды выделялись ещё и *A. caviae*, характерные для загрязнения воды стоками. О неблагополучии эпизоотической ситуации на заводе также свидетельствовали *A. sobria*, *A. hydrophila*, *A.sp.3* и *Acinetobacter*. Аналогичные бактерии выделяли с поверхности жабр и из внутренних органов рыб, в посевах которых одновременно с ними встречались БГКП и *Citrobacter*.

В конце января 2000 г. после подключения артскважины №2 и введения в эксплуатацию бактерицидных ламп было установлено их положительное действие при обработке воды на водоподаче. После 15-ти часовой работы бактерицидных ламп отметили 3-х кратное снижение ОМЧ в воде, что существенно повлияло и на уровень контаминации рыбы. В посевах проб от 5-ти рыб из 7 рост бактериальной флоры не отмечался, от 2-х остальных - единичные колонии и умеренный рост.

Согласно полученным данным использование соли не только не сыграло положительной роли, но у некоторых аэромонад вызвало защитное капсулообразование, обеспечивая их устойчивость к неблагоприятным факторам среды и лекарственным препаратам. Подобная ситуация объясняется либо



несвоевременной и нерегулярной очисткой бассейнов от органических остатков, либо нарушением технологического режима водоподачи, делающим неэффективными обработки этой системы и мешающими нормальным рыбоводным процессам. На примере 7-го цикла отсутствие работы механической очистки привело к росту бактериальной обсеменённости до 19 400 КОЕ/мл, что объяснялось тем, что при постоянно выделяемых продуктах метаболизма в процессе кормления рыб, в воду попадают остатки несъеденного корма и экскременты, частично растворяющиеся в воде и образующие взвешенные и коллоидные вещества, которые в дальнейшем оседают на дно и способствуют размножению микроорганизмов. За весь период обследования завода у рыб постоянно наблюдались разной степени интенсивности некротические поражения почек и жабр [157].

Конечным продуктом белкового обмена у рыб является аммиак, составляющий от всех азотистых (органических) соединений от 60 до 80% и который постоянно выделяется рыбой через жабры и почки в воду. Именно аммиак может являться основным токсическим веществом, влияющим на состояние жабр и почек.

Для улучшения эпизоотической ситуации на Можайском рыбозаводе регулярно проводили бактериологический контроль, результаты которого позволяли проводить мероприятия по снижению уровня бактериальной контаминации воды и поднятию резистентности организма рыбы, а также постоянно следили за содержанием аммиачных соединений в воде в замкнутой рыбоводной системе Можайского ПЭКОРЗ [157].

Практически во всех обследованных хозяйствах при проведении вскрытия у рыб в брюшной полости обнаруживался спаечный процесс, свидетельствующий о перенесённом воспалении. Состояние слизистой кишечника зависело от состава микрофлоры. При наличии большого количества условно-патогенной микрофлоры, в условиях недостаточного кормления и кормов неудовлетворительного качества слизистая часто воспалялась, истончалась и создавались все условия для проникновения бактерий через стенку кишечника в

кровеное русло. Если меры по улучшению ситуации срочно не проводились, то создавались благоприятные условия для развития патологического процесса. В этом плане особую опасность представляет период выхода рыбы из зимовки. Рыба бывает ослаблена, особенно, если зимой отмечались температурные перепады, она вела себя беспокойно, расходуя энергетические ресурсы, ухудшая свой иммуно-физиологический статус. Если при этом её своевременно не поддержать, рыба начинает поедать детрит, в котором содержится, кроме всяких токсичных примесей, масса условно-патогенных бактерий, которые в ослабленном организме рыбы начинают делать своё чёрное дело. Немаловажное значение имеет и возраст рыбы. Раньше считалось, что больше всего подвержены заболеванию «краснухой» - аэромонозом особи с ускоренным темпом роста, чаще заболевали двухлетки, годовики, реже сеголетки, как правило, к концу сезона. Нам пришлось столкнуться с типичной клиникой аэромоноза: асцитом (тело приобретало вид полумесяца), двухсторонним экзофтальмом и кровоизлиянием в глазное яблоко у личинок карпа в РТСХ. От живых отловленных личинок с клиническими проявлениями была выделена чистая культура вирулентных *A.sobria*. К утру вся личинка погибла. Откуда и каким образом эта инфекция появилась в инкубационном цеху, так никто не смог сказать. Скорее всего, виноват был человеческий фактор, какие-то нарушения в технологическом процессе всё же были.

## **5.2. Влияние антропогенного воздействия на микробиоценоз воды и рыбы в рыбохозяйственных водоёмах**

Выращивание рыбы в садках позволяет на порядок увеличить рыбопродуктивность по сравнению с естественными водоёмами, но приводит к ухудшению гидрохимического режима за счёт загрязнения водной среды продуктами метаболизма, остатками корма, что способствует активизации роста численности микрофлоры водоёма. Возрастает роль условно-патогенных бактерий, активность которых повышается с увеличением концентрации органических веществ в окружающей водной среде. Возникновение и распространение заболеваний бактериальной этиологии связано с повышенными температурами, большими плотностями посадок и интенсивным кормлением, накоплением продуктов метаболизма, привнесением с кормом дополнительной бактериальной флоры [6, 17, 25, 26, 73, 144, 176]. Накопление в воде большого количества органических веществ, наличие гниющих остатков живых организмов, растительности, комбикормов и загрязнение водоёмов промышленными стоками, способствует активизации миксобактерий, энтеробактерий (особенно протей, энтеробактера, клебсиелл), анаэробных аэромонад, НФШ, которые пассируясь через организм рыбы, повышают уровень своей ферментативной активности и могут стать причиной значительного отхода рыб. Такие случаи неоднократно регистрировались в прудовых, садковых хозяйствах, естественных водоёмах, на лососевых и осетровых рыбоводных заводах [142, 143, 157, 312].

Особенно четко можно проследить изменения микробиоценоза воды в рыбоводных хозяйствах, расположенных на водоемах-охладителях ГРЭС, так как развитие микрофлоры усиливается повышенной температурой воды. Примером может служить тепловодное садковое хозяйство «Черепетский рыбхоз» Тульской области. Постоянным источником загрязнения является молокозавод. Сбрасываемые коммунальные воды богаты белковыми остатками, которые гниют. Такие условия способствуют развитию гнилостной микрофлоры. Кроме того, органические вещества, попадающие в водоем-охладитель, накапливаясь, создают

благоприятные условия для развития неферментирующих щелочеобразователей - рр. *Acinetobacter*, *Moraxella*, анаэрогенных аэромонад, миксобактерий. Такое изменение микробиоценоза водоёмов имеет не только эпизоотическое значение (развитие патологических процессов у рыб), но и эпидемиологическое, так как эти возбудители могут вызывать заболевания и у человека.

Садковое хозяйство «Черепетский рыбхоз» функционирует с 1968 г., занимается производством товарной рыбы и рыбопосадочного материала. Выращивание рыбы происходит в садках с использованием искусственных гранулированных кормов отечественного и импортного производства. Садковые линии установлены в Черепетском водохранилище в районе сбросного канала Черепетской ГРЭС (р. Черепеть).

С профилактической целью в летнее время при высокой температуре воды с июня по сентябрь вносилась хлорная известь (восемь и более обработок), профилактическое кормление рыб от бактериальных болезней рыб проводили кормами с антибаком и субалином.

Изучение микробиоценоза воды проводили в динамике с мая по октябрь. Пробы воды отбирали из сбросного канала до впадения ручья с молокозавода, из ручья, сбросного канала после впадения ручья и садков разных линий. Из этих же садков отбирали по 5-10 экземпляров рыб для бактериологических и иммунологических исследований.

Общее микробное число воды (ОМЧ) сбросного канала в зависимости от времени было от 220 КОЕ/мл до обильного и микробиоценоз в основном был представлен бактериями группы кишечной палочки, аэромонадами и ацинетобактером (*Ac. baumannii*), *Vac. sp.*, периодически появлялись миксобактерии.

В пробах воды из ручья молокозавода после 100 кратного разведения ОМЧ было от 600 тыс. КОЕ/мл до миллиона и более. Микробиоценоз был представлен БГКП (в т.ч. и с бронзовым блеском), миксобактериями, энтеробактериями (цитробактером, протеем, энтеробактером) и анаэрогенными аэромонадами. Существенную часть микробиоценоза составляли неферментирующие

щелочеобразователи - ацинетобактеры (*Ac. calcoaceticus* и *Ac. baumannii*) и *Moraxella sp.* Все это свидетельствовало об очень высоком содержании органических веществ в воде. В пробах воды из сбросного канала микробиоценоз был практически такой же, но ОМЧ резко снизилось - в десятки раз. В микробиоценозе начинали преобладать аэромонады, БГКП, НФЦ и значительно реже выделялись цитробактер и миксобактерии. ОМЧ в воде садков - от 3 тыс. до 4 тыс. КОЕ/мл.

Уровень контаминации рыбы зависел от степени бактериальной обсемененности воды: отсутствие роста от 20 до 100%, рост единичных колоний - от 10 до 40% и умеренно-обильный рост от 0 до 50%. Микробиоценоз в основном был представлен аэромонадами, БГКП, ацинетобактером и цитробактером.

У выделенных из воды и от рыб аэромонад методом диффузии в агар изучили чувствительность к ципрофлоксацину и левомицетину и вирулентность на чашках с ДНК-агаром (таблицы 7 и 8).

Таблица 7 - Чувствительность аэромонад к ципрофлоксацину и левомицетину (%)

Степень чувствительности, мм	Ципрофлоксацин	Левомицетин
Резистентные	17,5	7,5
Слаборезистентные	62,5	5,0
Чувствительные	18,0	62,5
Высокочувствительные	2,0	25,0

Таблица 8 - Вирулентность аэромонад (зона деполимеризации ДНК, мм)

Степень вирулентности	Аэромонады из воды n=113	Аэромонады из рыбы n=122
Авирулентные (от 0 до 1,0)	7,1	57,1
Слабовирулентные (до 2,5)	14,3	28,6
Вирулентные (3 - 4,5)	39,3	4,8
Высоковирулентные (более 5)	39,3	9,5

Количество резистентных и высоковирулентных штаммов аэромонад возрастало к концу вегетационного сезона.

Особое внимание обращает на себя тот факт, что в воде больше, чем в рыбе вирулентных и высоковирулентных аэромонад, а так же во всех посевах преобладали капсулообразующие микроорганизмы, как аэромонады, так и энтеробактерии и НФЦ, что свидетельствовало о неблагоприятном для них гидрохимическом режиме, немалый вклад в который вносит и ручей, вытекающий с территории молокозавода.

Следует отметить, что после проведения опытно-производственной вакцинации карпов инактивированной формолвакциной против БГС в сентябре 2004 г. у карпов опытных групп в мае 2005 г. уровень контаминации был значительно ниже, чем у контрольных (таблица 9).

Таблица 9 - Уровень контаминации внутренних органов у карпов опытной и контрольной групп

Группа рыб	Уровень контаминации					
	Роста нет		Единичный рост		Умеренный рост	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Контроль	25	62,5	7	17,5	8	20,0
Опыт	30	75,0	10	25,0	0	0

В условиях экологического неблагополучия, при повышенной агрессивности среды, аэромонады, подвергаясь воздействию неблагоприятных факторов, усиливают свою ферментативную активность и параллельно с этим возрастает их вирулентность. Таким образом, с одной стороны всевозможные стресс-факторы снижают резистентность рыбы, угнетая её иммунную систему, способствуя развитию эндогенной инфекции, с другой стороны - вызывают повышение вирулентности аэромонад и провоцируют развитие острого процесса. Значительную роль в ухудшении экологической ситуации в водоёме играют промышленные предприятия, находящиеся вблизи территории рыбоводных хозяйств и своими стоками загрязняющие экосистему водоёма.

В одном из прудов Бисеровского рыбоводного хозяйства в микробиоценозе воды часто выявлялись различные энтеробактерии, в том числе цитробактеры, протеи и БГКП. Долго не могли установить источник их появления. При исследовании воды из небольшого ручейка, впадающего в этот пруд, высеяли 11 представителей, относящихся к различным видам. Когда выяснили истоки этого ручейка, оказалось, что в него попадают стоки госпитального отделения. После административного разбирательства и проведения соответствующих мероприятий, загрязнения прекратились и ситуация нормализовалась.

Всегда следует помнить, что сохранность чистоты окружающей среды и охрана здоровья рыб - очень тесно взаимосвязанные процессы.

### 5.3. Подвижные аэромонады, выделенные от рыб и из воды, и их биологические свойства

Бактерии рода *Aeromonas* являются одним из компонентов бактериальной флоры воды и обнаруживаются во всех водоёмах, особенно загрязнённых органическими веществами. В интенсивно эксплуатируемых рыбоводных прудах количество аэромонад колеблется от нескольких сотен до тысяч микробных клеток в 1 мл воды [158]. Благодаря биохимической активности аэромонады способствуют разложению органических веществ и самоочищению водоёма.

В лаборатории ихтиопатологии ВНИИПРХ проблемой аэромонад и аэромоназов начали заниматься с 80-х годов прошлого столетия. Было проведено исследование культур аэромонад, выделенных нами, и музейных коллекций аэромонад Всероссийского института экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ, Москва), УкрНИИРХ и ХАКИ (Венгрия), выделенных от больных рыб. Была выявлена чёткая корреляция между способностью продуцировать ДНКазу и вирулентностью культур, выделенных от больных рыб, в биопробе. Методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ДЭПААГ) мы смогли установить три группы аэромонад: **первая группа** - облигатные патогены, вызывающие гибель рыбы в течение нескольких часов, дающие положительный результат при постановке биопробы контактным методом. В лабораторных условиях сохраняют свою вирулентность на протяжении длительного срока (в нашем случае более 25 лет). **Вторая группа** - аэромонады с индуцированной вирулентностью, повышающейся в результате пассирования через организм рыбы (особенно при высоких плотностях посадки и наличии эктопаразитов), либо при воздействии неблагоприятных факторов, активизирующих ферментативную активность аэромонад. В момент выделения от больных рыб они могут не отличаться от высоковирулентных возбудителей, но при культивировании на искусственных питательных средах теряют свою вирулентность. Биопроба контактным методом с такими культурами даёт отрицательный результат. К **третьей группе** аэромонад относятся авирулентные представители водного микробиоценоза, принимающие активное участие в процессах самоочищения водоёма. При проведении этих



исследований мы обратили внимание на то, что аэромонады второй группы могут легко переходить в третью, а при пассировании через организм рыбы или при неблагоприятных условиях окружающей среды аэромонады третьей группы приобретают вирулентность и переходят во вторую группу [178]. Вирулентные по ДНКазной активности аэромонады, выделенные из патматериала от больной рыбы, дают положительный результат при постановке биопробы [141]. В то же время ДНКазоположительные аэромонады, выделенные от клинически здоровой рыбы и из воды, не всегда вызывают гибель рыбы или развитие клинических признаков (примерно в 30% случаев результат отрицательный) [173]. Для изучения эпизоотической роли авирулентных аэромонад мы провели эксперимент в лабораторных условиях. Было отобрано шесть штаммов аэромонад, выделенных от здоровой рыбы (79-1, 79-2, 92-22) и из воды прудов (120-7, 152-32-12, 295-1-3). У всех штаммов была низкая ДНКазная активность ( $\pm$ , -, -, ++, -, + соответственно) и отрицательная биопроба. Все штаммы было решено пропассировать через организм рыбы. Для контроля реинфекции получили тетрациклиноустойчивые мутанты путём культивирования их на питательной среде, содержащей тетрациклин в различных концентрациях с предварительным определением чувствительности к тетрациклину методом серийных разведений (таблицы 10 и 11).

Таблица 10 - Определение чувствительности аэромонад к тетрациклину

Штамм	Разведение							КР	КС
	1:10	1:100	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000			
79-1	-	-	-	-	-	+	+	-	
79-2	-	-	-	-	-	+	+	-	
92-22	-	-	-	-	-	+	+	-	
120-7	-	-	-	-	-	+	+	-	
152-32-12	-	$\pm$	+	+	+	+	+	-	
259-1-3	-	-	-	-	-	+	+	-	

**Примечание:** КР- контроль роста к-ры на среде без тетрациклина, КС- контроль среды без к-ры

Таблица 11 - Рост аэромонад на эритрогагаре с тетрациклином

Штамм	Разведение				
	1:8000	1:4000	1:2000	1:1000	КР
79-1	+	-	-	-	+
79-2	+	-	-	-	+
92-22	+	-	-	-	+
120-7	+	-	-	-	+
152-32-12	+	+	+	+	+
259-1-3	+	-	-	-	+

Штамм 152-32-12 уже изначально дал рост на всех чашках. Предварительные исследования показали, что на среде с концентрацией тетрациклина 1:4000 ничего не растёт, поэтому адаптировали отобранные штаммы к этой концентрации. Для этого потребовалось различное количество пассажей: 9, 7, 4, 7, 3 и 13 соответственно. Для закрепления полученной резистентности было проведено ещё по три пассажа через эритрогагар с содержанием тетрациклина 1:4000 и было начато пассирование мутантов через организм карпа. Каждая культура вводилась трём рыбам. Через 2 суток проводили реизоляцию аэромонад с последующим заражением трёх рыб (таблица 12).

Таблица 12 - Динамика изменения вирулентности штаммов аэромонад

Штаммы, рыба	Пассажи			
	I	II	III	IV
<b>79-1</b>				
1-я	Погибла на 2й день. Вздутое брюшко, кровоизлияние в радужной оболочке глаза. Асцит.	Язва на месте инъекции 1,5x2 см, кровоизлияние в радужной оболочке глаза.	Погибла на 2-й день. Вздутое брюшко, кровоизлияние в радужной оболочке глаза. В брюшной полости большое количество асцитной жидкости.	
2-я	Видимых изменений нет.	То же	То же	
3-я	Язва на месте инъекции 1,7x2,6 см	-// -	Припухлости на месте инъекции с небольшим изъязвлением в центре	
<b>79-2</b>				

1-я	Погибла на 2-й день. Кровоизлияние в радужной оболочке глаза. Асцит.	Язва на месте инъекции 1,0x x1,5 см с гиперемией вокруг нее.	Погибла на 2-й день. Вздутое брюшко, кровоизлияние в радужной оболочке глаза. Асцит.	
2-я	Припухлость на месте инъекции с гиперемией вокруг нее.	То же	То же	
3-я	То же	Кровоизлияние в радужной оболочке глаза.	-//-	
<b>92-22</b>				
1-я	Погибла на 2 - й день БКП <sup>х</sup> . Из паренхиматозных органов массивный рост аэромонад.	Погибла на 2-й день. Вздутие брюшка, депигментация на месте инъекции, кровоизлияние в радужной оболочке глаза, обильное выделение слизи из ануса. В брюшной полости большое количество асцитной жидкости.		
2-я	Припухлость на месте инъекции с гиперемией вокруг, кровоизлияние в радужной оболочке глаза.	То же		
3-я	То же	Припухлости с гиперемией.		
<b>120-7</b>				
1-я	Видимых изменений нет.	Покраснение всей поверхности, обильное выделение слизи из ануса.	Погибла на 2-й день с депигментацией на месте инъекции с гиперемией вокруг этой зоны.	
2-я	То же	Обширная язва на месте инъекции 1,5x0,8 см.	То же	
3-я	Припухлость на месте инъекции с гиперемией вокруг.	Язва на месте инъекции 2,0x1,2 см.	-//-	
<b>152-32-12</b>				

1-я	На месте инъекции небольшие припухлости без гиперемии.	На месте инъекции язва размером 0,2x0,3 см.	На месте инъекции язва 0,6x0,7 см, заполненная некротизированной тканью.	Язва на месте инъекции 1,2x2 см. Кровоизлияние в радужной оболочке глаза. в печени и селезенке дегенеративные изменения.
2-я	То же	То же	На месте инъекции язва 0,7x1,5 см, заполненная некротизированной тканью.	То же
3-я	Видимых изменений нет.	На месте инъекции небольшая припухлость с гиперемией.	На месте инъекции небольшая припухлость с кровоизлияниями в центре. Экзофтальм.	-//-
<b>295-1-3</b>				
1-я	После инъекции на 3-е сутки гибель. Вздутое брюшко, кровоизлияние в радужной оболочке глаза, в брюшной полости большое кол-во асцитной жидкости.	На месте инъекции небольшая припухлость с гиперемией.		
2-я	На месте инъекции язва 0,2x0,3 см с обширной гиперемией вокруг них.	На следующий день после заражения образовались язвы вокруг места инъекции.		
3-я	На месте инъекции язва до 0,2 см.	То же		

**Примечание:** <sup>x</sup> БКП - без клинических признаков

Параллельно с повышением вирулентности культур аэромонад увеличивалась и зона деполимеризации ДНК - до 5-7 мм. Интересно отметить, что индуцированная ДНКазная активность у аэромонад второй группы, выделенных

из воды или от здоровой рыбы, иногда достигала 13-15 мм, однако в биопробе они не всегда вызывали развитие клинических признаков. Но достаточно было небольшого «толчка», и они практически не отличались от облигатных патогенов.

Таким пусковым механизмом могут служить неблагоприятные экологические условия, применение антибактериальных препаратов и др. Повышение агрессивности среды вызывает ответную реакцию со стороны микроорганизма, вынуждая его мобилизовать все факторы защиты и агрессии.

Следует обратить внимание ещё на один момент. Даже эксперимент с тетрациклиностойчивыми мутантами показывает весьма высокую вариабельность результатов биопробы. Она зависит от уровня резистентности каждой рыбы, от условий аквариальной, от индивидуальных свойств каждой культуры. Всё это увеличивает риск получить недостоверный результат. Проведение ДНКазного тестирования позволяет увеличить количество исследуемых культур на одной чашке (до 16-20), что в значительной степени повышает достоверность результатов. Чтобы держать под контролем эпизоотическую ситуацию в хозяйстве, необходимо регулярно проводить подобные исследования, так как в течение рыбоводного сезона количество высоковирулентных штаммов аэромонад может увеличиваться с 8,8 до 80,0% и в конечном итоге привести к развитию заболевания.

Работая с аэромонадами, выделенными в различных хозяйствах из воды, от больной и здоровой рыбы, мы столкнулись с таким фактом, что не все аэромонады укладываются в существующую классификацию. Вначале мы стали относить их в группу *A.sp.*, когда в этой группе собралось достаточное количество штаммов, различающихся по биохимическим свойствам, для облегчения проведения эпизоотологического анализа и оценки значимости каждого представителя, мы стали подразделять их на биовары: *A.sp.*, *A.sp.1*, *A.sp. 2* и т.д. К 2010 году нами было установлено 10 биоваров, в настоящее время их 14. Правда, *A.sp.4* и *A.sp.5*, были впоследствии отнесены к *A.veronii* и *A.schubertii* соответственно (таблица 13) [178].

Уже благодаря этой классификации стало возможным оценивать эпизоотическую значимость выделяемых аэромонад по их групповой принадлежности и вирулентности (таблицы 14 и 15).

По частоте выделяемости и из рыбы, и из воды в Рефтинском и Бисеровском хозяйствах занимают *A.sobria*, *A.caviae* и *A.hydrophila*. Из биоваров в рыбе чаще выявлялись *A.sp.2* и *A.sp. 4*, в воде - *A.sp. 4* и *A.sp. 5*. Полнее всего этиологическая структура подвижных аэромонад представлена в Бисеровском и Клинском хозяйствах - по 10 видов и биоваров, в микробиоценозе воды в Осёнках выявлено 2 вида и биовар, в то время, как в рыбе - 3 вида и 6 биоваров. Анаэробные аэромонады (*A. caviae*, *A.sp. 5*, *A.sp. 6*, *A.sp. 7*, *A.sp. 8*, *A.sp. 9*) характеризуют высокий уровень органического загрязнения воды, а он по данным бактериологических исследований выше всего в Рефтинском, Клинском и Бисеровском хозяйствах.

Как показали наши исследования, проведённые в разных зонах, среди культур, выделенных от рыбы и из воды, преобладали *A.sobria*. Реже всего выделялись (по нисходящей) *A. eucrenophila* (1,7% из рыбы и 3,9% из воды), *A.sp.* (0,7% - 2,6%), *A.sp. 9* (0,7%-0,9%), *A.sp. 6* (0,3%-1,9%).

По степени вирулентности среди культур, выделенных из рыбы, наиболее вирулентными (ДНКазная активность 4 - 13 мм) оказались аэромонады *A.sp.6* (71,4%), *A.sp.1* (60,7%), *A.sobria* (58,2%), *A.hydrophila* (57,2%), *A.sp.2* (51,5%), *A.sp.* (50,0%). Менее 50 % - *A.caviae*, *A.eucrenophila*, *A.sp.4*, *A.sp.5*, *A.sp.9* (47,1 - 42,1%), менее 40% - *A.sp.3*, *A.sp.11*, *A.sp.8* (37,2-31,9%). Высоковирулентные культуры *A.sp.12* от рыб выделялись в 25% случаев.

Из воды наиболее часто выделялись высоковирулентные аэромонады биоваров *A.sp.1* и *A.sp.* (63,6-63,5%), более 50% было среди *A.sp.6*, *A.sobria*, *A.hydrophila*, *A.caviae*, *A.sp.2* (58,2-57,2-56,1-51,6-50,0%).

Таблица 13 - Биохимические свойства подвижных аэромонад

Вид, биовар	Тесты			
	Глюкоза	Салицин	Л-арабиноза	Эскулин
<i>A. hydrophila</i> <b>H<sub>2</sub>S</b> ++	<b>кГ</b>	+	+	+
<i>A. eucrenophila</i> <b>H<sub>2</sub>S</b> -	<b>кГ</b>	+	+	+
<i>A. sobria</i>	<b>кГ</b>	-	-	-
<i>A. caviae</i>	<b>к</b>	+	+	+
<i>A. media</i>	<b>к</b>	<b>d</b>	+	<b>d</b>
<i>A.sp.</i>	<b>кГ</b>	+	-	-
<i>A.sp. 1</i>	<b>кГ</b>	-	+	+
<i>A.sp. 2</i>	<b>кГ</b>	-	-	+
<i>A.sp. 3</i>	<b>кГ</b>	-	+	-
<i>A.sp. 4 (A. veronii)</i>	<b>кГ</b>	+	-	+
<i>A.sp. 5 (A. schubertii)</i>	<b>к</b>	-	-	-
<i>A.sp. 6</i>	<b>к</b>	+	-	-
<i>A.sp. 7</i>	<b>к</b>	-	+	+
<i>A.sp. 8</i>	<b>к</b>	-	-	+
<i>A.sp. 9</i>	<b>к</b>	-	+	-
<i>A.sp. 10</i>	<b>к</b>	+	+	-
<i>A.sp. 11</i>	<b>к</b>	+	-	+
<i>A.sp.12</i>	<b>кГ</b>	+	+	-
<i>A.sp.13 (H<sub>2</sub>S#)</i>	<b>кГ</b>	-	-	-

Условные обозначения: **к** - кислота; **кГ** - кислота, газ; " + " - реакция положительная;

" - " - реакция отрицательная; **d** - различные реакции

Таблица 14 - Этиологическая структура подвижных аэромонад, выделенных в рыбоводных хозяйствах (1994-2010)

Рыб-хоз	Источ. выдел.	К-во проб	К-во культ.	A.sob-gia	A.ca-viae	A.hyd-rophila	A.sp.	A.sp. 1	A.sp. 2	A.sp. 3	A.sp. 4	A.sp. 5	A.sp. 6	A.sp. 7	A.sp. 8	A.sp. 9
1.	Рыба	405	612	238	153	119	11	8	33	14	32	3	1	-	-	-
	Вода	44	271	107	52	15	8	3	11	16	37	18	4	-	-	-
2.	Рыба	140	117	30	12	18	3	3	27	12	6	-	6	-	-	-
	Вода	15	21	3	-	12	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-
3.	Рыба	62	125	69	4	15	1	2	6	12	15	-	1	-	-	-
	Вода	11	123	57	21	36	1	-	-	9	1	-	-	-	-	-
4.	Рыба	178	124	63	4	19	-	12	6	5	-	11	-	4	-	-
	Вода	7	17	7	5	-	3	-	-	1	-	-	1	-	-	-
5.	Рыба	173	108	51	6	6	-	1	12	5	1	16	-	3	6	1
	Вода	23	50	27	4	4	1	3	2	1	-	2	-	5	-	1
6.	Рыба	111	55	9	25	14	-	1	4	1	-	1	-	-	-	-
	Вода	33	40	9	9	16	3	-	2	-	-	1	-	-	-	-
7.	Рыба	557	378	158	65	63	24	9	19	14	12	7	-	2	3	2
	Вода	79	180	93	15	19	22	2	-	5	10	5	2	7	-	-
<b>Все го</b>	Рыба	1626	1519	618	269	254	39	36	107	63	66	38	8	9	9	3
	Вода	212	702	303	106	102	38	8	21	32	48	26	7	12	-	1

**Примечание:** 1 - РТСХ, 2 - Осёнка, 3 - Егорьевский, 4 - Лотошинский, 5 - Клинский, 6 - Конаковский, 7 - Бисеровский



Таблица 15 - Этиологическая структура ДНКазоположительных аэромонад, выделенных от рыб (белая строка) и из воды (сиреневая строка)

Аэромонады	Зоны деполимеризации ДНК (мм)								Всего %	
	0 - 1.5		2.0 - 3.5		4.0 - 5.5		6.0 - 13.0			
	n	%	n	%	n	%	n	%		
A.sob- ria	198	17.5	275	24.3	324	28.6	335	29.6	1132	43.4
	231	17.0	291	23.3	385	30.8	361	26.4	1250	44.4
A.eucre- nophila	16	35.6	8	17.8	13	28.8	8	17.8	45	1.7
	56	50.5	11	9.9	26	23.4	18	16.2	111	3.9
A.hyd- rophila	39	16.9	60	25.9	67	29.0	65	28.2	231	8.8
	20	17.2	31	26.7	30	25.9	35	30.2	116	4.1
A.caviae	34	20.9	52	32.1	47	29.1	29	18.0	162	6.2
	26	21.3	33	27.0	37	30.3	26	21.3	122	4.4
A.sp	7	38.9	2	11.1	6	33.3	3	16.7	18	0.7
	13	17.6	14	33.3	27	36.5	20	27.0	74	2.6
A.sp.1	10	12.7	21	26.6	30	37.9	18	22.8	79	3.0
	10	9.1	30	27.3	45	40.9	25	22.7	110	3.9
A.sp.2	36	22.1	43	26.4	44	26.9	40	24.6	163	6.3
	37	26.4	33	23.6	38	27.1	32	22.9	140	4.9
A.sp.3	21	24.4	33	38.4	11	12.8	21	24.4	86	3.3
	25	21.2	42	35.6	20	16.9	31	26.3	118	4.3
A.sp.4	29	20.6	47	33.3	47	33.3	18	12.8	141	5.4
	35	25.7	43	31.6	43	31.6	15	11.1	136	4.8
A.sp.5	71	26.5	75	27.9	82	30.6	40	15.0	268	10.2
	66	33.3	44	22.2	60	22.4	29	22.1	198	7.1
A.sp.6	0	0	2	28.6	1	14.3	4	57.1	7	0.3
	0	0	23	41.8	22	40.0	10	18.2	55	1.9
A.sp.7	19	33.3	29	50.9	3	5.3	6	10.6	57	2.2
	39	41.5	34	36.2	12	12.8	9	9.5	94	3.3
A.sp.8	25	25.8	41	42.3	23	23.7	8	8.2	97	3.6
	32	31.4	44	43.0	15	14.7	11	10.8	102	3.6
A.sp.9	6	31.6	5	26.3	6	31.6	2	10.5	19	0.7
	5	18.5	9	33.3	11	40.7	2	7.5	27	0.9
A.sp.10	0	0	0	0	1		0	0	1	0.4
	0	0	0	0	6		0	0	6	0.2
A.sp.11	32	34.0	28	29.8	28	29.8	6	6.4	94	3.6
	57	39.6	39	27.1	35	24.3	13	9.0	144	5.2
A.sp.12	3	37.5	3	3.5	2	25.0	0	0	8	0.2
	5	38.5	4	30.8	3	23.1	1	7.6	13	0.5
<b>Всего</b>	546	20.9	724	27.8	735	28.2	603	23.1	2608	100,0
	639	22.7	725	25.7	815	28.9	638	22.7	2816	100,0

Менее 50% от общего количества ДНКазоположительных культур с высокой вирулентностью было среди биоваров *A.sp.9*, *A.sp.5*, *A.sp.3*, *A.sp.4* (48,2 – 44,5 – 43,2 – 42,7% соответственно). Суммарно среди аэромонад, выделенных от рыбы, 51,3% были высоковирулентны, а среди аэромонад, выделенных из воды, 51,6%. Кроме трёх штаммов, выделенных от рыб в Молдавии, Дагестане и Туркмении, и отнесённых к первой группе облигатных патогенов, все остальные были отнесены ко второй группе, хотя при выделении при постановке биопробы они вызывали острые клинические проявления: язвы, экзофтальмию, кровоизлияние в глазном яблоке, ерошение чешуи и асцит. При проведении биопробы с культурами первой группы у рыб отмечалось нарушение координации, судорожные волнообразные сокращения поверхности тела, рыба опускалась на дно и в течение одного-двух часов погибала.

Интересны результаты проверки вирулентности аэромонад, выделенных от рыбы, на белых мышах, проведённые Т.И.Хомяковой с сотрудниками в Государственном научном центре прикладной микробиологии в Оболенске и Московском НИИ медицинской экологии, где занимались разведением пиявок для гирудотерапии и вопрос о вирулентности аэромонад представлял и для них практический интерес [124].

В эксперимент по изучению вирулентности аэромонад были взяты три штамма *A. hydrophila* 341 (3 мм зона деполимеризации ДНК), 342 - 1 (8 мм) и 342 - 2 (0 мм). Вирулентные свойства выбранных аэромонад исследовали на белых мышах (возраст 7 недель, вес 18-20 г) путём в/б введения. Заражающие дозы - 500, 100, 20 и 4 млн. Контроль проводили высевом суспензий испытуемых штаммов на МПА с последующим подсчётом выросших колоний. На каждую заражающую дозу брали 4 мыши. Всего на один испытуемый штамм - 16 мышей. За заражёнными животными наблюдали в течение 7 суток. Павших животных вскрывали. Из печени (п), селезёнки (с) и крови из сердца (к) делали высев на МПА. По истечении срока наблюдения оставшиеся в живых мыши были эфтаназированы с последующим высевом проб печени, селезёнки и крови из сердца на МПА. Сведения о заражающих дозах, гибели животных, времени гибели



Вирулентность исследуемых культур *A. hydrophila* выражали величиной LD<sub>50</sub>, которую рассчитывали по Керберу (в модификации Ашмарина и Воробьёва):

$$\lg LD_{50} = \lg D_{\max} - G(\Sigma L_1 - 0,5), \text{ где}$$

$D_{\max}$  - максимальная заражающая доза,

$G$  - логарифм кратности разведений,

$L_1$  - отношение числа павших к числу зараженных животных.

Важным показателем при характеристике вирулентных свойств инфекционных агентов является среднее время гибели экспериментальных животных (СВГ), которое для белых мышей рассчитывали по формуле:

$$\text{СВГ (час)} = \Sigma \text{СВГ}_i / N, \text{ где:}$$

$\Sigma \text{СВГ}_i$  - суммарное время гибели павших в эксперименте животных,

$N$  - количество павших животных.

Результаты определения вирулентности (LD<sub>50</sub>) и среднего времени гибели (СВГ) экспериментальных животных представлены в таблице 20.

Как следует из данных, представленных в таблице 19, два из трёх исследованных штаммов *A. hydrophila* оказались вирулентными для белых мышей: они вызвали у экспериментальных животных септический процесс, приведший к гибели животных. Третий штамм *A. hydrophila* 342-2 (0 мм) оказался авирулентным для белых мышей.

Из двух вирулентных штаммов наиболее вирулентным оказался штамм 341

Таблица 20 - Вирулентность (LD<sub>50</sub>) и среднее время гибели (СВГ) белых мышей в эксперименте с *A. hydrophila*, выделенными от рыбы

Название штамма	LD <sub>50</sub>	СВГ
<i>A. hydrophila</i> 341 (3 мм)	$1,778 \times 10^8$	34,75 часа
<i>A. hydrophila</i> 342-1 (8 мм)	$2,291 \times 10^8$	32,5 часа
<i>A. hydrophila</i> 342-2 (0 мм)	Штамм не вирулентен	-

(3 мм), выделенный от карпа с клиническими проявлениями, хотя у него ДНКазная активность была ниже, что ещё раз подтвердило результаты параллельных исследований ДНКазной активности и результатов биопробы аэромонад, выделенных из разных источников.

Патогенез аэромоноза - комплексный процесс, затрагивающий белковый, липидный и электролитный обмены [5], однако детальное изучение биохимических изменений у рыб при аэромонозе не проводилось. Значительный интерес в этом плане представляли исследования липидного состава, в частности, жирных кислот клеточных мембран, играющих существенную роль в устойчивости организма к инфекции и к течению патологического процесса [14]. Изучению была подвергнута динамика содержания фосфолипидов крови и их жирнокислотного состава у годовиков карпа при экспериментальном аэромонозе в процессе развития инфекции - от 4-х часов до 7 суток с момента контакта рыб с аэромонадами. Липиды исследовали традиционным многоступенчатым методом, включавший экстракцию липидов, приготовление метиловых эфиров жирных кислот и их газовую хроматографию на хроматографах «Хром-41».

В процессе развития бактериальной инфекции, вызванной аэромонадами, наблюдалась переориентация обмена липидов крови. Для начального этапа было характерно снижение уровня фосфолипидов на фоне уменьшения количества лейкоцитов. Затем происходила стимуляция лейкоцитов путём включения в мембранные липиды полиеновых жирных кислот, в основном докозагексаеновой и арахидоновой. В дальнейшем защита организма у зараженных аэромонадами карпов осуществлялась за счёт увеличения числа форменных элементов белой крови [14,15]. Экспериментальный аэромоноз, вызванный в/м введением высоковирулентной культуры *A.sobria* 77-18, характеризовался анемией и лейкопенией. Последняя проявлялась в снижении всех групп нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов и резким (в десятки раз) увеличением промиелоцитов, которые отмечались уже на третий день эксперимента. Близкие изменения в картине крови отмечены на 5-й день опыта при введении рыбе культуры *A.sobria* 78-16. Внесение этой культуры в воду даёт менее выраженные изменения

гематологических показателей. На 5-й день отмечаются отклонения в картине красной и белой крови, которые к 7-му дню нормализуются [15].

При спонтанном аэромонозе были отмечены различия в липидном и жирнокислотном составе некоторых тканей у голодающих и питающихся карпов после иммунизации, которые наряду с тканевой резистентностью обеспечивают также иммунологическую реактивность рыб. У иммунизированных голодающих рыб при аэромонозе повышенное содержание в печени и почках фосфолипидов, содержащих полиеновые жирные кислоты (эйкоза пентаеновую преимущественно в печени) по сравнению с питающимися, затрагивает как структуру мембран, так и процессы энергобеспечения, что должно определять более высокий уровень детоксикационной способности этих органов, а также активности клеточных механизмов иммунного ответа (16).

Интересно отметить, что культура *A.sobria* 78-16 при первичном выделении было ДНК-отрицательной и в биопробе не вызывала никаких клинических проявлений, в связи с чем использовалась в качестве контрольного авирулентного штамма. К моменту проведения вышеописанного эксперимента штамм 78-16 использовался несколько раз. В результате пассирования через организм рыбы у него появились признаки вирулентности, сопровождающиеся не только клиническими проявлениями, но и гематологическими изменениями. Всё это лишнее раз подчёркивало важность постоянного контроля за уровнем аэромонад, содержащихся в воде рыбоводных прудов, так как даже авирулентные штаммы при технологических нарушениях, особенно при переуплотнённой посадке, наличии эктопаразитов могут вызвать вспышку аэромоноза [39].

Изучение вирулентности аэромонад имеет большое значение, т.к. позволяет дать правильную оценку эпизоотической ситуации в хозяйстве и грамотно провести соответствующие противоэпизоотические мероприятия.

В случае выделения аэромонад первой группы необходим карантин, тогда как при вспышке, вызванной аэромонадами второй группы, достаточно проведения курса лечения и санитарно-гигиенических мероприятий. В настоящее время не во всех лабораториях есть возможность изучения электрофореграмм

выделенных культур, поэтому наиболее доступным методом исследования является биопроба. При внутрибрюшинном заражении свежесыводенной бульонной культурой 1-й группы гибель рыбы наступает в течение нескольких часов.

Обширная информация отечественных и зарубежных авторов свидетельствует об эпидемиологическом значении аэромонад, поэтому, работая с патологическим материалом, всегда следует очень строго соблюдать правила техники безопасности и личной гигиены [152].

#### 5.4. Диагностика бактериальной геморрагической септицемии рыб

Исследования, проведённые в лаборатории ихтиопатологии с 1980 года, показали, что высеваемость условно-патогенных микроорганизмов увеличивается (таблица 21).

Таблица 21- Этиология заболеваний рыб БГС

Годы	К-во экз. рыб	Роста нет, %	Бак.подтв., %	В том числе, %	
				аэромонад	усл.-патог.
1980-1989	2065	50,1	49,9	80,6	9,6
1990-1999	3630	40,7	59,3	63,5	21,6
2000-2014	5139	30,2	69,8	66,6	42,0

Учитывая увеличение количества условно-патогенной микрофлоры в микробиоценозе воды и рыбы, при посеве исследуемого материала стали использовать оптимальный набор сред. На МПА или эритритагаре отмечали уровень обсеменённости (ОМЧ), а по морфологическим признакам предположительно можно отметить наличие флавобактерий (по окраске колоний от желтого до оранжевого цвета), колонии ацинетобактеров и моракселл (уплощённые колонии белого цвета), эпидермального и золотистого стафилококков (выпуклые колонии белого и ярко-желтого цветов). На среде Эндо отмечали энтеробактерии различных родов: БГКП с различной интенсивностью окраски, в виде бледно-розовых колоний могут быть цитробактер, клебсиелла, энтеробактер, протей, аэромонады. На среде Сабуро отмечали дрожжеподобные и плесневые грибы, миксобактерии, на энтерококкагаре - рост энтерококка. Но эти морфологические признаки наблюдают, если культура типичная. На практике приходилось наблюдать феномен «роения» (ползучий рост, ранее присущий только протее) у БГКП, моракселл и ацинетобактеров. При этом одна колония могла расползтись по всей поверхности среды. Кроме этого, многие бактерии вырабатывают капсулу, которая служит защитой от воздействия неблагоприятных



факторов окружающей среды, и размеры этой капсулы были иногда такие, что тяжи с поверхности колонии стекали на крышку чашки Петри.

Прежде всего это *Pseudomonas fluorescens v. capsulata* [174], а также могут быть аэромонады, БГКП (рис. 6) и НФЦ.

После просмотра чашек с посевами отобранные колонии (прежде всего те, которые в большинстве) пересевали на первично-дифференцирующую среду Клиглера, по характеру роста на которой, по результатам микроскопирования, после проведения теста на цитохромоксидазу и каталазу проводили предварительную идентификацию выросшей культуры до рода, а после посева на среду Хью-Лейфсона (проверка О/Ф теста) уточняли родовую принадлежность выделенной культуры (таблица 4).



Рис. 6. Капсулообразующие колонии БГКП из воды бассейна с рыбой

Дифференциацию аэромонад проводили в соответствии с признаками, приведёнными в таблице 13.

Для удобства работы при проведении диагностики заболевания и идентификации возбудителей мы использовали алгоритм исследования в форме блок-схемы (таблица 22).

Видовую принадлежность выделенных культур определяли путём посева на «пёстрый ряд» Гисса (таблицы 24-27).

В результате проведённых исследований за период с 1980 по 2014 гг. при диагностике бактериальной геморрагической септицемии из проб воды и рыбы было выделено сопутствующей микрофлоры 22849 и 6297 штаммов соответственно (таблица 23).

При изучении мониторинга микробиоценоза лососевых и осетровых рыб в разное время на различных рыбоводных предприятиях нами были получены интересные результаты по частоте выделения аэромонад и сопутствующей микрофлоры.

Объектом исследования служили лососевые и осетровые рыбы в основном имевшие клинические признаки заболевания. Следует отметить, что в микробиоценозах лососевых рыб в значительном количестве присутствовали анаэробные аэромонады и неферментирующие щелочеобразователи (27,1 и 28,9% соответственно), что свидетельствует о существенном загрязнении рыбоводных водоёмов сточными водами. За время наблюдений (1980-2007 гг.) было обследовано 1162 экз. лососевых рыб с бактериологическим анализом 2771 пробы (таблицы 28-29). Вирулентность аэромонад варьировала в широких пределах: от 0 до 13 мм, при этом большие зоны деполимеризации ДНК проявлялись у аэромонад, выделенных от рыб с клиническими проявлениями. Чувствительность выделенных культур определяли к препаратам, чаще всего используемым в хозяйствах. При этом отмечена разница по чувствительности аэромонад к антибактериальным препаратам в хозяйствах, применявших и не применявших ципрфлоксацин (антибак), который в последние годы широко применялся в хозяйствах (таблица 30).

Таблица 22 - Выделение и идентификация рыбопатогенных бактерий

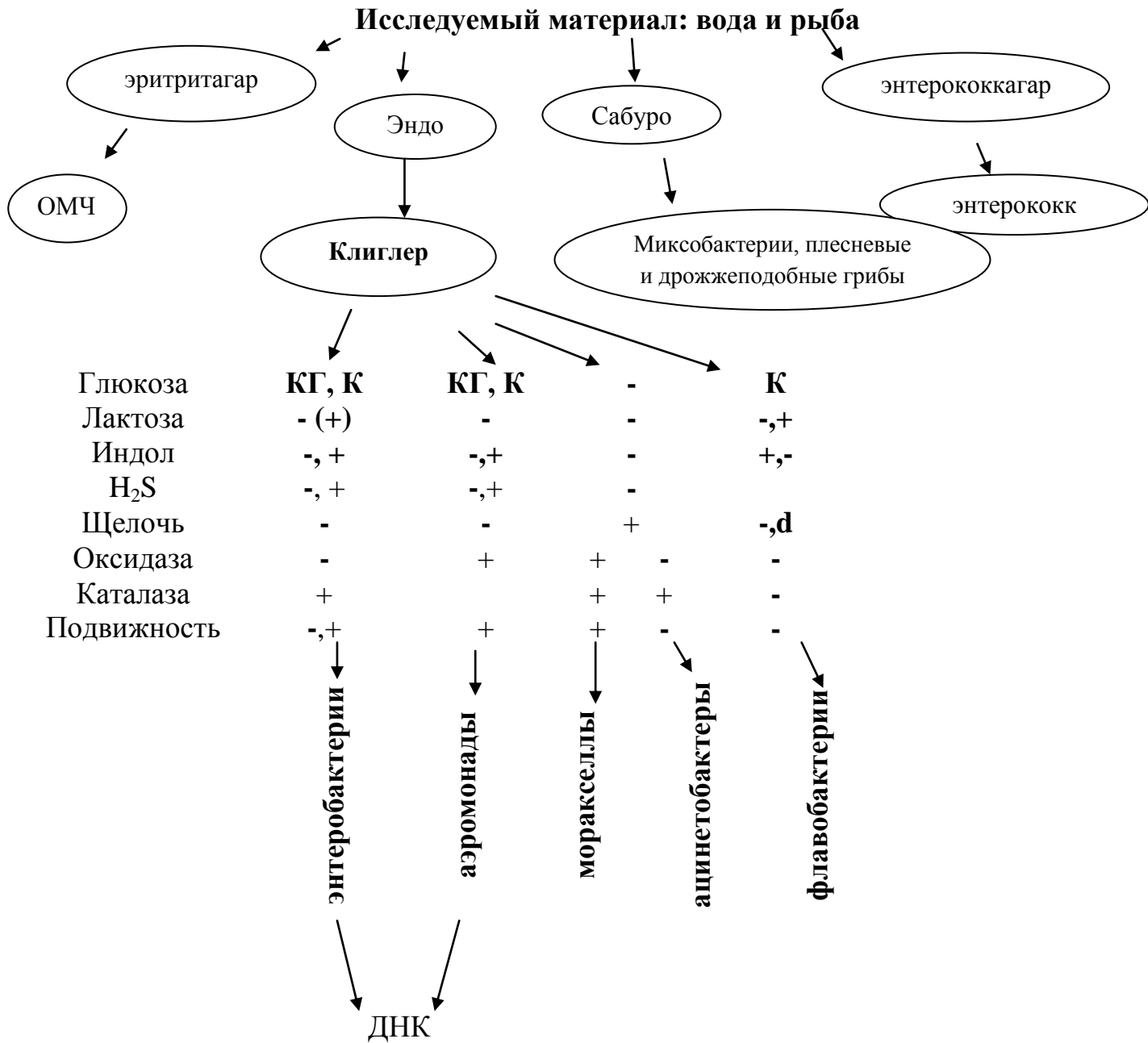


Таблица 23 - Сопутствующая микрофлора воды и рыбы 1980 – 2014 гг. (количество и %)

Возбудители	1980 - 1989				1990 - 1999				2000 - 2014			
	Вода		Рыба		Вода		Рыба		Вода		Рыба	
БГКП	26	17.1	79	14.4	1245	52.7	254	13.5	9731	47.9	1389	35.8
<i>Proteus</i> spp.	2	1.3	6	1.1	161	6.8	194	10.3	1403	6.9	124	3.2
Слизеобразующие бактерии	44	28.6	48	8.7	190	8.0	98	5.2	1999	9.8	197	5.1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>					53	2.2	158	8.4	472	2.3	324	8.4
<i>Ac. baumannii</i>							5	0.3	298	1.5	173	4.5
<i>Moraxella</i> spp.	48	30.6	276	50.3	81	3.4	454	24.2	585	2.9	538	13.9
<i>Enterococcus</i> spp.									511	2.5	43	1.2
<i>Mycobacterium</i> spp.			4	0.7	73	3.1	121	6.4	3224	15.8	361	9.3
<i>Citrobacter</i> spp.	1	0.7	4	0.7	38	1.6	54	2.9	106	0.5	78	2.0
<i>Bacillus</i> spp.			4	0.7	39	1.7	18	1.0	745	3.7	51	1.4
<i>Pseudomonas</i> spp.			15	2.7	208	8.8	233	12.4	29	0.1	187	4.8
<i>P. fluorescens v. capsulata</i>			18	3.3	174	7.4	116	6.2	14	0.1	-	-
<i>Flavobacterium</i> spp.	1	0.7	28	5.3	13	0.6	26	1.4	921	4.5	150	3.9
<i>Enterobacter</i> spp.	3	2.1	4	0.7	36	1.5	44	2.3	63	0.3	73	1.9
Плесневые грибы	6	4.2	11	2.0					175	0.9	151	3.9
<i>Candida</i> spp.	3	2.1	3	0.5			5	0.3	59	0.3	24	0.7
Стафилококки	18	12.6	49	8.9	35	1.5	23	1.2				
<i>Arizona</i> spp.					2	0.1						
<i>Klebsiella</i> spp.					14	0.6	56	3.1				
<i>Corynebacterium</i> spp.							17	0.9				
<b>Всего:</b>	<b>152</b>	<b>100</b>	<b>549</b>	<b>100</b>	<b>2362</b>	<b>100</b>	<b>1876</b>	<b>100</b>	<b>20335</b>	<b>100</b>	<b>3863</b>	<b>100</b>

Таблица 24 - Дифференцирующие признаки родов и видов сем. Enterobacteriaceae

Признак	Escherichia	Edwardsiella		Salmonellae			Klebsiella	Enterobacter			Hafnia	Proteus				Providencia	
		ictaluri	tarda	Salmonella	Arizona	Citrobacter		cloacae	aerogenes	liquefaciens		vulgaris	mirabilis	morganii	rettgeri	alkalifaciens	stuartii
Подвижность	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+	<b>d</b>	+/-	+	+	+	+	+	+
Индол/H <sub>2</sub> S	+/-	-/-	+/+	-	-	-/+	-/+		-	-	-	+	<b>[-]</b>	+	+	+/-	+/-
Реакция MR/VP	+/+	-/-	+/-	+	+	+	-		-	+/-	+	+	+	+	+	+	+
Желатин	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	(+)	+	-	+(+)	+	<b>[-]</b>	<b>[-]</b>	-	-
Мочевина	-	-	-	-	-	-/d	(+) <sup>4</sup>	(+)	-	-/+	-	+	+	+	+	-	-
Малонат Na	-	-	-	-	-	+/d	+ <sup>4</sup>	+	+/-	-/d	<b>d</b>	-	-	-	-	-	-
Глюкоза (газ)	+/-	+	+	+	+	+	+ <sup>4</sup>		+	+	<b>d</b>	+/-	+	<b>d</b>	-/+	+/-	-
Лактоза	+/-	-	-	-	<b>d</b>	<b>d</b>	+ <sup>4</sup>	+/(+)	+	<b>d</b>	-/+	-	-	-	-	-	-
Маннит	+	-	-	+	+	+	+		+	+	+	-	-	-	+/-	-	<b>d</b>
Сахароза	<b>d</b>	-	-	-	-	<b>d</b>	+	+/d	+	+	<b>d</b>	+	<b>d</b>	-/d	<b>d</b>	<b>d</b>	<b>d</b>
Инозит	-/+	-	-	<b>d</b>	-	-/d	+ <sup>4</sup>		+	+	-	-	-	-	+	-	+
Салицин	<b>d</b>	-	-	-	-	<b>d</b>	+		+	+	<b>d</b>	<b>d</b>	<b>d</b>	-	-	-	-
Дульцит	<b>d</b>	-	-	+	-	<b>d</b>	-/+		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ксилоза	+/d			+	+	+	+		+	+	+	+	+	<b>[-]</b>	<b>[-]</b>	-	-
Мальтоза	<b>d</b>			+	+	+	+ <sup>4</sup>		+	-	+	<b>[+]</b>	-	-	-	-	-

Условные обозначения: (+) - замедленная реакция; [+] - большинство штаммов положительное; [-] - большинство штаммов отрицательное; d - разная реакция; +<sup>4</sup> - положительная реакция на 4-е сутки

Таблица 25 - Дифференцирующие признаки видов рода *Moraxella*  
подрода *Moraxella*

Признак	M.atlan- tae	M.bo- vis	M.lacu- nata	M.nonli- que- faciens	M.oslo- ensis	M.phenyl- pyrivica
Форма клеток - палочки	+	+	+	+	+	+
Гемолиз	-	[+]	-	-	-	-
Гидролиз желатина	-	[+]		-	-	-
Разжижение сы- воротки крови	-	[+]	+	-	-	-
Рост в присут- ствии 6% NaCl	-	-	-	-	-	[+]
Уреаза	-	-	-	-	[-]	d
Восстановление NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	[-]	+	+	d	[+]
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	-

Таблица 26 - Дифференцирующие признаки видов рода *Acinetobacter*

Признак	A.bau- mannii	A.calco- aceticus	A.haemo- lyticus	A.john- sonii	A.junii	A.lwoffii
Рост при 44 <sup>0</sup> С	+	-	-	-	-	-
37 <sup>0</sup> С	+	+	+	-	+	+
Гидролиз желатина	-	-	96	-	-	-
Гемолиз	-	-	+	-	-	-
Цитрат Симмонса	+	+	91	+	82	-
К-та из глюкозы	95	+	52	-	-	6

**Условные обозначения:** числа - % положительных реакций

Таблица 27 - Дифференцирующие признаки видов рода *Flavobacterium*

Признак	<i>F.aquatile</i>	<i>F.balustinum</i>	<i>F.branchiophila</i>	<i>F.breve</i>	<i>F.gleum</i>	<i>F.indologenes</i>	<i>F.menin gosepti cum</i>	<i>F.odoratum</i>	<i>F.thalpophilum</i>
Образование кислоты из:									
Глюкозы	+	+	+	d	+	+	d	-	+
Арабинозы	-	-	-	-	d	-	-	-	+
Лактозы	+	-	-	-	-	-	d	-	+
Мальтозы	+	-	+	d	+	+	+	-	+
Сахарозы	+	-	+	-	-	-	-	-	+
Эскулин	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Индол	-	+	-	+	+	+	d	-	
Уреаза	-	-		-	d	-	d	+	+
Желатиназа	-	+	+	+		+	+	+	d

Эпизоотологическое обследование осетровых хозяйств показало, что важную роль в обеспечении эпизоотического благополучия рыб играет среда их обитания. При сравнительном изучении микробиоценоза воды и рыбы выявили основные группы этиологически значимых микроорганизмов, способных также снижать качество рыбной продукции. Эпизоотическое состояние одного из крупнейших промышленных хозяйств - Конаковского завода товарного осетроводства, не всегда было благополучным и во многом зависело от качества поступающей воды. На протяжении нескольких лет в летний период выращивания рыбы регистрировали ОМЧ на эритрогагаре от минимальных (1180 КОЕ/мл) до максимальных (8400 КОЕ/мл) показателей. Вток в отстойник (бак-распределитель) всегда показывал высокий уровень ОМЧ (до 11940 КОЕ/мл). Часто бактериальный фон воды в отстойнике и в бассейнах был настолько

высоким, что на плотных питательных средах при посеве без разведения образовывался сливной рост не поддающихся подсчёту колоний.

В микрофлоре водной среды обнаруживали БГКП, аэромонады, НФЩ - моракселлы и ацинетобактеры, миксобактерии и протей. При высеве проб из внутренних органов в чистой культуре присутствовали аэромонады и НФЩ, а в посевах соскобов с поверхности жабр - аэромонады, миксобактерии и НФЩ.

При эпизоотологическом обследовании осетрового товарного хозяйства ООО «Биоакустик» (Клинский район) отмечали неблагополучие поступающей в лотки и бассейны прямоочной воды. Количественные показатели микрофлоры воды были от минимального ОМЧ (1940 КОЕ/мл) до максимального (9160 КОЕ/мл) значений. В воде обнаруживали большое количество моракселл, БГКП, протей, ацинетобактеров и аэромонад разных видов и биоваров. В одном случае наблюдали рост моракселл до 25760 КОЕ/мл, что способствовало контаминации внутренних органов молоди стерляди и бестера моракселлами и аэромонадами. При обработке воды хлорамином ситуацию удалось нормализовать. Одним из крупных рыбоводных хозяйств является Новомичуринское садковое хозяйство (Рязанская область). Выращивание осетровых и других видов рыб в садках приводит к массивному органическому загрязнению водной среды, что отрицательно воздействует на рыбу. У годовиков белуги отмечали вздутие брюшка и поверхностное плавание. При вскрытии наблюдали тёмную печень с фиолетовым оттенком, рыхлые и отёчные почки, в плавательном пузыре - большое количество экссудата. Высев из внутренних органов рыб выявил обильный рост аэромонад и энтерококков. На Можайском ПЭРЗ предусмотрена замкнутая система водообеспечения с биологической и механической очисткой. Однако состав микрофлоры воды не всегда был благоприятным для выращивания осетровых рыб и зависел от её качества, степени очистки, микрофлоры используемых кормов, их размываемости, продуктов жизнедеятельности рыб и санитарного состояния рыбоводных ёмкостей. Исследования микробиоценоза воды на этом предприятии показали, что поступающая в бассейны вода контаминирована в большом количестве БГКП с бронзовым блеском,



аэромонадами, ацинетобактерами, моракселлами, протеом и миксобактериями. При отсутствии специального УФ-облучения показатели ОМЧ в воде, поступающей в бассейны и в разные циклы системы, колебались от 4060 до 46060 КОЕ/мл. Высокий уровень ОМЧ (10080 - 13600 КОЕ/мл) регистрировали в осветлённой воде после механической очистки, что свидетельствовало о накоплении бактерий на механических фильтрах.

В посевах из внутренних органов выращиваемой рыбы рост бактериальной флоры не отмечали или это были единичные колонии (в основном аэромонады и цитробактер в монокультуре или в ассоциации с БГКП). Регистрировали умеренную контаминацию жабр БГКП, аэромонадами, моракселлами, ацинетобактером и протеом. Многолетние исследования осетровых рыб показали, что наибольшую опасность для них представляют ассоциативные болезни, вызываемые комплексом микроорганизмов - бактериальная геморрагическая септицемия. При миксобактериозе и аэромонозе осетровых выделяется сопутствующая микрофлора, количество которой часто превышает основные для этих инфекций патогены. Кроме осложнения течения болезни она затрудняет лечение, так как обладает разной чувствительностью к антибактериальным препаратам.

У осетровых рыб структура аэромонад и сопутствующей микрофлоры довольно пёстрая (таблицы 31 и 32). Содержание анаэробных аэромонад и НФЦ составляет 33,9 и 18,6 % соответственно, что свидетельствует о высоком органическом загрязнении рыбоводных водоёмов и способствует развитию БГС.

Как видно из результатов исследований, наряду с этиологическим разнообразием подвижных аэромонад, выделяющихся из организма осетровых рыб увеличивались и показатели сопутствующей микрофлоры. Результатом таких изменений стал переход с прудовой технологии выращивания на промышленные методы - садковое, бассейновое и в УЗВ.

Резюмируя результаты бактериологических исследований, следует отметить, что при промышленном выращивании рыб водная среда не всегда соответствует нормативным параметрам. Её бактериальный фон не должен быть

более 3000 КОЕ/мл. Однако в хозяйствах он нередко превышает данные показатели, а составляющие его микроорганизмы часто становятся этиологически значимыми для рыб. При этом наиболее опасными становятся миксобактерии, аэромонады и цитробактеры. В условиях замкнутой системы водообеспечения бактериальные показатели воды бывают значительно выше, чем на прямоточной воде. В первом случае развитие бактериальной флоры происходит за счёт большого количества субстрата, который составляют взвешенные частицы размытого корма в воде. При прямоточном водоснабжении эти взвеси быстрее выносятся из бассейна.

Наиболее важным условием при выращивании рыб должны быть мероприятия по санации рыбоводных ёмкостей, уменьшению взвешенных частиц в воде, дезинфекции воды. Систематический бактериологический контроль за микробиоценозом воды, мероприятия по повышению иммуно-физиологического статуса рыбы в условиях индустриальной аквакультуры приведёт к снижению бактериальных заболеваний и потерь выращиваемой рыбы [151, 225].

Таблица 28 - Этиологическая структура аэромонад, выделенных от лососевых рыб

Годы	К-во рыб	К-во проб	A.so-bria	A.hydro-phila	A.caviae	A.sp.	A.sp.2	Asp.3	A.sp.4	A.sp.5	A.sp.8	A.salmo-nicida	Всего
1980-1989	310	963	41	74	91	10	-	-	-	-	-	24	240
1990-1999	741	1575	107	15	59	6	6	1	26	-	-	-	220
2000-2007	111	233	95	63	84	5	10	7	-	12	11	-	287
Итого	1162	2771	243	152	234	21	16	8	26	12	11	24	747

Таблица 29 - Сопутствующая условно-патогенная микрофлора, выделенная от лососевых рыб

Годы	БГКП	Entero-bacter	Citrobac-ter	Proteus spp.	Vibrio	НФЦ	Pseudomo-monas sp.	Ps.capsu-lata	Плеснев. грибы	Candida albicans	Прочие	Всего
1980-1989	19	1	5	1	8	85	1	3	3	-	38	164
1990-1999	66	7	16	121	12	69	61	15	28	3	18	416
2000-2007	21	3	31	24	-	73	15	21	11	-	6	205
Итого	106	11	52	146	20	227	77	39	42	3	62	785

Таблица 30 - Степень чувствительности к антибактериальным препаратам аэромонад, выделенных в рыбоводных хозяйствах

Степень чувствительности (мм)	Препараты			
	Фуразолидон	Левомицетин	Тетрациклин	Ципрофлоксацин
Резистентные ( 0 - 9)	12,5 / 2,4 <sup>*)</sup>	10,1 / 1,2	12,5 / 10,9	23,2 / 0
Слабочувствительные (10 - 19)	37,5 / 43,5	21,7 / 14,1	37,5 / 48,4	46,6 / 4,7
Чувствительные (20 - 30)	50,0 / 50,6	53,6 / 40,0	50,0 / 40,7	34,9 / 58,8
Высокочувствительные (31 - 45)	0 / 3,5	14,6 / 44,7	0 / 0	1,3 / 36,5

**Примечание:** <sup>\*)</sup> - в числителе - количество штаммов, выделенных в хозяйствах, применявших ципрофлоксацин (антибак), в знаменателе - количество штаммов, выделенных в хозяйствах, не применявших ципрофлоксацин

Таблица 31 - Этиологическая структура аэромонад, выделенных от осетровых рыб

Годы	К-тво рыб/проб	A.so -bria	A.hyd- rophila	A.ca -viae	A.sp.	A.sp. 1	A.sp. 2	A.sp. 3	A.sp. 4	A.sp. 5	A.sp. 6	A.sp. 7	A.sp. 8	A.sp. 9	A.sp. 10	A.sp. 11	Все- го
1980-89	32/83	6	42	23	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	76
1990-99	264/601	42	57	64	5	-	10	4	2	-	1	-	-	-	-	-	185
2000-07	296/974	340	39	28	2	32	31	13	41	159	3	6	9	3	1	42	749
Итого	592/1658	388	138	115	12	32	41	17	43	159	4	6	9	3	1	42	1010

Таблица 32 - Сопутствующая условно-патогенная микрофлора, выделенная от осетровых рыб

Годы	БГКП	Proteus sp.	НФЦ	Миксобакт.	Enterobact.	Citrobacter	Pseudom.sp.	Pseud.caps.	Прочие	Всего
1980 - 1989	4	1	5	2	-	-	-	-	-	12
1990 - 1999	63	71	37	29	20	3	54	71	8	356
2000 - 2007	121	29	345	247	126	42	64	84	-	1058
Итого	188	101	387	278	146	45	118	155	8	1426

## **5.5. Бактериальные контаминанты комбикормов и их влияние на окружающую среду и организм рыб**

При выращивании рыбы большое значение имеет качество используемых комбикормов. При этом немаловажную роль играет не только их сбалансированность по основным видам компонентов, но и степень их обсеменённости микроорганизмами, часто являющимися этиологическими агентами в патологии рыб, будучи возбудителями бактериальной геморрагической септицемии, но не указанными в документе «Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов №13-7-2/1010» [22].

Начиная с 2002 года, нами было изучено 377 проб отечественных и импортных комбикормов, из которых только 20 (5.3%) были свободны от контаминантов (рис. 7). Из остальных проб было выделено 1013 штаммов микроорганизмов, относящихся к различным нозологическим группам [64, 140, 182]. Чаще всего высевался энтерококк (83,8%), менее 50% составляли: стафилококки (49,6%), ацинетобактеры (46,6%), бациллы (45,5%), флавобактерии (35,7%), бактерии группы кишечной палочки (33,8%), протеи (30,8%). Остальные контаминанты выделялись значительно реже: плесневые грибы (15,8%), дрожжеподобные грибы (*Candida*) (11,3%), моракселлы (8,6%), энтеробактер (8,6%), сапрофиты (5,6%), картофельная палочка (3,8%), микрококки (1,1%) и только в одном случае был выделен цитробактер (0,3%). Чаще всего высокий уровень контаминации отмечается у комбикормов, хранящихся в рассыпном виде. В этом случае дополнительным источником контаминантов являются грызуны. Следует отметить, что не все контаминанты играют главную роль в непосредственном возбуждении патологических процессов у рыб. Так, картофельная палочка при повышении влажности и температуры воздуха может вызывать порчу кормов, в результате чего они могут становиться токсичными, способными вызывать воспалительные процессы в кишечнике. В одном из садковых хозяйств,

расположенном в прибрежной зоне озера произошла массовая гибель молоди форели и сига. Анализ микробиоценоза воды не выявил ничего подозрительного,

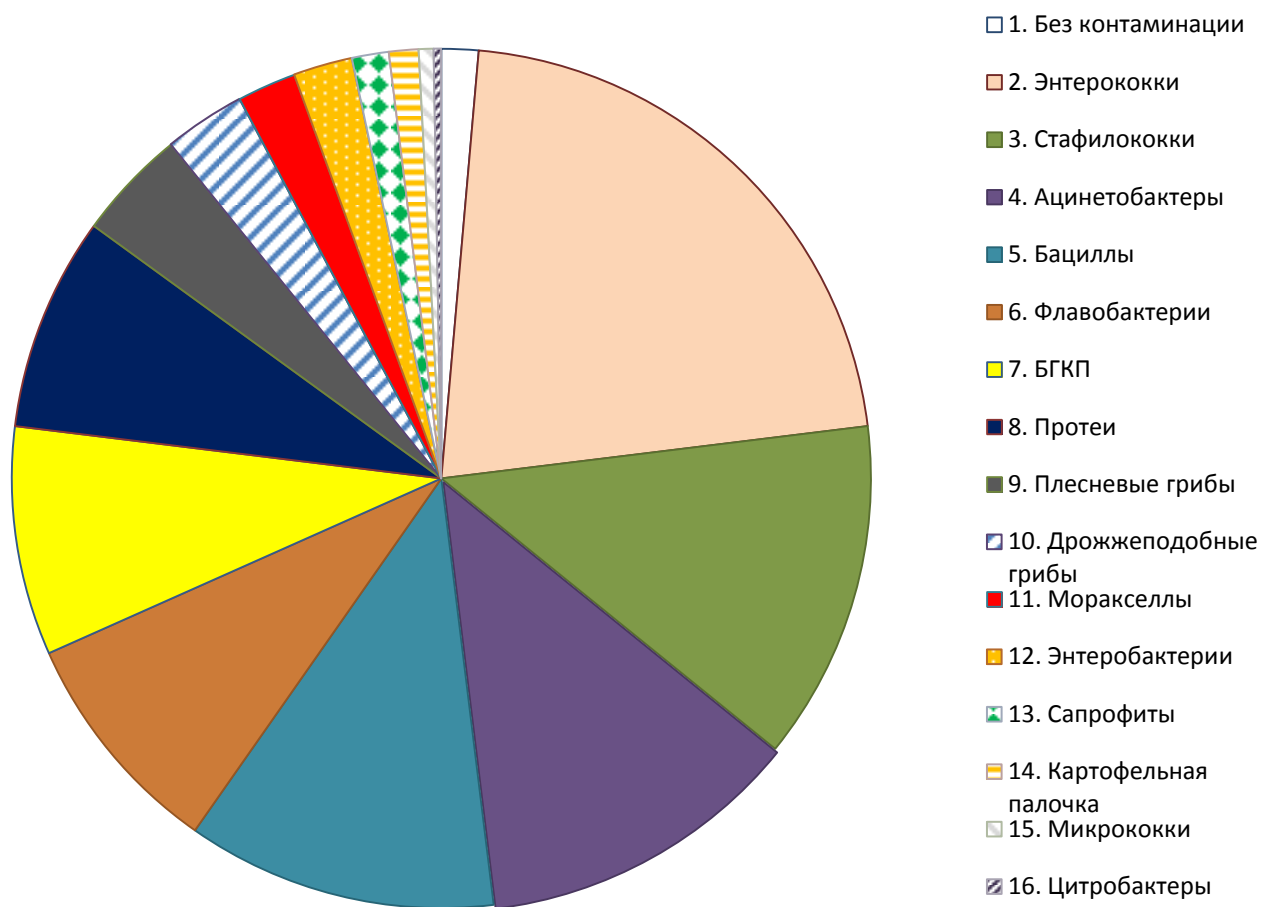


Рис. 7. Контаминанты комбикормов

а у погибающей рыбы кишечник был вишневого цвета, стенки нижнего отдела кишечника практически расплавлены. В посевах комбикорма преобладала картофельная палочка и единичные сапрофиты. Таким образом, при хранении комбикорма на складе картофельная палочка начала активно развиваться и вызвала токсичность корма, что и стало причиной массовой гибели рыбы (погибшую молодь собирали ведрами). Не вызывают заболеваний сапрофиты, микрококки, непатогенные кишечные палочки. В то время, как такие микроорганизмы, как протеи, энтеробактер, энтерококк, неферментирующие щелочеобразователи (ацинетобактерии и моракселлы), протеи и цитробактерии могут вызвать септические заболевания. При этом вирулентность каждого может усиливаться при выделении их в различных ассоциациях. Если в результате

технологических нарушений, несбалансированности комбикормов, неблагоприятных условий окружающей среды у рыбы снижена резистентность, у неё могут поражаться паренхиматозные органы, что может стать причиной развития бактериальной геморрагической септицемии. Комбикорма могут оказывать существенное влияние на микробиоценоз воды, в которой обитает рыба. Если корм не поедается рыбой и разрушается в воде, он привносит дополнительную микрофлору, ухудшающую микробиоценоз воды. В связи с этим усиливается бактериальный прессинг на рыбу, что отрицательно сказывается на её здоровье. В таких случаях микробиоценоз рыбы фактически отражает микробиоценоз воды (рис. 8-10).

Уровень обсеменённости комбикормов колебался от 40 до 5.200.000 КОЕ/г. Однако в зависимости от видового состава контаминантов даже при высоком уровне контаминации комбикорма не были токсичными, а при более низком - наоборот. Поэтому необходим постоянный строгий бактериологический контроль за качеством комбикормов, как отечественных, так и импортных. Это очень важно, поскольку контаминанты, обсеменяющие комбикорма, опасны и для человека. Такие бактерии, как энтерококки, ацинетобактеры, моракселлы могут



Рис.8. Микробиоценоз комбикорма



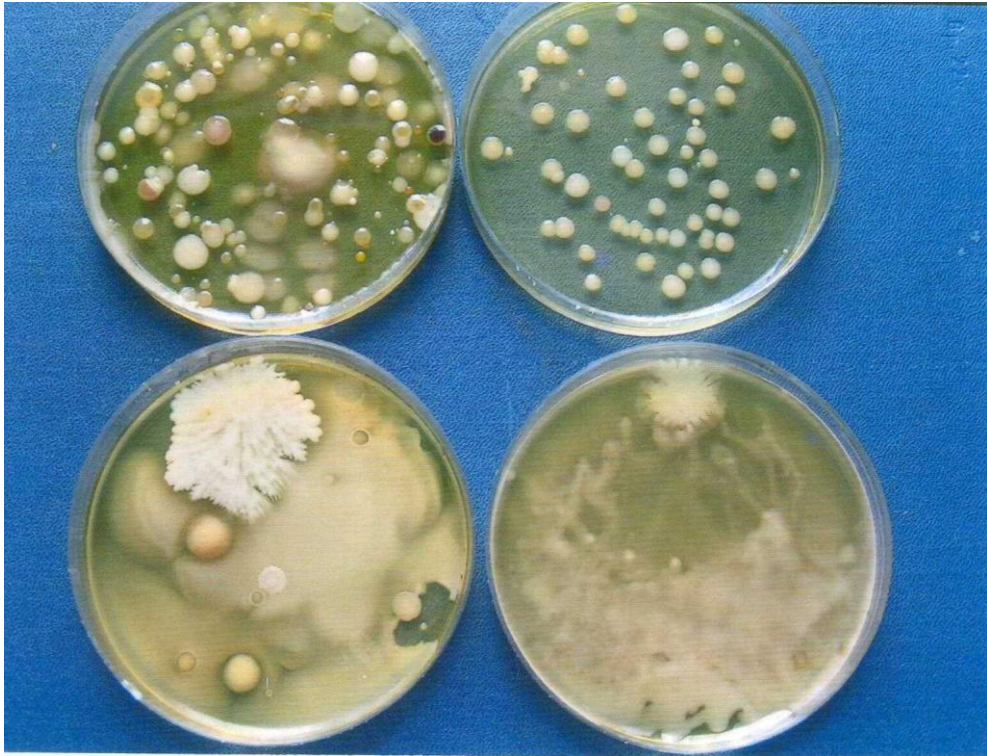


Рис.9. Микробиоценоз рыбы



Рис.10. Микробиоценоз воды

вызывать различные патологические процессы у людей.

Нами у одной сотрудницы института, занятой на производстве комбикормов, были выделены моракселлы вначале из гнойника на руке, а затем - гемокультуру моракселлы, у второй - из мочи. При этом обе длительное время безрезультатно лечились амбулаторно различными антибиотиками. При проверке чувствительности выделенных культур они оказались резистентными к 17 препаратам.

При развитии бактериальной геморрагической септицемии бывает очень трудно подобрать антибактериальный препарат, поскольку у разных представителей чувствительность весьма различается. И подавляя одних возбудителей, мы способствуем размножению других. В результате может возникнуть реинфекция. Чтобы избежать этого, иногда приходится параллельно с применением антибактериальных препаратов назначать курс пробиотиков, а после проведения курса антибиотикотерапии необходимо обязательно провести кормление рыбы с пробиотиком для повышения её резистентности.

## **5.6. Профилактика аэромоноза и бактериальной геморрагической септицемии рыб**

Одной из существенных проблем в инфекционной патологии рыб в пресноводной аквакультуре является проблема аэромоноза. Раньше эту болезнь связывали в основном с интенсификацией рыбоводства, приводящей к накоплению органики в водоёмах и, как следствие, к усилению прессинга на рыб бактериальной водной микрофлоры (экзогенный путь развития инфекции). В последнее время возрастающее значение приобретает другой - эндогенный путь возникновения и развития бактериальных заболеваний. При этом, в связи с экономическими трудностями, переживаемыми в период перестройки рыбоводными хозяйствами страны, развитие патологического процесса было обусловлено недостатком кормов, их низким качеством и высокой бактериальной обсеменённостью. Это вело к снижению резистентности организма, в результате чего разнообразная микрофлора, находящаяся в кишечнике рыб, проникала в кровяное русло, током крови разносилась по организму, инфицировала и повреждала паренхиматозные органы. В таких случаях часто развивался неспецифический септический процесс - бактериальная геморрагическая септицемия [191]. В результате бурного размножения бактерий рыба часто погибала. При этом применение антибиотиков не всегда давало положительный результат, что объясняется, с одной стороны, чрезвычайным разнообразием контаминирующей микрофлоры, высокой резистентностью её к широкому спектру химиопрепаратов и антибиотиков, а с другой - отрицательным действием некоторых антибактериальных средств на иммунную систему рыб [160, 161].

Выходом из такой ситуации могло стать применение препаратов, способных повысить иммуно-физиологический статус рыбы, сделать её менее чувствительной к возбудителям. Как показали исследования, к таким препаратам могут быть отнесены вакцины, иммуностимуляторы и пробиотики [47, 56, 66, 132, 139, 145, 148, 150, 153, 154, 156, 162, 167].

### 5.6.1. Методы специфической профилактики

В процессе разработки методов специфической иммунопрофилактики нами совместно с биохимиками Института биологии Карельского научного центра РАН были получены и испытаны цитоплазматическая вакцина ВЮС-2 и формолвакцина (бактерин) из высоковирулентного штамма *A.sobria* 77-18 [189, 190].

#### 5.6.1.1. Цитоплазматическая вакцина ВЮС-2

В апреле 1983 г. в прудовом рыбноводном хозяйстве Молдавии от белого толстолобика с некротическим поражением жабр, единичными разлитыми геморрагиями, язвами, ерошением чешуи и экзофтальмией параллельно с *Rhabdovirus carpio* были выделены аэромонады, идентифицированные в дальнейшем как *A.sobria*, образывавшие зону деполимеризации ДНК на ДНКазаре (Дифко) 3-7 мм. По просьбе работников лаборатории физиологии рыб для проведения экспериментальных работ нами 80 годовикам карпа было введено по 0,1 мл суточной бульонной культуры этого штамма. Для контроля были взяты две культуры аэромонад, выделенные в том же хозяйстве, но не обладавшие ДНКазной активностью. Уже через 1,5 - 2 часа у рыб, инъецированных ДНКазой положительными культурами, появились конвульсивные судорожные движения. К вечеру все 80 годовиков погибли. При этом клинических и патолого-анатомических признаков не отмечали, кроме резкого кровенаполнения паренхиматозных органов и сгустков крови в перикарде. Опыт удалось повторить только после 4-хкратного разведения бульонной культуры.

Из 90 рыб, инъецированных ДНКазоположительными культурами, через сутки погибло 14. У всех отмечено: вздутое брюшко, хорошо выраженная гиперемия у основания грудных и брюшных плавников и по средней линии между грудными плавниками. Другие признаки (гиперемия и выпячивание ануса,

кровоизлияния в глазном яблоке, экзофтальм и ерошение чешуи) были переменными. У карпов, погибавших на 2-е и 3-и сутки, в брюшной полости отмечали небольшое количество кровянистого экссудата, кишечник был переполнен кровянистой жидкостью. К оставшимся 40 годовикам карпа с ясно выраженной клинической картиной было подсажено по 40 шт. межродовых гибридов карпа с карасём и карпа с сазаном. Проведение этой биопробы преследовало две цели: 1) провести оценку выделенных культур при контактном способе заражения и 2) дать сравнительную оценку устойчивости двух указанных выше групп рыб. Опытным рыбам обеих групп на правом боку тонкой браншей глазного пинцета повреждали кожный покров - делали небольшой укол. Рыбу содержали в аквариуме при 20<sup>0</sup>С с постоянной проточностью и аэрацией, и ежедневным кормлением. На 4-е сутки появились клинические признаки - гиперемия кожных покровов, изъязвление в месте укола и ерошение чешуи у карпосазана. На 5-е сутки началась гибель. Хотя по общей жизнеспособности карпокараси ненамного превосходили карпосазанов (в обеих группах погибло к концу опыта 50.0% и 57.5% рыб соответственно) и клинические признаки у них были более выражены, но они быстро исчезали и гибель в этой группе прекратилась раньше.

Проведённые исследования показали чёткую корреляцию между вирулентностью в биопробе и ДНКазной активностью выделенных аэромонад, а также различную чувствительность к бактериальным агентам карпокарася и карпосазана. Различие в чувствительности к тем или иным патогенам, существующее между отдельными линиями, расами, породами рыб одного вида, необходимо обязательно учитывать в опытах по количественному определению вирулентности изучаемых патогенов [53]. Штамм *A.sobria* 77-18 характеризовался следующими свойствами.

**Морфологические и культуральные свойства.** При культивировании на МПБ при температуре 25-26<sup>0</sup>С штаммы 77-18 вызывают равномерное помутнение среды, образуют нежную, тонкую плёнку, бактерии палочковидной формы, концы закруглённые, грамотрицательные, некислотоустойчивые. Спор и цист не

образуют. На эритрит-агаре через 18-20 часов образуют колонии размером 1-1,5 мм, круглые, выпуклые с ровным краем (S-форма), кремовато-белые, полупрозрачные, вязкой консистенции. На среде Риппея-Кабелли через 18-20 часов аналогичные колонии желто-оранжевого цвета.

**Физиологические и биохимические свойства.** Хемогетерографы, используют в качестве источника углерода различные сахара и органические кислоты. Факультативный анаэроб. Сбраживает до кислоты и газа: маннит, сахарозу, мальтозу, галактозу, трегалозу, фруктозу. Не усваивает - рамнозу, салицин, сорбит, дульцит, ксилозу, раффинозу, d- и l- арабинозу, инозит, образует газ на среде с глюкозой и глицерином, замедленно сбраживает лактозу, растёт на цитратной среде Симмонса, не растёт на среде с мочевиной по Христенсену, вызывает редукцию нитратов, в реакции Фогеса - Проскауэра и с метиленовым красным отрицательный, резистентный к вибриостатическому агенту 0/129. Гидролизует желатин, крахмал, казеин, твины 20, 21, 40, 60, 80 и 85. Не растёт на среде с KCN, не обладает гиалуронидазой и плазмокоагулазой, обладает гемолизином, бутандиолдегидрогеназой, бетагалактозидазой, фенилаланиндезаминазой, дезоксирибонуклеазой (ДНКазой), образует индол.

В составе цитоплазматических белков штамма методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия выявлено до 40 белковых компонентов. На фракцию с молекулярной массой  $57 \pm 2$  кДа приходится от 17% и выше от суммы белков на электрофореграмме. Концентрация этого белка у авирулентного штамма 78-16 менее 10% от общей суммы белков (рис.11, 12).

Штамм 77-18 обладает вирулентными свойствами.  $LD_{50}$  -  $9,55 \times 10^7$ . Вызывает 100% гибель рыбы при внутримышечном введении в течение 3-4 часов без развития клинических признаков. С данным штаммом впервые получена положительная биопроба контактным способом.

Для того, чтобы выделить и более подробно изучить выявленные на электрофореграмме белковые фракции, бактериальную культуру выращивали на матрасах с эритрит-агаром, затем смывали изотоническим раствором хлорида



натрия и бактериальную массу центрифугировали при 1500 g в течение часа. Супернатант сливали, осадок промывали изотоническим раствором хлорида натрия и центрифугировали при тех же условиях. К полученному после центрифугирования осадку добавляли охлаждённый до  $-20^{\circ}\text{C}$  ацетон в соотношении 1:5 по объёму и оставляли на 1 час при  $-20^{\circ}\text{C}$ , периодически помешивая. Затем смесь центрифугировали 10 мин. при 1000 g, сливали ацетон и к осадку добавляли порцию чистого ацетона в прежнем соотношении и оставляли на 30 мин. при периодическом перемешивании. После этого смесь центрифугировали при 1000 g 10 мин., ацетон сливали, осадок высушивали на воздухе при комнатной температуре до полного исчезновения запаха ацетона при постоянном перемешивании, чтобы исключить образование комков. Ацетоновый порошок хранился при комнатной температуре в закрытой посуде до использования без потери биологических свойств. Этот порошок передавался биохимикам в Петрозаводский Институт биологии КНЦ РАН, где с ним проводили дальнейшую работу Л.П. Смирнов с коллегами [113].

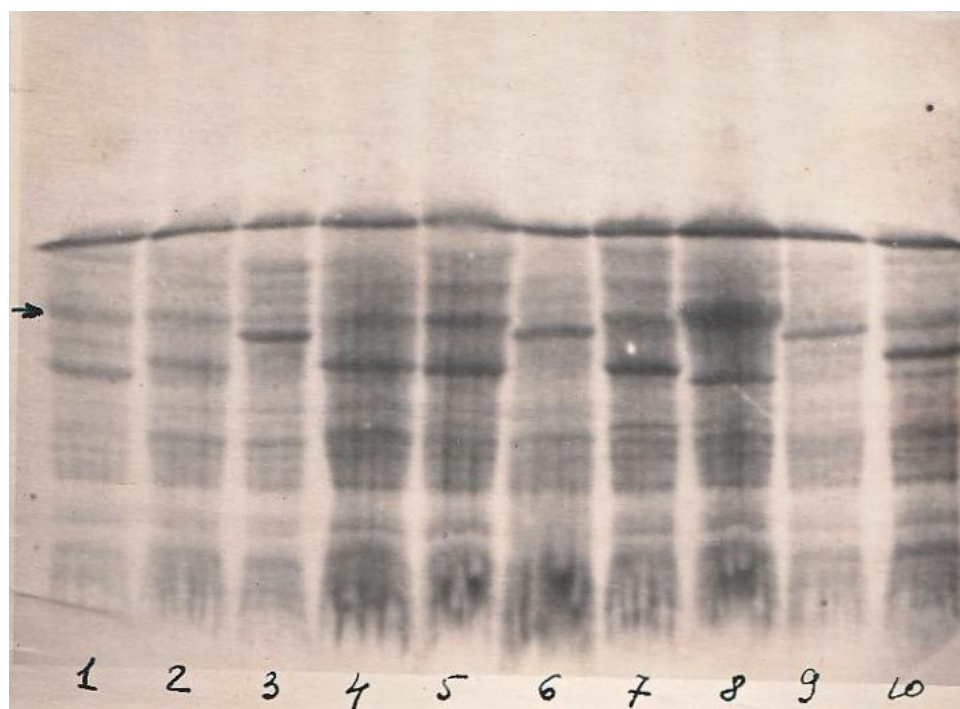


Рис. 11. Электрофореграммы штаммов аэромонад, выделенных от рыб и из воды в Молдавии (колонка 8 - *A. sobria* 77-18)



Рис.12. Электрофореграммы штаммов *A.sobria* 77-16 (А) и *A.sobria* 77-18 (Б)

Навеску ацетонового порошка (10 г) разбавляли 0.1 М трис-НСL буфером рН 7.2, содержащим 0.2 М КСl в соотношении 1:5 и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвейма с тефлоновым пестиком 3 мин. при 2000 об/мин. Гомогенат подвергали ультразвуковой обработке при 22 кГц 3 раза по 30 сек с минутным интервалом на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-2Г. Далее гомогенат центрифугировали при 105000 g 1 час. Супернатант, содержащий цитоплазматические белки микроорганизма, наносили на колонку К26/100, заполненную сефадексом Г- 100 и элюировали со скоростью 50 мл/ч трис-НСl



буфером с рН 7.2, содержащим 0.2 М КСl. Выходящие из колонки фракции регистрировали на абсорбциометре при 280 нм и собирали в коллектор фракций. Фракцию 2, имевшую молекулярную массу 60 кДа, отбирали и концентрировали до объема 0,5 мл методом ультрафильтрации на мембранных фильтрах Амикон У10. Сконцентрированный таким образом белок подвергали лиофильной сушке [187, 188].

При в/м инъекции карпам 50 мкг этой фракции у рыб клинические проявления не развивались, а биохимическая картина крови была аналогичная как при остром аэромонозе. При заражении этих рыб вирулентными аэромонадами ни одна из них не заболела. Тогда было принято решение полученный препарат под названием фракция №2 использовать в качестве антигена против гомологичного и гетерологичного штаммов аэромонад.

Двухлеткам карпа в/б ввели 50 и 70 мкг фракции 2. Предварительно её растворили в 0.5 и 0.7 мл раствора Хенкса и добавили равное количество адьюванта Фрейнда. Контролем служили карпы, которым ввели стерильный раствор Хенкса. Рыба содержалась в аквариумах при 20 - 21,5<sup>0</sup>С при постоянной проточности, аэрации и двухразовом кормлении. Через 15 дней всех карпов заразили смывом суточной агаровой культуры *A.sobria* 77-18. На вторые сутки после заражения на месте инъекции у всех рыб образовалась припухлость, более выраженная у рыб контрольной группы. К концу первой недели вся рыба контрольной группы погибла. Через 30 дней после прорыва припухлостей у рыб опытных групп началась эпителизация. Результаты эксперимента представлены в таблице 33.

Таблица 33 - Протективные свойства белковой фракции 2

Группа рыб	Доза антигена, мкг	К-во рыб	Заражающая доза	Погибли	Выжили
1 опытная	50	10	0.2	3	7
2 опытная	70	5	0.2	-	5
Контроль	-	10	0.2	10	-

Данные опыта свидетельствуют о том, что 15 дней после иммунизации - срок недостаточный для протективной защиты при дозе введения антигена 50 мкг.

После проведения этих экспериментов провели дополнительную электрофоретическую разгонку фракции 2, получили четыре белковые фракции, протективные свойства которых были проверены по отношению к гомологичному штамму 77-18. Двухлеткам карпа в/б ввели по 100 мкг каждой фракции. Через 30 дней карпам опытных и контрольной групп ввели в/м смыв суточной агаровой культуры 77-18. На вторые сутки после заражения у рыб контрольной группы отметили обширные припухлости с гиперемией на месте инъекции, на 3-и сутки - у рыб опытных групп, инъецированных 1, 3 и 4-й фракциями, на 4-е - у вакцинированных 2 фракцией, при этом у последних припухлости были менее выражены. На 4-5-е сутки произошла гибель рыб контрольной группы. Результаты опыта представлены в таблице 34.

Таблица 34 - Проверка протективных свойств белковых фракций 1-4

Группа	Фракция	К-во рыб	Доза протек. антигена, мкг	Заражающая доза, см <sup>3</sup>	Погибли	Выжили
1 опыт	1	20	100	0,2	7	13
2 опыт	2	20	100	0,2	2	18
3 опыт	3	20	100	0,2	4	16
4 опыт	4	20	100	0,2	11	9
Контроль	-	20	-	0,2	20	0

Таким образом, из 4-х проверенных фракций большей протективной активностью обладала фракция 2. Припухлости и изъязвления были менее выражены, развились с задержкой, погибло меньшее количество рыбы, рубцевание началось в более ранние сроки.

Для проверки протективного действия фракции 2 против гетерологичных штаммов аэромонад были отобраны аэромонады 404 и 145-103, выделенные из экссудата больных карпов. 40 двухлеткам карпа инъецировали по 100 мкг фракции 2 в изотоническом растворе хлорида натрия. 20 контрольным карпам в/б инъецировали стерильный изотонический раствор хлорида натрия. Через 40 дней

всех карпов в/м заразили 1,5-суточной культурой штаммов 404 и 145-103. Результаты опыта представлены в таблице 35.

Таблица 35 - Протективное действие белковой фракции 2 против гетерологичных штаммов аэромонад

Количество рыб	Заражение штаммом 404			Количество рыб	Заражение штаммом 145-103		
	Доза, см <sup>3</sup>	Погибли	Выжили		Доза, см <sup>3</sup>	Погибли	Выжили
20 опыт.	0,2	-	20	20 опыт	0,2	-	20
10 конт.	0,2	3	7	10 кон.	0,2	3	7

Результаты эксперимента показали, что в каждом опыте погибло по 3 контрольных рыбы. У карпов, вакцинированных фракцией 2, отмечали незначительные клинические признаки, которые через 2 недели практически исчезли, что подтвердило протективное действие фракции 2 и против гетерологичных штаммов аэромонад.

На основании полученных результатов была подана заявка и получен патент [188].

В 1990 году производственные испытания фракции 2 было решено провести в Вереженском рыбопитомнике Теленештского рыбокомбината в Молдавии. В этом рыбопитомнике имелась группа прудов (зимовальные, летне-маточные, мальковые, нерестовые) и инкубационный цех. Водоснабжение питомника осуществлялось из нагульного пруда «Вережены», который наполнялся паводковыми водами. В нём выращивали товарную рыбу.

По данным результатов бактериологических исследований, проведённых сотрудниками МолдНИРХС, во внутренних органах рыбы из нагульных прудов хозяйства было обнаружено значительное количество аэромонад различной степени вирулентности. Для производственных испытаний был выделен летне-маточный пруд №28 площадью 0,1 га.

Первоначально планировалось иммунизированную и контрольную рыбу (по 100 экз.) в течение трёх недель выдержать в аквариальной (для формирования иммунитета), а затем выпустить в пруд. Однако, в связи техническими неполадками (отключилось электричество) вся рыба погибла. Отбор новой

группы рыб был проведён в июне на фоне начинающегося заболевания. Рыбу отбирали по отсутствию клинических признаков, что не исключало попадания особей в продромальном состоянии. Всего было отобрано 200 экз. годовиков местного куболтского карпа второго поколения селекции (КВП) - со средней навеской 95 г, фресинета чешуйчатого (ФЧ) - 100 экз. со средней навеской 60 г, фресинета рамчатого (ФР) - 200 экз. со средней навеской 100 г. Из числа отобранных годовиков половина рыбы была иммунизирована фракцией 2 (опыт - **О**). Каждой рыбе в/б ввели 50 мкг препарата в 0,2 мл изотонического раствора хлорида натрия. Остальная рыба с красной меткой в чешуйных кармашках была посажена в пруд в качестве контроля (**К**). Отход одного карпа КВП с красной меткой без клинических признаков был зарегистрирован 7 июля. В сентябре пруд был полностью спущен, вся рыба обловлена и просмотрена. При клиническом осмотре учитывали наличие рубцов, свидетельствующих о перенесённом заболевании, и язв. Полученные результаты представлены в таблице 36.

Таблица 36 - Оценка протективного действия фракции 2 при иммунизации годовиков карпа в 1990 г. (Вереженский питомник)

Группа рыб	Опыт		Контроль	
	Наличие рубцов и язв, %	Средняя навеска, г	Наличие рубцов и язв, %	Средняя навеска, г
КВП	14,6	851	62,2	688
ФЧ	11,8	614	70,3	573
ФР	13,6	590	51,7	545

Меньшую навеску неиммунизированных карпов можно объяснить отрицательным влиянием уровня пораженности, т.к. у контрольной группы рыб, кроме рубцов, на поверхности тела были язвы различной величины.

В 1991 г. исследования были продолжены там же. 500 экз. годовиков карпа породных групп фресинет чешуйчатый и фресинет рамчатый были разделены на две группы (по 125 экз. каждой породной группы). Из них 250 рыб были провакцинированы аналогичным способом (опыт - **О**) и 250 экз. с красными

метками (контроль - К). Одновременно для контрольного бактериологического исследования по методу случайной выборки было отобрано по 10 годовиков без клинических признаков. У всех рыб внутренние органы были в норме, кишечник заполнен комбикормом.

В результате бактериологического исследования от семи карпов выделены различные микроорганизмы - единичные колонии 2 - 3 типов, в том числе от четырёх карпов из печени и селезёнки были выделены аэромонады. При изучении вирулентности по характеру ДНКазной активности три штамма выделенных аэромонад характеризовались как слабовирулентные (зона деполимеризации ДНК 1-2 мм), и восемь штаммов как вирулентные и высоковирулентные (зона деполимеризации ДНК 4 - 6 мм). Два штамма с ДНКазной активностью 1 - 2 мм идентифицированы как *A.punctata*, девять как *A.hydrophila*. Параллельно с годовиками аналогичным способом была проведена вакцинация трёхгодовиков карпа этих же породных групп по 100 экз.

В июне в Молдавии прошли ливневые дожди, приведшие к переполнению части прудов, в связи с чем рыба из других прудов попала в пруд №28. Обнаружили это по увеличению числа опытных рыб по сравнению с исходными в июле (таблица 37).

Таблица 37 - Результаты контрольных обловов годовиков и ремонтной группы карпа в июле

Группа рыб	Годовики				Ремонт			
	Всего отловлено	В том числе (абс./%)			Всего отловлено	В том числе (абс./%)		
		БКП	с язвками	с рубцами		БКП	с язвками	с рубцами
КФЧ	94	45/47,8	45/47,8	4/4,4	75	34/45,3	34/45,3	7/9,4
КФР	120	53/44,0	60/50,0	7/6,0	58	17/29,4	30/51,7	11/18,9
ОФЧ	140	82/58,6	49/35,0	9/6,4	68	54/79,4	7/10,3	7/10,3
ОФР	129	83/64,4	42/32,5	4/3,1	67	58/91,1	3/4,45	3/4,45

Так как контрольная рыба была с красными метками, то вся дополнительная рыба была автоматически отнесена к опытной, что в некоторой степени ухудшило

результаты (большой процент изъязвлений, меньше средняя навеска). Окончательный учёт годовиков был произведён в сентябре, 4-х годовиков ремонтно-маточной группы - в октябре (таблица 38).

Испытания, проведённые в условиях Молдавии, показали высокую эффективность протективного действия вакцинного препарата фракции 2 против бактериальной геморрагической септицемии, вызываемой подвижными аэромонадами и сопутствующей микрофлорой [168].

Таблица 38 - Результаты вакцинации годовиков и карпов ремонтно-маточной группы весной 1991 года при осеннем облове

Группа Рыб	Под-группа	Годовики			Четырёхгодовики		
		К-во рыб	С клин. приз.%	БКП, %	К-во рыб	С клин. приз.%	БКП, %
Фресин. чешуйч.	Контр.	125	68,7	31,3	100	77,7	22,3
	Опыт	125	19,2	80,8	100	22,0	78,0
Фресин. рамчат.	Контр.	125	66,6	33,4	100	59,8	40,2
	Опыт	125	15,1	84,9	100	37,0	63,0

В ноябре 1991 г. была проведена вакцинация ремонтной группы канальных сомов (400 шт.- **О**) в Приднепровском тепловодном хозяйстве на Украине, у которых отмечали септическое заболевание смешанной этиологии, сопровождающееся сильным поражением кишечника. Параллельно большая часть рыбы (250 тыс. шт.- **К<sub>н</sub>**) была инъецирована раствором левомицетина, часть рыбы (100 шт.- **К**) с красной меткой оставлена без обработки (контроль). Все три группы рыб содержались в одном бассейне. Уже в декабре начался отход единичных особей контрольной группы, инъецированной левомицетином (**К<sub>н</sub>**). С повышением температуры до 13,5<sup>0</sup>С отход в этой группе увеличился, начался единичный отход в группе чистого контроля (**К**). При окончательном учёте в декабре 1992 г. установлено, что в группе **К<sub>н</sub>** погибло 5,36% рыб, в группе **К** - 29,0%, в группе вакцинированных (**О**) - не погибла ни одна рыба.

Полученные результаты свидетельствовали о высокой эффективности препарата, который мог быть использован как вакцина для профилактики

аэромоноза и БГС весной и как стимулятор, повышающий специфическую резистентность рыбы осенью. Препарат высокоэкономичен, поскольку даже в микродозах (50 мкг/рыбу) даёт положительный эффект, независимо от массы рыбы [166].

Широкие производственные испытания фракции 2 были проведены в Молдавии, на Украине, поскольку там отмечалась наиболее сложная эпизоотическая ситуация в рыбоводных хозяйствах, но после того, как эти республики стали заграницей, по решению Главного управления ветеринарии были начаты работы по испытанию этого препарата в пределах Российской Федерации. Для проведения исследований были отобраны два прудовых хозяйства - Осёнка и Егорьевское Московской области и Рефтинское тепловодное садковое хозяйство (РТСХ) на Урале. Все хозяйства были неблагополучные по краснухе, Рефтинское хозяйство с 1979 г., рыбхозы Егорьевский и Осёнка - с 1989г. Несмотря на то, что диагноз «краснуха» с 1974 года был разделён на весеннюю виремию карпа, аэромоноз и псевдомоноз [65], тем не менее, «краснуха» продолжала регистрироваться в отчётности 3-вет.

Перед вакцинацией во всех хозяйствах в 1993-1995 гг. провели вирусологические и бактериологические исследования для уточнения эпизоотического фона.

Вирусологически было исследовано 150 мальков, 128 годовиков, 6 двухгодовиков и два производителя карпа. Результаты исследований были отрицательные.

Бактериологически было исследовано 54 пробы воды, патматериал от 474 экз. рыб разных возрастов, отобрано для дальнейшего изучения и идентификации 1098 штаммов аэромонад, так как было важно знать, на каком фоне проводится вакцинация, как меняется этиологическая структура аэромонад, их вирулентность.

Во всех хозяйствах при бактериологическом обследовании по характеру микробиоценоза воды и уровню контаминации рыбы установлена напряженная эпизоотическая обстановка. Наиболее неблагоприятная ситуация складывалась в

РТСХ, где на фоне экологического неблагополучия (загрязнения сточными водами Рефтинской ГРЭС и молокозавода) количество аэромонад в воде доходило до 80% и больше от числа выросших колоний. О высоком уровне органического загрязнения свидетельствовало и значительное количество *A. caviae*, санитарно-показательного микроорганизма в этиологической структуре аэромонад - 25,7% в рыбе и 19,8% в воде. Неудовлетворительная экологическая ситуация не только отрицательно сказывалась на состоянии рыбы, но и приводила к повышению вирулентности аэромонад. Об этом свидетельствовал тот факт, что более 50% из них обладал ДНКазной активностью выше 5 мм. Кормление рыбы некачественными кормами и в недостаточном количестве способствовало развитию патологических изменений алиментарного происхождения во внутренних органах. Из 474 обследованных рыб патолого-анатомическая картина в пределах нормы была отмечена у единиц. Такое состояние рыбы при любых стрессирующих условиях приводит к развитию неспецифического инфекционного процесса - бактериальной геморрагической септицемии. Выходом из такой ситуации могло стать применение препаратов, способных повысить иммунофизиологический статус рыбы, сделать её менее чувствительной к возбудителям. Как показали ранее проведённые исследования, к таким препаратам могут быть отнесены фракция 2 и иммуностимуляторы, в частности ридостин (РД) и полирибонат (ПР). Испытание последних вирусологами было проведено в РТСХ. Наличие разных аэромонад в сочетании с условно-патогенной и сапрофитной микрофлорой в паренхиматозных органах, высокий уровень содержания аэромонад в воде свидетельствовали о сложной эпизоотической ситуации в хозяйстве. При ухудшении условий содержания рыбы, резком повышении температуры воды могла создаваться угроза развития острой вспышки бактериальной геморрагической септицемии или аэромоноза, в связи с чем и было принято решение о проведении вакцинации в этих хозяйствах. В двух прудовых хозяйствах вакцинировали рыб маточного стада и старшей ремонтной группы, в РТСХ - вакцинацию проводили во всех возрастных группах, начиная с сеголетков, чтобы оценить длительность протективного действия, уточнить сроки



вакцинации. Опытную и контрольную рыбу отсаживали в разные рядом стоящие садки (РТСХ), нагульный летне-маточный пруд и зимовальный (рыбхоз Осёнка), зимовальный пруд (рыбхоз Егорьевский).

До последнего времени эффективность вакцины проверяли при весенней и осенней бонитировке по наличию клинических признаков и уровню бактериальной контаминации внутренних органов опытной и контрольной групп рыб. Изучение влияния вакцинации на иммунологический статус рыб начали проводить с 1995 года, используя в том числе замороженные сыворотки, отобранные от рыб опытной и контрольной групп в предыдущие годы.

Первую вакцинацию провели в апреле и сентябре 1993 г. в РТСХ (рис. 13), в апреле и октябре - в рыбхозе Осёнка, в октябре 1993 г. - в р/х Егорьевский. В мае 1994 г. в р/х Егорьевский вакцинировали ремонтную группу парского карпа. В июле вакцинировали группу сеголетков местного карпа, двухлетков японского цветного (Кои) и немецкого карпа в РТСХ. За время наблюдения ни одна группа рыб не была ревакцинирована. В общей сложности было провакцинировано 300 производителей и 348 двухлеток ремонтной группы в р/х Осёнка, 726 рыб местного ремонтно-маточного стада и 392 двухлетка парской породы в р/х Егорьевский, 2365 рыб разных возрастных и породных групп в РТСХ. Всего было провакцинировано 4131 экз. рыб. Результат весенней вакцинации учитывали осенью при полном облове рыбы. Каждую особь просматривали, учитывали рубцы и язвы на поверхности тела. При отсутствии поражений у рыб опытной и контрольной групп контролем служили бактериологические исследования паренхиматозных органов рыб обеих групп.



Рис.13. Проведение вакцинации карпов в РТСХ

### *Рефтинское тепловодное садковое хозяйство*

Рефтинское рыбноводное хозяйство эксплуатируется с 1976 г., имеет 1200 садков (3x4 м<sup>2</sup> каждый) общей площадью 16 тыс.м<sup>2</sup>, размещённых на 5 понтонных линиях водоёма-охладителя Рефтинской ГРЭС, являющегося частью Рефтинского водохранилища. Хозяйство несло хронические убытки от заболевания карпа аэромонозом с 1979 г. В 1991 году были начаты работы по вакцинации против аэромоноза ремонтных групп карпа. Наряду с оценкой защитного действия вакцины проводили наблюдения за развитием половой системы у иммунизированных рыб. Материалом для исследований послужили различные возрастные группы местного беспородного чешуйчатого карпа, выращенные в РТСХ в 1992-1993 гг.

Хозяйство имеет умеренный температурный режим (минимальная температура - -6-8<sup>0</sup>С, максимальная - +23 - +25<sup>0</sup>С), в котором вегетационный период длится около 5-5,5 месяцев. Вакцинацию рыб проводили в годовалом и двухгодовалом возрасте. Вакцинированных и контрольных карпов выращивали отдельно, но садки были расположены рядом, плотность посадки годовиков составляла 300 шт/садок, двухгодовиков - 100 шт/садок. Гибели рыб во время выращивания не было отмечено.

При обследовании хозяйства в июне 1994 г.одновременно с отбором проб патматериала и посевом воды для оценки эпизоотической ситуации был проведён учёт результатов вакцинации карпов ремонтной группы, вакцинированных весной и осенью 1993 г.

При клиническом осмотре вакцинированных двухгодовиков из 290 экз. у 6 (2,06%) в области левого грудного плавника были отмечены небольшие гиперемизированные участки с частичным разрушением эпидермиса.

Из 160 вакцинированных трёхгодовиков у трёх (1,7%) отмечено выраженное ерошение чешуи на боковой поверхности тела в области спинного плавника (1 рыба), диффузная гиперемия брюшка (1 рыба) и на боковой

поверхности в области брюшных плавников - локальная гиперемия (1 рыба). У одного карпа на боку обнаружена рваная рана (результат агрессивного поведения чаетк).

В контрольной группе из 300 рыб у 11 (3,7%) - многочисленные язвы различных размеров и локализации. От 5 контрольных двухгодовиков с язвами, 4-х вакцинированных трёхгодовиков с клиническими проявлениями, от 10 вакцинированных и 12 контрольных двухгодовиков без клинических признаков был взят патматериал для бактериологических исследований.

В посевах паренхиматозных органов от вакцинированных рыб без клинических признаков рост бактериальной флоры не выявлен. От рыб контрольной группы без клинических признаков выделялась сапрофитная флора и единичные аэромонады. В посевах от 7 двухгодовиков с клиническими проявлениями (от 5 контрольных и двух вакцинированных) обнаружен обильный рост сапрофитной флоры и аэромонад. От двух вакцинированных рыб (с ерошением чешуи и рваной раной на боковой поверхности) бактериальная флора не выделена.

Исследования воды показали, что уровень ОМЧ воды сбросного канала выше, чем на садковой линии (4700 КОЕ/мл и 640 КОЕ/мл соответственно). Но если в воде канала содержание аэромонад составляло 30,6% бактериальной флоры, то на садковой линии - 75,0%, что создавало дополнительную угрозу аэромонадной инфекции при травматизации и увеличении плотностей посадки. Все штаммы аэромонад обладали низкой и средней вирулентностью. Как и при предыдущих исследованиях преобладающим видом был *A.sobria*.

В сентябре при проведении бонитировки был проведён учёт протективного действия во всех группах. Из 275 двухлетков, вакцинированных в апреле 1993 г., у одного (0,36%) на боковой поверхности выявлена зарубцевавшаяся язва. Из 269 трёхлетков - у двух - рубцы, у одного - небольшая язвочка, у двух - гиперемия в области грудных плавников (1,85%). В то же время в садках с товарной рыбой количество пораженных рыб доходило до 20 - 40%, в связи с чем было срочно начато кормление комбикормом с окситетрациклином.

Среди годовиков и двухгодовиков, вакцинированных весной 1994 г., пораженных особей не выявлено.

В июле 1994 г. для проведения гистологических и иммунологических исследований и морфометрических измерений была проведена вакцинация 250 сеголетков местного карпа со средней навеской 59,2 г. Опытная (вакцинированная) группа карпов была помечена красным красителем между брюшными плавниками, контрольная - между грудными. Обе группы рыб были посажены в один садок. Морфометрические данные, полученные в апреле 1995 г., представлены в таблице 39.

Суммарное подведение результатов вакцинации в РТСХ приведено в таблице 40 [154].

Таблица 39 - Морфометрические данные карпов-двухлеток опытной и контрольной групп (вакцинация в июле 1994 г.) в апреле 1995 г.

Группа	№№	L (см)	l(см)	H (см)	P (кг)	Пол	Вес гонад (кг)
Опыт	29	66,0	65,0	21,0	4,0	♀	0,74
	30	66,0	57,0	22,0	4,4	♀	0,80
	31	59,0	50,0	20,0	2,9	♂	0,37
	32	58,0	48,0	19,0	2,7	♂	0,37
Контроль	33	45,0	39,0	15,0	1,3	♀	0,09
	34	43,0	36,0	17,0	1,5	♀	0,03
	35	48,0	41,0	16,0	1,9	♂	0,08
	36	44,0	37,5	13,0	1,1	♂	0,07

Условные обозначения: L - зоологическая длина всего тела; l - длина тела без хвостового плавника; H - наибольшая высота тела; P - вес рыбы; ♂ - самец; ♀ - самка

Таблица 40 - Оценка протективного действия вакцины ВЮС-2 в РТСХ

Группа рыб	Дата вакцинации	К-во рыб	Количество пораженных рыб по датам контроля, %										
			09.1993		06.1994		09.1994		04.1995		10.1995		
			О	К	О	К	О	К	О	К	О	К	
1	04.1993	343	-	8,4	-	3,7	1,9	40,0	1,5	Взяты на реализацию			
2	-//-	300	-	3,4	1,7	10,0	Взяты на нерест						
3	-//-	100	Взяты на нерест, клинические признаки не обнаружены										
3+	09.1993	210	Взяты на нерест, клинические признаки не обнаружены										
0+	07.1994	250					-	1,6	0,8	32,3	0,6	10,4	
1+ хромис.	-//-	505*					6,9	26,7					
1+ немец.	-//-						15,4	70,7					
1+ местн.	-//-	250					0,4	40,0	-	10,0	2,3	х	

**Примечание:** О - опытная группа рыб; К - контрольная группа рыб; х - взяты на реализацию; \* - двухлетки - хромисты и немецкие карпы из дальнейшего учёта исключены, т.к при учёте в сентябре 1994 г. их оказалось больше, чем посадили.

### *Прудовые хозяйства Егорьевское и Осёнка*

Прудовое хозяйство **Егорьевское**, согласно ветеринарной отчётности 3-вет, неблагополучно по аэромонозу с 1989 г. Несмотря на постоянное применение лечебных кормов с фуразолидоном, инъекции дибиомицина производителям, обработку хлорной и негашеной известью, эпизоотическая ситуация практически не изменялась и оставалась довольно напряженной.

При клиническом осмотре рыб ремонтно-маточного стада в октябре 1993 г. у 20% особей были отмечены язвы на разных стадиях рубцевания, у нескольких особей - прободные язвы.

Проверка бактериального фона и вирусологические исследования показали отсутствие вирусных агентов и в то же время высокое содержание высоковирулентных аэромонад как в рыбе, так и в воде (46,2% и 33,4% соответственно). Высокая контаминация внутренних органов сеголетков даже при отсутствии клинических признаков свидетельствовала о низкой резистентности организма рыбы. В таком состоянии они уходили на зимовку. В дальнейшем, при любых неблагоприятных условиях такая рыба могла стать причиной вспышки аэромонадной инфекции. Это же можно сказать и о производителях.

Для профилактики заболевания 725 экз. производителей и рыб ремонтно-маточной группы были провакцинированы фракцией 2.

В мае 1994 г. при весенней бонитировке производителей и ремонта из зимовального пруда 12, вакцинированных осенью, у 12 рыб были отмечены следы зарубцевавшихся язв, которые были и до вакцинации.

Из зимовального пруда 13 клинически было осмотрено 392 карпа ремонтно-маточного стада парской породы. При осмотре у 53 рыб (13,5%) отмечены единичные изъявления и повреждения кожного покрова на различных стадиях рубцевания. Все карпы этой группы были провакцинированы.

Бактериологическому обследованию было подвергнуто 9 рыб, отбракованных по рыбоводным показателям - 4 контрольных и 5 вакцинированных.

В посевах печени, почки и селезёнки одной контрольной и всех вакцинированных карпов рост бактериальной флоры не был обнаружен. В посевах от трёх контрольных рыб выявлен рост единичных колоний сапрофитной микрофлоры.

В посевах воды из пруда №12 Омч - 8200 КОЕ/мл, колонии 6 типов (бациллы, энтеробактерии, псевдомонады, неферментирующие бактерии и более 50% аэромонад с ДНКазной активностью от 0 до 3 мм зоны деполимеризации ДНК. В посевах воды из пруда №13 Омч - 10600 КОЕ/мл. Колонии 7 типов с преобладанием (75%) аэромонад с ДНКазной активностью от 0 до 5 мм. Преобладали в посевах авирулентные аэромонады (69,2%).

В течение вегетационного периода 1994 г. отхода рыбы с клиническими признаками аэромоноза не отмечали. При пересадке рыбы в зимовальные пруды в октябре специалистами рыбхоза особи с клиническими признаками аэромоноза среди карпов ремонтно-маточного стада не были выявлены.

По информации ихтиопатолога хозяйства протективное действие препарата сохранялось у карпов ремонтно-маточного стада на протяжении 5 лет, вплоть до выбраковки производителей по возрасту.

Рыбхоз **Осёнка** также на карантине по поводу аэромоноза с 1989 г. Проведённое в апреле 1993 г. вирусологическое обследование 62 годовиков дало отрицательный результат. При бактериологическом посеве патматериала от 20 двухгодовиков и 2-х четырёхгодовиков без клинических признаков рост бактериальной флоры не был выявлен. В посевах воды из водоподающего канала и зимовального пруда обнаружен рост сапрофитной флоры и единичных слабовирулентных аэромонад.

В этом хозяйстве весной было провакцинировано 50 четырёхгодовиков и 200 двухгодовиков ремонтной группы. В октябре дополнительно провакцинировано 250 производителей и 148 карпов ремонтной группы.

При клиническом обследовании рыб признаков инфекционных заболеваний не обнаружили. Контрольные бактериологические исследования двух вакцинированных и двух контрольных карпов показали, что из паренхиматозных



органов опытной рыбы бактериальная флора не выделялась, тогда как от невакцинированных карпов были выделены *A.sobria* с зоной деполимеризации ДНК 5 и 6 мм.

Для оценки эпизоотической ситуации было обследовано 37 рыб разных возрастных групп, из которых у 14 (37,8%) обнаружен рост бактериальной флоры, в т.ч. от 10 рыб выделено 13 штаммов аэромонад. Контаминированной оказалась только печень. В трёх случаях это были аэромонады различных видов, в пяти случаях - аэромонады и энтеробактерии, в остальных случаях - по 1-2 колонии аэромонад. Водные штаммы были представлены *A.sobria* и двумя биоварами, обладавшими высокой вирулентностью (зона деполимеризации ДНК 7 - 8 мм), в то время, как штаммы, выделенные от рыбы, давали зону деполимеризации ДНК от 0 до 7 мм.

Лето 1994 г. было в основном на территории Российской Федерации довольно прохладным и с большим количеством осадков, что в значительной степени снижало опасность возникновения аэромоноза. Тем не менее в ряде случаев на фоне повышения температуры возникли заболевания в Истринском хозяйстве со значительным отходом и в Рефтинском ТСХ среди товарной рыбы, что заставило работников хозяйства в срочном порядке применить лечебные корма. Следует отметить, что корм с фуразолидоном, приготовленный весной, работниками рыбхозов широко использовался в качестве профилактического средства, что давно запрещено применять в зарубежной практике. Тем более сомнительной являлась целесообразность его систематического применения, т.к. это проводилось без всякого бактериологического контроля. А насколько важным является такой контроль, свидетельствовало то, что в разных хозяйствах, карантинированных по «краснухе», эпизоотическая ситуация была совершенно различная, разный аэромонадный фон и различное их процентное содержание в микробиоценозе (таблица 41).

Полнее всего этиологическая структура аэромонад в РТСХ, где представлены все виды и биовары, за исключением *A.sp 1* - отсутствует в воде, и

Таблица 41- Этиологическая структура аэромонад, выделенных из рыбы и воды в р/х РТСХ, Егорьевский и Осёнка (1993-1995 гг.)

Рыб-хоз	Источ-ник выделе-ния	К-во проб	К-во куль-тур	Виды и биовары выделенных аэромонад										Всего видов/ биоваров
				A.hydro- phila	A.sob- ria	A.ca- viae	A.sp.	A.sp. 1	A.sp. 2	A.sp. 3	A.sp. 4	A.sp. 5	A.sp. 6	
1	Рыба	298	492	96	198	126	6	3	24	9	27	3	-	3/6
	Вода	28	228	9	87	45	6	-	9	15	36	18	3	3/6
2	Рыба	36	117	15	69	-	-	-	6	12	15	-	-	2/3
	Вода	11	123	36	57	21	-	-	-	9	-	-	-	3/1
3	Рыба	140	117	18	30	12	3	3	27	12	6	-	6	3/6
	Вода	15	21	12	3	-	-	-	6	-	-	-	-	2/1
Всего	Рыба	474	726	129	297	138	9	6	57	33	48	3	6	3/7
	Вода	54	372	57	147	66	6	-	15	24	36	18	3	3/6

**Примечание:** 1-РТСХ; 2-Егорьевский р/х; 3-р/х Осёнка

*A.sp.6* - в рыбе. Самый бедный микробиоценоз воды в Осёнках - два вида и один биовар, и в Егорьевском - три вида, один биовар.

По количеству выделенных культур по видам первое место занимают *A.sobria*, затем *A.caviae* и *A.hydrophila*. А по биоварам - из рыбы чаще всего выделялись *A.sp. 2*, затем *A.sp.4* и *A.sp.3*.

Из воды - виды представлены с такой же частотой, а биовары - *A.sp. 4*, *A.sp.3* и *A.sp.5*. Такая картина отмечалась, несмотря на систематическое использование фуразолидона, что ещё раз подчёркивает бессмысленность профилактического использования этого препарата. Систематическое использование антибиотиков приводит к появлению значительного количества капсулообразующих псевдомонад, отличающихся более высокой резистентностью к антибактериальным препаратам и изменяющих микробиоценоз в водоёмах в худшую сторону. Это приобретает ещё более отрицательное значение на фоне увеличивающегося загрязнения органическими веществами, промышленными и бытовыми стоками, о чём свидетельствует присутствие значительного количества *A.caviae*.

От одной рыбы из одного органа могут выделяться различные аэромонады, не говоря уже о разных органах, плюс к этому наличие и сапрофитной флоры, что свидетельствует о снижении резистентности организма, но не может быть диагностировано как аэромонад. Отсутствие бактериального роста при посеве патматериала от рыб с клиническими проявлениями ещё раз подтверждает, что возникновение клинических признаков, язвенных поражений, ерошение чешуи могут вызвать разные причины, и не последнюю роль в этом могут играть плотности посадки, недоброкачественные корма, загрязнение воды промышленными стоками и т.д. Но даже в таких, экологически неблагоприятных условиях, проведение вакцинации фракцией 2 сыграло положительную роль, повышая резистентность организма рыбы [ 139, 163, 164, 169, 177].

На основании полученных положительных результатов была подана заявка на получение патента на вакцину ВЮС-2 и получен положительный результат - патент [187].

### *Характеристика гаметогенеза по влиянию вакцинации ВЮС-2 на развитие воспроизводительной системы карпа*

Экспериментальные данные по влиянию вакцины ВЮС-2 показали не только положительный результат воздействия на жизненный цикл организма рыб в целом, но и на развитие половых клеток в ходе гаметогенеза. В связи с этим были проведены исследования по развитию половых клеток и половых циклов у вакцинированных и контрольных опытных групп на примере местного беспородного чешуйчатого карпа, выращенного в садках Рефтинского тепловодного садкового хозяйства.

Известно, что при выращивании на тёплых водах карп не только хорошо растёт, но и быстрее достигает половой зрелости. В условиях РТСХ самцы созревают на втором году, самки - на третьем году жизни. Процессы гонадо - и гаметогенеза у самок и самцов из-за ранней специализации клеток, особенностей протекания мейоза различаются как по морфологической картине строения гонад, так и по цитологическим преобразованиям. По этой причине материалы о развитии гонад при вакцинации у самок и самцов представлены отдельно. Перед отбором проб рыб взвешивали, коэффициент зрелости вычисляли как процентное отношение массы половых желёз к общей массе тела рыбы [50, 72, 170].

#### *Особенности роста и развития яичников у самок*

Сравнительный анализ по выращиванию контрольных и экспериментальных самок показал повышенный рост массы тела во всех возрастных группах вакцинированных карпов. Преимущество очевидно: для 1+, 2 и 2+ , соответственно, 21,3%, 58,4%, 99,6% (таблица 42).

Для вакцинированных двухлетних (1+) самок при сравнении с контролем - II стадия зрелости, характерна III стадия зрелости гонад, при которой осуществляется процесс вителлогенеза. В весеннее время в возрасте двухгодовиков завершается процесс вителлогенеза и у самок уже присутствует IV стадия зрелости гонад. Таким образом, вакцинированные самки достигают половой зрелости в двухгодовом возрасте, в то время как у контрольных самок -

в трёхгодовалом возрасте наблюдается переход в III стадию зрелости. Ооциты у вакцинированных особей в 1,5 - 2 раза больше, чем у контрольных самок. Контрольные самки отстают в развитии воспроизводительной системы, что указывает на положительный эффект воздействия вакцины ВЮС-2.

Для половозрелых трёхлетних вакцинированных самок в течение года характерно прохождение половых циклов. Из-за отсутствия нереста показаны временные половые циклы развития гонад в возрасте трёхлеток III-IV-VI- следы резорбции невыметанной икры и у трёхгодоваликов закономерное протекание II-III-IV - стадии зрелости (таблица 42).

Таблица 42 - Характеристика оогенеза у самок при выращивании в садках

Возраст, лет	Масса тела, г	Коэффициент зрелости, %	Стадия зрелости	Средн. размер ооцитов, мкм
Контрольные карпы				
1+	1393 ± 97,7	2,05 ± 0,6	II	272 ± 20,08
2	1472 ± 217,9	3,30 ± 0,8	II - III	588 ± 33,02
2+	1723 ± 358,1	4,55 ± 2,1	III	687 ± 130,9
Вакцинированные карпы				
1+	1690 ± 130,0	4,3 ± 0,60	III	561
2	2332 ± 116,04	10,27 ± 3,39	IV	905 ± 14,5
2+	3440 ± 130,3	4,78 ± 0,57	III-IV-VI	833 ± 105,6
3	3025 ± 974,8	2,24 ± 1,8	II-III-IV	565 ± 65,6

### ***Особенности роста и развития семенников у самцов***

В таблице 43 представлены материалы о росте и развитии семенников карпов контрольной и опытной групп. Преимущество по массе тела среди вакцинированных самцов не вызывает сомнения. Для карпов 1+, 2 и 2+ оно составляет 3,9%, 91,7% и 173,8% соответственно. Различия по стадиям зрелости среди контрольных и вакцинированных рыб не обнаружены. Самцы той и другой группы половозрелые, текущие, для гонад характерны волны сперматогенеза. Необходимо отметить более развитые семенники у вакцинированных рыб, коэффициент зрелости у них всегда выше.

Таблица 43 - Рост и развитие семенников у карпов  
при выращивании в садках

Возраст, лет	Масса тела, г	Коэффициент зрелости, %	Стадия зрелости
Контрольные карпы			
1+	1690 $\pm$ 80,8	1,00 $\pm$ 0,9	III - IV
2	970 $\pm$ 168,9	4,93 $\pm$ 0,7	III - IV - V
2+	1110 $\pm$ 97,7	5,13 $\pm$ 1,6	III - IV
Вакцинированные карпы			
1+	1757 $\pm$ 132,9	6,99 $\pm$ 0,9	III - IV
<u>2</u>	1860 $\pm$ 181,8	5,48 $\pm$ 0,7	III - IV - VI
2+	3040 $\pm$ 40,4	5,93 $\pm$ 1,07	IV
3	2450 $\pm$ 242,4	3,73 $\pm$ 0,3	III - IV - VI

Более эффективной является весенняя вакцинация, когда имеются более оптимальные условия для развития иммунитета у рыбы. Осенняя вакцинация при низкой температуре воды, так же, как и вакцинация на высоте пика развития заболевания, является менее эффективной. В первом случае отрицательное влияние оказывает низкая температура, при которой иммунная система не функционирует, во втором - уже слишком высокий прессинг бактериальных агентов и иммуногенное действие не у всех рыб успевает срабатывать. Проведённые гистологические исследования показали, что применение вакцины у ремонтного и производителей карпа, выращиваемых в садках, сопровождается ускоренным накоплением массы тела и массы гонад, как у самок, так и у самцов. Развитие половых клеток у рыб, подвергнутых воздействию вакцины, ускоряется. Особенно это заметно у самок. Половые клетки (ооциты) становятся более крупными, их размер увеличен в 1,5 - 2 раза. Гистологический анализ развития гонад и формирования половых клеток у самок и самцов не выявил отклонений от нормы. [47, 170].

### ***Испытание Ридостина и Полирибоната с вакциной ВЮС-2***

Существенным недостатком вакцины ВЮС-2, ограничивающим её широкое использование, это инъекционный метод введения. С одной стороны - этот метод наиболее эффективен, с другой - наиболее трудоёмкий.

Для разработки новых методов вакцинации необходимо большое количество препарата, получить которое в лабораторных условиях практически невозможно. Да и обеспечить хозяйства, имеющие ремонтно-маточное стадо, лабораторным препаратом мало вероятно. Учитывая высокое протективное действие препарата было принято решение о создании опытного производства вакцины ВЮС-2, которая представляла собой принципиально новый экологический препарат, лиофилизированный цитоплазматический белок, выделенный из высоковирулентного штамма *A.sobria*.

В результате первых вирусологических исследований в РТСХ, проведённых в феврале 1993 г., от годовиков карпа был выделен возбудитель ВВК, а при бактериологических - из паренхиматозных органов выделены разнообразные аэромонады в сочетании с сапрофитной микрофлорой, что свидетельствовало о сложной эпизоотической ситуации в хозяйстве. В связи с этим параллельно с проверкой эффективности протективного действия вакцины было принято решение провести производственную проверку «Временного наставления по применению ридостина и полирибоната для профилактики весенней виремии карпа».

Иммуностимуляторы Ридостин и Полирибонат были разработаны в Институте биологически активных веществ (НИКТИ БАВ) Минздравмедпрома РФ (г. Бердск). Это препараты соответственно двух- и одноцепочечной РНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Они применялись в медицинской и ветеринарной практике страны для профилактики и лечения ряда заболеваний. При профилактическом применении препараты эффективны против вирусных болезней рыб [132]. Механизм их действия заключался в стимуляции факторов

собственной неспецифической резистентности и в то время активно изучался на рыбе.

Помимо самостоятельного применения этих иммуностимуляторов, в порядке инициативы было проведено испытание их адьювантных свойств. Для этого двум группам рыб препараты вводили в/б, в предусмотренных «Наставлением...» дозировках, предварительно объединив их с вакциной, которую применяли в стандартной дозировке 50 мкг/рыбу; контролем служила интактная необработанная рыба. Для эксперимента отбирали клинически здоровых годовиков средней массой 65 г. Обработанная рыба была помечена и рассажена в два садка. Учёт результатов был проведён через 3,5 месяца (таблица 44).

В двух группах (ПР+ВЮС-2 в/б и контроль) установлено превышение фактического количества рыб на день учёта над количеством взятых в опыт, что произошло из-за отсутствия строгого контроля за подопытной рыбой и не позволило дать объективную оценку эффективности обработки. Можно говорить лишь о некоторой позитивной тенденции в группах обработанных рыб.

Таблица 44 - Результаты обработки годовиков карпа  
иммуностимуляторами и вакциной ВЮС-2

Группа	Метод обработки	К-во рыб	Осталось рыб экз.(%)	В том числе	
				Здоровых экз., (%)	Больных экз., (%)
РД	ГИ	250	188(90,0)	188 (83,6)	37 (16,4)
ПР	ГИ	250	189(75,6)	151 (79,9)	38 (20,1)
ВЮС-2	в/б	250	219(87,6)	197 (90,0)	22 (10,0)
РД	в/б	250	206(82,4)	170 (82,6)	36 (17,4)
ПР	в/б	250	194(77,6)	162 (83,5)	32 (16,5)
РД+ВЮС-2	в/б	250	238(95,5)	211 (88,7)	27 (11,3)
ПР+ВЮС-2	в/б	250	295(105,3)	251 (85,1)	44 (14,9)
Контроль	-	250	266(106,4)	214 (80,5)	52 (19,5)

**Примечание:** РД - ридостин, ПР - полирибонат, ГИ - гиперосмотическая инфльтрация



Для бактериологического исследования было отобрано по 5 экз. рыб из каждой группы. Патолого-анатомически у всех рыб отмечена анемичность, рыхлость, редуцированность паренхиматозных органов, почки и печень мажущей консистенции. У рыб с сильно выраженным экзофтальмом (К 6-7) в брюшной полости отмечали отсутствие экссудата, сильно выраженный спаечный процесс, все внутренние органы и кишечник представляли сплошной конгломерат. Как видно из таблицы 45, от контрольных рыб высевалась наиболее разнообразная микрофлора, включая сапрофитную. Обработка препаратами сузила спектр контаминантов до вирулентных аэромонад. Все препараты повышали защиту рыб от бактериальных инфекций. Эффект усиливался при переходе от ГИ к в/б введению.

У рыб, обработанных вакциной в чистом виде и в комплексе с иммуностимуляторами, контаминация внутренних органов бактериальной флорой вообще не была обнаружена. Результаты применения вакцины ВЮС-2 и иммуностимуляторов в тепловодном хозяйстве показали перспективность исследований в данном направлении. Проводившиеся в течение 3,5 лет наблюдения позволили сделать вывод, что в условиях тепловодного садкового хозяйства продолжительность защиты против аэромонада и ВВК после однократной вакцинации превышает два года. Возможно, в особо неблагоприятной ситуации при высоком содержании аэромонад в воде понадобится увеличить дозу вакцины. В тепловодных садковых хозяйствах, где отбор ремонтной группы начинается с сеголеток и рыба находится в ограниченном пространстве, вакцинацию целесообразно проводить на этом этапе, а через 2 года ревакцинировать рыбу. Но безусловно, чтобы владеть эпизоотической ситуацией, своевременно предупреждать возможность возникновения очагов смешанной аэромонадной инфекции, необходим систематический бактериологический контроль.

Таблица 45 - Результаты бактериологического обследования годовиков карпа через 3,5 месяца после обработки иммуностимуляторами и вакциной

Группа рыб	Патматериал	Микробиоценоз	Доля обсеменённых проб
РД, ГИ	1п,пч;2п,пч;3п	<i>A.caviae</i>	6/10
	3пч	<i>A.sobria</i>	
	4-5 п,пч	Роста нет	
ПР, ГИ	1п	<i>A.sobria</i>	5/10
	1п, 2п, 3пч	<i>A.caviae</i>	
	4пч	<i>A.sobria</i>	
	2пч,3п,4п,5п,пч	Роста нет	
ВЮС-2, в/б	1-5 п,пч	Роста нет	0/10
Контроль	1п	<i>A.sp.</i>	12/14
	1п, 2п,пч	<i>A.sobria</i>	
	3п,пч	<i>A.sobria, A.caviae</i>	
	4п,пч	Энтеробактерии	
	5п, пч	Роста нет	
	6-7 п,пч	<i>A.caviae</i> , НФЦ	
РД, в/б	1п,пч	<i>A.sobria, A.caviae</i>	4/10
	2 п,пч	<i>A.sp., A.caviae</i>	
	3-5 п,пч	Роста нет	
ПР, в/б	1 п,пч	<i>A.caviae</i>	2/10
	2-5 п,пч	Роста нет	
РД + ВЮС-2	1-5 п,пч	Роста нет	0/10
ПР + ВЮС-2	1-5 п,пч	Роста нет	0/10

Использованные иммуностимуляторы ридостин и полирибонат в дополнение к установленному антивирусному действию оказались эффективны и против бактериальной инфекции. Их применение вело как к качественному, так и к количественному изменению (снижению) бактериальной контаминации рыб [191].

### 5.6.1.2. Бактерин (формолвакцина)

Испытания, проведённые на Украине, в Молдавии, Московской области и на Урале, показали высокую эффективность вакцины ВЮС-2, однако широкое применение его было ограничено инъекционным способом введения, в связи с чем для групповой обработки рыб на основе этого же штамма *A.sobria 77-18* была разработана инактивированная формолвакцина (бактерин) [179].

Впервые в России бактерин для групповой обработки карпов, выращенных в прудовых условиях на тёплых водах Костромской ГРЭС и экспериментальной прудовой базе «Сунога» ИБВВ РАН, был испытан на карпах 1+. Бактерин был приготовлен в ВИЭВе из патогенного штамма *A.hydrophila E 3* для борьбы с аэромоназом карпа в тепловодных хозяйствах [66]. Иммунизацию проводили путём в/б инъекций и гиперосмотической инфильтрации. Индекс резистентности оценивали по результатам заражения рыб гомологичным штаммом. Оценка протективных свойств вакцины проводилась через 40 дней после иммунизации. Было установлено, что иммуногенный эффект вакцины был выше при индивидуальной вакцинации, чем при групповом методе. К сожалению, проверка эффективности вакцинации по отношению к гетерологичным штаммам аэромонад не проводилась.

Учитывая имеющуюся информацию по использованию бактериина против фурункулёза, йерсиниоза и вибриоза [297, 239, 229, 228, 238, 240, 241, 286], мы решили попытаться получить аналогичный препарат против аэромоназа, вызываемого подвижными аэромонадами [155]. Для получения маточной расплодки штамм бактерий *A.sobria 77-18* засеивали во флаконы ёмкостью 500 мл, наполненные на 3/4 МПБ и инкубировали в термостате при +25<sup>0</sup> С в течение 18 часов. Чистоту полученной культуры контролировали по характеру роста на чашках с эритритагаром, засеянных одновременно с посевом во флаконы, и в мазках из культуры, окрашенных по Граму или синькой Лёффлера.

Маточную расплодку бактерий засеивали на плотную среду эритритагар в стеклянных матрасах ёмкостью 1000 - 2000 мл и инкубировали при + 25<sup>0</sup> С в

течение 18 - 20 часов. Выросшие колонии смывали со среды охлаждённым до +4 - +5<sup>0</sup>С изотоническим раствором хлорида натрия (ИРХН). Отмывку взвеси бактерий производили ИРХН при трёхкратном центрифугировании на центрифуге РС-6 с бакетным ротором и объёмом стаканов 750 мл при 3000 об/мин в течение 90 мин. Полученный отмытый осадок ресуспендировали охлаждённым ИРХН, тщательно размешивали в центрифужном стакане, переливали в стеклянный флакон и вносили 0,5 - 0,75% 40%-го раствора формалина, закрывали ватно-марлевой пробкой с бумажным колпачком и на 18-20 часов помещали в термостат при +25<sup>0</sup>С.

После инкубирования в термостате взвесь тщательно перемешивали и делали высев из каждого флакона на 4 чашки с эритритагаром по 1 мл. Капли растирали шпателем и помещали чашки в термостат, а флаконы с бактериальной взвесью - в холодильник. Через 18 часов посеvy просматривали. Отсутствие роста характерных колоний свидетельствовало о стерильности препарата. При обнаружении колоний проводили дополнительную обработку формалином с последующим контролем стерильности.

Протективный эффект вакцинации оценивали в биопробе и выражали через индекс защиты [198] при заражении карпов штаммами гомологичных и гетерологичных аэромонад, выделенных от рыб. Об иммуногенности вакцины судили по титру циркулирующих в сыворотке крови рыб агглютининов.

Серия экспериментов, проведённых в 1999 г. в аквариальных условиях на годовиках карпа, позволила установить концентрацию бактериона, дающую наибольший иммуногенный эффект, как 10<sup>9</sup> микробных клеток в 1 мл рабочего раствора и оптимальную длительность обработки - 10 мин. Для вакцинации использовали метод гиперосмотической инфильтрации (ГИ) с последующим заражением рыбы суточной агаровой культурой вакцинного штамма. Защитный эффект, оказываемый бактерином при данных условиях, изменялся в зависимости от способа заражения, но был достаточно выраженным и коррелировал с иммуногенным эффектом. В контрольной группе при в/м заражении вся рыба погибла в течение 8 суток. Первые две рыбы отошли со слабо выраженными

клиническими признаками (небольшие припухлости и гиперемия в месте инъекции), у остальных рыб - обширные вздутия на боковой поверхности, ерошение чешуи и гиперемия поверхности тела, экзофтальмия (рис.13).

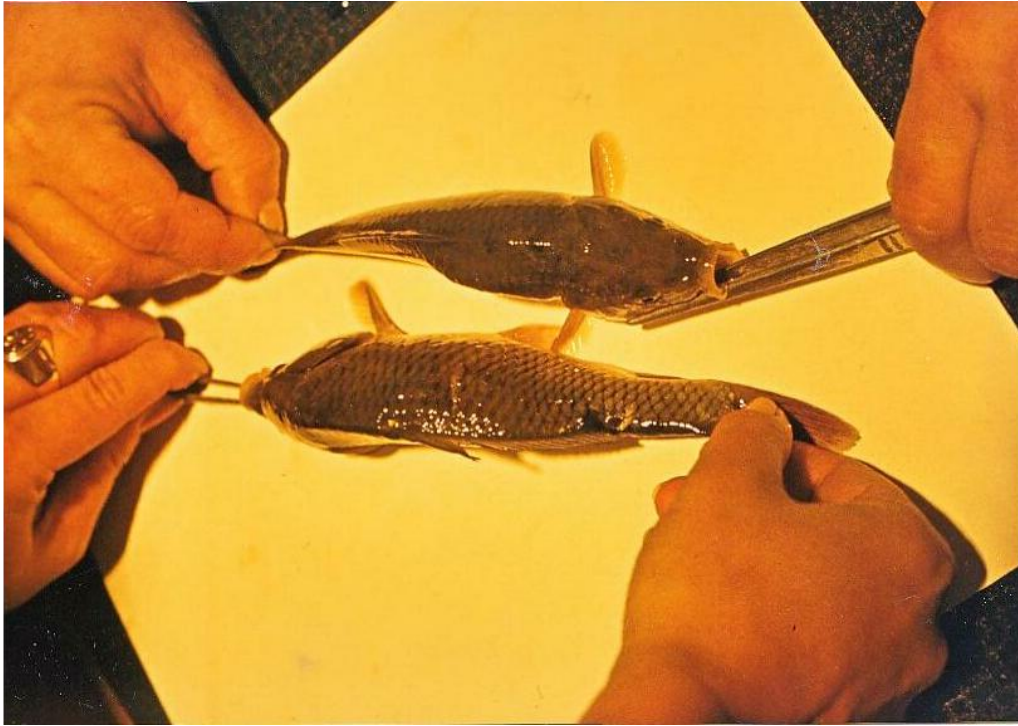


Рис. 13. Клиническая картина у карпов контрольной группы после заражения *A.sobria* 77-18

В брюшной полости - внутренние органы гидремичны, у последних погибающих рыб - разжижающий некроз почек. При в/б заражении погибло 16 рыб (80,0%) с менее выраженными клиническими признаками: гиперемия поверхности тела, точечные геморрагии на брюшке и у основания грудных плавников. В то же время поражение внутренних органов было более выражено.

В опытной группе при в/б заражении вся рыба на протяжении периода наблюдения вела себя активно. При в/м заражении из 20 рыб погибло 13 (65,0%), хотя клинические признаки были менее выражены, чем в контроле. Припухлости, образовавшиеся в месте инъекции, постепенно исчезли, тогда как в контрольной

группе они вскрылись на второй неделе и на их месте образовались обширные изъязвления.

Вторая серия опытов была проведена на рыбе, полученной осенью при пересадке из нагульных прудов и содержащейся в аквариумах при температуре 19-20<sup>0</sup>С. Остальные условия содержания рыбы и обработки бактерином были аналогичны вышеуказанным. После вакцинации рыбы через две недели провели отбор крови, через 10 дней после этого - провели заражение методами в/б инъекции и скарификации, как менее грубыми.

В контрольной группе клинические признаки появились уже на следующий день после заражения, на 4-й день - началась гибель, продолжавшаяся в течение 6-ти дней. На 14-й день началась эпителизация изъязвлённых поверхностей. В последующие 10 дней гибель рыбы не наблюдалась. Всего в контрольной группе погибло 13 рыб, зараженных методом в/б инъекции (65,0%) и 17 - в группе скарифицированных (85,0%).

В опытной группе при в/б инъекции не погибла ни одна рыба. На 9-й день после заражения у одной рыбы появилась точечная (0,6 мм) геморрагия в месте инъекции, на 11-й - у второй. После 14-го дня и эти признаки исчезли. У рыбы, зараженной методом скарификации, клинические признаки появились на 7-й день, отмечались до 16-го дня и были более выраженными. При окончательном учёте результатов на 20-й день после заражения у 11 рыб никаких клинических признаков не отмечено, у 6-ти - незначительная гиперемия, у 3-х - гиперемия и лёгкая припухлость в зоне нанесения инокулята [170, 35] (таблица 46).

Таблица 46 - Иммуногенная активность и протективное действие бактериона при различных способах заражения рыбы

Группа рыб	К-во шт.	Метод заражения	Количество погибших	Индекс защиты, %	ТАА
Опыт	20	в/м инъекция	13	35	1:8 - 1:64
Контроль	20		20		1:2 - 16
Опыт	20	в/б инъекция	0	100	1:128 - 1:1024
Контроль	20		13		1:32 - 1:256
Опыт	20	скарификация	0	100	1:128 - 1:1024
Контроль	20		17		1:32 - 1:256

Изучение уровня образования агглютинирующих антител у рыб этой серии опытов показало весьма различные результаты. Исследование 28 -ми сывороток крови карпов опытной группы и 10 -ти контрольной после зимовки выявило титры антител 1:8 - 1:64 и 1:2 - 1:16 соответственно. От второй группы карпов - из нагульных прудов исследовано 29 опытных и 10 контрольных сывороток. Титр антител составил 1:126 - 1:1024 и 1:32 - 1:256 соответственно.

Оценивая уровень активности иммунной системы карпов этих двух групп, следует отметить, что после зимовки, при более низкой температуре воды, титры агглютинирующих антител оказались ниже, чем у карпов из нагульных прудов. Поэтому напрашивался вывод о целесообразности вакцинации рыбы перед посадкой в зимовальные пруды. Учитывая необходимость проверки длительности защитного действия бактерина и его уровня после зимовки, в 2000 г. был проведён эксперимент в производственных условиях ЭПО «Якоть» [171].

При весенней бонитировке в 2001г. по уровню контаминации внутренних органов были получены следующие результаты: в опытной группе роста нет у 70% рыб, рост единичных колоний - у 26,7%, умеренный рост - у 3,3%. Если рассматривать по срокам вакцинации, то у рыб, вакцинированных в мае, отсутствие роста и рост единичных колоний - по 50%. У рыб, вакцинированных в июле - соответственно 80% и 20%, у рыб, вакцинированных в сентябре - 80% и 10%, рост умеренного количества колоний - у 10%.

Благодаря полученным экспериментальным данным, в 2001 г. были начаты работы по оценке протективного и иммуногенного эффекта применения бактерина в экспериментально-производственных условиях с проведением процедуры вакцинации параллельно со стандартными рыбоводными мероприятиями.

Работу проводили на прудах ЭПО ВНИИПРХ «Якоть». Исследования велись общепринятыми ихтиопатологическими, микробиологическими и иммунологическими методами (реакция микроагглютинации). Для статистической оценки достоверности различия средних величин, полученных

при учёте реакции агглютинации, использовали t-критерий Стьюдента при уровне значимости 95% [101].

В мае 2001 г. в два нагульных пруда были посажены 4 группы двухгодовиков карпа: в пруд №1 группа **O-VII**, вакцинированная в июле 2000 г., и группа **O-IX**, обработанная бактерином в сентябре 2000 г., в пруд №2 - рыба, вакцинированная в мае 2001 г., перед посадкой в нагул **O-V** и контрольная группа **K**. Все карпы были без клинических признаков, в удовлетворительном состоянии.

В первой серии исследований весной 2001 г. был изучен эффект осенней и летней вакцинации после зимовки рыбы. Титры агглютинирующих антител сыворотки крови определялись по отношению к двум антигенам: *A.sobria* 77-18 и *A.sobria* 119-19 п (вирулентный штамм, выделенный от рыбы в одном из рыбхозов Московской области). О защитном эффекте судили по патолого-анатомической картине и бактериальной обсеменённости паренхиматозных органов. Полученные результаты представлены в таблице 47.

Таблица 47 - Характеристика протективного и иммуногенного действия бактериона после зимовки в 2001 г.

Группа рыб	Кол-во, штук	С патолог. изменен.	С контам. паренх. орган.	Титр агглютинирующ. антител	
				A.77-18	A.119-19 п
O-VII	10	0	4	1:16	1:32
O-IX	10	0	8	1:32	1:32
K	12	12	12	1:32	1:32

Анализ результатов реакции агглютинации не выявил существенных различий между средними значениями титров в опытных и контрольных группах. По литературным данным, интенсивность синтеза антител напрямую зависит от температуры воды и наличия в организме достаточных ресурсов для энергетического и пластического обмена [67, 78]. Но в то же время результаты показывают на достаточно высокую способность карпов опытных групп по сравнению с контрольной к элиминации бактерий и поддержанию гомеостаза



внутренней среды организма. Из паренхиматозных органов карпов групп О-VII и О-IX выделялись комплексы *A.sobria*, *A.hydrophila*, *A.caviae*, *Acinetobacter calcoaceticus*. Все аэромонады имели ДНКазную активность от 3 до 8 мм, т.е. были вирулентные и высоковирулентные. Таким образом, разница между эффективностью работы иммунной системы рыб опытных и контрольной групп определяется ещё большей трудностью разрушения и выведения из организма более вирулентных бактерий [82].

В сентябре 2001г. при облове нагульных прудов были проведены исследования карпов О-V, О-VII, О-IX и К групп. Уровень агглютининов оценивался по отношению к тем же антигенам, что и весной. Результаты приведены в таблице 48.

Таблица 48 - Характеристика протективного и иммуногенного действия бактерина после летнего нагула карпов

Группа рыб	Кол-во, шт.	С контам.паренхим.орг.	Титр агглютинир. антител	
			А. 77-18	А. 119-19 п
О-VII	10	4	1:16	1:32
О-IX	10	2	1:16	1:32
О-V	10	8	1:32	1:32
К	10	6	1:32	1:16

В течение всего рыбоводного сезона, несмотря на достаточно высокие значения ОМЧ (до 4500 КОЕ/мл) и преобладание в микробиоценозе вирулентных и высоковирулентных (ДНКазы от 3 до 7 мм) аэромонад, клинические признаки аэромоноза и других заболеваний не выявлены.

Статистически достоверных различий между средними титрами антител в опытных и контрольных группах обнаружить не удалось. Значительная микробная обсеменённость паренхиматозных органов, главным образом сапрофитами, и наличие в них патологических изменений вне зависимости от группы, из которой взята выборка, характеризует интенсивность воздействия агрессивных факторов окружающей среды на макроорганизм при недостаточном возрастании иммунных факторов. Это объясняется нарушением технологии

выращивания рыбы, которая более месяца не получала комбикорм, а плотность посадки карпов в пруды была стандартная для интенсивного рыбоводства.

В 2002 г. было продолжено изучение в экспериментально-производственных условиях ЭПО «ВНИИПРХ» «Якоть» иммуно-протективных свойств бактериина против БГС рыб. Условия проведённых экспериментов были максимально приближены к производственным, т.е. рыбоводный процесс в экспериментальных прудах не отличался от принятых технологических норм.

В два нагульных пруда №4 и №5 было посажено 4 группы годовиков карпа. В каждом пруду 60% рыб было помечено красителем в чешуйные кармашки и провакцинировано бактерином в транспортировочной ёмкости в течение 20-30 мин. при перевозке в нагульные пруды. Они составили опытные группы карпов прудов №4 и №5 (**О-4** и **О-5**), остальные 40% годовиков - группы контроля (**К-4** и **К-5**).

В ходе опыта были проведены иммунологические, микробиологические и патолого-анатомические исследования карпов при разгрузке зимовалов (до мечения и вакцинации опытных групп) и перед обловом нагульных прудов в конце августа. Группы **О-5** и **К-5** исследовались дополнительно в конце октября. Определение титров агглютинирующих антител проводилось по отношению к двум антигенам: *A.sobria* 77-18 и высоковирулентному штамму *A. sobria* 300-32n, выделенному при микробиологическом исследовании от рыбы, используемой в опыте. Данные, полученные в ходе работ, приведены в таблице 49.

При анализе данных, полученных 21 августа, обнаружены статистически достоверные различия ( $P \leq 0,05$ ) между средними титрами антител, специфичных к *A.sobria* 77-18 опытной и контрольной групп пруда № 4. Достоверных различий средних титров агглютининов к *A.sobria* 300-32 п в этих же выборках не установлено. Различия между средними по выборкам пруда №5 статистически не существенны.

Таблица 49 - Характеристика иммуногенных и протективных свойств  
бактерина в течение рыбоводного сезона 2002 г.

Группа рыб	К-во, шт.	Дата исследова- ний	С патологией внутренних органов, шт.	С контамина- цией внутр. органов, шт.	ТАА	
					77-18	300-32 п
После зимовк	54	28.04	23	12	1:32	1:8
О-4	20	21.08	8	7	1:64	1:16
К-4	20		20	7	1:32	1:8
О-5	20		8	7	1:32	1:8
К-5	20		16	6	1:16	1:8
О-5 <sub>1</sub>	20	22.10	0	0	1:512	1:4
К-5 <sub>1</sub>	20		20	0	1:64	1:2

На получение достоверных результатов по 5-му пруду могло повлиять значительное поражение гельминтами годовиков карпа, которыми пруд был зарыблен. В полости кишечника 52 % обследованных весной годовиков обнаружены *Khavia sinensis*, интенсивность инвазии составила 1-28 шт. на рыбу. При последующих обследованиях гельминтов не обнаруживали, но наличие инвазии на момент вакцинации могло снизить интенсивность синтеза антител, не причиняя ущерба потенциалу их продукции.

Учитывая вышеизложенные факты, 22 октября проведены дополнительные исследования рыб из 5-го пруда. Средний титр агглютининов к *A.sobria* 77-18 в опытной группе **О-5<sub>1</sub>** статистически достоверно ( $P \leq 0,01$ ) превысил таковой в контрольной **К-5<sub>1</sub>**. Нам не удалось обнаружить различий в уровне контаминации внутренних органов вакцинированных и контрольных карпов.

От обследованных рыб выделялись единичные вирулентные и высоковирулентные аэромонады. Однако прослеживались чёткие закономерности при анализе данных патолого-анатомического вскрытия. Количество карпов со значительными изменениями во внутренних органах в контрольных группах заметно превосходит таковое количество в опытных. Показательно то, что патологические изменения у подавляющего большинства рыб были представлены

выраженным спаечным процессом в брюшной полости - признаком перенесённого воспалительного процесса.

Несмотря на высокие значения ОМЧ воды опытных прудов (до 6480 КОЕ/мл) и значительный удельный вес в микробиоценозе вирулентных аэромонад, вся рыба была без клинических признаков на протяжении всего времени наблюдения. Тот факт, что внедрившиеся в карпов патогены обладали значительной вирулентностью, но были малочисленны, несмотря на высокие показатели ОМЧ воды, и в ряде случаев не оказывали повреждающего действия, достаточно положительно характеризует протективный потенциал бактериина.

В 2003 г. работа по изучению протективного и иммуногенного действия бактериина была продолжена на прудах ЭПО «Якоть», где провели вакцинацию и ревакцинацию группы, вакцинированной весной 2002 г., карпов и вакцинацию карпов на базе садкового тепловодного участка «Нептун» НТЦ «Селекцентр» в Тверской обл.

Весной иммунный статус рыб, вакцинированных в 2002 г. показал, что к антигену 77-18 (гомологичный штамм) титр агглютинирующих антител в опытной группе составлял 1:256, к антигену 55-15п (гетерологичный штамм) - 1:64; в контрольной - 1:16 и 1:8 соответственно. При проверке уровня контаминации у вакцинированных карпов рост бактериальной флоры не выявлен. У рыб контрольной группы в 30% случаев роста нет, в 50% - рост единичных колоний, в 20% - умеренный и сливной.

Методом прямой иммерсии 200 экз. двухгодовиков карпа были ревакцинированы при температуре воды 11<sup>0</sup>С и вместе с вакцинированными и контрольными группами карпа посажены в пруд.

Кроме титра агглютинирующих антител, при иммунологических исследованиях определяли уровень завершённого фагоцитоза и БАСК. Результаты иммунологических исследований карпов на ЭПО «Якоть», проведённые осенью 2003 г. при облове нагульных прудов, приведены в таблице 50.

Таблица 50 - Характеристика иммунологических показателей карпов контрольной (**К**), вакцинированной (**В**) и ревакцинированной (**Р**) групп на ЭПО «Якоть»

Группа рыб	Уровень завершен. фагоцитоза	БАСК, %	Титры антител	
			A.sobria 77-18	A.sobria 55-15 п
К	44,9 ± 5,8	26,6 ± 1,3	1:128	1:64
В	65,0 ± 4,6	50,5 ± 0,5	1:2048	1:128
Р	73,6 ± 4,0	55,5 ± 0,7	1:4096	1:256

На рыбоводном участке «Нептун» у карпов постоянно отмечали язвенные поражения. При обследовании 10 годовиков без клинических признаков у одного экземпляра роста бактериальной флоры не отмечено, у семи - рост единичных колоний и у двух - умеренно-обильный рост бактериальных колоний.

500 годовиков, провакцинированных при температуре воды 16<sup>0</sup>С, и 500 экз. годовиков контрольной группы были посажены в 2 рядом стоящих садка. При окончательном учёте результатов в сентябре у карпов опытной группы клинические признаки не были обнаружены. У 15% рыб контрольной группы отмечены изъязвления на поверхности тела, у 30% - гиперемия брюшка. Из паренхиматозных органов карпов опытной группы в 20% проб выделены единичные бактерии, в контрольной группе было контаминировано 40% обследованных рыб. Иммунологические показатели вакцинированных (**В**) и контрольных (**К**) групп карпов приведены в таблице 51.

В конце рыбоводного сезона средняя масса рыб в опытной группе была 1540 г, в контрольной - 1305 при начальной средней массе тела 220 г. [162].

Таблица 51- Иммунологические показатели двухлеток карпа рыбоводного участка «Нептун», вакцинированной (**В**) и контрольной (**К**) групп

Группа рыб	Уровень завершен. фагоцитоза, %	БАСК, %	Титры антител	
			A.sobria 77-18	A.sobria 55-15 п
К	16,3 ± 3,5	-	1:256	1:64
В	30,2 ± 3,2	62,6 ± 1,6	1:2048	1:256

С 2004 г. опытно-производственные испытания вакцины были начаты в тепловодном садковом хозяйстве ЗАО «Черепетский рыбхоз», где у карпов постоянно регистрировали язвенные поражения. Рыбу вакцинировали на садковой линии в лотке ейского типа с аэрацией при температуре воды 17<sup>0</sup>С. После обработки рыбу сразу возвращали в садки. Вакцинированные карпы были посажены в лотки 41 и 43. Группы контроля находились в садках 39 и 47 на той же садковой линии [162].

Предварительные исследования 10 рыб из каждого садка установили при наличии язвенных поражений на поверхности тела контаминацию внутренних органов у 58,8 - 66,7% аэромонадами, энтеробактериями и *Acinetobacter baumannii*.

Исследования иммунологических показателей проведены через 24 и 71 день после вакцинации рыбы, данные приведены в таблице 52. Результаты контрольного облова в декабре представлены в таблице 53.

Полученные в сентябре низкие иммунологические показатели карпов можно объяснить длительным недостаточным кормлением рыб в связи с отсутствием комбикорма. По данным В.Р. Микрякова (1991) [78], у голодающих карпов интенсивность антителообразования снижается в 8,4 раза.

Таблица 52 - Иммунологические показатели карпов  
ЗАО «Черепетский рыбхоз»

Дата отбора проб	Группы рыб	№садков	БАСК, %	ТАА	
				77-18	220-5
28.09.2004	До вакцинации	41	1	1:4	1:4
		43	0	1:2	1:2
<b>ВАКЦИНАЦИЯ ОПЫТНЫХ ГРУПП</b>					
21.10.2004	Опыт (24 дня после вакцинации)	41	77,00 $\pm$ 1,80	1:128	1:32
		43	71,00 $\pm$ 1,40	1:128	1:32
	Контрольные группы	39	56,00 $\pm$ 5,20	1:8	1:16
		47	59,00 $\pm$ 3,20	1:16	1:16
7.12.2004	Опыт (71 день после вакцинации)	41	45,25 $\pm$ 1,94	1:64	1:16
		43	40,25 $\pm$ 0,90	1:64	1:16
	Контрольные группы	39	5,25 $\pm$ 1,94	1:8	1:8
		47	16,25 $\pm$ 1,10	1:8	1:4

Таблица 53 - Характеристика рыбоводных показателей и уровня контаминации рыб опытных и контрольных групп

Садок	Средняя масса, г	Прирост, г	Рыб с язвами, %	Уровень контаминации			Микробиоценоз
				роста нет	единич.	обильн.	
41-О	529	97	4,92	13	6	1	Ac.baumannii, БГКП
43-О	556	82	25,2	17	2	1	Ac.baumannii
39-К	358	47	9,48	12	8	-	Ac.baumannii
47-К	536	56	43,5	19	1	-	Ac.baumannii

Аэромонады не были выделены ни в одном случае. Интересно отметить, что несмотря на то, что в садке 47 было самое большое количество рыб с язвенными поражениями, в 19 пробах из 20 рост бактериальной флоры не выявлен, что ещё раз подтверждает мнение, что язвы не всегда свидетельствуют о наличии инфекционного процесса.

Кроме вышеуказанных исследований, в условиях аквариальной были проведены испытания для определения влияния температурного фактора на эффективность вакцинации. В пластиковые 90-литровые ёмкости посадили по 10 двухгодовиков карпа без клинических признаков, средней массой 287,5 г. Рыба содержалась при постоянной проточности, аэрации и дополнительной фильтрации воды.

Предварительные исследования 10 карпов из этой же выборки показали, что их внутренние органы находятся в нормальном состоянии и не контаминированы бактериальной микрофлорой.

В течение пяти дней начальная температура воды в ёмкости была снижена с 20<sup>0</sup> до 12<sup>0</sup>С. У всех рыб были взяты пробы крови для иммунологических исследований. Затем при температуре 12<sup>0</sup>С карпов в трёх ёмкостях обрабатывали бактерином 15 мин, после чего температуру воды в течение семи дней повысили до 20<sup>0</sup>С. С третьего дня повышения температуры карпы начали получать

полноценный гранулированный комбикорм АК-1ФС по поедаемости. Через 9 дней после вакцинации для оценки иммунологических свойств бактериина у карпов всех групп была взята кровь. Через 30 дней после забора крови вся рыба была подвергнута в/м заражению суспензией вирулентных аэромонад. Заражающая доза составила  $4,7 \times 10^8$  кл/рыбу. Каждая из трёх опытных групп рыб была заражена определённым штаммом аэромонад. Группа  $O_1$  - *A.sobria* 70-23n (гетерологичный),  $O_2$  - *A.sobria* 77-18 (гомологичный),  $O_3$  - *A.sobria* 70-24n (гетерологичный). Рыба групп контроля ( $K_1$ ,  $K_2$  и  $K_3$ ) заражались соответствующими штаммами. Гибель рыбы началась через три дня после заражения. У погибающих карпов наблюдались кровоизлияния в глазном яблоке, гиперемия вокруг анального отверстия, припухлости в месте инъекции. При патолого-анатомическом вскрытии в брюшной полости отмечали наличие кровянистого экссудата и отёк паренхиматозных органов. Позже стали регистрировать локальное ерошение чешуи и обширное гнойное расплавление ткани в зоне введения бактериальной суспензии. Подобную картину наблюдали практически у всех карпов контрольных групп и более, чем у половины опытных. При вскрытии погибших рыб наблюдали гипотрофию и гидремию печени и почек, наличие выраженного спаечного процесса. К 12.11.2004 г. гибель рыб в опытных группах прекратилась и началось активное заживление поражений, развившихся в месте инъекций. Гибель рыб в контрольных группах продолжалась до 23.11.2004 г. Последние погибшие экземпляры имели выраженный геморрагический синдром, сопровождавшийся образованием язв. К 26.11.2004 г. у всех карпов, выживших в опытных группах, место инъекции было покрыто образовавшейся чешуёй, отличавшейся от нормальной более мелкими размерами и тёмной окраской. Регенерация разрушений ткани в месте инъекции у контрольных рыб протекала заметно медленнее - чешуя только начинала восстанавливаться. Данные иммунологических исследований до и после вакцинации, индекс защиты и иммунологические показатели группы рыб, выживших после заражения, приведены в таблицах 54, 55 и 56.



Таблица 54 - Иммунологические показатели карпов групп К,О и К<sub>1</sub>

Группа рыб	Температура воды, °С	Уровень за- верш.фаго- цитоза, %	БАСК, %	Титр агглютинирующих антител		
				A.sobria 77-18	A.sobria 70-23 п	A.sobria 70-24 п
К	12	47,4±2,2	31,1±0,6	1:256	1:128	1:2
О	20	86,2±1,5	47,4±0,9	1:4096	1:256	1:8
К <sub>1</sub>	20	78,2±2,2	43,0±1,8	1:512	1:512	1:2

Таблица 55 - Индексы защиты бактерины при заражении карпов гомологичным (77-18) и гетерологичными (70-23 и 70-24) штаммами аэромонад

Группа рыб	Заражающий штамм	Заражено рыб,экз.	Погибло рыб,экз.	Индекс защиты, %
О <sub>1</sub>	A.sobria	10	2	50
К <sub>1</sub>	70-23	10	4	
О <sub>2</sub>	A.sobria	10	4	60
К <sub>2</sub>	77-18	10	10	
О <sub>3</sub>	A.sobria	10	2	67
К <sub>3</sub>	70-24	10	6	

Таблица 56 - Иммунологические показатели рыб опытной (О<sub>1</sub>) и контрольной (К<sub>1</sub>) групп, выживших после экспериментального аэромоноза

Группа рыб	Уровень завершенного фагоцитоза, %	БАСК, %	ТАА		
			A.sobria 77-18	A.sobria 70-23 п	A.sobria 70-24 п
О <sub>1</sub>	73,2±2,6	78,0±0,3	1:262144	1:8192	1:64
К <sub>1</sub>	39,4±4,1	24,0±1,8	1:16	1:4096	1:16

Полученные результаты положительно характеризуют протективное действие бактерины. Следует учитывать, что индексы защиты получены при максимально жестком способе заражения - в/м инъекции высоковирулентных

аэромонад. Несколько большая защита одного из гетерологичных штаммов по сравнению с гомологичным объясняется тем, что бактериин был приготовлен из штамма, который к тому времени в течение 20 лет хранился на искусственной питательной среде и не пассировался через рыбу.

В связи с небольшим количеством рыб, выживших в группах  $O_2, K_2$  и  $O_3, K_3$ , заключительные иммунологические исследования были проведены с группой рыб  $O_1, K_1$  (таблица 56). Анализ полученных данных указывает на то, что значения всех исследованных показателей достоверно выше, чем в контрольной ( $P < 0,01$ ).

У рыб, вакцинированных после перенесённого экспериментального аэромоноза, наблюдалось сильное повышение уровня БАСК (на 165%), которое можно объяснить появлением специфичных ко всем трём использованным антигенам антител в высоких титрах (до 1:262144). Отмечалось незначительное (на 18%) снижение уровня завершённого фагоцитоза.

В контрольной группе наблюдалось сильное снижение всех неспецифических иммунных показателей (почти в 2 раза). Значительное увеличение претерпевает только интенсивность синтеза антител, специфичных к заражающему штамму *A.sobria 70-23n*. Данную ситуацию можно объяснить тяжело перенесённым заболеванием, сильно истощившим ресурсы организма, необходимые для продукции иммунных факторов, и возникшими физиологическими дисфункциями. В то же время антитела, продуцированные во время борьбы с инфекцией, сохранились в высоких титрах.

Динамика иммунного ответа, наблюдаемая в эксперименте, положительно характеризовала иммуногенные свойства бактериина и соответствовала имеющимся в литературе данным [263, 246].

Испытания бактериина в аквариальной и хозяйствах различного типа показали достаточно высокий уровень его иммуногенности и протективного действия. В связи с этим возникла необходимость проведения более широких производственных испытаний, для чего потребовалось изготовление препарата промышленным способом. В отделе противобактериальных препаратов ФГУ ВНИТИБП (Щелково) были начаты исследования по отработке методики и

техники глубинного культивирования аэромонад. Культивирование проводили в лабораторном ферментёре АНКУМ-2М, оснащённом системами автоматического контроля и регулирования основных технологических параметров (рН, рО<sub>2</sub>, еН, температура), с использованием оптимизированного по содержанию минеральных компонентов бульона Хоттингера. В результате были приготовлены две партии формализованного бактериина: первая - с культуральной жидкостью (бульоном) и вторая - в виде отмытой ИРХН и ресуспендированной массы бактериина [105, 130].

В первую очередь было проведено испытание обоих препаратов на токсичность, для чего рыбам было введено в/м по 0,5 мл испытуемых препаратов, содержащих  $1 \times 10^9$  микробных клеток. За время наблюдения (в течение 20 дней) ни одна рыба не погибла.

Испытания иммуногенности опытных партий промышленной вакцины были проведены на двухлетках карпа средней массой 350 г. При определении исходного уровня контаминации и иммунологических показателей было установлено, что из печени и почек у всех рыб выделялись единичные бактерии группы кишечной палочки. Уровень бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК) составил  $19,2 \pm 6,7$ , титр агглютинирующих антител (ТАА) к антигену *A.sobria* 77-18 - 1:2 - 1:32. Опытная рыба была рассажена в пять аквариумов (4 опытных и один контрольный) с проточностью и аэрацией по 12 экз.в каждый. Температура воды была 7-8<sup>0</sup> С, которую постепенно подняли до 10-12<sup>0</sup>С. Через 10 дней после адаптационного периода рыба была провакцинирована погружением в раствор препарата: в двух опытных аквариумах - бактерином с культуральной жидкостью (I-II), в двух - бактерином, отмытым ИРХН (III-IV), пятая группа - контрольная (V) была обработана аналогичным способом только питательным бульоном. Концентрация клеток бактериина была 10<sup>9</sup>/мл, экспозиция обработки - 15 - 20 мин.

Вакцинацию рыбы проводили при низкой температуре, чтобы выяснить эффективность бактериина в условиях, при которых производят пересадку рыбы весной из зимовальных прудов в нагульные. Через 20 дней после вакцинации

провели отбор проб крови для иммунологических исследований у рыб контрольной и опытных групп. Результаты иммунологических показателей и уровня контаминации рыб обеих групп показали, что под действием бактериона как с бульоном, так и без него произошло увеличение БАСК и ТАА (таблица 57).

Таблица 57 - Иммунологический статус рыб после вакцинации опытными партиями промышленного бактериона

Группа рыб	Уровень контаминации, % от общего числа рыб			БАСК	ТАА
	роста нет	единичный	умеренный		
I	34,0	33,0	33,0	53,8 <sub>+10,6</sub>	1:64-1:512
II	72,2	11,1	26,7	53,3 <sub>+3,2</sub>	1:128-1:512
III	<b>94,4</b>	<b>5,6</b>	<b>0</b>	<b>63,2<sub>+3,2</sub></b>	<b>1:256-1:1024</b>
IV	<b>100,0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>67,6<sub>+8,8</sub></b>	<b>1:512-1:2048</b>
V	0	20,0	80,0	38,2 <sub>+6,7</sub>	1:16-1:256

**Примечание:** I - II - группы, вакцинированные бактерином с культуральной жидкостью; III - IV - группы, вакцинированные бактерином, отмытым ИРХН; V - контрольная группа

Для определения протективного действия промышленной партии бактериона, отмытого ИРХН, было проведено экспериментальное в/м заражение рыб опытной и контрольной групп 3-х суточной бульонной культурой *A.sobria*.

Первые клинические признаки у рыб в контрольной группе появились уже на 2-е сутки. Суммарные данные по результатам эксперимента в контрольной и опытной группах рыб (в %) представлены в таблице 58.

Таблица 58 - Протективное действие промышленного бактериона в эксперименте

Группа рыб	К-во рыб	Клинические признаки (%)				
		БКП	язвы	фурункулы	припухлости в месте инъекции	красные точки в месте инъекции
Опыт	20	54,2	4,2	8,3	12,5	20,8
Контр.	20	8,7	30,5	30,4	30,4	-

При подведении итогов установлено, что рыба опытной группы за три месяца содержания на поддерживающем режиме кормления увеличила свою навеску на 40,8 г, а рыба контрольной группы - на 9,5 г.

Проведённые исследования позволили положительно оценить протективную эффективность и иммуногенные свойства бактериина. Использование этого препарата позволило усилить способность рыб противостоять бактериальному прессингу из окружающей водной среды и выживать в изменённых экологических условиях интенсивно эксплуатируемых рыбоводных прудов. Кроме того, за счёт общей нормализации физиологических процессов препарат способен повышать устойчивость рыб к стрессирующим факторам, играющим роль пускового механизма в развитии БГС. Использование при контроле эпизоотической ситуации по БГС рыб иммуно-физиологических методов позволит рыбоводным предприятиям наращивать выпуск экологически чистой пищевой рыбной продукции [172]. Результаты экспериментальных и опытно-производственных испытаний формолвакцины свидетельствуют об её эффективном иммуногенном и протективном действии. У иммунизированных рыб увеличивается содержание антителсинтезирующих клеток, возрастают показатели фагоцитарной активности лейкоцитов и бактерицидных свойств сыворотки крови. Формолвакцина может быть использована для повышения специфической резистентности рыбы к возбудителям бактериальной геморрагической септицемии (аэромоназа) в рыбоводных хозяйствах разного типа [103, 104].

### 5.6.2. Пробиотики

Эффективность развития пресноводной аквакультуры зависит от многих факторов: оптимальных условий выращивания посадочного материала, качества используемых комбикормов, соблюдения технологических процессов, санитарно-гигиенического режима водной среды. К сожалению, эти требования не всегда выполняются, культура рыбоводства оставляет желать лучшего. Если используются некачественные корма, нарушается кислородный и температурный режим, рыба постоянно подвергается воздействию различных стресс-факторов, создаются благоприятные условия для развития инфекционного процесса, обусловленного ассоциацией микроорганизмов (при этом не обязательно патогенных), а чаще даже комплексом сапрофитных бактерий, которые контаминируют организм рыбы в результате снижения её резистентности. Попытки применения в таких случаях антибактериальных препаратов приводят к временному улучшению, затем снова наступает ухудшение. Часто этот процесс может протекать без клинических проявлений, рыба не теряет товарный вид, но экономические потери имеют место, так как энергетический потенциал рыба затрачивает на борьбу с контаминантами, а не на увеличение массы тела. Во избежание таких потерь и для профилактики инфекционных заболеваний в настоящее время в рыбоводстве широко используются пробиотические препараты [116, 148, 153, 180, 253, 309] .

В медицине и ветеринарии для повышения иммуно-физиологического статуса организма и особенно после курса лечения антибактериальными препаратами давно применяют пробиотики, в состав которых входят различные микроорганизмы, обладающие высокой антагонистической активностью, принимающие участие в процессах пищеварения, имеющие целый комплекс витаминов, аминокислот и ферментов. Они, активно борясь с патологической микрофлорой, способствуют развитию нормофлоры. Это колибактерин, ацидофильное молоко «Наринэ», лактобактерин, бифидумбактерин, бификол, ацилакт и др. Одной из наиболее важных функций пробиотиков является

продуцирование комплекса биологически активных веществ, способных нейтрализовать токсины бактерий, опасные метаболиты [122, 313]. Более широкое применение в рыбоводной практике с 90-х гг. имеет Субалин на основе *Bacillus subtilis* [193, 221, 245]. Раньше применяли препарат производства ОАО «Днепрфарм» (Украина) [129], в настоящее время его производит ОАО «ВекторЕвро» (Москва) под названием СУБ-ПРО [114, 115, 118, 157, 175, 180, 181]. После получения положительных результатов при экспериментальных исследованиях провели производственные испытания на Черепетском тепловодном хозяйстве Тульской области, Егорьевском, Лотошинском, Клинском и Бисеровском рыбоводных хозяйствах Московской области. Уже после недельного кормления комбикормом с Субалином отмечали нормализацию клинических и патолого-анатомических проявлений у рыб: исчезала сухость кожных покровов, тело рыбы было равномерно покрыто блестящей слизью, рубцевались язвы, паренхиматозные органы приобретали нормальный цвет и консистенцию, стенки кишечника были упругие, не рвущиеся. Существенно снижалась контаминация внутренних органов, несмотря на значительный прессинг водной микрофлоры. В Лотошинском рыбхозе при ОМЧ в пруду с годовиками карпа, прокормленными Субалином, было 38 тыс КОЕ/мл. При бактериологическом исследовании ни от одной рыбы не были выделены бактерии, в то время как годовики, не получавшие Субалин, все были контаминированы разнообразной микрофлорой. Положительные изменения в эпизоотической ситуации отмечали во всех хозяйствах, где соблюдались сроки и длительность использования Субалина. Как показали иммунологические исследования в ряде хозяйств, применение Субалина положительно влияло на повышение бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК) и титра агглютинирующих антител к аэромонадам [18, 20, 68, 148, 153].

В Бисеровском рыбхозе в пруд №3 были посажены годовики и крупные двухгодовики карпа, в пруд №1А - крупные двухгодовики карпа при повышенной плотности посадки. В обоих прудах рыба получала комбикорм с Субалином. Контролем служил так называемый Министерский пруд с крупными

и средними карпами, используемыми для платной рыбалки и получавшими тот же корм без пробиотика. В конце сезона от рыб из этих прудов была взята кровь для иммунологических и патматериал для бактериологических исследований. Была проведена проверка титра агглютинирующих антител к антигену *A. sobria* 77-18, уровень контаминации паренхиматозных органов и степень приживаемости пробиотка в кишечнике (табл. 59).

Таблица 59 - Титр агглютинирующих антител у рыб из прудов №№ 3, 1А и Министерского Бисеровского рыбхоза в сентябре 2000 г.

Объект	Титры агглютинирующих антител											
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
Пруд № 3 (годовики + Субалин)	К-во рыб	3	1	1	2	3	1					
	%	27,2	9,1	9,1	18,3	27,2	9,1					
Пруд № 3 (двухгодовики+ Субалин)	К-во рыб	1						2	3	2	1	1
	%	8,3					16,6	16,6	25,3	16,6	8,3	8,3
Пруд №1 А + Субалин (высо- кая плотность)	К-во рыб	1		1	2	1	2				1	
	%	12,5		12,5	25,0	12,5	25,0				12,5	
Министерский пруд (без пробиотика)	К-во рыб	2	1	2	2	1	1	3		2	1	
	%	13,3	6,7	13,3	13,3	6,7	6,7	20,0		13,3	6,7	

Как видно из таблицы 59, наиболее высокие титры антител у крупных двухгодовиков из пруда № 3, посаженных вместе с годовиками. У них не выявлена контаминация внутренних органов, более высокие результаты по набору массы тела и в кишечнике выявлена приживаемость Субалина у семи рыб из 10 обследованных. У годовиков отмечен рост бактериальной флоры в посевах паренхиматозных органов (единичный и умеренный) и в соскобах со стенок кишечника рост колоний Субалина отсутствовал. Всё это объясняется тем, что при внесении корма на кормовые точки более крупная рыба отгоняла мелкую, в результате чего ей практически мало что доставалось. Такая же картина наблюдалась и при высоких плотностях посадки. Наедались в первую очередь



более сильные особи. Результаты этого эксперимента ещё раз подчеркнули важность соблюдения рыбоводных нормативов, о чём было напомнено рыбоводам хозяйств.

В результате использования Субалина в хозяйствах было отмечено его положительное влияние на выход рыбы из зимовки, темп роста, её иммунофизиологические и органолептические показатели. Позже начали использовать препараты ацидофильной палочки, Зоонорм и Бифидум-СХЖ. Главным компонентом первых препаратов служили промышленные штаммы *Bac. acidophilis* и культура Наринэ производства Ереванского НИИ эпидемиологии и микробиологии, в двух последних препаратах содержатся бифидумбактерии, которые в Зоонорме в комплексе с активированным углём, в результате чего Зоонорм может служить одновременно и детоксикантом.

В 60-х гг. прошлого столетия за рубежом, а затем и в нашей стране перед проведением экспериментальных исследований на животных требовалось нормализовать микрофлору кишечника с помощью ацидофильного молока. Это позволяло быть уверенным, что полученные результаты эксперимента не искажены под влиянием условно-патогенных микроорганизмов кишечника. В то время для проведения этих работ даже было организовано производство по выпуску сухого ацидофильного молока. В рыбоводной практике ацидофильные препараты применялись на лососевых заводах Дальнего Востока, Мурманской, Ленинградской областей и в Рефтинском тепловодном садковом хозяйстве (РТСХ) на Урале.

На РТСХ у годовиков и двухгодовиков карпа после зимовки отмечались плавники с разрушенной межлучевой тканью, гиперемия, потеря чешуи и изъязвления на разных участках поверхности тела, слизистая кишечника истончённая, воспалённая, легко рвущаяся, паренхиматозные органы с патологическими отклонениями и контаминированные бактериальной флорой.

В связи с отсутствием финансирования комбикормов не было, но в складском помещении было большое количество отсева. На подсобном хозяйстве Рефтинской ГРЭС взяли мешок сухого молока и ацидофильную закваску, которые

использовались при откорме свиней, приготовили ацидофильное молоко, смешали его с отсевом, пропустили через мясорубку, подсушили и в течение 10 дней кормили рыбу этим кормом, который она охотно съедала. После такого кормления рыба приобрела товарный вид, при контрольном исследовании патологических изменений и контаминации внутренних органов не выявили. Не менее успешно проявило себя ацидофильное молоко на основе *Lactobacillus acidophilus* «Наринэ» (Армения). Скармливание корма с 10%-ной добавкой пробиотика даже в течение 5 дней позволило прекратить гибель и увеличить темп роста окской стерляди, осетра и севрюги. При использовании ацидофильного молока прирост тела рыб был на 27% больше, чем в группе, получавшей корм с добавкой аскорбиновой кислоты.

Самые длительные наблюдения по использованию Субалина в рыбоводстве проведены нами в Бисеровском хозяйстве (с 1997 г.). При соблюдении технологии и сроков применения препарата, несмотря на сложные эпизоотические условия в хозяйстве, удавалось избегать развития БГС без использования антибактериальных препаратов.

В апреле 2002 г. на Центральном участке ОАО «Бисеровского рыбокомбината» было проведено зарыбление нагульных прудов. При визуальном осмотре рыбы 5 мая вся рыба была без клинических признаков, в удовлетворительном состоянии. Однако 16 мая примерно у 30% рыб во 2-м пруду появились признаки БГС (рис. 15) и ОМЧ воды выше 12 000 КОЕ/мл, в связи с чем была проведена обработка пруда хлорной известью вдоль береговой линии.

21 мая при контрольном облове было выявлено около 15% рыб с язвами, геморрагиями, единичные особи - с ерошением чешуи (рис. 16).

При бактериологическом обследовании 12 рыб была выявлена разнообразная микрофлора (таблица 60).

3 июня начали кормление с Субалином: 3.06 - 6.06 и 11.06 - 12.06. При исследовании проб рыбы и воды были получены следующие результаты: из 10 рыб - 7 БКП, одна - с зарубцевавшейся язвой, две - с петехиями на брюшке, кровоизлияниями на хвостовом стебле и усилением сосудистого рисунка на

внутренних органах. У шести рыб - в брюшной полости выраженный спаечный процесс и анемичная печень, у двух - рыхлые, гидремичные почки.



Рис.15. Рыба из пруда №2 Центрального участка 16.05.2002 г.



Рис. 16. Рыба из пруда №2 Центрального участка ОАО  
«Бисеровский рыбокомбинат» 21.05.2002 г.

Таблица 60 - Уровень контаминации и микробиоценоз карпов из пруда №2 Центрального участка ОАО «Бисеровский рыбокомбинат»

Рыба	Клинические признаки	Патолого-анатом. картина	Уровень контаминации	Микробиоценоз
1п, пч	Экзофтальмия, диффузное эрошение чешуи, язвы, гипремия, кровоизлияния в плавники и их разрушение	В брюшной полости экссудат, печень, почки гидремичные, анемичные	умеренный рост	A.sp.4
			роста нет	
2п, пч			умеренный рост	A.sobria, A.sp.4
роста нет				
3п, пч экссудат			обильный рост	A.sobria, БГКП Acin.calcoacet.
			роста нет	
4 п, пч			единичн. колонии	БГКП
			роста нет	
5п, пч			умеренный рост	БГКП
			единичн. колонии	БГКП
6 п, 6 пч	обильный рост	Acin.calcoacet.		
	умеренный рост	Acin.calcoacet.		
7п, пч	единичн. колонии	Acin.calcoacet.		
8-10	БКП	п- анемичная пч - в пределах нормы	п, пч - роста нет	
роста нет				
11п, пч			единичн. колонии	БГКП
роста нет				
12п, пч	единичн. кол. олонииок	БГКП		

**Примечание:** п - печень, пч - почка, БКП - без клинических признаков

При посеве воды из пруда №2 на эритритагаре ОМЧ было 480 КОЕ/мл, преобладали БГКП, Acinetobacter calcoaceticus, A. sp. 4 и A.sobria.

В связи с повышением температуры воды для предупреждения БГС 6-8 и 7-14.08 было повторно проведено кормление с Субалином.

При исследовании рыбы и воды 22.08 из 10 рыб 7 были БКП, у одной - геморрагии на хвостовом стебле, у двух - небольшие изъязвления на боках. Патолого-анатомическая картина была разнообразной: кровянистый экссудат (1), анемичная печень (6), гидремичная почка (2), жировое перерождение печени (7).

В 12 посевах проб паренхиматозных органов рост бактериальной флоры не обнаружен, в 5 - рост единичных колоний, в одном - умеренный, в двух - обильный. Микробиоценоз был представлен БГКП, НФЦ, *A.sobria*, *A.hydrophila*, *A.sp.4*, *A.sp.5*, *A.sp.7* с ДНКазной активностью от 0 до 8 мм.

В воде было отмечено резкое нарастание ОМЧ - 16800 КОЕ/мл. При этом около 50% микробиоценоза было представлено неферментирующими бактериями.

В связи с резко ухудшившейся ситуацией и низким уровнем приживаемости Субалина (из 30 кишечников рост *Bac.subtilis* в виде единичных колоний выявлен только в 8), было решено продлить курс кормления с Субалином. Также была проверена активность исходного препарата Субалина. Было установлено, что она соответствует ТУ 88.105.003-98. Предположительно отрицательное влияние на эффективность препарата могло оказать одновременное с кормлением Субалином применение хлорной, негашеной извести и  $KMnO_4$ . Кроме того, проверка комбикорма с Субалином, приготовленного вручную, показала неравномерное смачивание гранул, что могло отразиться на уровне приживаемости Субалина в кишечнике.

После трёх 6-тидневных курсов кормления Субалином у 15 рыб были взяты сыворотки крови для иммунологических исследований. В качестве антигенов использовали музейный штамм *A.sobria 77-18* и выделенный в этом же хозяйстве от рыбы *A.sobria 144-6п*. К штамму 77-18 титры агглютинирующих антител были 1:32 - 1:4096 (1:32 - 1, 1:64 - 1, 1:128 - 5, 1:256 - 1, 1:2024 - 4, 1:4096 - 3). К штамму 144-6п все титры агглютининов были 1:4096, что свидетельствовало о более высокой напряженности иммунитета к аэромонадам, циркулирующим в хозяйстве. До применения Субалина в Бисеровском рыбокомбинате для

поддержания эпизоотической ситуации на приемлемом уровне с **профилактической** и терапевтической целью постоянно использовали фуразолидон и левомицетин (по несколько курсов за сезон). Но широко используемый в отечественном рыбоводстве фуразолидон в концентрации 20 мкг/мл не способен подавлять размножение большинства выделенных в подмосковных рыбхозах штаммов аэромонад [18]. Более того, исследования, проведённые позже, показали, что бактерии были устойчивы и к целому ряду других антибактериальных препаратов.

В интенсивно эксплуатируемых рыбоводных прудах количество аэромонад колеблется от нескольких сотен до тысяч микробных клеток в 1 мл воды [196, 54]. К таким относятся и пруды Бисеровского рыбокомбината. На хозяйстве применяются высокие плотности посадки, в связи с чем всегда существует вероятность вспышки инфекционного заболевания. В таких условиях применение антибактериальных препаратов сильно ограничено из-за формирования среди бактериальных патогенов антибиотикорезистентных штаммов, развития под действием препарата иммунодефицита у рыб. Немаловажным является и загрязнение медикаментами конечной пищевой продукции, что значительно ограничивает возможности её реализации.

Проводя отбор проб, мы тестировали аэромонады, выделенные из воды и рыбы, на чувствительность к антибиотикам, в том числе к чаще всего используемому левомицетину. С апреля по сентябрь было проведено 8 исследований патматериала от рыбы и проб воды. В апреле и мае все выделенные штаммы аэромонад были чувствительны к левомицетину, в июне появилось 36,8% слабочувствительных, дальше их количество увеличилось до 56,2%. А если учесть, что в течение рыбоводного сезона количество высоковирулентных аэромонад тоже увеличилось с 8,8 до 52,6 - 80,0%, то острота проблемы становится очевидной. При изучении чувствительности к левомицетину и фуразолидону в следующем году в этом же хозяйстве были выделены аэромонады практически резистентные к обоим препаратам. Следует отметить, что в условиях экологического неблагополучия при повышенной агрессивности среды (особенно

в зонах ГРЭС, различных производственных и животноводческих комплексов) аэромонады, подвергающиеся воздействиям неблагоприятных факторов, усиливают свою ферментативную активность и параллельно с этим возрастает их вирулентность. Таким образом, с одной стороны, всевозможные стресс-факторы снижают резистентность рыбы, угнетая её иммунную систему, способствуя развитию эндогенной инфекции, с другой - вызывают повышение вирулентности аэромонад и других грамотрицательных бактерий, активизируют действие ферментов агрессии и провоцируют развитие острого процесса. Применение в таких случаях антибиотиков и фуразолидона может только ухудшить ситуацию. Для предупреждения вспышек БГС оптимальным являлось повышение иммунного статуса рыбы путём использования пробиотика Субалин [118, 139, 148, 153, 156, 175, 180].

Предварительные исследования показали, что для достижения надёжного защитного эффекта в одно кормление на каждый кг живой массы рыбы должно приходиться 35 млн спор пробиотика, что составляет 0,4 мг [180]. Практически это не всегда соблюдалось и в результате не всегда удавалось получить 100%-ный положительный эффект. С 2001 по 2006 гг. систематический контроль и своевременное проведение курсов кормления с Субалином, санитарно-гигиенические мероприятия, проводимые на прудах, предотвращали развитие БГС. Анализ фактического материала показывает, что эффект от применения Субалина мало зависит от видовой характеристики микробиоценоза прудовой воды, а в первую очередь связан с колонизационной активностью жизнеспособных спор *Bacillus subtilis*. Установлено, что под действием Субалина усиливается продукция агглютинирующих антител, препарат обладает иммуностимулирующим действием.

Применение его в садковых, прудовых хозяйствах и на лососевых рыбозаводах дало положительный результат. Улучшалось физиологическое состояние рыбы, начинался процесс активного рубцевания язв (таблица 61).



Таблица 61- Эффективность применения Субалина в рыбоводных хозяйствах (1998 - 2002 гг.)

Хозяйства	Болезни рыб	Клинические признаки (%%)	
		До лечения	После лечения
<b>Форелевые хозяйства</b>			
Смоленское садковое	Миксобактериоз	75	30
	Некроз плавников	70	22
Адлерское	Миксобактериоз	63	22
	Некроз плавников	55	15
<b>Лососевые рыбзаводы</b>			
Нарвский	Некроз плавников	30	-
Выгский	Энтерит	46	-
<b>Осетровые рыбзаводы</b>			
Можайский	БГС	65	21
Кемский	Энтерит	62	-

В мае 1997 г. в ЗАО «Черепетский рыбхоз» Тульской области был проведён курс лечения Субалином товарного карпа-двухгодовика со значительными клиническими проявлениями БГС. Рыбу предварительно отсортировали, отбирая экземпляры с клиническими проявлениями. Уже после двухдневного курса (100 мг/кг рыбы) было отмечено улучшение. В 2,5 раза снизился отход рыбы, активно начался процесс рубцевания язв. Положительные изменения отмечали и в состоянии паренхиматозных органов. При использовании Субалина более длительное время для лечения этой группы рыб был получен ещё более выраженный эффект. При этом следует отметить, что экологическая ситуация в хозяйстве была весьма неблагоприятная и бактериальный прессинг водной среды был высокий (до 9000 КОЕ/мл) [175, 177].

В настоящее время применение Субалина в хозяйствах упростилось в связи с разработкой технологии внесения препарата в комбикорм в процессе гранулирования и экструдирования (Патент №2140165. Приоритет от 14.07.1998) [165]. Таким образом, комбикорм с Субалином может готовиться промышленным способом на комбикормовых заводах. Каждая партия выпускаемого лечебного корма должна проходить соответствующую проверку на равномерность смешивания и активность, т.е. насколько препарат равномерно смешан со всеми компонентами корма и его количество в комбикорме (рис.17 и 18). Нам приходилось сталкиваться с заявлениями, что кормление с Субалином провели, а эффекта - нет. А при проверке комбикорма активность оказалась нулевая, препарат «куда-то» исчез.

Особо важное значение имеет кормление с Субалином осенью, непосредственно перед посадкой рыбы в зимовальные пруды и весной после выхода из зимовки и началом кормления для заполнения желудочно-кишечного тракта нормофлорой и недопускания попадания в него микрофлоры детрита, содержащего большое количество аэромонад и других условно-патогенных микроорганизмов.

В 2010 г. в экспериментальных условиях аквариальной нами был испытан на двухгодовиках карпа и ленского осетра пробиотик «Проваген» (производство ЗАО «Биотехнологическая компания «Восток», п. Восточный Кировской обл.) При исходном исследовании у 10 карпов печень и почки были контаминированы аэромонадами, а бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК) - нулевая, т.к. сыворотки уже были контаминированы бактериями. Средняя масса тела ( $m_{cp}$ ) рыб - 146 г.

Первая опытная группа ( $O_1$ ) в течение 10 дней получала Проваген (из расчёта 300 г/т комбикорма), вторая опытная группа ( $O_2$ ) была заражена в/м

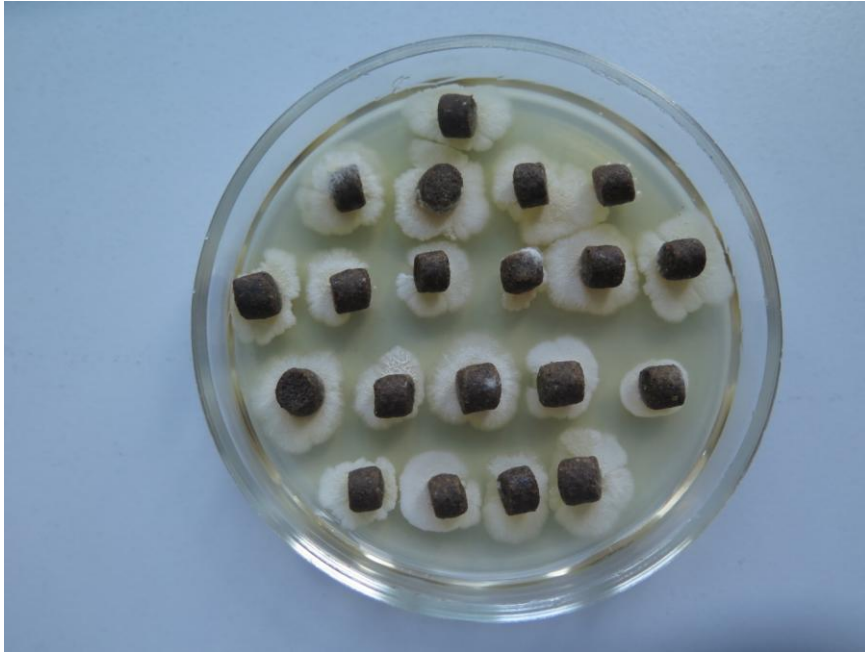


Рис.17. Проверка равномерности смешивания пробиотика СУБ-ПРО с компонентами комбикорма



Рис.18. Определение содержания СУБ-ПРО в 1 г комбикорма

бульонной культурой вирулентных аэромонад. Через 10 дней группа рыб **О<sub>1</sub>** была заражена аналогичным способом, а группа **О<sub>2</sub>** начала получать комбикорм с Провагеном. Контрольная группа рыб **К** так же, как и опытные группы получала комбикорм АК-2КЭ (Ассортимент-Агро, Сергиев-Посад) (таблица 62).

Аналогичный эксперимент был проведён с годовиками ленского осетра. Исходная средняя масса - 102 г, БАСК -  $16,4 \pm 7$ . Во всех посевах печени и почек - умеренный рост бактериальной флоры. Результаты опыта приведены в таблице 63.

Таблица 62 - Влияние Провагена на иммуно-физиологический статус двухгодовиков карпа

Группы рыб	Уровень контаминации, %				БАСК	m <sub>ср</sub>	
	Роста нет	Единич-ный	Умерен-ный	Обиль-ный		Абс., г	Прирост, г
O <sub>1</sub>	50,0	25,0	25,0	-	$35,8 \pm 0,25$	194,0	48,0
O <sub>2</sub>	-	10,0	50,0	40,0	$29,6 \pm 0,16$	157,9	11,9
К	-	-	-	100,0	$18,4 \pm 0,7$	167,0	21,0

**Примечание:** O<sub>1</sub>- Проваген - заражение, O<sub>2</sub> - заражение - Проваген, К - контроль

Таблица 63 - Влияние Провагена на иммуно-физиологический статус годовиков ленского осетра

Группы рыб	Уровень контаминации, %				БАСК	m <sub>ср</sub>	
	Роста нет	Един.	Умерен.	Обильн.		Абс., г	Прирост, г
O <sub>1</sub>	60,0	30,0	10,0	-	$41,1 \pm 6$	175,0	73,0
O <sub>2</sub>	-	75,0	8,3	16,7	$19,7 \pm 3,6$	154,0	52,0
К	40,0	60,0	-	-	$11,6 \pm 2,2$	167,0	65,0

Как в группе карпов, так и осетров, получавших Проваген, при последующем заражении клинические признаки не проявлялись, однако полной элиминации бактерий из паренхиматозных органов добиться не удалось.

Кроме того, защитное действие Провагена было более выражено при заражении рыбы после проведения курса кормления с пробиотиком. И у карпов, и у осетров в группе O<sub>2</sub> не выявлено отсутствие роста и прирост массы тела даже ниже, чем в контроле, т.к. рыба больше тратила энергетические ресурсы на борьбу с возбудителем.

В конце эксперимента была проведена оценка физиологического состояния осетров по гематологическим показателям в соответствии с общепринятыми в аквакультуре методами. Из физиолого-биохимических показателей определяли:

- концентрацию гемоглобина (цианметгемоглобиновым методом);
- число эритроцитов (пробирочным методом с подсчётом в камере Горяева;
- уровень эритропоэза, количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу

учитывали на окрашенных (по Паппенгейму) мазках крови, идентификацию форменных элементов проводили по классификации Н.Т. Ивановой [46 б].

Для анализа было взято по 10 рыб из опытной и контрольной групп. Статистическую обработку полученных материалов проводили по пакету программ Statistica для РС.

Результаты гематологического анализа показали, что введение в корм пробиотика на уровень гемоглобина в организме рыб не повлияло. Наблюдается увеличение количества эритроцитов (на 11%) на фоне снижения их насыщенности гемоглобином (на 9%). У рыб из опытной группы выявлено снижение активности эритропоэза (процента молодых форм эритроцитов в периферическом русле) на 32%.

Наиболее значимые изменения отмечены в лейкоцитарной картине. У рыб опытной группы - увеличение общего числа лейкоцитов на 32% относительно контрольной группы. В лейкоцитарной формуле (процентное отношение различных групп лейкоцитов) выявлено увеличение иммунокомпетентных клеток - нейтрофилов и лимфоцитов, но пересчёт в абсолютные числа (тыс./мкл) показал, что нейтрофилы не претерпевают изменений, а количество лимфоцитов возрастает в 1,6 раз относительно контрольной группы рыб (таблица 64). Лимфоциты выполняют в организме цитотоксическую функцию и антителообразования. Активизация этих механизмов в организме увеличивает резистентность рыбы к различным болезнетворным агентам и другим неблагоприятным факторам окружающей среды. Однако у осетров было выявлено отрицательное влияние на эритропоэз и насыщение эритроцитов гемоглобином. Было отмечено увеличение на 11% количества эритроцитов на фоне снижения их оснащённости гемоглобином на 9%. У рыб из опытной группы установлено снижение активности эритропоэза. В связи с этим не рекомендуется длительно

Таблица 64 - Показатели крови ленского осетра при испытании пробиотика  
«Проваген»

Показатели	Контроль	Опыт
Гемоглобин, г/л	57,6 ± 2,2	58,2 ± 3,1
Эритроциты, тыс./мкл	605 ± 37,9	671 ± 46,6
Содержание гемоглобина в одном эритроците, пг	98,5 ± 6,5	89 ± 6,9
Эритропоэз, %	2,5 ± 0,9	1,7 ± 0,7
Лейкоциты, тыс./мкл	45,8 ± 4,3	60,9 ± 9,0
Нейтрофилы, %:		
миелоциты	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,1
метамиелоциты	3,2 ± 0,4	4,5 ± 1,1
палочкоядерные	12,4 ± 1,5	9,7 ± 1,9
сегментоядерные	14,7 ± 2,5	9,9 ± 1,6
Общее число нейтрофилов, %	31,0 ± 3,0	24,4 ± 3,4
- // -, тыс./мкл	14,5 ± 2,4	14,6 ± 2,8
Эозинофилы, %	6,7 ± 1,7	5,6 ± 1,4
- // -, тыс./мкл	3,3 ± 0,9	3,2 ± 0,8
Моноциты, %	2,6 ± 0,7	2,2 ± 0,3
- // -, тыс./мкл	1,4 ± 0,6	1,4 ± 0,3
Лимфоциты, %	59,4 ± 4,0	67,5 ± 3,6
- // -, тыс./мкл	26,5 ± 2,2	41,4 ± 7,0

применять Проваген, так как это может спровоцировать анемию [169]. Обычно такая картина крови наблюдается при снижении железа или при дефиците витамина В<sub>12</sub>. В целом эти показатели (СГЭ и эритропоэз) не выходили за пределы физиологической нормы для этого вида рыб. Но это влияние необходимо учитывать при длительном использовании Провагена, т.к. будет происходить стабильное снижение активности эритропоэза (выхода молодых эритроцитов в периферическую кровь), раз уже тенденция к этому есть. Снижение общего количества эритроцитов на фоне снижения содержания гемоглобина в эритроците может спровоцировать анемию. Возможно, Проваген блокирует образование железа и В<sub>12</sub> или разрушает, образуя с ними комплексы и они не выполняют свою функцию.

В последние годы всё более широкое применение в рыбоводной практике при индустриальном выращивании ценных пород рыб находят пробиотики на основе бифидобактерий - Бифидум-СХЖ и Зоонорм, выпускаемые московской фирмой ЗАО «Партнёр». Пробиотик Бифидум-СХЖ содержит лиофилизированную микробную массу живых антагонистически активных бактерий штамма *Bifidobacterium bifidum* №1 с добавлением сахарозо-желатиновой среды и лактозу, расфасованных в пакеты с разным количеством доз. Одна доза препарата содержит  $1 \times 10^7$  КОЕ бифидобактерий. Препарат представляет собой сыпучую массу (порошок) разных оттенков бежевого или беловато-серого цвета со специфическим запахом, сладковатого вкуса, при растворении в воде образует слабо опалесцирующую бесцветную взвесь.

Действие препарата определяют содержащиеся в нём бифидобактерии, обладающие антагонистической активностью против широкого спектра патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. «Зоонорм» представляет собой лиофилизированную микробную массу бактерий вида *Bifidobacterium bifidum* №1, иммобилизованных на частицах измельченного активированного угля. По внешнему виду препарат представляет собой порошок от светло- до тёмно-серого цвета с чёрными вкраплениями. При растворении в воде образует суспензию с частичками сорбента чёрного цвета. Микроколонии бифидобактерий, сорбированные на активированном угле, способствуют выведению токсических метаболитов, активируют процесс пристеночного пищеварения, осуществляют физиологическую защиту кишечного барьера от проникновения микробов и токсинов во внутреннюю среду организма. Препараты безвредны и побочного действия не оказывают.

Сравнительные исследования, проведённые на Можайском ПЭРЗ с годовиками окской стерляди, показали, что при 10-дневном курсе кормления прирост массы тела рыб в контрольных группах был 4,9% и 9,9%, при кормлении комбикормом с Бифидум-СХЖ - 14,0%, при кормлении комбикормом с «Зоонормом» - 18,7%. При этом было отмечено устойчивое снижение уровня контаминации внутренних органов условно-патогенными бактериями.

Положительные результаты были получены при использовании Зоонорма в процессе выращивания личинок радужной форели и африканского сома при переходе на смешанное питание. И в первом, и во втором случаях бактериальный фон многократно превышал все допустимые нормативы. Форель, получавшая корм, обработанный Зоонормом в трёхнедельном возрасте достигала 600 - 850 мг, гибели не было. Африканский сом получал аналогичное кормление до навески 20 - 25 г. При этом клинические и патолого-анатомические признаки и контаминацию внутренних органов у рыб не выявили. Следует отметить, что пробиотические препараты можно применять на самых ранних этапах выращивания рыбы, обрабатывая артемию и дафний, предназначенных для кормления рыб. Это позволяет ускорить темп роста и повысить резистентность мальков.

В 2005 и 2006 гг. в выростных прудах ЭПО Якоть ФГУП «ВНИИПРХ» были проведены очередные испытания Субалина и Зоонорма на клинически здоровых двухлетках карпа средней массой 161 г (2005 г.) и 345 г (2006 г.).

Весной 2005 г. пять выростных прудов зарыбили согласно нормативам для 1 зоны рыбоводства (2,5 тыс. шт./га) и из этой же группы рыб по методу случайной выборки отбирали по 10 экз. рыб (группа **К<sub>1</sub>**), от которых брали кровь для иммунологических исследований и делали посев паренхиматозных органов на эритритагар и среду Эндо для определения микробиоценоза и уровня контаминации рыб. Для кормления рыбы использовали полнорационные корма для двухлетков и трёхлетков карпа: контрольная группа **К<sub>2</sub>** - без добавок, первая опытная группа **О<sub>1</sub>** - с минимальными добавками Зоонорма в течение всего вегетационного периода, вторая опытная группа **О<sub>2</sub>** - с добавлением Зоонорма курсами, третья опытная группа **О<sub>3</sub>** - с минимальными дозами Субалина в течение всего вегетационного периода и четвёртая опытная группа **О<sub>4</sub>** - с добавлением Субалина курсами (таблица 65) [68]. Кормление с пробиотиками проводили с 6.06 по 31.08 в 2005 г. и с 1.06 по 31.08 в 2006 г.



Таблица 65 - Расчёт необходимого количества комбикорма и пробиотиков в 2005 г.

№ пруда	Группа	Внесение препарата	К-во рыб	Месяцы								
				Июнь			Июль			Август		
				1*	2	3	1	2	3	1	2	3
1	Контроль	-	275	3,6	4,6	5,7	6,8	7,8	11,2	12,0	12,0	12,4
2	Зоонорм, доз	Ежедневно	175	1,8/ 2,5	2,5/ 2,5	3,2/ 2,5	3,9/ 2,5	4,6/ 2,5	7,7/ 2,5	8,3/ 2,5	8,6/ 2,5	8,8/ 2,5
3	Зоонорм, доз	Курсами	200	2,3/ 20	3,1/ 20	3,9	4,7/ 25	5,5/ 25	8,6	9,2/ 30	9,6/ 30	9,4
4	Субалин, доз	Ежедневно	200	2,5/ 0,8	3,2/ 1,1	4,1/ 1,3	4,9/ 1,6	5,6/ 1,8	8,7/ 2,9	9,3/ 3,1	9,6/ 3,2	9,4/ 3,1
5	Субалин, доз	Курсами	190	2,5/ 3,2	3,2/ 4,1	4,0	4,7/ 6,1	5,4/ 6,9	8,5	9,0/ 11,5	9,3/ 11,9	9,4

**Примечание:** 1\* - подекадные курсы кормления; над чертой - количество корма в сутки (кг); под чертой - количество доз в сутки

Контроль за эпизоотическим состоянием прудов проводили ежедекадно при контрольных обловах. Для изучения иммуно-физиологических показателей и патолого-анатомической картины карпов контрольной и опытных групп методом случайной выборки отбирали по 10 рыб.

Для оценки влияния пробиотиков на иммуно-физиологическую систему рыб изучали бактерицидную активность сыворотки крови, титр агглютинирующих антител, уровень контаминации паренхиматозных органов, приживаемость Субалина и Бифидумбактерий в кишечнике.

Для определения приживаемости Субалина соскоб со слизистой кишечника помещали в пробирку с изотоническим раствором хлорида натрия и прогревали на водяной бане в течение 20 мин, после чего делали высеv на чашки с эритритагаром с канамицином [139]. Для определения приживаемости бифидумбактерий по 1 мл соскобов со слизистой кишечника вносили в пробирки с 9 мл предварительно прогретой бифидумсреды, после чего делали ряд десятикратных разведений. Посевы инкубировали при 37<sup>0</sup>С в течение суток, после

чего проводили учёт. На эритритагаре подсчитывали колонии субалина, бифидумбактерии определяли по наличию характерных колоний в анаэробной среде.

В сентябре после облова всех прудов было проведено взвешивание карпов контрольной и опытных групп (таблица 66).

Таблица 66 - Весовые показатели рыб контрольной и опытных групп при осеннем облове в 2005 г. (ЦЭБ Якоть)

Группа	Весеннее зарыбление, шт.	M <sub>1</sub> при посадке, г	M <sub>2</sub> при облове, г	Прирост	
				г	%
K <sub>1</sub>	275	168,7	671,4	502,7	298,0
O <sub>2</sub>	175	152,6	789,7	621,2	407,1
O <sub>3</sub>	200	149,5	671,5	522,0	349,2
O <sub>4</sub>	200	161,0	708,4	547,4	340,0
O <sub>5</sub>	190	170,0	791,8	621,8	365,8

Следует отметить, что увеличение массы тела рыб в опытных группах лежит в пределах статистической достоверности относительно группы контроля.

Второе обследование эпизоотической ситуации на ЭПО Якоть было проведено в мае 2006 г. Для бактериологического исследования были взяты пробы воды из прудов, 10 экз. рыб (группа K<sub>1</sub>), которые вышли после зимовки, и по 10 экз. рыб из каждой группы опыта 2005 г., (всего 50 экз.). От этих рыб были отобраны пробы крови для иммунологических исследований и паренхиматозных органов для оценки уровня контаминации (таблицы 67 и 68). Из таблиц видно, что иммуно-физиологический статус рыб опытных групп после зимовки остаётся довольно высоким.

Отбор проб воды из прудов, в которых выращивалась опытная и контрольная рыба, проводили с 15.06 по 9.08. Всего было отобрано 20 проб.

Уровень бактериальной обсеменённости воды колебался от 840 до 13 360 КОЕ/мл в июне, от 2020 до 74 560 КОЕ/мл в июле, от 1540 до обильного в августе.

Этиологическая структура аэромонад была весьма пёстрой. Чаще всего выделялись *A.caviae*, *A.eucrenophila*, *A.hydrophila*, *A.sp.5*, *A.sp.9* и практически во всех посевах присутствовали БГКП.

Показатели прироста рыб контрольных и опытных групп за 2005 и 2006 гг. приведены в таблице 69.

Таблица 67 - Уровень контаминации паренхиматозных органов контрольной и опытных групп эксперимента 2005 г. весной 2006 г.

Группа	Уровень контаминации, абс./%			
	Роста нет	Единичный	Умеренный	Обильный
К <sub>2</sub>	12/60,0	7/35,0	1/5,0	-
О <sub>1</sub>	18/90,0	2/10,0	-	-
О <sub>2</sub>	18/90,0	2/10,0	-	-
О <sub>3</sub>	17/85,0	1/5,0	2/10,0	1/5,0
О <sub>4</sub>	17/85,0	3/15,0	-	-

**Примечание:** К<sub>2</sub> - кормление без добавок; О<sub>1</sub> - кормление с Зоонормом в течение сезона; О<sub>2</sub> - кормление с Зоонормом курсами; О<sub>3</sub> - кормление с субалином в течение сезона; О<sub>4</sub> - кормление с Субалином курсами

Следует отметить, что в 2006 г. в выростных прудах был высокий бактериальный прессинг, что не могло не сказаться на уровне контаминации и темпах прироста массы тела рыбы (таблица 69, 70).

Таблица 68 - Иммунологические показатели рыб контрольной и опытных групп эксперимента 2005 г. весной 2006 г.

Группа	БАСК	Титр агглютинирующих антител	
		К антигену 77-18	К антигену 360-2
К <sub>2</sub>	74,6±18,1	1:8	1:4
О <sub>1</sub>	99,6 ± 0,0002	1:16	1:8
О <sub>2</sub>	99,4 ± 0,0004	1:16	1:16
О <sub>3</sub>	85,1 ± 2,0	1:8	1:16
О <sub>4</sub>	99,4±0,0004	1:16	1:16

**Примечание:** К<sub>2</sub> - кормление без добавок; О<sub>1</sub> - кормление с Зоонормом в течение сезона; О<sub>2</sub> - кормление с Зоонормом курсами; О<sub>3</sub> - кормление с субалином в течение сезона; О<sub>4</sub> - кормление с Субалином курсами

Таблица 69 - Показатели прироста массы тела рыб в 2005 и 2006 гг.

Группа	Начальн. масса, г		Конечн. масса, г		Прирост, г		Прирост, раз	
	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006
K <sub>1</sub>	169	350	673	961	504	611	4,0	2,8
O <sub>1</sub>	153	323	688	955	535	632	4,5	3,0
O <sub>2</sub>	150	353	664	940	514	587	4,4	2,7
O <sub>3</sub>	161	350	686	752	525	402	4,3	2,2
O <sub>4</sub>	170	343	657	893	487	550	3,9	2,6

У группы, получающей с комбикормом Субалин в течение всего сезона, отмечена 100%-ная высеваемость бацилл, что свидетельствовало о хорошей приживаемости пробиотика в кишечнике рыб. Приживаемость Зоонорма в обеих группах отмечена у 100% рыб, но при курсовом применении Зоонорм высевался в более высоких разведениях (таблица 71). При кормлении с пробиотиками у рыб повысилась специфическая и неспецифическая резистентность. Протективное действие препаратов оценивали по патолого-анатомическим признакам, уровню контаминации внутренних органов рыб бактериальной флорой, бактерицидной активности сыворотки крови и титру агглютинирующих антител [153]. При определении иммунологических показателей полученные результаты статистически обработаны [100] и сведены в таблицу 72.

Таблица 70 - Уровень контаминации рыбы контрольной и опытных групп

Группа рыб	Уровень контаминации, абс/%			
	Роста нет	Единичный	Умеренный	Обильный
<b>ВЕСНА</b>				
K <sub>1</sub>	16/80,0	2/10,0	2/10,0	-
<b>ЛЕТО</b>				
K <sub>2</sub>	18/90,0	2/10,0	-	-
O <sub>1</sub>	19/95,0	1/5,0	-	-
O <sub>2</sub>	20/100	-	-	-
O <sub>3</sub>	18/90,0	-	1/5,0	1/5,0
O <sub>4</sub>	17/85,0	3/15,0	-	-
<b>ОСЕНЬ</b>				
K <sub>2</sub>	16/80,0	4/20,0	-	-
O <sub>1</sub>	19/95,0	1/5,0	-	-
O <sub>2</sub>	18/90,0	-	1/5,0	1/5,0
O <sub>3</sub>	20/100	-	-	-
O <sub>4</sub>	18/90,0	2/10,0	-	-

Таблица 71 - Приживаемость бифидумбактерий в кишечниках опытных рыб

Зоонорм, минимум		Зоонорм, курсами	
№ рыбы	Результат	№ рыбы	Результат
1	$3 \times 10^5$	1	$1 \times 10^9$
2	$2 \times 10^4$	2	$5 \times 10^8$
3	$5 \times 10^3$	3	$1 \times 10^7$
4	$3 \times 10^4$	4	$2 \times 10^6$
5	$2 \times 10^4$	5	$1 \times 10^8$
6	$3 \times 10^5$	6	$3 \times 10^6$
7	$3 \times 10^5$	7	$4 \times 10^6$
8	$1 \times 10^4$	8	$1 \times 10^3$
9	$1 \times 10^5$	9	$3 \times 10^4$
10	$2 \times 10^7$	10	$2 \times 10^5$

Таблица 72 - Иммунологические показатели рыб контрольной и опытных групп осенью 2006 г.

Группа	БАСК	Титр агглютинирующих антител	
		к антигену 77-18	к антигену 360-2
K <sub>2</sub>	$72,6 \pm 13,4$	1:64	1:8
O <sub>1</sub>	$90,5 \pm 0,95$	1:128	1:16
O <sub>2</sub>	$96,3 \pm 0,04$	1:256	1:16
O <sub>3</sub>	$97,1 \pm 0,007$	1:128	1:32
O <sub>4</sub>	$92,1 \pm 0,27$	1:256	1:32

Проведённые исследования показали эффективность применения пробиотиков Субалин и Зоонорм для укрепления иммуно-физиологической системы рыб. Однако отмечено, что значительное усиление бактериального прессинга на рыбу влияет на иммунологические показатели, в частности на титр агглютинирующих антител, т.к. значительный расход энергетических ресурсов рыбы затрачивается на борьбу с контаминантами. Поэтому применение пробиотических препаратов должно сочетаться с проведением дезинфекционных мероприятий в прудах и созданием оптимальных условий обитания для рыб. Одновременно с этим своевременный рыбоводный и ихтиопатологический контроль по рыбоводным и клиническим показателям позволит оценить качество выращиваемой рыбы и выявить отрицательные факторы, воздействующие на неё.

### **5.7. Проблема экологической безопасности лечебных и профилактических мероприятий в рыбоводстве**

Экологии в настоящее время уделяется большое внимание. Загрязнение окружающей среды происходит катастрофическими темпами и немалый вклад в этот процесс вносят рыбоводные хозяйства. Это и различные нарушения технологических процессов, несоблюдение санитарно-гигиенического режима, несвоевременная уборка погибшей рыбы, в результате чего загрязнённая вода попадает в естественные водоёмы. Но самый большой вред наносит бесконтрольное применение антибактериальных препаратов, что создаёт угрозу, имеющую не только эпизоотическое, но и эпидемиологическое значение.

В своё время, когда только появилась информация о ципрофлоксацине, был создан на его основе препарат Антибак, который при проверке его активности оказался высоко эффективным против многих рыбобатогенных возбудителей, в связи с чем было предложено оставить его в качестве препарата резерва, как в медицинской практике - применять только в экстренных случаях. Однако авторы разработки с этим предложением не согласились дали ему широкую дорогу не только с лечебной целью, но и с профилактической, утверждая, что по имеющимся данным резистентность к нему не вырабатывается. Мы уже приводили данные по чувствительности к антибактериальным препаратам в хозяйствах, где антибак применяли, и где не применяли. А при изучении чувствительности к антибактериальным препаратам в одном из рыбоводных хозяйств выявили в зоне угнетения роста вокруг диска с ципрофлоксацином рост резистентных мутантов (рис.19). В последнее время всё больше поступает информации из рыбоводных хозяйств о безрезультатном проведении курса лечения Антибаком. В некоторых хозяйствах, где рыбе провели несколько курсов антибакотерапии, у рыбы были патологические изменения рёбер и позвоночников, а на печени - точечные кровоизлияния (как следы от укола иглой).

В Соединённых Штатах все фторхинолоны получили в медицине так называемую «чёрную метку» в связи с тем, что при использовании могут вызвать у человека повреждение (разрыв) ахиллесова сухожилия.

Особую трудность представляет выбор антибактериального средства при диагностике БГС, поскольку там бывают возбудители с весьма различающейся чувствительностью (рис. 20).

Не менее важным является выдерживание сроков необходимых для выведения препарата из организма рыбы в случае её лечения. Мы столкнулись с

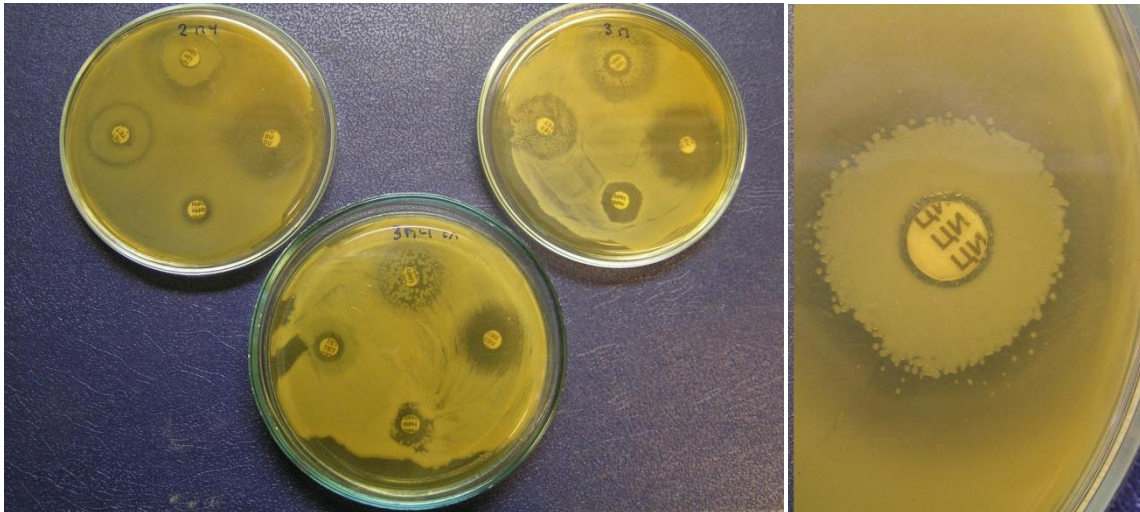


Рис. 19. Рост ципрофлоксацинзависимых мутантов аэромонад вокруг диска с ципрофлоксацином

фактом, когда женщина в хозяйстве приобрела форель, пролеченную окситетрациклином, к которому у неё оказалась сильнейшая аллергия, в результате чего она была госпитализирована с анафилактическим шоком. С большим трудом её удалось спасти.



Рис. 20. Чувствительность к антибиотикам различных аэромонад, выделенных от рыбы

Особо следует учитывать, что в результате бесконтрольного использования антибактериальных препаратов создаются условия для передачи от одних бактерий другим путём конъюгации R-фактора - фактора множественной лекарственной резистентности, что может представлять угрозу для человека, о чём мы уже указывали. Вот почему все лечебные и профилактические мероприятия должны находиться под очень жестким контролем. Использовать антибактериальные препараты только в самых крайних случаях, когда без них обойтись уже нельзя, а профилактику проводить, повышая иммунофизиологический статус рыбы пробиотиками или вакцинами, не нарушать технологические процессы и строго выполнять санитарно-гигиенические требования.



## 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведение данной работы было продиктовано необходимостью изучения биологических свойств и эпизоотической значимости подвижных аэромонад, этиологической расшифровки бактериальной геморрагической септицемии и определения значимости бактериальных агентов - возбудителей БГС и разработки схем их идентификации, а также отработки мер борьбы с аэромонадом и БГС.

Выполнение этих исследований позволило установить, что подвижные аэромонады являются не только возбудителями вторичных инфекций, а среди них были выявлены облигатные патогены, вызывающие аэромоназ контактным методом и 100%-ную гибель опытной рыбы. Интересно было отметить тот факт, что эти аэромонады были выделены только в южных республиках Советского Союза: Молдавии, Туркмении и Дагестане. Именно из одного из таких штаммов *A.sobria* 77-18, выделенного в Молдавии от белого толстолобика, была выделена путём диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия фракция 2, которая в дальнейшем была использована в качестве цитоплазматической вакцины ВЮС-2, показавшая высокие протективные свойства не только против гетерологичных аэромонад, но и против вибрионов, с которыми у аэромонад было выявлено антигенное родство. Затем из этого же штамма *A.sobria* 77-18 была приготовлена формолвакцина (бактерин), также успешно прошедшая испытания в лабораторных и производственных условиях. Дальнейшую судьбу этих препаратов решила финансовая проблема: нечем было платить за производство вакцины...

Многолетние работы по идентификации аэромонад, выделенных из воды и рыбы с клиническими проявлениями и здоровых с использованием 32 компонентов «пестрого ряда» Гисса не позволили получить результатов, с помощью которых можно было легко проводить эпизоотологическую оценку выделенных штаммов. А использование короткого «пёстрого ряда» в составе салицина, L-арабинозы и эскулина с предварительным посевом на среду Клиглера позволили выделить 14 *A.sp.* групп, из которых *A.sp.4* и *A.sp.5* были определены

как *A.veronii* и *A.schubertii* соответственно. Благодаря этому разделению стало возможным провести анализ эпизоотологической значимости различных типов и биоваров. Такая же оценка была проведена и по степени вирулентности по ДНК-азной активности. Следует отметить, что изучение уровня ДНКазной активности значительно упростило и облегчило определение значимости роли выделенных аэромонад в микробиоценозе водоёма и рыбы. Раньше очень редко озадачивались тем, что аэромонады являются представителями нормального микробиоценоза воды и принимают активное участие в процессах самоочищения водоёма. Выделили аэромонады и наложили карантин. Нам пришлось столкнуться с таким случаем, когда в Магаданской области после выделения аэромонад, без идентификации и изучения вирулентности был наложен карантин по фурункулёзу на лососевый завод. С этим фактом пришлось разбираться комиссионно. Много неверных заключений с последующими выводами было сделано в результате используемой ветеринарными врачами практики отбора материала в две пробирки - со скошенным агаром и МПБ. Только прямой просев на чашки Петри со средами непосредственно в хозяйстве позволял получить достоверный результат и делать правильные выводы.

Анализ многолетних результатов обследования рыбоводных хозяйств показал, что аэромонад в чистом виде в настоящее время практически не встречается, наряду с аэромонадами выделяется целая группа бактериальных агентов, иногда до 9 - 10 различных видов, т.е. мы имеем дело с полиэтиологичным заболеванием - бактериальной геморрагической септицемией. По данным медицинских справочников практически все сопутствующие микроорганизмы имеют не только эпизоотологическое, но и эпидемиологическое значение. А об этиологической роли аэромонад в патологии человека имеется обширная зарубежная и отечественная литература, что следовало бы учесть в СанПиНе на питьевую воду.

В настоящее время большое внимание уделяется вопросу экологии окружающей среды. Много вреда принесло и рыбе, и микробиоценозу водоёмов, и окружающей среде, в том числе и человеку широкое и бесконтрольное

использование антибактериальных препаратов. Появилось огромное количество антибиотикорезистентных штаммов различных возбудителей, микроорганизмов, изменивших свои морфологические и биологические свойства, что усложнило не только диагностику, но и борьбу с ними. Самое главное, что такие возбудители с множественной лекарственной устойчивостью выделялись не только от рыбы, но и от людей, сталкивавшихся в процессе трудовой деятельности с рыбой и с кормами.

Положительные результаты, полученные в процессе использования цитоплазматической вакцины ВЮС-2, бактерина, выработанного из того же высоковирулентного штамма *A.sobria* 77-18, пробиотиков СУБ-ПРО, Зоонорма, Бифидум-СХЖ, промышленной ацидофильной закваски и Наринэ показали, что будущее аквакультуры зависит в первую очередь от культуры рыбоводства и от экологических препаратов - вакцин и пробиотиков. Тогда мы будем получать здоровую рыбу и экологически чистую рыбную продукцию.

По материалам, полученным в результате многолетних исследований, подготовлены и переданы для утверждения и официального выпуска «Методические рекомендации по лабораторной диагностике и профилактике аэромоназа и бактериальной геморрагической септицемии рыб» в ФГУ «Центральную научно-методическую ветеринарную лабораторию».

Следует отметить, что в данном направлении предстоит ещё многое сделать. Многие положения из лабораторных руководств, выпущенных в прежние годы, устарели. В связи с изменяющимися условиями окружающей среды многие, хорошо известные, микроорганизмы настолько изменили свои свойства, что впору писать новые руководства, которыми могли бы пользоваться молодые практические работники. Появляются новые возбудители бактериальных болезней, которые следует изучать, отрабатывать схемы их идентификации, методов борьбы с ними, оценивать их эпизоотологическую и эпидемиологическую значимость. В рыбоводные хозяйства и в практические лаборатории приходят новые специалисты, которых необходимо вооружать новыми знаниями.

Полученная в результате проведённых исследований информация используется в курсе лекций по ихтиопатологии в высших и средних учебных заведениях и на курсах повышения квалификации работников рыбного хозяйства.

## 7. ВЫВОДЫ

В результате выполненных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Для правильной оценки эпизоотической ситуации в рыбоводных хозяйствах необходимо проводить отбор материала для исследования от живых рыб с клиническими проявлениями и проводить посев непосредственно в хозяйстве на чашки Петри с набором сред в зависимости от ситуации. При перевозке рыбы для исследования в лабораторию происходит контаминация внутренних органов микрофлорой из кишечника, что в результате приводит к ошибочному заключению.

2. Подвижные аэромонады являются не только возбудителями вторичных инфекций, но и облигатными патогенами, способными вызывать заболевание и 100%-ную гибель рыбы при постановке биопробы контактным методом. Такие аэромонады за всё время работы (с 1980-го года) были выделены только трижды в южных республиках: Молдавии от белого толстолобика, в Туркмении и Дагестане от карпов.

3. Использование короткого "пёстрого ряда" Гисса из салицина, L-арабинозы и эскулина с предварительным исследованием на первичной дифференциально-диагностической среде Клигlera позволило выделить 14 *A.sp.* биоваров, из которых *A.sp.4* и *A.sp.5* были определены, как *A.veronii* и *A.schubertii*.

4. Методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия подвижные аэромонады были разделены на три группы. Первая - облигатные патогены, сохраняющие свою вирулентность на протяжении многих лет (в нашем случае - более 30 лет), вторая - с индуцированной вирулентностью под влиянием условий окружающей среды или в результате пассирования через организм рыбы. В момент выделения они могут быть высоковирулентными, но при хранении на искусственных питательных средах теряют вирулентность. Третья группа - авирулентные представители микробиоценоза водоёма, принимающие активное участие в процессах

самоочищения водоёма. При определённых условиях (ухудшение условий среды обитания, повышение её агрессивности, технологические нарушения и др.) аэромонады третьей группы легко могут перейти во вторую, а при улучшении условий - перейти в третью.

5. Распределение выделенных аэромонад по биоварам позволило оценить их эпизоотическую значимость по частоте выделения из воды и материала от рыбы. Среди видов первое место в микробиоценозе рыб и воды суммарно по различным хозяйствам занимали *A.sobria*, *A.caviae* и *A.hydrophila*. Среди биоваров - чаще всего выделялись из рыб *A.sp.2*, *A.sp.4* и *A.sp.3*, из воды - *A.sp.4*, *A.sp.* и *A.sp.3*.

6. Определение ДНКазной активности аэромонад дало возможность значительно увеличить количество изучаемых культур и повысить достоверность полученных результатов. Среди вирулентных и высоковирулентных штаммов чаще всего выделялись от рыбы *A.sobria*, *A.eucrenophila* и *A.hydrophila*, *A.sp.*, *A.sp.1* и *A.sp.2*, из воды - *A.sobria*, *A.hydrophila* и *A.caviae*, *A.sp.*, *A.sp.1* и *A.sp.6*. Таким образом, на протяжении всего времени наблюдений больше всего вирулентных и высоковирулентных штаммов в пробах воды и рыбы выявили среди *A.sobria*.

7. В результате ухудшения условий окружающей среды у многих микроорганизмов (БГКП, аэромонад, моракселл, ацинетобактеров) ярко проявилась способность к капсулообразованию. Капсула служит не только средством защиты, но и фактором агрессии микроорганизмов, что затрудняет борьбу с ними.

8. В последнее время под влиянием различных факторов у некоторых микроорганизмов появилась способность к роению: иногда одна колония расплзлась по всей поверхности среды (моракселлы, ацинетобактеры, БГКП).

9. В настоящее время аэромонады в чистом виде в открытых водоёмах практически не встречается. Регистрируется полиэтиологическое заболевание - бактериальная геморрагическая септицемия (БГС), вызываемая ассоциациями нескольких видов микроорганизмов: энтеробактериями, аэромонадами,

моракселлами, ацинетобактерами, энтерококками, миксобактериями. Количество сопутствующей условно-патогенной микрофлоры постепенно увеличивается.

10. Во всех рыбоводных хозяйствах необходим постоянный санитарно-бактериологический контроль за уровнем ОМЧ воды, т.к. от этого зависит иммуно-физиологический статус рыбы. При его снижении, может наступить контаминация внутренних органов и рыба будет тратить свои энергоресурсы на борьбу с контаминантами вместо увеличения массы тела

11. Большинство возбудителей, вызывающих БГС, в том числе и вирулентные аэромонады (*A.sobria*, выделенные от учащихся в г. Дмитрове при желудочно-кишечном расстройстве) принимают активное участие в развитии патологических процессов в различных органах у человека, в связи с чем необходимо строгое соблюдение техники безопасности при работе на водоёмах, с рыбой и в цехах при производстве комбикормов.

12. Цитоплазматическая вакцина ВЮС-2 и формолвакцина (бактерин), полученные из высоковирулентного штамма *A.sobria* 77-18, выделенного из патматериала от белого толстолобика с клиническими проявлениями, показали свои высокие протективные свойства, не только против гомологичного штамма, но и против гетерологичных штаммов аэромонад и вибрионов.

13. Использование пробиотических препаратов СУБ-ПРО, Зоонорма, Бифидум-СХЖ, ацидофильного молока «Наринэ» позволяет не только повышать иммуно-физиологический статус рыб в неблагоприятных условиях, но и улучшать комбикорма неудовлетворительного качества. Проведение курса кормления с пробиотиком при выходе из зимовки позволяет рыбе быстро восстановиться, проведение курсовых приёмов пробиотика при повышении температуры во время вегетационного периода повышает иммуно-физиологический статус рыбы и не допускает развития БГС. Кормление рыбы кормом с пробиотиком перед уходом на зимовку способствует более успешному перенесению тяжелых условий зимнего периода.

14. Предложенная схема идентификации микроорганизмов в

значительной степени облегчает работу бактериологов НИИ и практических лабораторий.

## 8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева, Е.В. Роль водной среды в формировании состава микрофлоры угля Вислинского залива / Е.В. Авдеева // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: Сборник тезисов докладов Всероссийской научно-практической конференции, Москва, 16-18 июля, 2003. - М., 2003. - С. 10-11.

2. Авдеева, Е.В. Микрофлора промысловых видов рыб из естественных водоёмов Калининградской области / Е.В. Авдеева, О.В.Казимирченко // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: Расширенные материалы 4 Международной конференции, Борок - Москва, 24-27 сентября, 2015. - Ярославль. 2015. - С.377-380.

3. Авдеева, Е.В. Условно-патогенные бактерии рыб внутренних водоёмов Калининградской области и их патогенное значение // Е.В. Авдеева, М.Ю. Котлярчук // Тезисы докладов съезда Гидробиологического общества РАН, Калининград, 23 сентября, 2001. Т.3. - Калининград, 2001. - С. 3-4.

4. Аморос Хименес, Г.К. Кишечная микрофлора промысловых рыб Волго-Каспийского региона / Г.К. Аморос Хименес, Л.В. Ларцева // Биологическое и рациональное использование гидробионтов, их роль в экосистемах. Тезисы докладов конференции молодых учёных ТИНРО, Владивосток, 27-29 апреля, 1993. - Владивосток, 1993. - С. 3-4.

5. Афанасьев, В.И. Механизм возникновения эпизоотии аэромоноза карпов в прудовых хозяйствах / В.И. Афанасьев // Пути улучшения ветеринарно-санитарных мероприятий по профилактике и ликвидации инфекционных болезней рыб в рыбоводных хозяйствах и бассейнах зимовальных комплексов. Всесоюзный семинар. - М., 1978. - С. 5-6.

6. Афанасьев, В.И. Влияние температуры воды на развитие аэромоноза у рыб (карпов) / В.И. Афанасьев // Ветеринария. - 1978. - №9. - С. 56-58.



7. Афанасьев, В.И. Использование кротонолактона при аэромонозе рыб / В.И. Афанасьев, В.С. Сулейманян // Ветеринария. - 1977. - №4. - С. 68-70.
8. Афанасьев, В.И. Аэромоноз растительноядных рыб / В.И. Афанасьев, В.С. Сулейманян, В.В. Панасенко // Сельские зори. - 1978. - №5. - С. 56.
9. Бауер, О.Н. Болезни прудовых рыб / О.Н. Бауер, В.А. Мусселиус, Ю.А. Стрелков // М: Колос, 1969. - 335 с.
10. Бауер, О.Н. Болезни прудовых рыб / О.Н. Бауер, В.А. Мусселиус, Ю.А. Стрелков // М: Лёгкая и пищевая промышленность, 1981. - 320 с.
11. Беретарь, И.М. Анализ эпизоотической ситуации по болезням рыб в Краснодарском крае в 2009 году / И.М. Беретарь // Ветеринария Кубани. - 2010. - №1. - С. 16-19.
12. Беретарь, И.М. Эпизоотическая обстановка по болезням рыб в Краснодарском крае и разработка комплекса оздоровительных мероприятий / И.М. Беретарь, А.А. Лысенко // Труды Кубанского гос. аграрного университета. -2009. - №1, ч.1. - С. 14-21.
13. Бжевская, Л.И. Характеристика микрофлоры, выделенной от здоровой молоди сёмги и при патологических процессах на Солзенском лососевом рыбозаводе Архангельской области / Л.И. Бжевская // Информационный пакет Аквакультура. Болезни рыб / Всероссийский научно-исследовательский и проектно-конструкторский ин-т экон., инф. и АСУ рыбного хозяйства. - 1998. - №2. - С. 22-24.
14. Богдан, В.В. Влияние экспериментальной аэромонадной инфекции на тканевые липиды карпа / В.В. Богдан, Л.Н. Юхименко, Л.П. Смирнов // «1 Симп. по экол. биохимии рыб, Ярославль, окт., 1987. Тезю докл.» Ярославль, 1987.- С.27-28.
15. Богдан, В.В. Влияние аэромонадной инфекции на фосфолипиды крови годовиков карпа / В.В. Богдан, Л.Н. Юхименко, Л.П. Смирнов // Сб. науч. тр.: Болезни рыб. Вып. 63.- М.: ВНИИПРХ, 1991. - С.33-39.
16. Богдан, В.В. Особенности липидного обмена у иммунизированных голодных и питающихся карпов при спонтанном аэромонозе // В.В. Богдан, Л.П.

Смирнов, Л.Н. Юхименко // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расширенные материалы научно-практ. конференции. Борок, 16-18 июля 2003 г. М.: 2004.- С. 54-62.

17. Богомол, Э.В. Процессы антропогенного воздействия на экосистемы /Э.В. Богомол // Морфологические и функциональные особенности гидробионтов: Тезисы докладов межрегиональной научной конференции. - М., 2001. - С.10-12.

18. Борисова, М.Н. Эпизоотическая ситуация рыбохозяйственных водоёмов Московской области и пути её улучшения / М.Н. Борисова, Н.Г. Козаченко, И.П. Иренков // Тезисы докладов Международной конференции «Проблемы инфекционных и инвазионных болезней в животноводстве на современном этапе». - М., 1999. - С. 141-142.

19. Борисова, М.Н. Дифференциальная диагностика аэромоноза карпов / М.Н. Борисова, Т.Д. Пичугина, И.П. Иренков, Т.М. Новоскольцева, В.И. Козлова, М.В. Черкасова, Е.А. Завьялова // Ветеринария. - 2003. - №9. - С. 25-28.

20. Борисова, М.Н. С заботой о здоровье рыб / М.Н. Борисова, Т.Д. Пичугина, Е.А. Завьялова, А.Е. Дрошев, В.В. Стаффорд // Рыбное хозяйство. - 2010. - №5. - С. 71-73.

21. Бурлаченко, И.В. Изменения в метаболизме молоди стерляди под воздействием микроорганизмов комбикормов в условиях индустриального культивирования / И.В. Бурлаченко // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Материалы 3 Международной конференции с элементами школы для молодых учёных, аспирантов и студентов, Петрозаводск, 22-26 сентября, 2010. - 2010. - С. 18-19.

22. Бурлаченко, И.В. Бактериальная обсеменённость комбикормов / И.В. Бурлаченко, К.Б. Аветисов, Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова // Рыбоводство и рыболовство. - 2001. - №2. - С. 16-18.

23. Бурлаченко, И.В. Влияние бактериального заражения кормов на рост и химический статус молоди стерляди / И.В. Бурлаченко, К.Б. Аветиаов, Л.Н. Юхименко. Л.И. Бычкова // Научно-практическая конференция «Проблемы и

перспективы развития аквакультуры в России»: Материалы докладов , Адлер, сентябрь, 24-27, 2001 г. - Краснодар: Здравствуйте, 2001. - С. 151-152.

24. Бычкова, Л.И. Микробиоценоз радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) и водной среды при садковом выращивании: /Л.И.Бычкова // Автореф. дис. канд. биол. наук. Московская государственная технологическая академия (МГТА). - 2002. - 25 с.

25. Бычкова, Л.И. Краткая оценка эпизоотического состояния рыбоводных хозяйств и водоёмов Московской области / Л.И.Бычкова, Л.Н.Юхименко // Тезисы докладов научной конференции «Морфологические и физиологические особенности гидробионтов». - М.: МГТА, 2001. - С.12-18.

26. Бычкова, Л.Н. Факторы, способствующие развитию бактериальной геморрагической септицемии (БГС) карпа в прудовом рыбоводстве / Л.И. Бычкова, Л.Н.Юхименко, Г.А. Бабич // Рациональное использование пресноводных экосистем - перспективное направление реализации национального проекта "Развитие АПК": Международная научно-практическая конференция, Москва, 17-19 декабря, 2007. - М., 2007. - С. 380-383.

27. Ванятинский, В.Ф. Болезни рыб / В.Ф. Ванятинский, Л.М. Мирзоева, А.В. Поддубная // М., Пищевая промышленность, 1979. - С. 73-81.

28. Ващенко, А.В. Применение пробиотических кормовых добавок NUPRO<sup>®</sup> и BIO-MOS<sup>®</sup>. Результаты при выращивании разновозрастных групп канального сома (*Ictalurus punctatus* Rafinesque) / А.В. Ващенко // Рыбоводство и рыбное хозяйство. - 2016. - №10. - С. 52-61.

29. Велибекова, С.Р. Патоморфологический анализ жабр осетровых рыб Кура-Каспийского бассейна / С.Р. Велибекова, Э.К. Рустамов // Материалы I Международной научно-практической конференции молодых учёных «Комплексные исследования биологических ресурсов южных морей и рек», Астрахань, 7-9 июля 2004.- Астрахань, 2004.- С. 44-48.

30. Видишев, Ю.А. Диагностика аэромоноза лососевых рыб Магаданской области / Ю.А. Видишев // Междунар. вестн. вет., 2011, №3.- С. 46-48.

31. Витомскова, Е.А. Диагностика аэромоноза тихоокеанских лососей при искусственном рыборазведении в условиях Магаданской области / Е.А. Витомскова, Е.М. Скоробрехова // Труды Международного Форума по проблемам науки, техники и образования, Москва, 1-5 декабря, 2003. Т. 2. - М., 2003. - С. 112-114.

32. Владовская, С.А. Иммуностимуляторы в кормах для рыб / С.А. Владовская // Анал. и реф. инф. Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре . - Всерос. н.-и. и проект.-конструкт. ин-т экон., инф. и АСУ рыбного хозяйства. - 2001, №4. - С. 23-26.

33. Вовк, Н.И. Адгезия бактерий к эритроцитам рыб / Н.И. Вовк // Проблемы иммунологии, патологии и здоровья рыб и других гидробионтов - 2: Расширенные материалы Международной научно-практической конференции, Борок, 17-20 июля, 2007. М., 2007. - С. 12-13.

34. Вовк, Н.И. Микрофлора рыб как индикатор их физиологического состояния и экологии волной среды / Н.И. Вовк, А.В. Руденко // Тезисы докладов науч. конф. - Киев, 1994. - С. 179-180.

35. Волынкин Ю.Л. Краснуха в рыбхозах Белгородской области / Ю.Л. Волынкин, С.П. Ноздрин, Т.Ф. Евсюкова, А.Г. Борисов и др. // Рыб. х-во. - 1991, №9. - С. 41-43.

36. Гаврилин, К.В. Влияние факторов окружающей среды на микробиоценоз рыбоводных прудов / К.В. Гаврилин, Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова // Материалы международной научн.-практ. конф. «Аквакультура начала XXI века: истоки, состояние, стратегия развития». Рыбное, 3-6 сентября 2002 г. - М., 2002. - С. 228-235.

37. Гаврилин, К.В. Оценка возможности применения медицинских препаратов, стимулирующих метаболические процессы, для коррекции стрессовых нагрузок и ускорения регенерации тканей рыб / К.В. Гаврилин, Т.А. Суворова, А.К. Пономарёв // Тр. ВНИРО, 2016. - 162.- с. 145-149.

38. Гаврилин, К.В. Экспериментально-производственные испытания бактериина против аэромоноза рыб / К.В. Гаврилин, Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова // Сб. науч. трудов. Болезни рыб. Вып. 79 / ВНИИПРХ. - М., 2004. - С. 46-54.
39. Головина, Н.А. Влияние аэромонад с различной вирулентностью на картину крови карпа в эксперименте / Н.А. Головина, Л.Н. Юхименко // Сб. научн. трудов. Болезни рыб. Вып. 63 / ВНИИПРХ. - М., 1991. - С. 74-82.
40. Головина, Н.А. Ихтиопатология / Н.А. Головина, Ю.А. Стрелков, В.Н. Воронин и др. // М., Колос, 2010. - С. 155-194, 469-473.
41. Гончаров, Г.Д. Серологическая диагностика, как новое доказательство вирусной природы «краснухи» карповых / Г.Д. Гончаров // Рыбное хозяйство, 1949, №4.- С. 45-46.
42. Гусева, Н.В. К вопросу об изучении краснухи у карпов в Ленинградской области / Н.В. Гусева // Изв. ВНИИОРХ, 1939, т.22. - С. 131-159.
43. Денисов, А.И. Аэромоноз карпа в рыбоводно-карповодных хозяйствах // 4 Всесоюзное совещание по рыбохозяйственному использованию теплых вод / А.И. Денисов // Курчатов, октябрь, 1990: Тезисы докладов. - М., 1990. - С. 177-178.
44. Догель, В.А. Бактериальные заболевания рыб / В.А. Догель, М.А. Пешков, Н.В.Гусева // Пищепромиздат, - Москва. - 1939. - Ленинград.- 111 с.
45. Жезмер, В.Ю. Бактериальные болезни рыб в установках с замкнутым циклом водообеспечения, вопросы их профилактики / В.Ю. Жезмер, Е.В. Ляшенко, Е.А. Галдина, Н.В. Кутищева // 9 Всес. совещ. по паразитам и болезням рыб, Петрозаводск, март 1991. Тезисы докладов.- Л., 1990.- С. 44-45.
46. Завгородняя, Е.Ф. Некоторые биологические свойства возбудителей брюшного тифа и паратифа В, выделенных от больных и бактерионосителей / Е.Ф.Завгородняя, И.Е.Троп // ЖМЭИ. - 1973, №5. - С. 21-24.
- 46 а. Иванова, Г.М. Эффективность применения препарата из *Azomonas agilis*, 24 в рыбоводстве / Г.М. Иванова, Н.М. Швец, Н.С.Жук, Н.Н. Гаврилова, Л.И. Захаренко // Тезисы докл. V Всесоюзн. симпоз. по инфекц. болезням рыб «Профилактика, лечение и диагностика инфекционных болезней рыб».- Москва,

1986.- С. 32-33.

46 б. Иванова, Н.Т. Атлас клеток крови рыб (сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб) / Н.Т. Иванова // Москва. - «Лёгкая и пищевая промышленность». -1983. - 79 с.

47. Илясова, В. А. Изучение особенностей полового созревания карпа при вакцинации против аэромоноза / В.А. Илясова, Л.Н. Юхименко, Е.Ф. Трямкина, Г.С. Койдан // Сб. науч. трудов Паразиты и болезни рыб. М.: Изд-во ВНИРО.- 2000.- С. 160-164.

48. Йоргенсен, Дж. Х. Микробиологический справочник для клиницистов (перевод с англ.) / Дж. Х. Йоргенсен, М.А. Пфеллер // М.: Мир. - 2006. - 244 с.

49. Иранманеш, А. Гистопатологические изменения при гепаторенальной интоксикации у *Aphanius hormuzensis* (*Aphaniidae*), вызванной гентамицином, и регенерация его почек посредством нефронного неогенеза / А. Иранманеш, М. Мотамеди // М.: Вопросы ихтиол. - 2018.- **58**, №6.- С.745.

50. Казанский, Б. Особенности функций яичников и гипофиза у рыб с порционным икрOMETанием / Б. Казанский // Тр. лаб. основ рыбоводства. - 1949, Т.2. - С.64-120.

51. Калина, Г.П. Микроорганизмы рода *Aeromonas*, патогенность для человека, патогенез и эпидемиология (обзор зарубежной литературы) / Г.П.Калина // ЖМЭИ.- 1974, №10. - С. 105-109.

52. Калинина, Н.Р. К вопросу об этиологии осеннего заболевания молоди сёмги, выращиваемой на Князегубском рыбозаводе / Н.Р. Калинина, Т.Л. Сорокина // «Проблемы изучения, рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря». Тезисы докладов региональной конференции, Архангельск, 1985. Архангельск, 1985. - С.230-231.

53. Калюк, А.Н. ДНК-азная активность как один из тестов определения патогенности стафилококков / А.Н. Калюк // Лабораторное дело.- 1971, №1. - С. 53-55.

53а. Карасёва, Т.А. Влияние препарата «Сухая бактериальная культура ацидофильной палочки» на здоровье и рост радужной форели / Т.А. Карасёва,

Н.К. Воробьева, М.А. Лазарева // Марикультура Северо-Запада России: Тезисы докл. науч.-практ. конф. - Мурманск, 2000.- С. 22-23.

54. Каховский, А.Е. Взаимосвязь интенсификации рыбоводства, условий обитания аэромонад и клинического состояния рыб / А.Е. Каховский, Л.В. Михайловская, Л.В. Кузьмина // Интенсификация выращивания товарной рыбы в Молдавии. - Кишинев. - 1989. - С. 68-79.

55. Каховский, А.Е. Экология условно-патогенных гетеротрофных бактерий в интенсивно эксплуатируемых рыбоводных прудах Молдавии и профилактика болезней рыб бактериальной этиологии / А.Е. Каховский, Л.В. Михайловская // 9 Всес. совещ. по паразитам и болезням рыб, Петрозаводск, март, 1991: Тезисы докладов. - Л., 1990. - С. 57-58.

56. Копылова, Т.В. Влияние плотности выращивания сеголетка карпа (*Cyprinus carpio* L.) на его рост / Т.В. Копылова // Динамика зооценозов, проблемы охраны и рационального использования животного мира Белоруссии: Тезисы докладов 6 зоологической конференции, Витебск, 19-21 сентября 1989 . - АН БССР, Ин-т зоологии. - Минск, 1989. - С. 18-19.

57. Котлярчук, М.Ю. Микрофлора карпа, выращиваемого в замкнутой системе водоснабжения Калининградского рыбного порта / М.Ю. Котлярчук // Биомониторинг и рациональное использование морских и пресноводных гидробионтов: Тезисы докладов конф. молодых учёных, Владивосток, 24-26 мая, 1999. - Владивосток, 1999. - С. 153-154.

58. Котлярчук, М.Ю. Санитарное состояние выращиваемого карпа в установках с замкнутой системой водообеспечения Калининградского морского рыбного порта / М.Ю. Котлярчук // Сб. науч. тр. Балт. гос. акад. рыбопромысл. флота. - 2000. - № 38. - С. 33-38.

59. Котлярчук, М.Ю. Микробный пейзаж карпа (*Cyprinus carpio* L.) при выращивании в установке с замкнутым циклом водообеспечения / М.Ю. Котлярчук // Автореф. дис. канд. биол. наук. - Калининград: Калинингр. гос. техн. ун-т, 2004. - 22 с.

60. Кузнецова, Е.В. Роль бактериальных болезней рыб в формировании эпизоотического состояния садковых хозяйств / Е.В. Кузнецова // Междунар. вестн. вет. 2015, №2.- С. 7-10.

61. Кухаренко, Н.С. Проявление инфекционной болезни карповых рыб (аэромоназ) в условиях Амурской области / Н.С. Кухаренко, И.В. Ковальчук, Н.В. Яковлева // Вестн. КрасГАУ. 2012, №8. - С. 134-135.

62. Ларцева, Л.В. Мониторинг аэромонадной контаминации промысловых рыб Волго-Каспийского бассейна / Л.В. Ларцева // Рыбохозяйственные исследования на Каспии: Результаты НИР за 1999 год / КаспНИИРХ. - Астрахань, 2000. - С. 300-301.

63. Ларцева, Л.В. Санитарно-эпизоотическая ситуация Волго-Каспийского региона на рубеже XXI века / Л.В.Ларцева, В.В.Проскурина, Л.В. и др. // Обзорная информация, серия: Болезни гидробионтов в аквакультуре. - М. - 2002, вып. 1. - С. 1-52.

64. Литов, А.В. Что мешает рыбе быть здоровой / А.В. Литов, Л.Н. Юхименко // Комбикорма, 2009, №8. - С. 51-52.

65. Лобунцов, К.А. Краснуха и «краснухоподобные» болезни рыб (этиология и дифференциальная диагностика) / К.А. Лобунцов // В кн.: Новые методы и опыт оздоровления рыбохозяйственных водоёмов от заразных болезней рыб. М., 1974. С. 70-74.

66. Лобунцов, К.А. Экспериментальное исследование эффективности вакцинации бактерином против аэромоназа карпов, выращенных в прудовых условиях на тёплых водах / К.А. Лобунцов, В.Р. Микряков, А.В. Попов, И.Г. Гречанов // Сб. тезисов докладов науч.-практ. конф. 21-22 ноября 2000 г. «Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре». М. - Россельхозакадемия. - 2000. - С. 85-86.

67. Лукьяненко, В.И. Иммунобиология рыб. Врождённый иммунитет / В.И. Лукьяненко // М.: Агропромиздат, 1989. - 270 с.

68. Лукьянова, Н.А. Применение пробиотиков Субалин и Зооноорм в прудах ЭПО Якоть и экономические затраты на пробиотики и корм за летний сезон / Н.А.



Лукьянова, Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова // Сб. научн. тр. «Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры». - М.: Компания Спутник+, 2006. - Вып. 81. - С. 129-135.

69. Луллу, А.В. О некоторых заболеваниях радужной форели (*Salmo gairdneri* R.), выращиваемой в бассейнах с солоноватой водой Рижского залива / А.В. Луллу, С.Г. Пученкова, К.О. Висманис, И.Г.Бургале // Актуал. пробл. зоол. . - Рига, 1989. - С.41-46.

70. Мазур, Т.В. Эпизоотическая ситуация по аэромонозу карпов и его поликультуры / Т.В. Мазур, И.Е. Гаркуша // Молодые учёные в решении актуальных проблем науки: Материалы 5 Международной научн.-практ. конференции. Владикавказ, 19-21 июня, 2014. - Владикавказ, 2014. - С.219-221.

71. Макарова, О.В. Механизмы развития сепсиса у человека при инфицировании *Aeromonas* spp. / О.В. Макарова // Сб. научных трудов Российско-Китайского семинара / М.: Медицина для всех. - 2007. - С. 29.

72. Макеева, А. Периодизация оогенеза у карповых рыб / А. Макеева, Н.Емельянова // Вопросы ихтиологии. - 1989. - 1989. - Т.29, вып.6. - С.931-943.

73. Маммаев, М.А. Оптимальная плотность посадки молоди стерляди, выращиваемой в установке с замкнутым циклом водоснабжения / М.А. Маммаев, М.М. Шихшабеков, М.К. Мирзаханов, Л.М. Маммаева // Вестн. ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация. 2018.- №3.- С.78-82.

74. Мельникова, С.Е. Микробиоценоз форелевого садкового хозяйства «Вирма» Карельской области в районе Сонострова Белого моря / С.Е. Мельникова, Т.В. Безгачина, А.Н. Козицкий // Марикультура Северо-Запада России: Тезисы докладов науч.-практ. конференции, Мурманск, 25-27 окт., 2000. - Мурманск, 2000. - С. 32.

75. Мессинова, О.В. Дезоксирибонуклеаза патогенных бактерий (обзор литературы) / О.В. Мессинова, Д.В. Юсупова // ЖМЭИ, 1966, №3. - С. 39-43.

76. Мессинова, О.В. Дезоксирибонуклеазная активность коринебактерий и её связь с токсичностью / О.В. Мессинова, Д.В. Юсупова, Н.С Шамсутдинов // ЖМЭИ, 1963, №1. - С. 20-25.

77. Методические рекомендации по определению патогенности аэромонад по степени ДНКазной активности / Юхименко, Л.Н. // Сб. инструкций по борьбе с болезнями рыб.- М.: Отдел маркетинга АМБ-агро,1998.- Ч.1. - С.150-151.

78. Микряков, В.Р. Закономерность формирования приобретённого иммунитета у рыб / В.Р. Микряков // Рыбинск, 1991. - 151 с.

79. Мирзоева, Л.М. Использование иммуностимуляторов в рыбных кормах / Л.М. Мирзоева // Инф. пакет. Аквакультура. Болезни рыб / Всерос. н.-и. и проект.-конструк. ин-т экон., инф. и АСУ рыб. хоз-ва. - 1999. - №1. - С. 47-49.

80. Мурза, И. Периодизация гаметогенеза и шкалы зрелости половых желёз самок и самцов кумжи / И. Мурза, О. Христофоров // Сб. науч. тр. ГосНИОРХ. - 1984. - Вып. 220. - С. 19-41.

81. Неретин, М.В. Инактивация возбудителя аэромоноза карповых рыб в водной среде с применением озона / М.В. Неретин // Вет. патол. - 2005. - №2. - С.86-92.

82. Новоскольцева, Т.М. Аэромоноз карпов: совершенствование мер борьбы и профилактика болезни / Т.М. Новоскольцева // Вет. с.-х. животных. 2011, №7. - С.12-15.

83. Новоскольцева, Т.М. Микрофлора крови карпов при язвенном синдроме / Т.М. Новоскольцева, И.П. Иренков, М.Н. Борисова // 1 Конгр. ихтиологов России, Астрахань, сент., 1997: Тез. докл. - Астрахань, 1997. - С. 383-384.

84. Обухова, О.В. Факторы, определяющие бактериальную контаминацию внутренних органов судака естественной популяции и в условиях аквакультуры / О.В. Обухова, Л.В. Ларцева // Эпизоотологический мониторинг в аквакультуре: состояние и перспективы: Расширенные материалы Всероссийской науч.-практ. конференции-семинара, Москва, 13-14 сент., 2005. - М., 2005. - С. 86-91.

85. Определитель бактерий Берджи / Под ред Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли и С. Уилльямса // Пер. с англ. - 9-е изд.,- в 2-х томах. - М.: Мир. - 1997. - С. 780.

86. Осадчая, Е.Ф. Выделение цитопатогенных агентов от карпов при острой форме краснухи / Е.Ф. Осадчая // Ветеринария, 1964, №9. - С. 29-34.

87. Осадчая, Е.Ф. Рабдовирусы, выделенные от больных краснухой карпов, и некоторые их свойства / Е.Ф. Осадчая // Рыбное хозяйство, 1977, №5. - С. 36-39.

88. Павлюк, А.А. Влияние условий выращивания в прудах на жизнестойкость выпускаемой молоди проходных осетровых видов рыб / А.А. Павлюк, Е.В. Горбенко // Вопросы рыболовства, 2018, **19**, №4.- С. 445-450.

89. Паршута, В.В. К проблеме изучения аэромонозов диких и искусственно выращиваемых рыб в прибрежных водах Балтийского моря / В.В. Паршута, Н.М. Кузнецова, И.Е. Таболина, И.Р. Бриезде // 3 Всес. конф. по мор. биол., Севастополь, 18-20 окт., 1988: Тезисы докл. - Ч. 1. - Киев, 1988. - С. 77-78.

90. Пастер, Е.У. Изучение патогенных и энтеротоксигенных свойств стафилококков и оценка методов их определения / Е.У. Пастер // Автореф. дисс. канд. мед. наук, Львов, 1971. - 19 с.

91. Пастер, Е.У. Частота продуцирования энтеротоксина ДНКзаположительными стафилококками разного происхождения / Е.У. Пастер // Материалы II съезда фармакологов Украинской ССР. - Киев: Здоровье, 1973. - С. 78.

92. Патент "Штамм бактерий *Aeromonas sobria* - продуцент протективного антигена" (SU 1839458 A1 C12 N1/20 Ф 61 K39/02, 1989).

93. Пищенко, Е.В. Аэромоноз (краснуха) карпов / Е.В. Пищенко // Рыбоводство и рыб. х-во, 2006, №10. - С. 32-34.

94. Плюснин, В.В. Ихтиопатологические исследования культивируемых тихоокеанских лососей в Приморье / В.В. Плюснин, В.Н. Валова, М.В. Калинина, Ю.П. Шульгин // Науч.-техн. пробл. марикультуры в стране: Тез. докл. Всес.конф., 16-20 мая, 1990. - Владивосток, 1989. - С. 182-183.

95. Поздеев, О.К. Медицинская микробиология: учебное пособие / О.К. Поздеев // Под ред. В.И. Покровского. - 4-е изд. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. - 768 с.

96. Полтева, А.В. Микробиологическая оценка состояния ихтиофауны озера Тунайча (о.Сахалин) / А.В. Полтева, Л.М. Кондратьева // *Microorganisms in*

Ecosystems of Lakes, Rivers and Reservoirs: Abstracts of International Baikal Symposium on Microbiology, Irkutsk, Sept., 8-13, 2003. - Irkutsk, 2003. - С. 129-130.

97. Просяная, В.В. Онекоторых инфекционных болезнях рыб (белого амура, канального сома и стекловидного угря) - новых объектов рыбоводства, акклиматизируемых на Украине / В.В. Просяная, Л.М. Хуторной, Г.Г. Соколовская // Респ. конф. по акклиматизации и внедрению новых объектов рыбоводства в водоёмах Украины. Киев, 1978. - С. 81-84.

98. Пученкова, С.Г. Аэромонадная инфекция у культивируемых рыб / С.Г. Пученкова, Т.В. Безгачина // Рыб. х-во, 1991, №12. - С. 68-69.

99. Пученкова, С.Г. Бактериальная септицемия радужной форели, выращиваемой в солоноватых водах / С.Г. Пученкова, А.В. Луллу // Науч.-техн. пробл. марикультуры в стране: Тез. докл. Всес. конф. 16-20 мая, 1990. - Владивосток, 1989. - С. 185-186

100. Пьяцца, А. Анализ иммунологических данных: Методы исследований в иммунологии / А. Пьяцца // Под ред. Лефковита И., Перниси Б. - М.: Мир, 1981. - С. 429-473.

101. Рокицкий, П. Биологическая статистика / П. Рокицкий // Минск: Высшая школа. - 1957. - 327 с.

102. Ромейс, Б. Микроскопическая техника / Б. Ромейс // М.: Изд-во иностранной литературы. - 1954. - С. 711.

103. Самуйленко, А.Я. Специфическая профилактика бактериальной геморрагической септицемии (аэромоноза) рыб / А.Я. Самуйленко, Е.Э. Школьников, С.А. Гринь, Н.К. Еремец, Ю.Д. Фролов, В.И. Еремец, Л.Н. Юхименко, А.В. Климов // Тр. Кубан. гос. аграр. ун-та. 2009, №1, ч.1. - С. 93-95.

104. Самуйленко, А.Я. Способ получения вакцины против аэромоноза рыб /А.Я. Самуйленко, Е.Э. Школьников, А.А. Раевский, С.А. Гринь, Л.В. Анисимова, Л.А. Коротева, Г.Ф. Коломнина, Л.Н. Юхименко, А.В. Климов, В.И. Еремец // Патент 2431664 Россия, МПК С12N 1/20, А61К 39/02 ВНИТИБП, № 2010122828/10; Заявл. 07.06.10; Опубл. 20.10.11.

105. Самуйленко, А.Я. Разработка технологии производства и испытание инактивированной формолвакцины против геморрагической септицемии рыб // А.Я. Самуйленко, Л.Н. Юхименко, Е.Э. Школьников, С.А. Гринь, Н.К. Еремец, Ю.Д. Фролов, В.И. Еремец // Ветеринарна медицина. Науково-практична конференція з міжнародною участю: «Актуальні проблеми охорони здоров'я риб та інших гідробіонтів». - Феодосія, 26-29 травня 2008 р.- Харків, 2008. - С. 363-367.

106. Сакур, О. Определение стадий зрелости и изучение половых признаков рыб / О. Сакур, Н. Буцкая // М.: 1963. - С. 36

107. Сариев, Б.Т. Применение антибактериальных препаратов в составе полнорационного комбикорма для осетровых рыб / Б.Т. Сариев, А.Н. Туменов, Г.Г. Абсатиров, С.С. Бакиев // Центр. науч. вестн., 2017, 2, №7.- С.31-33.

108. Сердюк, А.В. Результаты предварительной оценки угрозы инфекционных заболеваний в полярной аквакультуре лососевых / А.В. Сердюк, Н.Р. Калинина // Науч.-техн. пробл. марикультуры в стране: Тез. докл. Всес. конф., 16-20 мая, 1990. - Владивосток, 1989. - С. 186-187.

109. Скурат, Э.К. Профилактика бактериальных болезней растительноядных рыб в прудовых хозяйствах Беларуси / Э.К. Скурат, Р.Л. Асадчая // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: Сб. тез. докладов Всерос. науч.-практ. конф., Москва, 16-18 июля, 2003. - С. 118.

110. Skourat, E.K. Bacterial diseases of herbivorous fishes in Belarus / E.K. Skourat, V.A. Sivolotskaya, R.L. Asadchaya // 2 United States and Russia Bilateral Conferenct on Aquatic and Marine Animal Health, Shepherdstown. W.V., 21-28 Sept., 2003. - Kearneysville (W.V.), 2003. - С. 48.

111. Скурат, Э.К. Биологический метод профилактики аэромоноза карпа / Э.К. Скурат, В.А. Сиволоцкая, Т.А. Говор, Е.И. Гребнёва // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси: Сб. тр. Белорусского научно-исследовательского научно-исследовательского и проектно-конструкторского института рыбного хозяйства. - Минск, 1995. - С.194-198.

112. Скурат, Э.К. Аэромоноз карпа и меры борьбы с ним в условиях Республики Беларусь / Э.К. Скурат, В.А. Сиволоцкая, Т.А. Говор, Е.И. Гребнёва // 1 Конгр. ихтиологов России, Астрахань, сент., 1997: Тез. докл. - Астрахань, 1997. - С. 390-391.

113. Смирнов, Л.П. Биохимическая вакцина против бактериальных болезней рыб / Л.П. Смирнов, В.В. Богдан, Л.Н.Юхименко // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: Сб. тез. докладов Всерос. науч.-практ. конф., Москва, 16-18 июля, 2003. - М., 2004. - С.120-121.

113а. Смирнов, Л.П. Временные методические рекомендации по сравнительному анализу штаммов аэромонад методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия / Л.П. Смирнов, Л.Н. Юхименко // М.: 1988. - 14 с.

114. Смирнов, В.В. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерий рода *Bacillus* / В.В. Смирнов // Микробиология, 1993, Т.55, №3. - С. 63-67.

115. Ткачёва, И.В. Витамины в питании рыб / И.В. Ткачёва, Н.Н. Тищенко // Тр. Кубанского гос. аграр. ун-та, 2011, №1.- С.140-142.

116. Ткачёва, И.В. Применение пробиотических препаратов Субтилис и СУБ-ПРО в комбикормах для осетровых рыб / И.В. Ткачёва, Н.Н. Тищенко // Там же.- С. 122-124.

117. Глупов, Т.Х. Особенности проявления аэромоноза карпов в прудовых хозяйствах / М.М. Глупов, М.М. Шахмуразов, Ж.М. Апажева // Биологическое разнообразие Кавказа: Материалы 6 Международной конференции, Нальчик, 2004. - С. 228-229.

118. Трифонова, Е.С. Применение пробиотиков для компенсации воздействия агрессивных факторов водной среды для выращивания осетровых рыб в системах / Е.С. Трифонова, Л.И. Бычкова, Л.Н. Юхименко, К.В. Гаврилин // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов. Сб. докладов Всерос. науч.-практ. конф., Москва, 16-18 июля 2003 г. - М.: 2004. - С. 130-131.

119. Трояшкин, А.А. Метод определения ДНК-азной активности стафилококков / А.А. Трояшкин // Вопросы иммунологии и микробиологии стафилококковых и стрептококковых инфекций. Под ред. проф. А.Н. Смирновой. Л., 1975, Т. 109. - С.31-33.

120. Устименко, Е.М. Применение пробиотика «СУБ-ПРО» при выращивании молоди кеты на лососевом рыбоводном заводе (Камчатка) / Е.М. Устименко, Н.Г. Винник // Расширенные материалы III Междунар. конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб», Борок, 18-22 июля 2011 года. М.: Изд-во РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2011.- С.263-266.

121. Фалеева, Т. Анализ атрезии овоцитов у рыб в связи с адаптивным значением этого явления / Т. Фалеева // Вопросы ихтиологии. - 1965, Т.5, Вып.3 (36). - С. 455-470.

122. Филиппова, О.П. Опыт использования пробиотического препарата - бифилактрина на ранней стадии выращивания бестера / Филиппова О.П., Бычкова Л.И., Трифонова Е.С., Мягких Ф.Ф // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расширенные материалы Всероссийской науч.-практ. конференции, Борок, 16-18 июля 2003 года. Москва, 2004. - С. 534-538.

123. Хандажапова, Б.Б. Микробиологический мониторинг промысловых рыб озера Байкал / Б.Б. Хандажапова, В.Ц. Цыдыпов // Актуальные вопросы ветеринарной медицины: Материалы Сибирского международного ветеринарного конгресса, Новосибирск, 3-4 марта, 2005. - Новосибирск, 2005. - С. 164-165.

124. Хомякова, Т.И. Исследование вирулентности штаммов *A. hydrophila*, полученных из разных природных источников / Т.И. Хомякова, Ю.Н. Хомяков, Т.Х. Борзенкова, В.Н. Борзенков, К.В. Гаврилин, Л.Н. Юхименко, С.Е.Северин // Сб. матер. Междунар. Конгресса «Ликвидация и элиминация инфекционных болезней - прогресс и проблемы», Ст.-Петербург, 2003. - С. 120.

125. Хуторной, П.М. Условно-патогенная бактериальная флора различных возрастных групп белого амура, выращиваемых в прудах Донрыбкомбината / П.М. Хуторной // Рыбное хозяйство, 1975, вып.20. - С. 67-82.

126. Чайка, Н.А. Кампилобактериоз / Н.А. Чайка, Л.Б. Хазенсон, Бутцлер Ж.П. и др. // М.: Медицина, 1988. - С. 251-270.

127. Чичин, В.Н. Микробиологические исследования осетрового хозяйства Ростовской области Российской Федерации / В.Н. Чичин, Т.В. Безгачина, С.Е. Мельникова // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: Сб. тезисов докладов Всерос. науч.-практ. конференции, Москва, 16-18 июля, 2003. - М., 2003. - С. 137-138.

128. Чукалова, Н.Н. Микрофлора леща (*Abramis brama* L.) Куршского залива (юго-восточная часть Балтийского моря) / Н.Н. Чукалова, Е.В. Авдеева // Международная научная конференция «Инновации в науке и образовании - 2006», Калининград, 18-20 окт., 2006: Труды научной конференции. Калининград, 2006. - С. 68-70.

129. Шестаковская, Е.В. Профилактика заболеваний молоди рыб (лещ, судак, рыбец) при искусственном воспроизводстве / Е.В. Шестаковская, Т.В. Стрижакова, В.Т. Костяков, А.А. Подзорова, А.В. Казарникова // Итоги науч.-практ. работ в ихтиопатологии / Межвед. ихтиол. комис., Центр. произв. ст. по акклиматиз. и борьбе с болезнями рыб Минсельхозпрода Рос. Федерации. - М., 1997. - С. 121-122.

130. Школьников, Е.Э. Разработка технологии производства и испытание иммунобиологических свойств вакцины против геморрагической септицемии (аэромоноза) рыб / Е.Э. Школьников, Н.К. Еремец, Л.В. Анисимова, Л.А. Коротаева, Л.Н. Юхименко, А.В. Климов // Журнал Ветеринария и кормление «ВЕТКОМ». М.: «Ол Маркет». - 2009, №3. - С. 30-31.

131. Шкурина, З.К. Результаты ихтиопатологических исследований производителей горбуши и кеты Сахалини в 2002 году / З.К. Шкурина, В.А. Принцевская // Труды СахНИРО. - 2003, №5. - С. 259-265.

132. Щелкунов, И.С. Лабораторные и полевые испытания иммуностимуляторов на основе РНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для профилактики вирусных и бактериальных болезней рыб / И.С. Щелкунов, Т.И.



Щелкунова, О.А. Купинская, Ю.С. Аликин, Л.Н. Юхименко // 1 Конгр. ихтиологов России, Астрахань, сент., 1997: Тез. докл. - Астрахань, 1997. - С. 397.

133. Щербина, А.К. Болезни прудовых рыб / А.К. Щербина // Госиздат сельскохозяйственной литературы. - М.: 1952. - С. 83-101.

134. Щербина, А.К. Болезни рыб / А.К. Щербина // Киев, "Урожай", 1973. - С.95-134.

135. Щербина, А.К. Болезни рыб и основы рыбоводства / А.К. Щербина, Ф.М. Суховерхов // М.: "Колос", 1964. - 295 с.

136. Южанинов, М.Н. Получение золотой форели на водопроводной воде / М.Н. Южанинов // Рыбоводство, 2009, №1. - С. 38-40.

137. Юхименко, Л.Н. Материалы к изучению роли аэромонад в патологии человека / Л.Н. Юхименко, С.Н. Харитонов, Г.С. Староверова // ЖМЭИ, 1977, №7.- С. 143-145.

138. Юхименко, Л.Н. Бактериальная геморрагическая септицемия рыб, вызываемая подвижными аэромонадами, и её профилактика / Л.Н.Юхименко // Первый Российско-Американский симпозиум "Аквакультура и здоровье рыб" (12-19 июля 1998 г., п. Рыбное, Московской обл.). - М.: 1998. - С. 179-180.

139. Юхименко, Л.Н. Использование пробиотиков для профилактики болезней рыб / Л.Н. Юхименко // Сб. Водные биологические ресурсы России: состояние, мониторинг, управление / Материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, посв. 85-летию КамчатНИРО 3-6 окт., 2017 г. - Петропавловск-Камчатский. - КамчатНИРО, 2017. - С. 360-361.

140. Юхименко, Л.Н. Влияние уровня обсеменённости бактериальной флорой комбикормов на патологию рыб / Л.Н. Юхименко // «Золотая осень - 2014» - главный аграрный форум России (Сб. материалов 16-й российской агропромышленной выставки (8-11 октября 2014 г., Москва, ВДНХ). - М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2014. - С. 180.

141. Юхименко, Л.Н. Изучение вирулентности аэромонад по степени ДНКазной активности / Л.Н. Юхименко // Рыбоводство и рыбное хозяйство. - 2016. - №3.- С. 28-34.

142. Юхименко, Л.Н. Факторы, влияющие на здоровье рыб / Л.Н. Юхименко // Рыбоводство и рыбное хозяйство. - 2017.- №3.- С. 38-43.

143. Юхименко, Л.Н. Бактериальные болезни лососевых рыб и методы их профилактики / Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова // Марикультура Северо-Запада России: Тезисы докладов науч.-практ. конференции, Мурманск, 25-27 окт., 2000. - Мурманск, 2005. - С. 44-45.

144. Юхименко, Л.Н. Факторы, влияющие на развитие бактериальных болезней у форели при садковом выращивании / Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова // Науч.-практ. конф. «Проблемы и перспективы развития аквакультуры в России»: Материалы докладов, Адлер, сент., 24-27, 2001 г. - Краснодар: Здравствуйте, 2001. - С.278-279.

145. Юхименко, Л.Н. Иммунопрофилактика бактериальной геморрагической септицемии (аэромоназа) рыб / Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова // Пресноводная аквакультура: состояние, тенденция и перспективы развития. Сб. научных статей, посв. 60-летию МолдНИРХС. Есо-TIRAS, Кишинёв, 2005. - С. 111-114.

146. Юхименко, Л.Н. Этиологическая структура возбудителей бактериальной геморрагической септицемии рыб / Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов - 2: Расширенные материалы Международной науч.-практ. конференции, Борок, 17-20 июля, 2007. М., 2007. - С. 95-98.

147. Юхименко, Л.Н. Бактериальная геморрагическая септицемия рыб / Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова // Материалы Международной науч.-практ. конферен. «Водные биоресурсы, аквакультура и экология водоёмов», 25-26 сент. 2013 г. , Калининград. - Калининград: Изд-во ФГБОУ ВПО «КГТУ», 2013. - С. 301-306.

148. Юхименко, Л.Н. Испытания лечебного комбикорма с субалином в рыбхозах Московской области / Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова, К.В. Гаврилин // Анал. реф. инф. Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре / ВНИЭРХ. - 2002, №2. - с. 18-27.

149. Юхименко, Л.Н. Этиологическая структура возбудителей бактериальной геморрагической септицемии рыб / Л.Н. Юхименко, Л.И.Бычкова, К.В. Гаврилин // Вестн. АГТУ, 2005, №4 (27). - С. 25-26.

150. Юхименко, Л.Н. Проблема экологической безопасности лечебных и профилактических мероприятий в рыбоводстве / Л.Н.Юхименко, Л.И. Бычкова, К.В.Гаврилин, Е.С.Трифоновна // Аквакультура и интегрированные технологии: проблемы и возможности: Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 60-летию Московской рыбоводно-мелиоративной опытной станции и 25-летию её реорганизации в ГНУ ВНИИР. Москва, 11-13 апр., 2005. Т.2. - пос. им. Воровского (Моск. обл.). 2005. - С. 344-347.

151.Юхименко, Л.Н. Мониторинг микробиоценоза осетровых рыб / Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова, П.П. Головин, А.В. Литов // Ветеринария, 2009, №4. - С. 25-28.

152. Юхименко, Л.Н. Возбудители бактериальной геморрагической септицемии (БГС) рыб, микрофлора воды и комбикормов, имеющая эпидемиологическое значение / Л.Н. Юхименко, Л.И.Бычкова, А.А. Дружинина // Дальневосточный журнал инфекционной патологии, 2015. №26. - С. 43-46.

153. Юхименко, Л.Н. Профилактика бактериальной геморрагической септицемии рыб с использованием Субалина (на примере ОАО Бисеровский рыбокомбинат) / Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова, А.Н. Зюкин // Рыбное хозяйство, 2009, №1. - С. 86-88.

154. Юхименко, Л.Н. Специфическая и неспецифическая профилактика аэромоноза карпа в тепловодном хозяйстве / Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова, Г.С.Койдан // /Состояние и перспективы научно-практических разработок в области марикультуры России: Материалы совещания. Ростов-на-Дону, август 1996. М.: Изд-во ВНИРО, 1996. - С. 354-360.

155. Юхименко, Л.Н. Разработка бактериина против аэромоноза рыб / Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова, Г.С. Койдан // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре: Сб. тез. докл. науч.-практ. конф., 21-22 ноября 2000 г. - М., 2000. - С. 129-131.

156. Юхименко, Л.Н. Комбикорма с пробиотиком как средство профилактики заболеваний рыб / Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова, Г.С. Койдан // Сб. науч. тр. «Кормление и физиология рыб» - М.: ВНИИПРХ, Аквакорм, 2001. - Вып. 77. - С. 91-95.

157. Юхименко, Л.Н. Эпизоотическая ситуация на Можайском производственно-экспериментальном коллекционном островном рыбоводном заводе / Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова, Е.С.Трифонова // Тезисы науч.-практ. конф. «Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре» 21-22 ноября 2000 г. М.-Россельхозакадемия, 2000. - С. 131-133.

158. Юхименко, Л.Н. Выделение аэромонад из воды рыбоводных прудов / Л.Н. Юхименко, В.Ф. Викторова, В.И. Федорченко // Сб.науч. тр. ВНИИПРХ, 1987, №50. - С. 37-46.

159. Юхименко, Л.Н. Чувствительность карпов и его гибридов к бактериальной и вирусной инфекциям / Л.Н. Юхименко, В.Ф. Викторова, И.С. Щелкунов, Т.И. Щелкунова, Н.Б. Черфас, О.В. Емельянова // Болезни и паразиты в тепловодном рыбоводном хозяйстве, Душанбе, 1987. - С. 34-37.

160. Юхименко, Л.Н. Химиотерапия бактериальных болезней рыб, достоинства и недостатки / Л.Н. Юхименко, К.В. Гаврилин, Л.И. Бычкова // Сб. тезисов Всерос. науч.-практ. конференции «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов». - М.: Россельхозакадемия, 2003. - С. 142-143.

161. Юхименко, Л.Н. Влияние антибактериальных препаратов на формирование лекарственной устойчивости бактерий в условиях интенсивного прудового рыбоводства / Л.Н. Юхименко, К.В. Гаврилин, Л.И.Бычкова // Сб. науч. трудов. Болезни рыб. Вып. 79. - ВНИИПРХ. - М., 2004. - С. 216-223.

162. Юхименко, Л.Н. Бактерин (инактивированная вакцина) для групповой обработки рыб против бактериальной геморрагической септицемии (аэромоноза) / Л.Н. Юхименко, К.В. Гаврилин, Л.И. Бычкова, Ю.А. Пуховский // Сб. науч.трудов ВНИИПРХ Актуальные проблемы пресноводной аквакультуры. - М.: Компания Спутник+, 2005. - Вып. 80. - С. 240-250.

163. Юхименко, Л.Н. Инактивированная вакцина против бактериальной геморрагической септицемии (аэромоназа) рыб / Л.Н Юхименко // Науч. основы производства ветеринарных биол. препаратов / Материалы Международной науч.-практ. конф., посвященной 35-летию ВНИТИБП, 26-27 мая 2005 г. - Щелково, 2005. С. 400-404.

164. Юхименко, Л.Н. Методы специфической и неспецифической профилактики болезней рыб в прудовом и индустриальном рыбоводстве / Л.Н. Юхименко, К.В. Гаврилин, Л.И. Бычкова, Е.С. Трифонова // Актуальні проблеми аквакультури та раціонального використання водних біоресурсів: Матеріали міжнародної науково-практ. конф. 26-30 вересня 2005 р., м. Київ. - Київ, 2005. - С. 307-308.

165. Юхименко, Л.Н. СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ КОРМА / Л.Н. Юхименко, П.П. Головин, Н.А. Головина, Г.С. Койдан, Г.В. Кулаков, В.И. Лазутин // Патент (19) RU (11) 2140165 (13) С1 (51) 6 А 23 К 1/00, А61 К 35/66 27.10.1999, Бюл. №30.

166. Юхименко, Л.Н. Результаты использования новой вакцины против аэромоназа и энтеросептического заболевания рыб / Л.Н.Юхименко, Н.В. Гусева, Г.С.Керекеша, В.И.Доманчук, Г.Х. Куркубет, А.С. Ващенко // Тезисы докладов Всерос. науч.-произ. совещания по проблемам развития пресноводной аквакультуры 15-19 ноября 1993 г. - М.: ВНИИПРХ, 1993. - С. 77-78.

167. Юхименко, Л.Н. Иммунопрофилактика аэромоназа рыб / Л.Н. Юхименко, Н.В. Гусева, Г.С. Койдан // 1 Конгр. ихтиологов России, Астрахань, сент., 1997: Тез. докл. - Астрахань, 1997. - С. 399.

168. Юхименко, Л.Н. Производственные испытания вакцинного препарата ВЮС-2 против аэромоназа карпа в Молдавии / Л.Н. Юхименко, Н.В. Гусева, Г.С. Койдан, В.И. Доманчук, Г.Х. Куркубет, Л.А.Растегаева // Паразиты и болезни рыб / Сб. науч. тр. - М.: Изд-во ВНИРО, 2000. - С. 157-159.

169. Юхименко, Л.Н. Профилактика как основа противозооотических мероприятий в современной аквакультуре / Л.Н. Юхименко, А.Н. Зюкин, М.Н.

Реперьяш, Л.И. Бычкова, Н.Н. Романова // Сб. науч. тр. «Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры». Вып. 86. - М. - 2011. - С. 134-138.

170. Юхименко, Л.Н. Изучение особенностей полового созревания карп при вакцинации против аэромоноза / Л.Н. Юхименко, В.А. Илясова, Е.Ф. Трямкина, Г.С. Койдан // Паразиты и болезни рыб / Сб. науч. тр. - М.: Изд-во ВНИРО, 2000. - С. 160-164.

171. Юхименко, Л.Н. Специфическая иммунопрофилактика аэромоноза (бактериальной геморрагической септицемии - БГС) рыб в условиях индустриального рыбоводства / Л.Н. Юхименко, А.В. Климов, Л.И. Бычкова, П.П. Головин // Сб. трудов Междунар. науч.-практ. форума «Стратегия 2020: интеграционные процессы образования, науки и бизнеса как основа инновации развития аквакультуры России» 23.12.2008-15.02.2009. - М.: 2009. - С. 44-48.

172. Юхименко, Л.Н. Экспериментальные испытания инактивированной формолвакцины против бактериальной геморрагической септицемии (аэромоноза) рыб, приготовленной промышленным способом / Л.Н. Юхименко, А.В. Климов, П.П. Головин, Л.И. Бычкова // Сб. науч. тр. «Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры». 2010, №85. - С. 133-136.

173. Юхименко, Л.Н. Современное состояние проблемы аэромоноза рыб / Л.Н. Юхименко, Г.С. Койдан // Инф. пакет. Аквакультура. Болезни рыб / Всерос. н.-и. и проет.-констр. ин-т экон., инф. и АСУ рыб. х-ва. - 1997. - №2. - С. 1-9.

174. Юхименко, Л.Н. Эпизоотическая значимость *Pseudomonas fluorescens* v. *capsulata* / Л.Н. Юхименко, Г.С. Койдан, В.Ф. Борисенко, П.П. Головин, Л.И. Бычкова // Рыбное хозяйство/ Сер. Аквакультура. Информ. пакет. Болезни рыб. - М.: ВНИЭРХ. 1998. - Вып.2. - С. 8-13.

175. Юхименко, Л.Н. Перспективы использования субалина для коррекции микрофлоры кишечника рыб и профилактики БГС / Л.Н. Юхименко, Г.С.Койдан, Л.И. Бычкова // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре: Сб. тез. докл. науч. практ. конф., 21-22 ноября 2000 г. М., 2000. - С.- 133-135.

176. Юхименко, Л.Н. Влияние антропогенного воздействия на микробиоценоз воды рыбохозяйственных водоёмов и рыбы / Л.Н. Юхименко,

Г.С. Койдан, Л.И.Бычкова // Науч.-практ. конф. «Проблемы и перспективы развития аквакультуры в России»: Материалы докладов, Адлер, сент. 24-27, 2001 г. Краснодар: Здравствуйте, 2001. - С. 280.

177. Юхименко, Л.Н. Применение антибактериальных препаратов и профилактика бактериальной геморрагической септицемии (аэромоназа) в рыбоводных хозяйствах / Л.Н. Юхименко, Г.С. Койдан, Л.И. Бычкова, Г.Г. Башкиров // Аналит. и реф. инф. Рыбн. хоз-во. Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре. - М.: ВНИЭРХ, 2000. - Вып. 2. - С. 1-6.

178. Юхименко, Л.Н. Биологические свойства аэромонад и их роль в патологии рыб / Л.Н. Юхименко, Г.С. Койдан, Л.И. Бычкова, Л.П. Смирнов // Анал. и реф. инф. Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре. - М.: ВНИЭРХ, 2001. - Вып.4. - С. 1-9.

179. Юхименко, Л.Н. Разработка бактериина для групповой вакцинации рыб против аэромоназа / Л.Н. Юхименко, Г.С. Койдан, Л.И. Бычкова, К.В. Гаврилин, И.А. Сурова // Науч.-практ. конф. «Проблемы и перспективы развития аквакультуры в России»: Материалы докладов, Адлер, сент.,24-27, 2001 г. - Краснодар: Здравствуйте, 2001. - С. 281.

180. Юхименко, Л.Н. Протективное действие субалина против болезней культивируемых рыб / Л.Н. Юхименко, Г.С. Койдан, П.П. Головин, Н.А. Головина, К.В. Гаврилин, И.А. Сурова // Науч.-практ. конф. «Проблемы и перспективы развития аквакультуры в России»: Материалы докладов, Адлер, сент., 2001 г. - Краснодар: Здравствуйте, 2001. - С. 282-283.

181. Юхименко, Л.Н. Специфическая и неспецифическая профилактика бактериальной геморрагической септицемии (БГС) рыб / Л.Н. Юхименко, Г.С. Койдан, Н.В. Гусева, Н.А. Головина, Л.И. Бычкова, Г.В. Кулаков // Проблемы развития рыбного хозяйства на внутренних водоёмах в условиях перехода к рыночным отношениям: Материалы междунар. науч.-практ. конф. / Минск, 15-16 окт., 1998 г. - Минск: Бел. изд. Товарищество «Хата». 1998. - С. 332-336.

182. Юхименко, Л.Н. Бактериальные контаминанты комбикормов и их влияние на среду обитания и организм рыб / Л.Н. Юхименко, А.В. Литов, Л.И.

Бычкова // Водные биоресурсы и аквакультура / Под ред. Грициняка И.И., Гринжевского Н.В., Третьяка А.М. - Киев, 2010. - С. 397-399.

183. Юхименко, Л.Н. Характеристика резистентности аэромонад к антибактериальным препаратам при разном уровне их использования в рыбоводных хозяйствах / Л.Н. Юхименко, А.В. Литов, А.В. Пименов, А.Н. Зюкин, Л.И. Бычкова // Рациональное использование пресноводных экосистем - перспективное направление реализации национального проекта "Развитие АПК": Междунар. науч.-практ. конф., Москва, 17-19 дек., 2007. М., 2007. - С. 434-437.

184. Юхименко Л.Н. Влияние антропогенного воздействия на микробиоценоз водной среды и рыбы садковых рыбоводных предприятий / Л.Н. Юхименко, А.В. Пименов, А.В. Литов, Л.И. Бычкова, А.В.Климов // Рац. использование пресноводных экосистем - перспективное направление реализации нац. проекта "Развитие АПК": Междун. науч.-практ. конф. 17-19 дек., 2007. М., 2007. - С. 373-375.

185. Юхименко, Л.Н. Влияние промышленных стоков на микробиоценоз воды и рыбы рыбоводных садковых хозяйств / Л.Н. Юхименко, А.В. Прадед, А.В. Пименов, А.В. Литов, Л.И.Бычкова // Материалы X Междунар. науч.-практ. экологической конференции Живые объекты в условиях антропогенного пресса 15-18 сент., 2008 г., Белгород. Белгород, 2008. - С. 242-243.

186. Юхименко, Л.Н. Влияние сбросных вод городских очистных сооружений на микробиоценоз реки Оскол / Л.Н. Юхименко, М.Н. Реперьяш, Б.Н. Койдан, П.П. Головин // Всерос. научн. конф. с междунар. участием, посв. 80-летию Татарского отд. ФГБНУ "ГосНИОРХ". - С.Пб., 2011. - С. 387-391.

187. Юхименко, Л.Н. Вакцина для профилактики бактериально-геморрагической септицемии рыб / Л.Н. Юхименко, Л.П. Смирнов // Патент (19) RU (11) 2080874 (13) с1 (51) 6 А61 К39/02. Бюлл. №16.10.1997.

188. Юхименко, Л.Н. Штамм бактерии *Aeromonas sobria* - продуцент протективного антигена / Л.Н. Юхименко, Л.П. Смирнов, В.Ф. Викторова, В.В. Богдан, Н.Н. Немова // Патент (19) SU (11) 1839485 А1 (51) 5 С 12 N1/20, А61К 39/02/23/01. 1995.



189. Юхименко, Л.Н. Иммунопрофилактика бактериальной геморрагической септицемии (аэромоза) рыб / Л.Н. Юхименко, Л.П. Смирнов, Г.С. Койдан, К.В. Гаврилин, Л.И.Бычкова // Сб. науч. тр. Болезни рыб. Вып. 79, ВНИИПРХ. - М., 2004. - С. 223-227.

190. Юхименко, Л.Н. Специфическая профилактика бактериальной геморрагической септицемии (аэромоза) рыб / Л.Н. Юхименко, Л.П. Смирнов, Г.С. Койдан, Н.В. Гусева // И.П. Рыбное хозяйство. Сер.: Аквакультура. Болезни рыб. Вып.2. - М., ВНИЭРХ, 1998. - С. 14-21.

191. Юхименко, Л.Н. Специфическая и неспецифическая профилактика аэромоза карпа в тепловодном хозяйстве / Л.Н. Юхименко, И.С. Щелкунов, Г.С. Койдан, Л.И. Бычкова // Материалы совещания "Состояние и перспективы науч.-практ. разработок в области марикультуры России, Ростов-на-Дону, август, 1996. - М., ВНИРО. - 1996. - С. 354-360.

192. Ярошевич, К.О. Ассоциативное проявление ботриоцефалёза и аэромоза в индустриальном рыбоводстве ( эпизоотология, меры борьбы) / К.О. Ярошевич // Автореф. дисс. канд. вет. наук. Нижегородская гос. с.-х. акад. Нижний Новгород, 2003. - 22 с.

193. Addo S., Carrias A., Williams M. et.al. Effects of *Bacillus subtilis* strains and the prebiotic Previda<sup>®</sup> on growth, immune parameters and susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* / S. Addo, A. Carrias, M. Williams et.al. // Aquacult. Res. 2017, **48**, №9.- P.4798-4810.

194. Al-Harbi, A.H. Bacterial populations of African catfish, *Clarias gariehinus* (Burchell, 1822) cultured in earthen ponds / A.H. Al-Harbi, M.N. Uddin // J. Appl. Aquacult. 2010, 22, № 3. - P. 187-193.

195. Allan, B.J. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in infections / B.J. Allan, R.M.W. Stevenson // Can. J. Microbiol., 1981, 27: p.1114-1122.

196. Allen, D.A. *Aeromonas media*, a new species isolated from river water / D.A. Allen, B. Austin, R.R. Colwell // Int. J. Syst. Bacteriol., 1983, 33, № 3. - P. 599-604.

197. Altwegg, M. *Aeromonas* as human pathogen / M. Altwegg, H. Geiss // *Crit. Rev. Microbiol.* - 1989, № 16. - P. 253-286.
198. Amend, D.F. Potency testing of fish vaccines / D.F. Amend // *Dev. Biol. Standart.* - 1981. - V.49, № 1. - P. 447-454.
199. Amirkolaie, A.K. The effects of dietary Betaplus<sup>®</sup> and TechnoMos on<sup>®</sup> growth performance, blood parameters, and intestinal microflora in juvenile kutum, *Rutilus kutum* (Kamensky,1901) / A.K. Amirkolaie, S. Karimzadeh, S.P. Miandehy// *J. Appl. Ichthyol.*- 2017, **33**, № 3.- Н. 491-497.
200. Araujo, R.M. Distribution of mesophilic aeromonads in temperate aquatic habitats - relationship with faecal indicators / R.M. Araujo, R.M. Arribas, F. Lucena, R. Pares // *Water Sci. and Technol.* - 1989. - **21**, № 3. - P. 247-250.
201. Arous, J.B. Vaccine oil adjuvants for the development of aquaculture / J.B. Arous, L. Dupuis // *Ветерин. сегодня*, 2016, №4.- С. 62-65.
202. Asao, T. Инфекция, вызванная *Aeromonas* у человека / Т. Asao // *Модан мэдиа Mod. Media.* - 1988. - **34**, № 8. - P. 1-14 (перевод с японского).
203. Birgann, T. Bedeutung fur die Lebensmittelhygiene / T. Bigrann // *Monatsh. Veterinarmed.* - 1989. - **44**, № 24. - P. 862-867.
204. Bodey, G. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* / G. Bodey, R. Bolivar, V. Fainstein, L. Jadeja // *Rev. Infect. Dis.* - 1983, № 5. - P. 279-313.
205. Boulanger, I. Isolation of enterotoxigenic *Aeromonas* from fish / I. Boulanger, R. Lallier, G. Cousineau // *Can. J. Microbiol.*, 1977, **23**, № 9. - P. 1161-1164.
206. Brubaher, R.R. Mechanisms of bacterial virulence / R.R. Brubaher // *Annual Rev. Microbial.* - Palo Alto, Calif., 1985, vol. 39. - P. 21-50.
207. Burke, V. Enterotoxins of *Aeromonas* species / V. Burke, J. Robinson, M. Gracey // "*Experientia*", 1987. **43**, № 4. - P. 368-369.
208. Cahill, M.M. Bacterial flora of fishes: A Review / M.M. Cahill // *Microbial Ecol.* - 1990. - **19**, № 1. - P. 21-41.

209. Cai, X-F. Влияние хитоолигосахаридов на кишечную микрофлору молоди радужной форели / X-F. Cai, L. Lin et al. // *Period. Ocean Univ. China*, 2006, **36**, № 4. - P. 606-610 (перевод с китайского).
210. Chen, Y.-S. Skin and soft-tissue manifestations of *Shewanella putrefaciens* infection / Y.-S. Chen, M.-Y. Liu, J. Yen et al. // *Clin. Infect. Dis.* - 1997. - № 25. - P. 225-229.
211. Colwell, R.R. Developments in *Aeromonas* and *Plesiomonas* research / R.R. Colwell // *J. Diarrhoeal Diseases Res.* - 1988. - **6**, № 2. - P. 77.
212. Cowan, S.T. Manual for the identification of medical bacteria / S.T. Cowan, K.J. Steel // Cambridge at the university press.- 1965. - p.78.
213. Crondel, J.L. The influence of antibiotics on the immune system. Inhibition of the mitogenic leukocyte response in vitro by oxytetracycline / J.L. Crondel, J.A.M. Boesten // *Develop. Comp. Immunol.* - 1982. - № 2. - P. 211-216.
214. Cumberbatch, N. Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relation ship of toxigenic isolated to diarrheal disease / N. Cumberbatch, M.J. Gurwith, C. Langston et al. // *Inf. Immun.* - 1979. - **23**, № 3. - P. 829-837.
215. Dhayanithi, N. Immune protection by *Rhizophora apiculata* in clownfish against *Vibrio alginolyticus* / N. Dhayanithi, T. Ajithkumar, J. Arockiaraj et al. // *Aquaculture.*- 2015, **446**.- P. 1-6.
216. Dosso, M. Les diarrrhees a *Aeromonas* en Cote-Divoir / M. Dosso, A. Koua, K. Kouahou et al. // *Bull. Soc. Pathol. Exot.* - 1986, **79**, № 4. - P. 447-457.
217. Dixon, B.A. Antibiotic resistance of bacterial fish pathogen / B.A. Dixon // *World Aquaculture Society.* - 1994. - № 25. - P. 60-63.
218. Dixon, B.A. The biology of antibiotic resistance / B.A. Dixon // *World Aquaculture.* - 2001. - **32**, № 4. - P. 63-65.
219. Drazek, E. Low incidence of *Aeromonas* sp. in livestock feces / E. Drazek, N. Stern, J. Sam // *Abstr. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol.*, 1986, 23-28 March, 1986. - Washington, D.C., 1986. - P. 276.

220. Eko, F.O. Characterization and significant of *Aeromonas* spp. isolated from diarrhoeic stools in Nigeria / F.O. Eko, S.J. Utsal // *J. Trop. Med. and Hyg.* - 1989. - **92**, № 2. - P. 97-101
221. Evenhuis, J. Virulence and molecular variation of *Flavobacterium columnare* affecting rainbow trout in Idaho, USA / J. Evenhuis, H. Mohammed, S. laPatra et al. // *Aquaculture*. 2016, **464**. - P. 106-110.
222. Fan, Y. Influence of *Bacillus subtilis* ANSB060 on grows, digestive enzyme and aflatoxin residue in Yellow River carp fed diets contaminated with aflatoxin B<sub>1</sub> / Y. Fan, L. Liu, L. Zhao et al. // *Food and Chem. Toxicol.* 2018, **113**. - P. 108-114.
223. Farkas, J. Чувствительность бактерий, выделенных из рыб и воды, к антибиотикам / J. Farkas // *Halassat*, 1980, **6**. - P. 172-175 (перевод с венгерского).
224. Feng, J.-B. Microbiota of yellow grouper (*Epinephelus awoora* Temminck and Schlegel, 1842) fed two different diets / J.-B. Feng, C.-Q. Hu, P. Luo et al. // *Aquacult. Res.* 2010, **41**.- № 12. - P. 1778-1790.
225. Figura, N. *Aeromonas* et gastroenteriti nell'infanzia / N. Figura, C. Cedherini, L. Marri et al. // *Ann. ist.super sanita.* 1986, **22**, № 3. - P. 847-849.
226. Ghelichpour, M. Gill histopathological characteristics of Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fingerlings treated with potassium permanganate and formalin // M. Ghelichpour, H. Rajabiesterabadi, S. Hoseini // *Aquacult. Res.* 2016, **47**, №1, P. 276-282.
227. Gibbs, P.A. Food poisoning - current concerns / P.A. Gibbs // *BNF Nutr. Bull.* . - 1989. - **14**, Suppl. № 1. - P. 92-102.
228. Glunder, G. Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in wild birds / G. Glunder, O. Siegmann // *Avian. Pathol.* . - 1989. - **18**, № 4. - P. 685-695.
229. Gudding, R. Recent developments in fish vaccinology / R. Gudding, A. Lillehaug, Ø. Evensen // *Vet. Immunol. and Immunopathol.* - 1999. - **72**, № 1-2.- P. 203-212.
230. Gudmundsdóttir, B. Evaluation of cross protection by vaccines against atypical and typical furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) / B. Gudmundsdóttir, S. Gudmundsdóttir // *J. Fish Diseases.* - 1997. - **20**, № 5. - P.343-350.

231. Guo, H.-Y. Survival, growth and physiological responses of juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck & Schlegel, 1846) exposed to different dissolved oxygen concentrations and stocking densities / H.-Y. Guo, X.-Y. Dong et al. // *J. Appl. Ichthyol.* 2017, **33**, №4.- P. 731-739.
232. Hai, N.-V. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review / N.-V. Hai // *Aquaculture.* 2015, **446**. - P.88-96.
233. Herman, R. The role of infectious agents in fish kills / R. Herman // *Resour. publ. / Us. Dep. Inter., Fish and Wildlife Serv.* - 1990. - № 177. - P. 45-56.
234. Hsu, T.S. Correlation of extracellular enzymatic activity and biochemical characteristics with regard to virulence of *Aeromonas hydrophila* / N.S. Hsu, W.D. Waltman, E.B. Shotts // *Int. Symp. on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines*, Leetown, W.Va, USA, 1981, **49**, P. 101-111.
235. Hu, K. Effect of dietary glutamine on growth performance, non-specific immunity, expression of cytokine genes, phosphorylation of target of rapamycin (TOR), and anti-oxidative system in spleen and head kidney of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) / K. Hu, J.-X. Zhag, L. Feng et al. // *Fish Physiol. and Biochem.* 2015. **41**, № 3. - P.635- 649.
236. Hunt, G.H. Isolation of *Aeromonas* sp. from faecal specimens / G.H. Hunt, E.H. Price, U. Petel et al. // *J. Clin. Pathol.*, 1987, **40**, № 11. - P. 1382-1384.
237. Hwang, B.-O. Effect of hydrogen peroxide exposures on mucous cells and lysozymes of gill tissues of olive flounder *Paralichthys plivaeeus* / B.-O. Hwang, Y.-K. Kim, Y.-K. Nam // *Aquacult. Res.* 2016, **47**, №2.- P. 433-444.
238. Jeppesen, C. *Aeromonas* in drikkevand og levnedsmidler / C. Jeppesen // *Dan. veterinaertidsskr.* .- 1989. - **72**, № 23. - P. 1363-1372 (перевод с датского).
239. Jaffa, M. Vaccines are only one route to healthy farms / M. Jaffa // *Fish Farm Int.* - 1991. - **18**, № 4. - P. 16.
240. Jeremić, S. Immersive vaccination of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) with *Yersinia ruckeri* bacterin / S. Jeremić, D. Andjelić // *Acta vet.*- 2000. - **50**, № 2-3. - P. 77-82.

241. Jonson, K.A. Potential for immersion vaccination against *Aeromonas salmonicida* / K.A. Jonson, D.F. Amend // *J. Fish Diseases*. - 1984. - **7**, № 2. - P. 101-105.
242. Jeffris, C. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acid / C. Jeffris, D. Holtman, D. Puse // *J. Bacteriol.* - 1957. - **73**, № 4. - P. 590-591.
243. Joaquin, V. Cytotoxin production by *Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea / V. Joaquin, H. San, D. Pickett // *Abstr. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol.*, 1987. 87th Annu. Mtg., Atlanta, Ga, 1-5 March, 1987. Washington, D.C., 1987. - P.52.
244. Johansson, N. Transportation in tanks of twoyear old salmon (*Salmo salar* L.) as a predisposing factor for infection with *Aeromonas hydrophila* / *Swed. Salmon Res. Inst. - Rep. LFI Medd.* 3: 1-12.
245. Karulus, R. *Moraxella catarrhalis*: a review of an important human mucosal pathogen / R. Karulus, A. Campagnari // *Microbes Infect.* - 2000. - № 2. - P. 547-559.
246. Karunasagar, I. *Aeromonas hydrophila* septicaemia of indian major carps in some commercial fish farms of West Godavari District, Andhra, Pradesh // I. Karunasagar, G.M. Rosalind, Id. Karunasagar, K. Rao // *Curr. Sci. (India)*. - 1989. - **58**, № 18. - P. 1044-1045.
247. Kooij Dirk, Van Der. Properties of *Aeromonas* and their occurrence and hygienic significance in drinking water / Van Der Kooij Dirk // *ZBL. Bacteriol.* - 1988. - **107**, № 1. - P.1-17.
248. Kozinska, A. Influence of an experimental *Aeromonas hydrophila* vaccine on selected haematological values and non-specific immunity in carp (*Cyprinus carpio* L.) / A. Kozinska, J. Antychowicz // *Bull. Vet. Inst.* - 2000. - **44**, №2. - p.169-178.
249. Kwon, H.- C. Effects of a subunit vaccine (FlaA) and immunostimulant (CpG-ODN 1668) against *Vibrio anguillarum* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) / H.-C. Kwon, Y.-J. Kang // *Aquaculture*. 2016. 2016. - **454**. - P. 125-129.

250. Liobrera, A.T. *Aeromonas hydrophila* associated with ulcerative disease epizootic in Laguna de Bay, Philippines / A.T. Liobrera, R.O. Gacutan // *Aquaculture* , 1987, **67**, № 3-4. - P. 273-278.
251. Liu, Y.J. Role of *Ichthyophthirius multifiliis* in the infection of *Aeromonas hydrophila* / Y.J. Liu, C.P. Lu // *J. Vet. Med. B.* - 2004. - **51**, № 5. - P. 222-224.
252. Liu, Y. Effects of graded levels of dietary vitamin C on the growth, digestive capacity and intestinal microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) / Y. Liu, L. Chi, L. Feng et al. // *Aquacult. Res.* - 2011. - **42**, № 4. - P. 534-548.
253. Liu, Y.J. First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish (*Ophiocephalus argus*. Cantor) in China / Y.J. Liu, A.H. Li // *J. Fish Diseases.* - 2012. - **35**, № 5. - P. 335-342.
254. Liu, Q. Effect of stocking density on water quality and (growth, body composition and plasma cortisol content) performance of pen-reared Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) / Q. Liu, Z. Hou, H. Wen et al. // *Ocean Univ. China.* - 2016. - **15**, № 4. -P. 667-675 (перевод с китайского).
255. Liu, W. Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* and AHL lactonase on the control of *Aeromonas hydrophila* infection in tilapia / W. Liu, Ch. Ran et al. // *Microbiol. Open.* 2016. **5**, №4.- P. 687-699.
256. Liu, Ch.-H. Dietary supplementation of probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth performance and disease resistance against *Vibrio alginolyticus* in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*) / Ch.- H. Liu, K.Wu, T.-W. Chu et al. // *Aquacult. Int.* 2018. **26**, №1.- P. 63-74.
257. Lock, T.P. Bacterial infections of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*, Walbaum) returning to gamete collecting weirs in Michigan / T.P. Lock, K. Scribner, R. Tempelman et al. // *J. Fish Diseases.* - 2012. - **35**, № 1. - P. 39-50.
258. Lyungh, A. *Aeromonas* toxins / A. Lyungh, T. Wadström // *Pharmacol and Ther.* - 1981. - **15**, № 3. - P. 339-354.
259. Lu, C. Кинетика инфекции *Aeromonas hydrophila* у чёрного амурского леща (*Megalobrama amblycephala*) / C. Lu, J. Xie, B. Xi et al. // *J. Fish Sci. China.* - 2015. - **22**, № 5. - P. 1068-1074 (перевод с китайского).

260. Luo, X. Изоляция и идентификация каузативного агента висцеральной белопятнистой болезни у змееголова *Channa maculata* / X. Luo, G.-C. Deng, G.-I. Liao et al. // J. Dalian Ocean. Univ. - 2012. - **27**, № 2. - P. 95-100.
261. Mascher, F. *Aeromonas* species in f municipal water supply of a central european city: biotyping of strains and detection of toxins / F. Mascher, F. Reinthaler, D. Stünzner, B. Lamberger // Zbl. Bakteriolog. - 1988. - **B186**, № 4. - P.333-337.
262. Mei, G.-H. Предварительное исследование бактериального псевдотуберкулёза у зимующих тилляпий / G.-. Mei, Y.-S. Zhu, R. Cao et al. // Shuichan kexue. - 2002. - **21**, № 4. - P. 9-11 (перевод с китайского).
263. Marcio, H. *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de caso de estomatite em *Bothrops alternatus* (Serpente, Viperidae) / H. Marcio, M. Calixto, L. Procaci et al. // Rev. microbial. - 1987. - **18**, № 3. - P. 224-228.
264. Miyazaki, T. A histopathological study of motile aeromonad disease in ayu / T. Miyazaki, Y. Jo // Fish Pathol. 1985. - **20**, № 1. - P. 55-59.
265. Muiswinkel, W.D. Fish immunology and fish health in Fish immunology (eds. Margaret J. Manning & Mary F. Tatner) / W.D. Muiswinkel, D.P. Anderson // Academic press . - 1985. - P. 1-9.
266. Namdari, H. Microbiologic and clinical evidence supporting the role of *Aeromonas caviae* as a pediatric enteric pathogen / H. Namdari, E. Bottone // J. Clin. Microbiol. - 1990. - **28**, № 5. - P. 837-840.
267. Naviner, M. Seasonal variability of intestinal microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), with a particular attention to *Aeromonas* spp. as candidate indicator of antimicrobial resistance / M. Naviner, E. Giraud, H. Le Bris et al. // Rev. méd. vét. (France). 2006. - **157**, № 12. - P. 597-602.
268. Naviner, M. Antimicrobial resistance of *Aeromonas* spp. isolated from the growth pond to the commercial product in a rainbow trout farm following a flumequine treatment / M. Naviner, L. Gordon, E. Giraud et al. // Aquaculture. 2011. **315**, № 3-4. - P. 236-241.



269. Neumann W. Prufung einiger aus Karpfen isolierten Aeromonas-Stamme der Hydrophila-Punctata-Gruppe in Resistenztest / W. Neumann, W. Ploger // Dt. tierärztl. Wschr., 1980. - **87**, № 24-26. - P. 221.
270. Nicolau, E.A. Studii se Certaria de Inframicrob. Microb. se Parasitol. / E.A. Nicolau // Ar. 2, 1951. - P. 53-93.
271. Nishikawa, Y. Isolation and characterization of motile Aeromonas from human, food and environmental specimens / Y. Nishikawa, T. Kishi // Epidemiol. and Infec. - 1988. - **101**, № 2. - P. 213-223.
272. Oudar, J. Isolement d'une souche d'Aeromonas chez le lièvre / J.Oudar, Y. Richard, E. Domenec // Bull. Acad. vét. France. - 1974. - **47**, № 8-9. P. 391-396.
273. Paniagua, C. Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile Aeromonas spp. isolated from a river / C. Paniagua, O.Rivero, J.Anguita et al. // J. Clin. Microbiol. - 1990. - **28**, № 2. - P/ 350-355.
274. Plehn, M. Bacterium cyprinica nov. des Erreger des Botseuche der carpfenenartigen Fischen. / M. Plehn // Zbl. f. Bact. usw. I Origin. - 1904. - Bd. **35**, P.1.
275. Popoff, M.Y. Polynucleotide sequence relatedness among motile Aeromonas species / M.Y. Popoff, C. Coynault, M. Kiredjian, M. Lemelin // Curr. Microbiol. - 1981. - **5**, № 2, P. 109-114.
276. Racicot, J.G. Blood and liver enzymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich) with emphasis on their diagnostic use: studi of elly toxicity and a case of Aeromonas infection / J.G. Racicot // J. Fish. Biol. - 1975. - **7**, P. 825-835.
277. Refstie, T. Effect of density on growth and survival of rainbow trout / T.Refstie // Aquaculture.-1977. -№ 11. - P.329-334.
278. Rodriguez, M. Aislamiento de Aeromonas hydrophila en coprocultivo / M. Rodriguez, Z. Rodriguez, R. Rodriguez // Laboratorio. - 1988. - **83**, № 494. - P.189-194.
279. Roenger-Aust, S. Zur Frage einer Virusatiologie bei verschiedenen Fishkrankheiten / S. Roenger-Aust // Muncheer Beitrage zur Abwasser, Fischerei u. Flussbiologie. - 1953. - **H**, № 1. - P. 120-145.
280. Rolston, K. Human extraintestinal infections caused by Aeromonas species / K. Rolston // J. Diarrhoeal Diseases Res. - 1988. - **6**, № 2. - P. 99-102.

281. Rose, J.M. Pathogenic mechanisms of *Aeromonas hydrophila* / J.M.Rose, A.K.Chopra, D.W.Niesel et al. // Amer. Annu. Abstr. Meet. Soc. Microbiol. - 1987. - 87th Annu. Meet., Atlanta, Ga, 1-6 March, 1987. - Washington, D.C., 1987. -P.55.
282. Sack, D.A. Epidemiology of *Aeromonas* and *Plesiomonas* diarrhoea / D.A. Sack, C.K. Alam, B.A. Kay et al. // J. Diarrhoeal Diseases Res. - 1988. - **6**, № 2. - P. 107-112.
283. San Verusto, H. Antibiotic susceptibility of diarrhea-associated strains of *aeromonas hydrophila* / H. San Verusto, R. K. Scribner // Abstr. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol. - 1986. 86th Annu. Meet., Washington, D.C., 23-28 March, 1986. Washington, D.C., 1986. - P.23.
284. Sato, Y. Red-fin disease occurring continually in eels on a fish farm /Y. Sato // J. Japan Veter. Med. Assn. 1981. - **34**, № 11. - P. 527-530.
285. Santos, L.N. Isolamento e caracterização de *Aeromonas hydrophila* em um cisne (*Cygnus olor*) / L.N. Santos, E. Hofer, M.G. Almeida et al. // Rev. bras. med. vet., 1987. - **9**, № 4. - P.83-85.
286. Santos, R. Anti-Si (*Vibrio anguillarum*) vaccine (GAVA-3) for the prevention of the vibriosis disease in the turbot and salmonidae, and preparation process: **Заявка 1001016 ЕПВ, МПК<sup>7</sup> С12N 1/20, А61К 39/106** /R. Santos et al. // № 99911820.1; Заявл. 06.04.99; Опубли. 17.05.00, Бюл. № 20.
287. Sanyal, S.C. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* / S.C. Sanyal, S.J. Sing, P.C. Son // J. Med. Microbiol. - 1975. - **8**, № 1. - P. 195-198.
288. Schäperclaus, W. Fischkrankheiten / W. Schäperclaus // Akademie-Verlag, 1954.- Berlin. - P.
289. Schäperclaus, W. Weitere untersuchungen zur Ätiologie der infectiösen Bauchwassersucht der Karpfen / W. Schäperclaus // Deutsche Fisch Zeit. Ig. 13, 1966, Berlin. - P.
290. Shieh, H.S. Toxicity of *Aeromonas hydrophila* protease to Atlantic salmon / H.S. Shieh // Microbios Lett. - 1987. - **36**, № 141. - P. 17-21.

291. Shieh, H.S. Lethal toxicity of *Aeromonas sobria* protease to Atlantic salmon / H.S. Shieh // *Microbioshett.*, 1988. - **37**, № 146. - P. 65-68.
292. Smith, H. The state and future of studies on bacterial pathogenicity / H. Smits // *Virulence Mech. Bact. Pathog.* . Washington, D. C., 1988. - P. 365-382.
293. Song, Y. *Aeromonas liquefaciens* isolated from a skin rot disease of Formosa snakehead, *Channa maculata* (Lacépède) in Taiwan / Y. Song, H. Chung, G. Kou // *J. Fish. Soc. Taiwan.* - 1973. - **2**, № 1. - P. 56-59.
294. Soussy, C.J. Les aëromonas en pathologie humain. A propos de vingt observations personnelles / C.J. Soussy, F.J. Squinazi, J.L. Duval // *Med. et malad. infect.* - 1975. - **5**, № 1. - P. 11-19.
295. Souter, B.W. Enteric bacteria in carp (*Cyprinus carpio*) and white suckers (*Catostomus commersoni*) / B.W. Souter, R.A. Sonstegard, L.A. McDermott // *J. Fish. Res. Board Can.* . - 1976. - **33**, № 6. - P. 1401-1403.
296. Stelma, G.N. Exherimental evidence for enteropanhogenicity in *Aeromonas veronii* / G.N. Stelma, C.H. Johnson, P.L. Spaulding // *Can. J. Microbiol.* . - 1988. - **34**, № 7. - P. 877-880.
297. Stephen, S. Epizootic septicemia in frogs caused by *Aeromonas hydrophila* / S. Stelma, M. Sitaram Kumar, K.N. Achyutha Rao // *Curr. Sci. (India.* - 1975. - **44**, № 11. - P. 386-387.
298. Stephen, E.D. Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery / E.D. Stephen, H.J. Stephen // *Aquaculture.* - 2002. - **211**, № 1-4. - P. 9-28.
299. Tebbit, G.L. Development and use of *Yersinia ruckeri* bacterins to control enteric redmouths disease / G.L. Tebbit, J.D. Erickson, R.B. Vande Water // *Fish Biol.: Serodiagn. and Vaccines. Proc. Symp., Leetown, W. Va, 1981.* - Basel e.a., 1981. - P. 395-401.
300. Thorpe, J.E. An aeromonad epidemic in the brown trout (*Salmo trutta*) / J.E. Thorpe, J.R. Roberts // *J. Fish Biol.*, 1972. - **4**, № 3. - P. 441.
301. Tomasec, J. Untersuchugen uber die Ätiologie der Bauchwassersucht des Karpfens / J. Tomasec // *Veterinarski Archiv*, 21, 1951.

302. Tsatshev (Цачев), И. Проучвания върху хеморагичната септицемия (червенка) по шарана / И. Цачев // Реп. симп. на младите научна работница и специалиста от селската стопанство и от хранителната промишленостю София. 20.05-22.05. 1985, С. 4187-4213.

303. Uddin, M.N. Seasonal variation of bacterial flora in ponds in Saudi Arabia used for tilapia aquaculture / M.N. Uddin, A.H. Al-Harbi // J. Appl. Aquacult. - 2004. - **16**, № 1-2. - P. 53-61.

304. Urbaneck, D. Die Bedeutuna der Bakterienoberflächenstruktur für die Pathogenese von Infektionskrankheiten (übersichtsreferat) / D. Urbaneck, B.Werner // Monatsh. Veterinarmed. - 1989. - **44**, № 13. - P. 474-479.

305. Velitzelos, B. Aeromonas liquefaciens le facteur responsable de la peste rouge de l'anguille / B.Velitzelos, A. Donos, G. Papahaissis et al. // Piscicult. franc. - 1980. - № 61-62. - P. 29-30.

306. Wadström, T. Enterotoxin, haemolysin and cytotoxic protein in Aeromonas hydrophila from human infections / T.Wadström, A. Liungh // Acta Path. Microbiol. Scand. - 1976. - **84**, P. 112-114.

307. Wadström, T. Correlation between toxin formation and diarrhoea in patients infected with aeromonas / T.Wadström, A.Liungh // J. Diarrhoeal Diseases Res. - 1988.- **6**, № 2. - P. 113-119.

308. Weckman, B. Deoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources / B.Weckman, B.W.Caltin // J. Bact. - 1957. - **73**, № 6. - P. 747-753.

309. Wei Lee, S. Bacterial flora from a healthy freshwater Asian sea bass (Lates calcarifer) fingerling hatchery with emphasis on their antimicrobial and heavy metal resistance pattern / S.Wei Lee, M.Najiah, W. Wee // Vet. arh. . - 2010. - **80**, № 3, P. 411-420.

310. Yamamoto, T. Бактериальные адгезины и патогенность / Т.Уамamoto // Нихан сайкингаку дзасси, Jap. J. Bacteriol. - 1987. - **42**. - № 4. - P. 627-651 (перевод с японского).

311. Yamashita, M. et al. Probiotic dietary supplementation in Nile

tilapia as prophylaxis against streptococcosis / M. Yamashita, S. Pereira, L. Cardoso et al. // *Aquacult. Nutr.* - 2017. - **23**, №6. - P. 1235-1243.

312. Yoshimizu, M. Study on the intestinal microflora of salmonids / M. Yoshimizu, T. Kimura // *Fish. Pathol.* - 1976. - **10**, № 2. - P. 243-259.

313. Yoshimizu, M. Изучение кишечной микрофлоры лососевых. 1. Кишечная микрофлора рыб, выращиваемых в пресной и морской воде / M. Yoshimizu, T. Kimura, M. Sakai // *Нихон суйсан гаккайсю. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* . - 1976. - **42**, № 1. - P. 91-99 (перевод с японского).

314. Захариев, З. Честота на изолиране на *Aeromonas* от фекални проби / З. Захариев // *Епидемиол., микробиол. и инфекц. болести.* - 1974. - **11**, № 2. - С. 149-153.

315. Zhai, Q. Dietary *Lactobacillus plantarum* supplementation decreases tissue lead accumulation and alleviates lead toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) / Q. Zhai, H. Wang, F. Tian et al. // *Aquacult. Res.* - 2017. - **48**, №9. - P. 5094-5103.

## **9. ПРИЛОЖЕНИЯ**



СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГОСУДАРСТВЕННОМ КОМИТЕТЕ СССР ПО НАУКЕ И ТЕХНИКЕ  
(ГОСКОМИЗОБРЕТЕНИЙ)

## АВТОРСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

№

1839458

На основании полномочий, предоставленных Правительством СССР, Госкомизобретений выдал настоящее авторское свидетельство на изобретение:

"Штамм бактерий *Aeromonas sobria* продуцент протективного антигена"

Автор (авторы): Юхименко Людмила Николаевна, Смирнов Лев Павлович, Викторова Валентина Федоровна, Богдан Валентина Васильевна и Немова Нина Николаевна

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПРУДОВОГО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА И ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ КАРЕЛЬСКОГО ФИЛИАЛА АН СССР

Заявитель:

Заявка № 4772067 Приоритет изобретения 22 декабря 1989 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР.

30 декабря 1993 г.

Действие авторского свидетельства распространяется на всю территорию Союза ССР.

Председатель Комитета

Начальник отдела



*Расс*  
*Гин*



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

КОМИТЕТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ  
( РОСПАТЕНТ )

## ПАТЕНТ

N 1839458

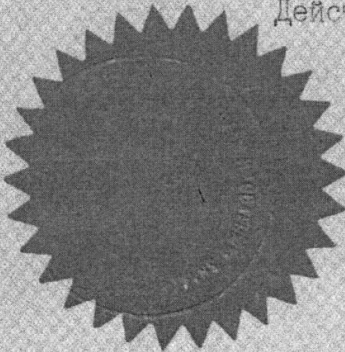
на ИЗОБРЕТЕНИЕ:  
"Штамм бактерий *AEROMONAS SOBRIA* - продукт протективного антигена"

Патентообладатель(ли): Всероссийский научно-исследовательский институт прудового рыбного хозяйства

Страна: Российская Федерация

Автор (авторы): Ехименко Людмила Николаевна, Смирнов Лев Павлович,  
Викторова Валентина Федоровна, Богдан Валентина  
Васильевна и Немова Нина Николаевна

Приоритет изобретения	22 декабря 1989 г.
Дата поступления заявки в Роспатент	22 декабря 1989 г.
Заявка N 4772067	
Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений	23 января 1995 г.
Действует с	23 января 1995 г.



ПРЕДСЕДАТЕЛЬ РОСПАТЕНТА





РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

КОМИТЕТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ПАТЕНТАМ  
И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ  
(РОСПАТЕНТ)

**ПАТЕНТ**

2080874

№ \_\_\_\_\_

на ИЗОБРЕТЕНИЕ

"Вакцина для профилактики бактериально-геморрагической септицемии рыб"

Патентообладатель (ли): Всероссийский научно-исследовательский институт прудового рыбного хозяйства

Автор (авторы): Юхименко Людмила Николаевна и Смирнов Лев Павлович

Приоритет изобретения 20 марта 1993г.

Дата поступления заявки в Роспатент 20 марта 1993г.

Заявка № 93016152

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений

10 июня 1997г.

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ РОСПАТЕНТА





РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

**№ 2140165**

На основании Патентного закона Российской Федерации, введенного в действие 14 октября 1992 года, Российским агентством по патентам и товарным знакам выдан настоящий патент на изобретение

**СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ КОРМА**

Патентообладатель(ли):

*Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного  
рыбного хозяйства*

по заявке № 98114053, дата поступления: 14.07.98

Приоритет от 14.07.98

Автор(ы) изобретения:

*см. на обороте*

Патент действует на всей территории Российской Федерации в течение 20 лет с **14 июля 1998 г.** при условии своевременной уплаты пошлины за поддержание патента в силе

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации

*г. Москва, 27 октября 1999 г.*

*Генеральный директор*

*А.Д. Корчагин*





РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 24013001

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ  
АЭРОМОНОЗА РЫБ

Патентообладатель(ли): *Государственное научное учреждение  
Всероссийский научно-исследовательский и технологический  
институт биологической промышленности (ВИБ)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2010122878

Приоритет изобретения 07 июня 2010 г.



Зарегистрировано в Государственном реестре  
изобретений Российской Федерации 28 октября 2011 г.

Срок действия патента истекает 07 июня 2030 г.


Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной  
собственности, патентам и товарным знакам



Б.П. Симонов



Автор(ы): **Самуйленко Анатолий Яковлевич (RU), Школьников Ефим Эмануилович (RU), Раевский Александр Андреевич (RU), Гринь Светлана Анатольевна (RU), Анисимова Любовь Викторовна (RU), Коротеева Людмила Александровна (RU), Коломнина Галина Федоровна (RU), Юхименко Людмила Николаевна (RU), Климов Антон Викторович (RU), Еремец Владимир Иванович (RU), Боро Иван Леонтьевич (RU)**



МИНИСТЕРСТВО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА СССР  
ВСЕСОЮЗНОЕ НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ  
ПО РЫБОВОДСТВУ (ВНПО по рыбоводству)



ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ПРУДОВОГО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА (ВНИИПРХ)

ВРЕМЕННЫЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
ПО ВЫДЕЛЕНИЮ И ИДЕНТИФИКАЦИИ  
АЭРОМОНАД

Москва 1987



## 2.2. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ И МИКОЗЫ

### 2.2.1. Инструкция о мероприятиях по профилактике и мерам борьбы с фурункулезом лососевых рыб

МИНИСТЕРСТВО  
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(Минсельхозпрод России)

ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

107139, Москва, Орликов пер., 1/11  
Для телеграмм: Москва, 84  
Минсельхозпрод  
Телекс: 417738 ЛЕН  
Телефоны: 975-58-50; 975-54-23  
26.11.97 № 13-4-2/1090

УТВЕРЖДАЮ  
Руководитель Департамента  
ветеринарии

В.М. Авилов

26 ноября 1997 г.



#### ИНСТРУКЦИЯ

*о мероприятиях по профилактике и мерам  
борьбы с фурункулезом лососевых рыб*

#### 1. Общие положения

1.1. Фурункулез - инфекционная болезнь лососевых рыб, культивируемых в рыбоводных хозяйствах или обитающих в реках, озерах и открытых водоемах (морях).

1.2. Возбудителем болезни является бактерия *Aeromonas salmonicida*, относящаяся к роду *Aeromonas*, семейству *Vibrionaceae*.

#### 2. Эпизоотология

2.1. Фурункулезом болеют палия, ручьевая и радужная форель, проходные тихоокеанские и атлантические лососи, реже рыбы из других семейств.

2.2. Наиболее восприимчивы к фурункулезу рыбы старше двухлетнего возраста.

2.3. Источником фурункулеза являются больные и переболевшие, а также дикие и сорные рыбы-бактерионосители.

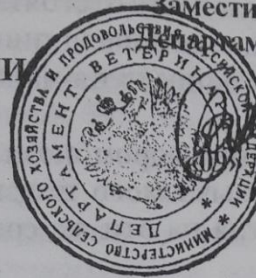
2.4. Перенос возбудителя происходит при пересадке и миграции рыб-бактерионосителей, через оплодотворенную икру, инфициро-

### 2.2.3. Методические указания по диагностике эритродерматита карпа

МИНИСТЕРСТВО  
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(Минсельхозпрод России)

ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

107139, Москва, Орликов пер., 1/11  
Для телеграмм: Москва, 84  
Минсельхозпрод  
Телекс: 417738 ЛЕН  
Телефоны: 975-58-50; 975-54-23  
09.12.97 № 13-4-2/1115



УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель начальника  
департамента ветеринарии

В.И. Селиверстов

10 декабря 1997 г.

#### МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ по диагностике эритродерматита карпа

##### 1. Общие положения

1.1. Эритродерматит карпа - инфекционное заболевание, характеризующиеся образованием обширных поверхностных некротизированных поражений.

1.2. Возбудителем болезни является *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*.

1.3. Эритродерматит поражает карповых рыб, начиная с двухлетнего возраста и в период полового созревания. Среди старых производителей гибель может достигать 45-90%.

1.4. Вспышки эритродерматита возникают весной при повышении температуры воды до 18-20°C, большом количестве органических веществ в воде, особенно при наличии травмированной рыбы.

1.5. Диагноз на эритродерматит ставят на основании клинических, патолого-анатомических данных, результатов лабораторных исследований и постановки биопробы.

1.6. Исследованию подвергают не менее 5 живых рыб с клиническими признаками.

##### 2. Бактериологические исследования

2.1. Возбудитель эритродерматита имеет четко выраженную дерматропность - локализуется между эпидермисом и дермой.

2.2. Для обнаружения возбудителя участки кожи вокруг язвы



Инструкция о мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб

## 2.2.4. Инструкция о мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб

МИНИСТЕРСТВО  
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(Минсельхозпрод России)

ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

107139, Москва, Орликов пер., 1/11  
Для телеграмм: Москва, 84  
Минсельхозпрод  
Телекс: 417738 ЛЕН  
Телефоны: 975-58-50; 975-54-23  
17.08.98 № 13-4-2/1366



УТВЕРЖДАЮ  
Руководитель Департамента  
ветеринарии

В.М. Авилов

17 августа 1998 г.

### ИНСТРУКЦИЯ

*о мероприятиях по борьбе  
с аэромонозом карповых рыб*

#### 1. Общие положения

1.1. Аэромоноз - инфекционная болезнь карпов, сазанов и их гибридов. Более устойчивы к аэромонозу караси, лини, белые амурь и некоторые другие карповые рыбы.

1.2. Возбудителями болезни являются бактерии (патогенные варианты), относящиеся к роду *Aeromonas*, семейству *Vibrionaceae*.

#### 2. Эпизоотология

2.1. Заболеванию подвержены рыбы всех возрастов, но более восприимчивы двухлетки и трехлетки.

2.2. Аэромоноз чаще проявляется в весенне-летний период. К осени болезнь принимает хроническое течение.

2.3. Источник инфекции - больные, переболевшие рыбы, обитающие в водоисточнике дикие рыбы. Возбудители болезни (патогенные аэромонады) могут быть обнаружены в воде.

2.4. Заражение рыб аэромонозом происходит через пищеварительный тракт (эндогенный путь), через поврежденную кожу и жабры (экзогенный путь).

2.7. Инкубационный период при аэромонозе, в зависимости от температурных условий и физиологического состояния рыб, составляет от 3 до 30 дней.



Методические указания по определению патогенности аэромонад по степени ДНКазной активности

## 2.2.5. Методические указания по определению патогенности аэромонад по степени ДНКазной активности

МИНИСТЕРСТВО  
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(Минсельхозпрод России)

ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

107139, Москва, Орликов пер., 1/11  
Для телеграмм: Москва, 84  
Минсельхозпрод  
Телекс: 417738 ЛЕН  
Телефоны: 975-58-50; 975-54-23  
09.12.97 № 13-4-2/1116



УТВЕРЖДАЮ

Заместитель начальника  
департамента ветеринарии

В.И. Селиверстов  
10 октября 1997 г.

### МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по определению патогенности аэромонад  
по степени ДНКазной активности

#### 1. Общие положения

1.1. Метод определения патогенности бактерий путем исследования активности бактериальных ферментов позволяет судить о потенциальной способности бактерий вызывать патологический процесс.

1.2. Патогенность (вирулентность) аэромонад зависит от активности продуцирования экстрацеллюлярных энзимов - факторов нестабильности, к которым относится и ДНКаза (дезоксирибонуклеаза);

1.3. Определение ДНКазы используется как косвенный метод определения патогенности. Применение метода ДНКазной активности позволяет получить ответ через 48 часов.

#### 2. Проведение исследования

2.1. Навеску ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты) из расчета 200 мг/100 мл среды растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, подщелоченной 1N раствором NaOH, вносят в расплавленный мясо-пептонный агар и стерилизуют однократно текучим паром 30 мин. Перед посевом агар расплавляют и стерильно добавляют на каждые 100 мл среды 0,8 мл 10%-ного CaCl<sub>2</sub>. Расплавленный агар разливают в чашки Петри по 25 мл; после застывания

**2.2.7. Методические указания по лабораторной диагностике псевдомонозов рыб**

МИНИСТЕРСТВО  
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(Минсельхозпрод России)

ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

107139, Москва, Орликов пер., 1/11  
Для телеграмм: Москва, 84  
Минсельхозпрод  
Телекс: 417738 ЛЕН  
Телефоны: 975-58-50; 975-54-23  
22.09.98 г. № 13-4-2/1403



УТВЕРЖДАЮ

Заместитель начальника  
департамента ветеринарии

В.И. Селиверстов

10 сентября 1998 г.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**

*по лабораторной диагностике  
псевдомонозов рыб*

**1. Общие положения**

1.1. Псевдомоноз – инфекционная болезнь тепловодных, холодноводных и аквариумных рыб, встречающаяся в прудовых и промышленных хозяйствах.

1.2. Возбудителями псевдомоноза являются вирулентные штаммы бактерий рода *Pseudomonas*. Чаще всего встречаются виды *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. aureofaciens*, *Ps. cyprinisepticum*, *Ps. intestinalis*, *Ps. anguilliseptica*, *Ps. chlororaphis*. Каждый из этих видов может вызвать заболевание самостоятельно, в ассоциации друг с другом или другими микроорганизмами.

1.3. Для бактериологического исследования берут только живую больную рыбу. В каждом случае исследуют не менее 5 экземпляров рыб с признаками болезни.

**2. Бактериологическое исследование**

2.1. Высевы производят из асцитной жидкости, печени, почек, селезенки, из крови (отдельно из каждой пробы) на чашки с МПА (рН 7,2-7,4).



Временная инструкция о мероприятиях по борьбе с миксобактериозами лососевых рыб

## 2.2.8. Временная инструкция о мероприятиях по борьбе с миксобактериозами лососевых рыб

МИНИСТЕРСТВО  
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(Минсельхозпрод России)

УТВЕРЖДАЮ  
Руководитель Департамента  
ветеринарии

ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

107139, Москва, Орликов пер., 1/11  
Для телеграмм: Москва, 84  
Минсельхозпрод  
Телекс: 417738 ЛЕН  
Телефоны: 975-58-50; 975-54-23  
18.09.98 г. № 13-4-2/1395



Б.М. Авилов  
18 сентября 1998 г.

**ВРЕМЕННАЯ ИНСТРУКЦИЯ**  
*о мероприятиях по борьбе*  
*с миксобактериозами лососевых рыб*

### 1. Общие положения

1.1. Миксобактериозы - широко распространенные бактериальные заболевания пресноводных рыб, вызывающие поражения жабр и кожи рыб при их выращивании в условиях интенсивного рыбоводства (садковые, бассейновые, тепловодные хозяйства).

1.2. Возбудителями миксобактериозов являются грамотрицательные палочковидные бактерии группы скользящих бактерий родов *Flexibacter* и *Cytophaga* длиной 3-8 мкм, шириной 0,3-0,5 мкм, обладающие медленным скользящим или вращательным движением.

1.3. Миксобактериозы проявляются как три самостоятельные заболевания: *флексибактериоз*, *бактериальная жаберная болезнь (БЖБ)* и *бактериальная холодноводная болезнь*.

1.3.1. *Флексибактериоз* (колумнарис-болезнь, «серое седло», «столбиковая болезнь») регистрируется у всех культивируемых видов рыб. Наибольшую опасность представляет для молоди лососевых и карповых рыб. Возбудитель - *Flexibacter columnaris* (семейство *Cytophagaceae*). В колониях на средах и на рыбе образует характерные столбчатые массы. Является постоянным компонентом водного бактериоценоза.

1.3.2. *Бактериальная жаберная болезнь (БЖБ)* - заболевание культивируемых лососей, поражает также рыб в тепловодных и прудовых хозяйствах. Возбудитель БЖБ - *Flexibacter branchiophila*, присутствующая в воде и грунтах, на ложе рыбоводных прудов.



МИНИСТЕРСТВО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА СССР  
ВСЕСОЮЗНОЕ НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ  
ПС РЫБОВОДСТВА (ВНПО по рыбоводству)  
ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ПРУДОВОГО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА (ВНИИПРХ)

ВРЕМЕННЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
ПО СРАВНИТЕЛЬНОМУ АНАЛИЗУ ШТАММОВ АЭРОМОНАД МЕТОДОМ  
ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ В ПРИСУТСТВИИ  
ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ

Москва 1988



## Приложение 3

18-22.04.96 г.

Рефтинское тепловодное  
садковое хозяйство

## А К Т I/I

Мы, нижеподписавшиеся, зав. сектором бактериологии ВНИИПРХ, к.б.н. Вихменко Л.Н., и.о. директора рыбхоза, гл. рыбовод Калинова Н.Ф., зав. отделом болезней рыб облвет-лаборатории Кудиним В.А. провели отбор проб для оценки эпизоотического состояния хозяйства и учета результатов вакцинации.

Для контрольного исследования результатов вакцинации из садка № 174 было отловлено по 3 карпа-трехлетка опытной и контрольной группы, вакцинированных в июле 1994 г. Все рыбы - без клинических признаков, навеска опытных карпов 1,4 - 1,7 - 1,6 кг, контрольных - 1,3 - 1,2 - 1,22 кг.

При патолого-анатомическом обследовании отклонений от нормы не обнаружено, в кишечнике - комбикорм, все самки.

От всех рыб печень и почки посеяны на среду Риппоя-Кабелли для выявления наличия аэромонад.

Для оценки эпизоотической ситуации из садков №№ 157, 159, с 2000 карпов-годовиков было отобрано 60 экземпляров без клинических признаков и 4 - с изъязвлениями на боковой поверхности и в области хвостового стебля и ерошением чешуи (у одного).

При патолого-анатомическом обследовании у всех годовиков отмечен выраженный спайчный процесс, паренхиматозные органы редуцированы, анемичные, гидремичны, рыхлой консистенции (у некоторых особей даже селезенку трудно было захватить пинцетом). Обращала на себя внимание преобладание патологической окраски печени - ядовито-желтая, глинисто-зеленоватая, мраморная, мозаичная, песочная, бледно-розовая с мозаичными краями. Селезенка примерно у 20% особей - в виде мелкоочечных образований.

У 3-х карпов средний и задний отдел кишечника сильно воспален и заполнен темно-красной слизью.

У 4-х годовиков выявлены единичные кавии.

У годовика с язвой на хвостовом стебле и локальным ерошением чешуи - в брюшной полости кровавый экссудат.

От 4-х карпов с клиническими признаками и 10 карпов условно здоровых печень и почки, экссудат и кровянистая слизь из кишечника были посеяны для бактериологического исследования.

Для вирусологического исследования от всех 64 годовиков были взяты печень, почка и селезенка и объединены в одну пробу от 5 рыб, патматерная рыб с клиническими признаками объединены по два в одну пробу.

Одновременно на сердечный агар и среду Риппея-Кабелли был проведен посев воды из водоподающего канала и двух садков второй линии. Температура воды 12,6°C.

Все исследования будут проведены в отделе ихтиологии ВНИИПРХ. Результаты будут высланы в хозяйство.

В связи с крайне неудовлетворительным состоянием внутренних органов годовиков, для улучшения состояния рыбы, можно рекомендовать провести курс кормления комбикормом, обогащенным ацидофильным молоком, богатым витаминами, ферментами и аминокислотами, благотворно влияющими на паренхиматозные органы и кишечник.

*Меев* - Л.Н. СХИМЕНКО

*Калинова* - Н.Ф. КАЛИНОВА

*Кудин* - В.А. КУДИН



30.07.96 г.

Рейтинское подсобное хозяйство  
Рейтинский рыбхоз

## А К Т

Мы, нижеподписавшиеся, зав. сектором бактериологии ВНИИПРХ, ст. м. с., к. б. н. Д. Н. Юхименко, зам. начальника подсобного хозяйства Н. Ф. Калинова, мастер по отлову рыбы А. В. Шахманаев, врач-ихтосапатолог Облветлаборатории В. А. Кудин составили настоящий акт в том, что в период с 26 по 30 июля 1996 г. нами был проведен учет результатов сравнительной обработки годовиков карпа вакциной ВЮС-2 и иммуностимуляторами ридостином и полирибоксатом (см. акт I/2 от 19-22.04.96 г.).

Все годовики, обработанные препаратами, и рыбы контрольной группы сидели в садке № 157.

При проведении учета были получены следующие результаты:

Группа рыб	Посажено рыб	Мет- ка	Всего	%	Осталось рыб					
					здор.	%	с руб- цами	%	с яз- вами	%
Контроль	270	в/х	268	99,3	187	69,8	76	28,4	5	I.
ВЮС-2	290	гр.	257	88,6	235	91,4	22	8,6	-	-
Ридостин	290	бр.	174	60,0	144	82,6	29	16,7	1	0.
Полирибоксат	290	гр./бр.	118	40,7	78	66,1	38	32,2	2	I.

Для бактериологического исследования на каждой группе было отобрано по 10 рыб без клинических признаков (для сравнительного анализа уровня бактериальной контаминации).

Патолого-анатомически у всех рыб отмечено наличие спазмического процесса, печень анемичная (у 4-х рыб в пределах нормы), у 3-х особей - на стадии жирового перерождения, почки без существенных отклонений. Слизистая кишечника у основной массы рыб в пределах нормы, у 3-х карпов - отечная, со следами бледно-желтой слизи.

От всех рыб на среду Риппеля-Кабелли были посеяны кусочки печени (п) и почек (пч). На эту же среду были посеяны пробы воды из водоподводящего канала, садка № 157 второй садковой линии, садка № 2 третьей садковой линии и водоема-охладителя за 3-ей садковой линией.

На чашках № 1-10 посев материала от рыб контрольной группы, II-20а - от рыб, вакцинированных вакциной ВЮС-2, 2I-30 - инъециро-

ванных раствором ридестина, 31-40 - полиробомата.

Первичный учет результатов посева показал следующее:

№№ 1 пч, 2п, 9п, пч, 10п, пч .

№№ 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 20ап , пч .

№№ 21 п, пч, 22 пч, 23, 25, 27, 29, 30 п, пч.

№ 32 п, пч - рост бактериальной флоры не обнаружен.

В остальных случаях рост бактерий 2-4 видов. В посевах воды канала 420 КоЕ/мл, садке № 157 - 1440 КоЕ/мл, садке № 2 - 1640 КоЕ/ за 3-ей садковой линией - 520 КоЕ/мл. Колонии переселены на среду Клиндера для дальнейшей идентификации.

Патолого-анатомическая картина у всех карпов показала, что двухнедельного курса кормления комбикормом с ацидофильной добавкой недостаточно. Следует удлинить его до 1 месяца ( после выхода из зимовки и перед уходом на зимовку).

Предварительный анализ клинической картины и уровня бактериальной контаминации показал более высокую эффективность вакцины ВЮС-2 и ридестина (91,4 и 82,6%).

Окончательные результаты будут выданы после окончания идентификации.

Предварительная характеристика эпизоотической ситуации в хозяйстве может быть оценена, как удовлетворительная.

*Иванов* Л. Н. ЮХИМЕНКО

*Иванов* В. А. КУДИН

*Иванов* Н. Ф. КАЛИНОВА

А. В. ШАХМАНОВ



Комитет Российской Федерации по рыболовству  
Всероссийский научно-исследовательский институт прудового рыбного хозяйства

## ОТДЕЛ ИХТИПАТОЛОГИИ

Россия, 141821, Московская область, Дмитровский район, п.Рыбное  
тел.: (095) 587-27-16, факс: (096) 223-16-05

10 сентября 1996 г.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

по результатам бактериологического исследования материала в р/х Рефтинский  
Рефтинской ГРЭС

26-30 июля 1996 г. для бактериологического исследования был отобран патматериал печень (п) и почка (пч) от 40 двухлеток карпа: контрольной группы (№№ 1-10), вакцинированных вакциной ВЮС-2 (№№ 11-20), обработанных ридостином (№№ 21-30) и полирибонатом (№№ 31-40), пробы воды из канала, садков № 157, 2 и за 3й садковой линией.

Результаты исследования приведены в таблице:

Группа рыб	№№ п/п	Орган	Выделенные азромонады или другая микрофлора	ДНКазная активность (мм)
1	2	3	4	5
КОНТРОЛЬ	1	п пч	A.caviae роста нет	6
	2	п пч	роста нет A.sobria	0
	3	п пч	A.caviae A.hydrophila	3 0
	4	п пч	A.caviae A.hydrophila	7 0
	5	п пч	A.caviae A.caviae, A.sobria	6; 3 3; 0; 0
	6	п пч	Энтеробактерии A.sobria	0
	7	п пч	A.sobria A.sp.2	0 0
	8	п пч	A.sp. A.sp.3	0 8
	9	п, пч	роста нет	
	10	п, пч	роста нет	
ВЮС-2	11	п пч	A.sp.6 A.caviae	2 3

1	2	3	4	5
	12	п пч	A.sp.2 A.sp.2, A.sobria	0 4; 6
	13	п, пч	роста нет	
	14	п, пч	роста нет	
	15	п, пч	роста нет	
	16	п, пч	роста нет	
	17	п, пч	роста нет	
	18	п, пч	роста нет	
	19	п, пч	A.sobria	7; 8; 7
	20	п, пч	роста нет	
РИДОСТИН	21	п, пч	роста нет	
	22	п пч	A.sobria роста нет	4; 6
	23	п, пч	роста нет	
	24	п, пч	Энтеробактерии, сапрофиты	
	25	п, пч	роста нет	
	26	п, пч	A.sobria	5; 5
	27	п, пч	роста нет	
	28	п  пч	A.sobria; A.sp.2; A.sp.4 A.sobria; A.sp.	8; 2; 4; 7 6; 5
	29	п, пч	роста нет	
	30	п, пч	роста нет	
ПОЛИРИБО- НАТ	31	п, пч	A.sobria	8; 9
	32	п, пч	роста нет	
	33	п, пч	Энтеробактерии, сапрофиты	
	34	п, пч	A.sobria	8; 5
	35	п пч	A.sp.1 сапрофитная флора	9
	36	п, пч	A.sobria	8; 6
	37	п пч	A.sp.3 A.sp.	3 6
	38	п  пч	Сапрофитная флора A.sobria	7
	39	п пч	Сапрофиты A.sp.1	6
	40	п пч	A.sp. A.sp.3	8 6



При исследовании воды получены следующие результаты:

ИСТОЧНИК	ОМЧ (КОЕ/мл)	Выделенные аэромонады (вид, биовар)	ДНКазная активность (мм)
1	420	A.sp.3; A.sobria	A.sp.6; 0; 6; 5; 8
2	1440	A.caviae; A.sobria	A.sp.; 4; 6; 7; 9
3	1640	A.caviae; A.sp.	A.sobria; 4; 6; 7
4	520	A.caviae; A.sobria	3; 5; 0; 5

Примечание: 1 - водоподающий канал;  
2 - садок 157 2й садковой линии;  
3 - садок 2 3й садковой линии;  
4 - водоем-охладитель за 3й садковой линией;  
ОМЧ - общее микробное число;  
КОЕ - колониеобразующие единицы.

Анализ полученных результатов показывает, что отсутствие в воде водоподающего канала *A.caviae* (с февраля 1993 г. по июль 1996 г.) и обнаружение его в воде садков и водоем-охладителя свидетельствует о постоянном попадании бытовых сточных вод, для которых *A.caviae* является обычным представителем.

Превышение общего микробного числа в садках по сравнению с водоподающим каналом в 3,4 и 3,9 раз показывает высокий уровень органики в садках, что способствует бурному размножению аэромонад в воде. Чтобы избежать этого, садки следует регулярно освобождать от погибшей рыбы, обрастаний и остатков комбикормов.

Как показало изучение биологических свойств аэромонад (на ДНКазном агаре), из 47 штаммов, выделенных от рыб и 25, выделенных из воды только 12 и 2 штамма соответственно были авирулентны или слабовирулентны (25,5% и 8,0%). Остальные штаммы были вирулентны и высоковирулентны.

При сравнительном анализе обследуемых групп рыб оказалось, что в контрольной группе от 8 рыб из 13 проб (п. пч) выделено 16 штаммов аэромонад, в группе, вакцинированной вакциной ВЮС-2 - от 3х рыб из 6 проб выделено 8 штаммов аэромонад, и в группах рыб, обработанных ридостином и полирибонатом, соответственно - 3-5-10 и 8-13-13.

При этом следует отметить, что при наличии бактериального роста на чашках умеренный рост обнаружен в посевах 2х проб в контрольной группе, вакцинированной и обработанной ридостином; обильный - в 4х пробах контрольной и по одной пробе - в вакцинированной и обработанной полирибонатом. В остальных случаях отмечен рост единичных колоний аэромонад и сапрофитной микрофлоры.

Повышенной контаминации группы рыб, обработанной полирибонатом, могло способствовать продолжительное стрессирование рыбы при отлове рыб других групп (отборе по меткам). Это еще раз подчеркивает отрицательное влияние стрессов на резистентность рыбы.

Следует отметить, что на фоне постоянного экологического неблагополучия водоема (периодическое появление нефтяной пленки на поверхности воды, резкие скачки бактериальной обсемененности воды в водоподающем канале, заторможенность роста бактерий на поверхности сред, свидетельствующие о воздействии на них каких-то токсикантов и др.) основное внимание должно быть направлено на повышение резистентности рыб. Это, в первую очередь, сбалансированные корма с доступными

пищевыми добавками (витаминно-минеральными), по мере возможности продолжать курс кормления с использованием культуры ацидофильной палочки.

Зав. сектором бактериологии ВНИИПРХ  
к.б.н., ст.н.с.



Л.Н.Юхименко

Научный сотрудник

Г.С.Койдан





26.09.96 г.

Садковое тепловодное хозяйство  
Рефтинской ГРЭС

## А К Т

Мы, нижеподписавшиеся, зав. сектором бактериологии ВНИИПРХ, ст. н. с., к. б. н. Мхименко Л. Н., зам. начальника хозяйства Калинова Н. Ф., мастер по отлову рыбы Шахманаев А. В., врач-ихтиопатолог Облветлаборатории Кудин В. А. составили настоящий акт в том, что в период с 21 по 26 сентября с. г. были проведены бактериологические исследования рыбы, обработанной вакциной ВКС-2, иммуностимуляторами ридостином и полирибонатом (см. акт 1/2 от 19-22.04.96 г.) по 5 экземпляров из каждой группы, 3 пятилеток, вакцинированных в апреле 1993 года (в возрасте годовиков), по 3 экземпляра трехлеток контрольной и опытной группы (вакцинированных в июле 1994 года), 5 двухлеток товарного карпа с 5 садковой линии и 5 сеголеток с 4 садковой линии, пробы воды из водоподающего канала ( $T^{\circ} 20^{\circ}\text{C}$ ), садков № 157 2-й садковой линии и № 2 3-й садковой линии ( $T^{\circ}$  воды  $18,5^{\circ}\text{C}$ ) и за 3-й садковой линией ( $T^{\circ}$  воды  $16^{\circ}\text{C}$ ).

От рыб брали кусочки печени (п) и почек (пч) и засевали на среду Риппея - Кабелли. На эту же среду делали посеvy воды.

После первичного учета желтые колонии подозрительные на аэромонады, засевали на первично-дифференцирующую среду Клиглера, на следующий день после определения теста на цитохром-оксидазу засевали на короткий "пестрый" ряд и чашки с ДНК агаром для определения вирулентности.

Всего было исследовано 39 рыб разных групп и возрастов, 4 пробы воды, выделено и идентифицировано 100 культур, из них 81 культура аэромонад, 10 культур энтеробактерий и 9 неферментирующих щелочных образцов.

Вся рыба, взятая по методу случайной выборки, была без клинических признаков.

При патолого-анатомическом вскрытии:

- у сеголеток - внутренние органы в пределах нормы, кишечник без следов воспаления, заполнен кормом;
- у двухлеток - печень и почки слегка анемичны, печень упругая, почки рыхлые, кровенаполненные, кишечник заполнен кормом;
- у пятилеток и трехлеток внутренние органы в пределах нормы.

Для сравнительного исследования двухлетки опытной и контрольной группы из садка № 157 были взяты все одновременно, чтобы исключить воздействие дополнительного стрессирования какой-либо группы от повторных обловов и длительности передержки. Рыба подряд

отбиралась из садка, привезена в лабораторию в чане для перевозки рыбы и исследовалась подряд, по мере попадания:

№№	Метка	Навеска (г)	Первичный посев	вид аэромонад	ДНКазная акт-ть (мм)
1.	в/х	470	Роста нет		
2.	в/х	260	"-		
3.	гр/бр	350	II - умерен. рост	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. sobria</i> , <i>A. caviae</i>	3;5 6;4
4.	в/х	230	Роста нет		
5.	гр	220	"-		
6.	гр	290	II-умерен. рост	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. sobria</i> , <i>A. caviae</i>	4 2,3;3
7.	гр	140	II - единичные колонии	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. caviae</i>	3 4;2;2
8.	в/х	270	п,пч - умеренн. рост	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. sobria</i>	2;4 2;3
9.	бр	<del>200</del> 140	II - умеренный рост	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. sobria</i>	3;2 1;3
10.	гр	130	Роста нет		
11.	бр	200	"-		
12.	гр/бр	260	п,пч - обильный рост	<i>A. caviae</i> , <i>A. hydrophila</i>	1 1
13.	в/х	315	п - умеренный рост	"-" <i>A. caviae</i>	0;2 1,5;2
14.	бр	110	п,пч - обильный рост	<i>A. hydrophila</i>	1,5; 1,5
15.	бр	105	п - единичные колонии	<i>A. caviae</i> , <i>A. sobria</i> , <i>A. hydrophila</i>	2; 3 2
16.	гр/бр	265	п-умеренный рост	"-" <i>A. caviae</i> , <i>A. sobria</i>	2,2 1;1,5
17.	гр/бр	125	Роста нет		
18.	гр/бр	160	"-		
19.	бр	65	"-		
20.	гр	230	"-		

Обращает на себя внимание значительный разброс навески рыб (у № 19 даже меньше исходной средней навески). У мелкой рыбы кишечник был пустой. Печень слегка анемичная. У рыб 4,8 и 15 мажущаяся, у остальных - упругая. У этих же рыб почки рыхлые, кровенаполненные. В остальных случаях почка в пределах нормы, селезенка у всех без отклонений от нормы.

По степени контаминации внутренних органов рыба контрольной группы и опытной группы распределилась следующим образом:



Группа	Роста нет	Един. колон.	умерен. рост	обильн. рост
Контроль	3	-	2	-
ВКС-2	3	2	-	-
Ридостин	2	1	1	1
Полирибонат	2	-	2	1

Таким образом в условиях повышенной плотности посадки (1140 двухлеток на садок), при значительном бактериальном прессинге более активными оказались вакцина ВКС-2 и ридостин.

При исследовании сеголеток и пятилеток - рост бактериальной флоры не обнаружен. В посевах печени и почек от трехлеток вакцинированных и почек контрольных рыб рост бактериальной флоры не обнаружен. В посевах их печени карпов № 2, 3, 4 контрольной группы - умеренный, обильный рост и единичные желтые колонии. При дальнейшем изучении культуры были идентифицированы следующим образом:

2п *A. sobria* (0 и 1,5 мм) и *A. hydrophila* (1 мм),  
 3п - " (1 и 1,5 мм) и - " (0 мм),  
 4п - " (1,5 мм), - " (1,5 мм), *A. caviae* (1 мм)

В посевах патматериала от двухлеток карпа во всех случаях (кроме № 3 пч) отмечен рост бактериальной флоры от единичных колоний до обильного. Дальнейшая идентификация позволила получить следующие результаты:

1п *A. sobria* (4 мм), *E. coli*,  
 1пч - " (4 мм), *A. caviae* (2 мм),  
 2п *A. caviae* (3 и 0 мм),  
 2пч *A. hydrophila* (1 мм), *Enterobacter*,  
 3п *A. sobria* (5 мм), *A. caviae* (3 мм),  
 4п - " (1,5 мм), *A. hydrophila* (2 мм),  
 4пч - " (2 и 3 мм), *A. caviae* (2 мм),  
 5п - " (2 и 3 мм),  
 5пч - " (3 мм), *A. hydrophila* (2 мм)

В посевах воды из водоподводящего канала 640 КОЕ/мл, из них 37,5% аэромонад (*A. sobria* и *A. hydrophila* с ДНКазной активностью 2; 1 и 0 мм); из садка № 157 - 4320 КОЕ/мл, из них 72,2% аэромонад (*A. hydrophila* с ДНКазной активностью

3;3 мм и *A. solviana* - 1,5;0;2;4; 4 мм и *A. caviana* - 3 мм); из садка № 2 - 2320 КоЕ/мл из них 25,0% аэромонад (*A. caviana* - 3 мм, *A. solviana* - 2;2 и 3 мм, *A. hydrophila* - 3 и 1,5 мм); за 3-й садковой линией - 940 КоЕ/мл, из них 31,9% аэромонад (*A. caviana* - 3 мм, *A. solviana* - 2 и 3 мм).

На основании проведенных исследований следует отметить значительное нарастание бактериальной обсемененности воды по сравнению июльскими данными (в 1,5-3-1,4-1,8 раза), что не могло не сказаться на уровне бактериальной контаминации рыб. Тем не менее, отсутствие бактериального роста в посевах материала от сеголеток, вакцинированных трехлеток и пятилеток и у 10 из 20 двухлеток из садка № 157 позволяет отнести этот эффект на счет проведенной обработки вакциной и иммуностимуляторами, а также применения ацидофильной добавки к комбикорму.

Следует отметить, что отсутствие бактериальной обсемененности у вакцинированных трехлеток и пятилеток может свидетельствовать о достаточной степени протективного действия вакцины в течение 2-3 лет.

Особое внимание необходимо обратить на то, что при проведении сравнительных экспериментов рыба должна быть однородной. В противном случае изначально более крупная рыба оказывается более конкурентно-способной, что особо важное значение приобретает в условиях дефицита корма.

Перед зимовкой рыбу необходимо рассортировать по размеру и провести курс кормления с ацидофильным молоком, чтобы повысить резистентность рыбы, что поможет ей лучше выжить в условиях наступающей зимы.

Как и при предыдущих исследованиях, не было отмечено случаев аэромоноза, вызванного одним высоковирулентным видом аэромонад от одной рыбы и даже из одного органа выделяются различные виды аэромонад с выраженной тенденцией к снижению вирулентности - 83,3% культур с ДНКазной активностью - 0-3 мм, 16,7% - 4-5 мм.

Анализ полученных результатов показывает, что регулярный контроль за санитарно-гигиеническим состоянием садков, их своевременная очистка от обрастаний, повышение резистентности рыбы позволит поставить вопрос о снятии карантина, подбор оптимальных плотностей посадки, даст возможность с уменьшением расхода комбикормов увеличить рыбопродуктивность.

Л. Н. ЮХИМЕНКО

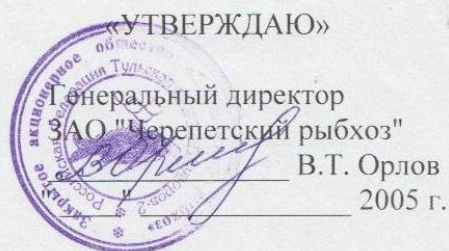
А. В. ШАХМАНАЕВ

Н. Ф. КАЛИНОВА

В. А. КУДИН



06.12.2005 г.  
г. Суворов  
Тульской обл.



### АКТ

производственных испытаний  
инактивированной формолвакцины  
против БГС (аэромоназа) рыб  
в ЗАО "Черепетский рыбхоз"

Научными сотрудниками лаборатории ихтиопатологии ФГУП "ВНИИПРХ" Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычковой и аспирантом этой же лаборатории Н.А. Лукьяновой в присутствии рыбоведа рыбхоза Ю.А. Пуховского 9-10 октября с.г. было проведено контрольное обследование рыбы, вакцинированной инактивированной формолвакциной в сентябре с.г. (см. акт от 07.09.05).

Перед вакцинацией рыба в 6 садках (1,5,7,9,13,15) была отсортирована, без язвенных поражений.

25.10.05 г. был проведен отбор проб паренхиматозных органов для исследования уровня контаминации, сывороток крови для определения иммунологических показателей (БАСК и титр агглютинирующих антител) от рыб контрольных (садки №№ 1 и 15) и опытных (садки 1,5,7,9,13) групп.

Рыбоводные показатели и уровни контаминации приведены в таблице 1.

Таблица 1

№ садка	Средняя навеска, г.		Прирост, г.	Язвы, %	Контаминация			
	6.09.05	25.10.05			р./н.	ед.	ум.	об./сл.
К1	254	407	153	13,6	-	13/65	4/20	3/15
05	266	462	196	3,9	17/85	3/15	-	-
07	234	412	178	10,9	16/80	3/15	1/5	-
09	221	415	194	4,9	8/40	10/50	-	2/10
013	229	477	248	5,4	13/65	2/10	3/15	2/10
К15	215	379	164	9,6	6/30	12/60	-	2/10

Иммунологические характеристики (БАСК и титр агглютинирующих антител) приведены в таблице 2.


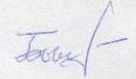
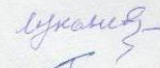
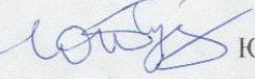


Таблица 2

№ садк а	БАСК		Титр агглютинирующих антител			
			77-18	331-БТ	77-18	331-БТ
	6.09.05	25.10.05	6.09.05		25.10.05	
К 1	39,9±23,5	49,9±24,3	1:4 - 1:32	1:4 - 1:16	1:4 - 1:32	1:4-1:64
О 5	59,8±23,4	99,8±0,6	1:4 - 1:32	1:4 - 1:16	1:4 - 1:256	1:4-1:256
О 7	59,9±23,1	89,8± 8,8	1:8 - 1:16	1:4 - 1:16	1:8 - 1:512	1:4-1:2048
О 9	99,8±0,1	99,8±0,14	1:4 - 1:8	1:4	1:4-1:256	1:4-1:128
О 13	79,8±15,3	79,9±21,5	1:4 - 1:16	1:4 - 1:32	1:4-1:256	1:4-1:256
К 15	99,7±0,6	39,9±23,5	1:4	1:4 - 1:8	1:8-1:128	1:4-1:64

### Заключение

Производственные испытания подтвердили иммуногенность и протективное действие инактивированной формолвакцины (бактерина), проявившиеся в улучшении иммуно-физиологического статуса рыбы и более активной элиминации бактериальных агентов из организма вакцинированных рыб.

Подписи: канд. биол. наук, ст. науч. сотр.  Л.Н. Юхименко  
 канд. биол. наук, науч. сотр.  Л.И. Бычкова  
 аспирант  Н.А. Лукьянова  
 рыбовод рыбхоза  Ю.А. Пуховский

«УТВЕРЖДАЮ»

Врио Генерального директора  
ФГУП «ВНИИПРХ»



А.А. Нестеренко

«    »    2006 г.

### АКТ

#### о результатах кормления рыбы пробиотическими препаратами «Зоонорм» и «Субалин» в 2006 году

11 мая 2006 года в выростные пруды левого берега с №1 по №5 произведено зарыбление лабораторией ихтиопатологии (в соответствии с нормативами) в количестве 1040 шт. общей массой 358,7 кг. 11 сентября 2006 года проведён облов вышеуказанных прудов. Выловлено трёхлетков в количестве 920 шт. общей массой 828,7 кг. Были отобраны пробы карпа для иммунологических и бактериологических исследований весной (двухгодовиков – 10 шт), летом (50 шт. – по 10 шт из каждого пруда) и осенью (трёхлетков – 35 шт). Вся рыба получала продукционный комбикорм К0100К: контрольная группа (К) – без добавок, группа О-2 – кормление "Зоонорм" минимум 5 доз в сутки, группа О-3 – кормление "Зоонорм" курсами 20-25-30 доз в сутки, группа О-4 – кормление "Субалин" минимум от 1,7 до 2,2 г в сутки, группа О-5 – кормление "Субалин" курсами от 6,3 до 8,8 г в сутки.

По уровню контаминации внутренних органов результаты представлены в таблице 1.



Таблица 1 Уровень контаминации внутренних органов  
контрольной и опытных групп

Группа	Уровень контаминации, абс/%			
	роста нет	единичный рост	умеренный	обильный
ВЕСНА				
К исх.	16/80	2/10	2/10	-
ЛЕТО				
К 1	18/90	2/10	-	-
О 2	19/95	1/5	-	-
О 3	20/100	-	-	-
О 4	18/90	-	1/5	1/5
О 5	17/94,4	1/5,6	-	-
ОСЕНЬ				
К 1	6/60	4/40	-	-
О 2	21/95,5	1/4,5	-	-
О 3	18/90	-	1/5	1/5
О 4	10/100	-	-	-
О 5	8/80	2/20	-	-

Примечание: К исх. – двухгодовики после зимовки;  
 К 1 – кормление без добавок;  
 О 2 – кормление "Зоонорм" минимум;  
 О 3 – кормление "Зоонорм" курсами;  
 О 4 – кормление "Субалин" минимум;  
 О 5 – кормление "Субалин" курсами.

Уровень бактериальной обсеменённости воды в течение вегетационного сезона резко колебался от 280 до 74560 КОЕ/мл.

Иммунологические данные представлены в таблице 2.

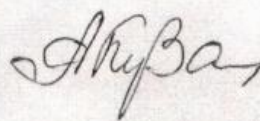


Таблица 2 – Иммунологические показатели рыб весной исходные, контрольной и опытных групп летом

Пруд	БАСК	ТАА
		к антигену 77-18
ВЕСНА		
К исх.	59,4 ± 28,0	1:32 – 1:256
ЛЕТО		
К 1	99,5 ± 0,0008	1:32 – 1:128
О 2	99,3 ± 0,0002	1:2 – 1:128
О 3	99,6 ± 0,0003	1:32 – 1:128
О 4	99,6 ± 0,0002	1:64 – 1:128
О 5	99,8 ± 0,0002	1:64 – 1: 1024
ОСЕНЬ		
К 1	79,9 ± 0,15	1:32 – 1:1024
О 2	99,9 ± 0,00006	1:32 – 1:256
О 3	81,7 ± 14,3	1:64 – 1:2048
О 4	99,9 ± 0,0001	1:32 – 1:256
О 5	99,9 ± 0,00004	1:128 – 1:512

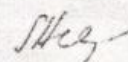
**Заключение.** Проведённые исследования показали эффективности применения пробиотиков "Субалин" и "Зоонорм" для повышения иммунофизиологического статуса рыб.

Заведующий ЭПО "Якоть"



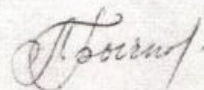
А.М. Кузьмин

Ст. науч. сотр., канд. биол. наук  
лаборатории ихтиопатологии



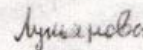
Л.Н. Юхименко

Ст. науч. сотр., канд. биол. наук  
лаборатории ихтиопатологии



Л.И. Бычкова

Инженер-ихтиопатолог ЭПО "Якоть",  
аспирант лаборатории ихтиопатологии



Н.А. Лукьянова



7.09.2006 г.  
г.Суворов  
Тульская обл.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор Приложения  
ЗАО "Черепетский рыбхоз"  
Тульская обл. Орлов  
7 сентября 2006 г.

АКТ

**о результатах проведения вакцинации карпов двухлеток  
в садковом тепловодном хозяйстве ЗАО "Черепетский рыбхоз"**

В сентябре 2005 года научными сотрудниками лаборатории ихтиопатологии и лаборатории генетики и селекции ФГУП "ВНИИПРХ" Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычковой, П.П. Головиным и В.Н. Дементьевым в присутствии заместителя начальника ГУ ТО "Суворовская РВС ББЖ" С.И. Ермиловой, рыбоводов ЗАО "Черепетский рыбхоз" Ю.А. Пуховского и И.Н. Макарова произвели обработку карпов двухлеток инактивированной формолвакциной (бактерином) против бактериальной геморрагической септицемии (см. Акт от 07.09.2005 г.).

В апреле 2006 года было проведено контрольное исследование результатов вакцинации после зимовки рыбы. Для определения эпизоотической ситуации был проведён отбор проб воды из двух контрольных и четырёх опытных садков, отбор проб паренхиматозных органов (печени и почек) и сыворотки крови от 10 рыб из каждого садка.

У рыб опытных (О) и контрольных (К) групп определяли уровень контаминации внутренних органов, титр агглютинирующих антител (ТАА) и бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК).

В посевах воды из садков определяли общее микробное число (ОМЧ) и микробиоценоз. ОМЧ в контрольных садках было 5880 и 7800 КОЕ/мл с преобладанием капсулообразующих бактерий, протей, БГКП и неферментирующих щёлчеобразователей (НФЩ). В опытных садках ОМЧ было от 2400 до 6260 КОЕ/мл с преобладанием НФЩ, в меньшем количестве выделялись капсулообразующие бактерии, протей и бациллы. Аэромонады во всех пробах выделялись в единичном количестве.

Результаты иммунофизиологического статуса рыб опытных и контрольных групп представлены в таблицах.

Таблица 1

Уровень контаминации внутренних органов рыб

Группа	Кол-во проб	Уровень контаминации, %			
		роста нет	единичный рост	умеренный рост	обильный рост
К	40	27,5	40,0	20,0	12,5
О	80	62,5	22,5	13,4	1,6



Таблица 2

Титры агглютинирующих антител к антигену 77-18

Группа	Титры агглютинирующих антител, %					
	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:4096
К	10,0	30,0	20,0	30,0	-	10,0
О	13,6	9,1	22,7	13,6	9,1	31,9

Таблица 3

Уровень контаминации антител к антигену 360-2

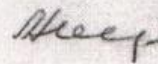
Группа	Титры агглютинирующих антител, %					
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
К	-	-	30,0	40,0	30,0	-
О	9,1	4,5	18,2	27,3	27,3	13,6

БАСК у рыб контрольной группы был  $82,9 \pm 13,7$ , у рыб опытных групп –  $89,6 \pm 8,9$  –  $99,7 \pm 0,0002$ .

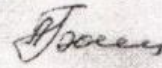
#### Заключение

При довольно напряжённой эпизоотической ситуации в хозяйстве обработка рыбы инактивированной формолвакциной дала положительный результат: отсутствие роста бактериальной флоры в посевах внутренних органов более чем в 2 раза чаще у рыб опытной группы, а умеренный и обильный рост в 2,2 раза чаще выявляется у рыб контрольной группы. Более высокие титры агглютинирующих антител выявлены к обоим антигенам у рыб опытной группы, хотя следует отметить, что к гетерологичному антигену 360-2 они были значительно ниже, чем к гомологичному. БАСК у опытных групп выше, чем у контрольных, что говорит об удовлетворительных иммуногенных и протективных свойствах инактивированной формолвакцины.

Ст. науч. сотр., канд. биол. наук

 Л.Н. Юхименко

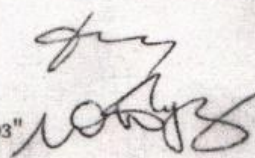
Науч. сотр., канд. биол. наук

 Л.И. Бычкова

Ст. науч. сотр., канд. биол. наук

В.Н. Дементьев

Рыбовод ЗАО "Черепетский рыбхоз"

 Ю.А. Пуховский





«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель  
генерального директора  
ФГУП «ВНИИПРХ»

А.Ю. Киселёв

2007 г.

**Заключение**

по результатам проверки токсичности инактивированной формолвакцины (бактерина), приготовленного ВНИТИБП (г. Щёлково)

19 марта 2007 г. ст. науч. сотр. ВНИИПРХ Л.Н. Юхименко, ст. науч. сотр. Л.И. Бычковой, зав. лаб. ихтиопатологии П.П. Головиным и инженером А.В. Климовым проведена обработка карпов-двухлеток опытными партиями бактерина промышленного производства приготовленного ВНИТИБП (г. Щёлково), для проверки токсичности.

Проверке подвергнуто 3 серии бактерина с бульоном: (1-ая партия) -  $1-8,7 \times 10^9$  кл/мл; 2- $15,4 \times 10^9$  кл/мл; 3- $18,1 \times 10^9$  кл/мл и 3 серии бактерина отмытого и ресуспендированного изотоническим раствором хлорида натрия: (3-я партия)  $1-22,0 \times 10^9$  кл/мл; 2- $24,0 \times 10^9$  кл/мл; 3- $10,5 \times 10^9$  кл/мл.

Для вакцинации используется доза  $1 \times 10^9$  кл/мл, поэтому для испытания токсичности внутривентрально была введена 10-кратная дозировка -  $10 \times 10^9$  кл/мл, поэтому рыбе вводили с учетом исходной концентрации соответствующие объемы бактерина:

1-я партия, 1-серия — 1,2 мл;	3-я партия, 1-серия — 0,5 мл;
2-серия — 0,65 мл	2-серия — 0,4 мл;
3-серия — 0,6 мл;	3-серия — 1,0 мл;
к1 — 1,0 мл;	к3 — 1,0 мл.

На каждую серию бактерина было взято по 3 двухлетка карпа. Трём контрольным карпам аналогичным способом был введён стерильный бульон (к1), и 3-ем карпам — стерильный изотонический раствор хлорида натрия (к3).

После инъектирования рыба была посажена в аквариумы с проточностью и аэрацией при температуре  $12^\circ\text{C}$ .

За весь период наблюдения (20 дней) ни одна рыба в опыте и контроле не погибла и клинических признаков не отмечено.

**Заключение**

Бактерин опытных партий, приготовленный промышленным способом, не токсичен для рыб.

Зав. лаб. ихтиопатологии

П.П. Головин

Канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Л.Н. Юхименко

Канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Л.И. Бычкова

Инженер

А.В. Климов



**«УТВЕРЖДАЮ»**  
 Генеральный директор  
 ФГУП «ВНИИПРХ»  
 А.А. Нестеренко  
 2007 г.



**АКТ**  
 проведения производственных испытаний  
 пробиотического препарата "Зоонорм"

14 мая 2007 года были зарыблены двухгодовиками карпа три выростных пруда левого берега ЭПО "Якоть" в количестве 650 шт. Для иммуно-физиологических исследований методом случайной выборки было отобрано 10 экз.

16 мая 2007 года начато прикармливание рыбы.

21 мая 2007 года начато производственное испытание пробиотического препарата "Зоонорм". Пруд № 1 (К1) – контроль, кормление без препарата; пруд № 2 (О2) – "Зоонорм" минимум, постоянное кормление с препаратом в количестве 5 доз в сутки (1 пакет); пруд № 3 (О3) – "Зоонорм" курс, кормление с препаратом в количестве 30 доз в сутки (6 пакетов) в течение 10 дней, а далее - без препарата.

9 июля 2007 года проведён контрольный облов. Из каждого пруда выловлено по 10 экз. рыб, всего 30 экз.

У всех рыб определяли уровень контаминации внутренних органов (печени и почек), иммунологические показатели: бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК) и титр агглютинирующих антител (ТАА) к антигену *A. sobria* 77-18.

Результаты иммуно-физиологических исследований приведены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика эффективности применения пробиотика  
 "Зоонорм" на выростных прудах ЭПО "Якоть"

Пруд	Уровень контаминации внутренних органов, %				Иммунологические исследования	
	роста нет	единичный	умеренный	обильный	БАСК	ТАА
К1	25,0	25,0	20,0	30,0	54,3 ± 10,2	1:64-1:512
О2	90,0	10,0	-	-	64,2 ± 3,2	1:64-1:4096
О3	65,0	35,0	-	-	63,4 ± 2,9	1:128-1:4096

**Заключение**

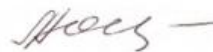
Проведённые исследования выявили положительное влияние "Зоонорма" на иммуно-физиологический статус рыб и препарат может быть рекомендован для применения в условиях предприятий аквакультуры.

Начальник  
 научно-производственного  
 рыбоводного комплекса



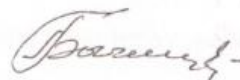
Р.В. Раевский

Канд. биол. наук,  
 ст. науч. сотр.



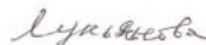
Л.Н. Юхименко

Канд. биол. наук,  
 ст. науч. сотр.



Л.И. Бычкова

Аспирант,  
 инженер-ихтиопатолог  
 научно-производственного  
 рыбоводного комплекса



Н.А. Лукьянова

ПРИЛОЖЕНИЕ В  
"УТВЕРЖДАЮ"

Первый заместитель  
генерального директора  
А.Ю. Киселев  
2007 г.



**ВРЕМЕННОЕ НАСТАВЛЕНИЕ**

по применению пробиотического  
препарата "Зоонорм"  
в рыбоводстве (в порядке  
производственных испытаний в 2007 г)

**1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ**

1.1. Зоонорм представляет собой лиофилизированную микробную массу живых антагонистически активных бактерий вида *Bifidobacterium bifidum* штамма №1, иммобилизованных на частицах измельченного активированного угля.

1.2. По внешнему виду препарат представляет собой порошок от светло-серого до темно-серого цвета с черными вкраплениями. Зоонорм сладковатого вкуса, со слабым кисломолочным запахом. При растворении в воде образуется суспензия с частичками сорбента черного цвета.

1.3. Зоонорм расфасован в стерильные пакеты из металло-полимерного многослойного материала (цефлена) по 5, 10, 100 доз. Допускается другая фасовка, согласованная в установленном порядке.

На пакетах нанесена маркировка, на которой указаны: наименование препарата; количество доз в одном пакете; номер серии; номер контроля; срок годности; надпись "для животных".

1.4. Хранят Зоонорм в сухом месте при температуре от 2 до 10<sup>0</sup>С. Срок годности - 1 год с даты изготовления.



1.5. Пакеты с нарушенной целостностью упаковки, содержащие плесень и другие примеси, выбраковываются.

## 2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

2.1. Активность препарата Зоонорм определяют содержащиеся в нем микроколонии бифидобактерий, которые обладают антагонистической активностью против широкого спектра патогенных и условнопатогенных микроорганизмов и тем самым нормализуют микрофлору кишечника, деятельность желудочно-кишечного тракта, улучшают обменные процессы, повышают усвояемость кормов. Микроколонии бифидобактерий, сорбированные на активированном угле, способствуют выведению токсических метаболитов, активируют процесс пристеночного пищеварения, осуществляют физиологическую защиту кишечного барьера от проникновения микробов и токсинов во внутреннюю среду организма путем ассоциации со слизистой оболочкой кишечника.

2.2. Зоонорм способствует повышению неспецифической резистентности организма и стимуляции роста и развития рыб.

2.3. В одной дозе препарата содержится не менее  $1 \times 10^7$  КОЕ (колониеобразующих единиц) бифидобактерий.

2.4. Препарат безвреден, побочных действий не вызывает.

## 3. ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА

3.1. Зоонорм применяют для профилактики и лечения желудочно-кишечных инфекций рыб, бактериальной геморрагической септицемии, вызванной различными грамотрицательными бактериями.

3.2. Препарат применяют перорально групповым методом. При этом способе используют пакеты с различной дозировкой. Расчетное количество препарата, необходимое для разового применения для данного количества рыб, разводят в объеме питьевой воды с температурой не выше  $37^\circ\text{C}$

(ориентировочно 1000 доз в 0,5 литра) и полученную суспензию перемешивают с общим количеством корма, необходимым для одного кормления. При смешивании с сухим кормом для разового применения количество препарата последовательно смешивают со 100 – 200 г корма, а затем смешивается с количеством корма, необходимым для одного кормления.

Необходимое количество пакетов, содержащих препарат определяют из расчёта:

$$\text{Число пакетов} = \frac{\text{Суточная доза} \times \text{Численность голов}}{\text{Количество доз в пакете}}$$

Пример расчёта: Требуется дать препарат в количестве 0,01 дозы. Численность рыб 1000 голов. На пакете указано "10 доз".

$$\text{Необходимое число пакетов} = \frac{0,01 \times 1000}{10} = 1$$

**Недопустимо растворение препарата в горячей воде и хранение его в растворенном виде.**

3.3. С профилактической целью препарат используют для рыб на стадии личинки при переходе на внешнее питание, после применения антибактериальных препаратов, для уменьшения отрицательного воздействия кормов низкого качества; для осетровых рыб перед снятием морфометрических показателей и проверкой гонад (таблица).

3.4. В лечебных целях Зоонорм применяют указанным выше категориям рыб в дозировках, указанных в таблице. Курс лечения рыб составляет 10-15 суток в прудовом хозяйстве, 15-20 суток в садковых хозяйствах и установках замкнутого типа водообеспечения.

Величина дозы и продолжительность лечения могут быть увеличены в зависимости от возраста и массы рыбы, а также от степени тяжести болезни по усмотрению специалиста ихтиопатолога.



**Дозировка препарата Зоонорм для рыб (карпа, осетра):**

Возрастная категория рыб	Дозы препарата	
	профилактическая	лечебная
1	2	3
Личинка, мальки	0,001 дозы /2 кормления в сутки	0,01 дозы/3-4 кормления в сутки
Сеголетки, годовики	0,001 дозы/ 1-2 кормления в сутки	0,01 дозы/2-3 кормления в сутки
Товарная рыба	0,01 дозы/1-2 кормления в сутки	0,1 дозы/2-3 кормления в сутки
Ремонт и производители	0,5-1 дозы/1-2 кормления в сутки	1-5 доз/2-3 кормления в сутки (для карпа); 5-10 доз/ 2-3 кормления в сутки (для осетровых)

3.5. При одновременном назначении препарата Зоонорм с витаминами, особенно группы А, В, С, эффективность его действия повышается. Одновременный приём с антибактериальными препаратами снижает эффективность действия препарата Зоонорм.

Наставление разработано лабораторией ихтиопатологии ВНИИПРХ совместно АО "Партнёр" г. Москва

КОПИЯ

4.

29.09.93 г.

Рефтинское са-  
хозяйство

## А К Т

настоящий составлен в том, что 29.09.93 г. был проведен учёт результатов вакцинации среди двухлеток /годовиков/ и трёхлеток /двухго-  
виков/ карпа, вакцинированных в апреле 1993 г. препаратом ВКС-2.

Садок I72 /опыт/. 337 рыб - Клинически все здоровые. Средняя навеска I600 г. Все рыбы мало различались по размеру.

Садок I74 /контроль/. 286 рыб, 8,4% с язвенными поражениями различных размеров и локализации. Большой разброс по массе тела и размерам. Средняя навеска - I850 г.

Садки I90, I92, I94 /трёхлетки, опыт/. Клинических поражений нет. Средняя навеска 3I25 г.

Садок I28 /контроль/: 233 рыбы. Средняя навеска I440 г. Большой разброс по массе тела и размеру рыб. В контроле 4 рыбы с язвами 4 - с рубцами /3,43%.

Группа четырёхгодовиков /трёхлеток/ не учитывалась в связи с тем, что она была взята на нерест.

Подписи:

Л.Н. Юхименко

А.А. Вихман

Н.Ф. Калинова

А.В. Шахманаев



КОПИЯ  
5-20 октября 1993 г.

Рыбхоз "Осенка"  
Коломенский р-н  
Московская обл.

### А К Т

Мы, нижеподписавшиеся, ветврач-эпизоотолог Респу бликанского эпизоотического отряда Департамента ветеринарии МСХ РФ Растегаева Л.А., зам. генерального директора А.О. Мосрыбхоз Степина В.К., с.н.с., к.б.н. НИИПРХ Юхименко Л.Н. в присутствии зав. производства рыбхоза Боровик С.Н. и ихтиопатолога хозяйства Байбакова К.Ю. составили настоящий акт эпизоотического обследования хозяйства и вакцинации ремонтно-маточной группы карпа.

.....

В настоящее время на день обследования хозяйства заканчивается сброс последнего нагульного пруда №7. Реализовано в торговую сеть 16,8 т товарной рыбы, отсажено на 3-хлетний оборот 65 т товарной рыбы, выращено и отсажено на зимовку 1993-1994 гг. 1 млн 20 тыс. сеянцев карпа средней навеской 25 г. Пересажено из летне-маточных и летне-ремонтных прудов 250 шт. производителей карпа и 4500 шт. ремонта разных возрастных групп /2-5-тилетки/.

Из указанного количества провакцинировано 250 шт. производителей и 148 шт. ремонта карпа.

При клиническом обследовании карпов, вакцинированных в апреле и мае 1993 г. 787 экз. чешуйчатого и зеркального карпа разных возрастных групп признаков инфекционных заболеваний не обнаружено.

У большинства обследованных рыб отмечено неудовлетворительное состояние жаберного аппарата: жабры ярко-алого либо бордового цвета, с неровными краями, отёчные, у некоторых рыб с некротизированными краями.

В соответствии с программой проверки вакцины ВКС-2 и отсутствием клинических признаков у рыб опытной и контрольной групп для контрольного бактериологического исследования было взято 2 опытных /вакцинированных весной/ и 2 контрольных трёхлетка карпа. Внутренние органы отобранных рыб без патологических изменений.

Подписи:            Л.А.Растегаева  
                          В.К.Степина  
                          Л.Н.Юхименко  
                          С.Н.Боровик  
                          К.Ю.Байбаков

Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации псевдомоноза рыб

**2.2.6. Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации псевдомоноза рыб**

**МИНИСТЕРСТВО  
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(Минсельхозпрод России)**

**ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ**

107139, Москва, Орликов пер., 1/11  
Для телеграмм: Москва, 84  
Минсельхозпрод  
Телекс: 417738 ИИИИ  
Телефоны: 975-58-50; 975-54-23  
18.09.98 г. № 13-4-2/1394

**УТВЕРЖДАЮ**  
Руководитель Департамента  
ветеринарии



В.М. Авилов  
сентября 1998 г.

**ИНСТРУКЦИЯ**

*о мероприятиях по профилактике и ликвидации псевдомоноза рыб*

**1. Общие положения**

1.1. Псевдомоноз – инфекционная болезнь тепловодных, холодноводных и аквариумных рыб, встречающаяся в прудовых и промышленных хозяйствах.

1.2. Возбудителями псевдомонозов являются вирулентные штаммы бактерий рода *Pseudomonas*. Чаще всего встречаются виды *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. aureofaciens*, *Ps. cyprinisepticum*, *Ps. intestinalis*, *Ps. anguilliseptica*, *Ps. chlororaphis*. Каждый из этих видов может вызвать заболевание самостоятельно, в ассоциации друг с другом или другими микроорганизмами.

**2. Эпизоотология**

2.1. Псевдомонозами болеют карповые рыбы (возбудители: *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. cyprinisepticum*, *Ps. intestinalis*), угри (*Ps. aureofaciens* и др.), лососевые рыбы (*Ps. fluorescens*, *Ps. chlororaphis*).

2.2. Псевдомонады являются представителями микробиоценоза воды во всех естественных и искусственных водоемах.

2.3. Источником инфекции могут быть больные, переболевшие, а также дикие и сорные рыбы, обитающие в источниках водоснабжения.





МИНИСТЕРСТВО  
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(Минсельхозпрод России)  
ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

107139, Москва, Орликов пер., 1/11.  
Для телеграмм: Москва: 84  
Минсельхозпрод  
Телетайп: 417738 ЛЕН

ИЗ. 05.96г. № 13-4-2/604

На № \_\_\_\_\_

УТВЕРЖДАЮ

Начальник Департамента  
ветеринарии  
В.М.Авилон



" МВЯ " 1996 г.

**ВРЕМЕННОЕ НАСТАВЛЕНИЕ**  
по применению сухой вакцины  
против бактериальной геморра-  
гической септицемии и аэромоназа рыб  
(в порядке широкого производственного  
испытания в 1996-1998г.г.)

#### 1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

- 1.1. Вакцина против бактериальной геморрагической септицемии и аэромоназа является бесклеточным лиофилизированным белковым препаратом, полученным из высоковирулентного штамма аэромонад биохимическим методом.
- 1.2. Вакцина представляет собой аморфный порошок светло-желтого цвета с зеленоватым оттенком, растворима в изотоническом растворе хлорида натрия с образованием опалесцирующего раствора. Вакцину расфасовывают в стерильные стеклянные флаконы согласно ТУ 10.09.202-86 или ТУ 64-2-10-87. В одном флаконе содержится 2,5 или 5,0 или 25 мг, что составляет соответственно 50, 100 и 500 иммунизирующих доз.
- 1.3. Флаконы с вакциной должны быть плотно закупорены резиновыми пробками, обкатанными металлическими колпачками. На каждом флаконе должна быть этикетка, на которой указано: наименование и товарный знак предприятия-изготовителя, название препарата, количество препарата в флаконе, номер серии, номер контроля, дата изготовления, срок годности, условия хранения и обозначение ТУ.
- 1.4. Флаконы с вакциной, содержащие посторонние примеси, имеющие нерастворяющиеся конгломераты и с нарушенной укупоркой бракуются.
- 1.5. Вакцина пригодна для применения в течение 5 лет при условии хранения в сухом темном помещении при температуре от 2 до 8° С.



Московская обл.  
Клинский р-он  
д. Воздвиженское

Утверждаю



В.И. Просинюк

2001 г.

Акт

по применению комбикорма с субалином в производственных  
условиях ЗАО "Рыбхоз Клинский"

Клинский рыбхоз неблагополучен по аэромонозу с 1989 г. При первом обследовании рыбоводного хозяйства в текущем году отмечено отсутствие клинических признаков у рыб из 1-го и 2-го прудов р/уч Владимировка и клинические признаки острой и хронической форм аэромоноза у рыб из 3-го пруда р/уч Новоселки: ерошение чешуи, экзофтальмия, вздутие брюшка и язвы, в брюшной полости кровянистый экссудат. у 4-х рыб из 20 рыб 1-го и 2-го прудов рост бактериальной флоры не обнаружен. Во всех остальных посевах (включая рыбу 3-го пруда) обильный рост бактерий группы кишечной палочки (БГКП) и протей или протей в чистой культуре. Выделение протей из воды и рыбы создавало весьма неблагоприятный прогноз, в связи с чем была проведена обработка прудов негашеной известью, затем препаратом ДОН-1 и для повышения иммуно-физиологического статуса рыбы ее прокормка комбикормом, содержащим субалин (1 фл/т комбикорма, изготовленным ОАО "Ассортимент - АГРО" г. Сергиев-Посад) в течение 5 дней.

При обследовании хозяйства 20 июня отмечено заметное улучшение патолого-анатомической картины, снижение уровня бактериальной контаминации, исчезновение протей. В посевах соскоба со стенок кишечника отмечен рост *Vac. subtilis* (субалина). Однако, стенки кишечника еще были тонкими и легко разрывались. Т.е. состояние рыбы в пруду 3 р/уч Новоселки значительно улучшилось.

Повторный курс прокормки субалином был проведен 10 - 15.08.01 г.

При контрольном обследовании рыбы 28.08.01 г. из 1-го пруда участка Владимировка у одной рыбы была рубцующаяся язва, остальные 11 - без клинических признаков. У всех рыб отмечено в разной степени выраженное воспаление кишечника. В 79,1% посевов патматериала рост бактериальной флоры не обнаружен, в 16,7% - единичные колонии *A. hydrophila* и протей, в 4,2% - умеренный рост аэромонад. В 3-м пруду р/уч Новоселки вся рыба была без клинических признаков, патолого-анатомическая



Московская обл.  
Лотошинский р-н  
ЗАО Рыбокомбинат  
"Лотошинский"



### А К Т

по результатам применения комбикорма с субалином  
на прудах р/к "Лотошинский"

В р/х "Лотошинский" основная проблема с сеголетками карпа, в связи с чем было принято решение провести прокормку именно этой возрастной группы.

Предварительное бактериологическое исследование 7.07.01 г. патматериала от сеголетков и проб воды из выростных прудов №12 и №13 показало высокий уровень бак. обсемененности воды - 22.400 КОЕ/мл в 12-м и 24.160 КОЕ/мл в 13-м пруду и значительную контаминацию внутренних органов у рыб: в 22,5% проб рост бактериальной флоры не обнаружен, в 10% - рост единичных колоний, в 35% - умеренный, в 32,5% - обильный. При этом выделялись аэромонады с ДНКазной активностью от 0 до 5 мм.

С 30.07. по 4.08.01 г. было проведено кормление сеголетков комбикормом с субалином (1 фл/т), приготовленном на Сергиев-Посадском заводе, в прудах №№12 и 13, в качестве контрольного был оставлен 14-й пруд.

17.08.01 г. было проведено обследование 3-х проб воды из выростных прудов 12, 13, 14 и патматериала от сеголетков из этих же прудов. Температура воды на момент обследования составляла 19°C.

Вся рыба без клинических признаков.

При патолого-анатомическом вскрытии из 10 рыб, взятых из пруда №12 (№№1-10), у 2-х - печень (п) слегка анемичная, почки (пч) гидремичные, мажущиеся, у одного - передняя камера плавательного пузыря (ПП) мутная, с вкраплениями гемосидерина.

Из 10 рыб, взятых из пруда №13 (№№11-20), - у 4-х анемичная и гидремичная печень и рыхлые, мажущиеся почки, ПП - у всех рыб без изменений.

Из 7-ми рыб отобранных из пруда №14 (№№21-27), - у одной - анемичная печень, у второй - почки рыхлые, мажущиеся, у третьей - разжижающий некроз почки.

При первичном просмотре чашек с посевами выявлено следующее:

от рыб 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20 из печени и почек, 4-ой из печени, 5-ой из почек - рост бактериальной флоры не обнаружен. В посевах почек 4-ой рыбы и печени 5-ой, печени и почек 15-й - рост единичных колоний, а из печени и почек 14-й - умеренный рост *A. sobria* и *A. sp 5* и 7 с ДНКазной активностью 5 и 9 мм.

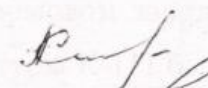

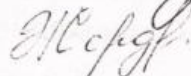
От рыб 21 п, пч рост бактериальной флоры не обнаружен. В посевах 22, 23, 24, 25 п, пч - сливной рост; 26, 27 п, пч - обильный рост светло-розовых колоний. Всего от этих рыб выделено 13 штаммов аэромонад *A. sp 5* (5 мм), *A. sobria* (6 мм), *A. sp 1* (1 мм) и *A. sp 3* с ДНКазной активностью 0-6 мм.

В посевах патматериала от рыб, получивших субалин, рост бактериальной флоры не обнаружен в 70%, в 20% - рост единичных колоний, в 10% - умеренный рост. В посевах от рыб контрольной группы в 14,3% роста нет, в 28,6% - умеренный, в 57,1% - обильный.

Уровень бактериальной обсемененности в прудах существенно различался: в 12-м - 5360 КОЕ/мл, в 13-м - на эритрит-агаре - сливной рост, на Эндо - 38.400 КОЕ/мл, в 14-м - 7980 КОЕ/мл. Но даже при таком уровне содержания бактерий в воде кормление сеголетков комбикормом с субалином дало положительный эффект.

Для получения более высоких результатов целесообразно или увеличить количество пробиотика, или кратность кормления.

Главный госветинспектор  
Лотошинского р-на  
Главный рыбовод хозяйства  
Ихтиопатолог хозяйства

А.И. Слудов  
С.А. Никитина  
О.В. Жердева



ЭПО "Якоть"  
 Дмитровский р-н  
 Московской обл.



УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора ВНИИПРХ

Ю.И. Илясов

2001 г.

### А К Т

по применению комбикорма с субалином  
 на прудах ЭПО "Якоть"

В июле 2001 г. при проверке эпизоотической ситуации ЭПО "Якоть" было установлено, что из паренхиматозных органов двух- трехлетков карпа при отсутствии клинических признаков заболевания выделены вирулентные штаммы аэромонад. Учитывая высокую температуру воды в прудах и значительный уровень ее бактериальной обсемененности (более 5000 КОЕ/мл), было решено провести профилактическую прокормку рыбы комбикормом с субалином. На комбикормовом заводе ОАО "Ассортимент-АГПО (г. Сергиев Посад)" на базе рецептуры К-111 был изготовлен лечебный комбикорм с субалином из расчета 8 г/т.

Контрольное исследование комбикорма 1.08.01.г. показало отсутствие роста в нем посторонней микрофлоры. Вокруг каждой гранулы на эритроит-агаре наблюдался активный рост субалина. На чашках с эритроит-агаром с добавлением канамицина при количественном посеве рост субалина составил  $308 \times 10^4$  КОЕ/г.

Рыбу кормили в соответствии с утвержденным Наставлением по применению субалина №13-5-2/1423 от 20.10.98 г. Продолжительность скармливания лечебного корма составила 12 дней (с 30.07. по 10.08. 2001 г.).

По завершению курса кормления субалином бактериологическому обследованию было подвергнуто 62 карпа разновозрастных групп и 5 белых амуров с целью оценки его эффективности.

В результате рост патогенной микрофлоры в посевах паренхиматозных органов карпа и белого амура не обнаружен, что свидетельствует о высокой эффективности применения субалина


При дальнейшем выращивании рыбы на ЭПО "Якоть", клинико-патологических признаков какого-либо инфекционного заболевания не наблюдалось.

Зав. ЭПО "Якоть"

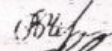
Ихтиопатолог ЭПО "Якоть"

Зав. лаб. ихтиопатологии, к.б.н.

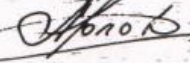
Ст. н. сотр. лаб. ихтиопатологии, к.б.н.



Ермошкин М.П.



Чернышов В.А.



Головин П.П.



Юхименко Л.Н.



п. Рыбхоз  
 Ногинского р-на  
 Московской области

УТВЕРЖДАЮ  
 Директор  
 "ОАО "Бисеровский рыбокомбинат"  
 Семенов А.К.  
 2001 г.



АКТ  
 по проверке эффективности применения  
 субалина в "Бисеровском рыбокомбинате" против  
 бактериальной геморрагической септицемии (аэромоноза) карпа  
 в 2001 году

На протяжении ряда лет Бисеровский р/к неблагополучен по аэромонозу карпа и для борьбы с этим заболеванием с лечебной целью постоянно использовали фуразолидон и левомицетин по несколько курсов за сезон. В последнее время эффективность от применения препаратов резко снизилась, а из воды рыбоводных прудов и паренхиматозных органов карпов выделялись аэромонады слабочувствительные и резистентные к фуразолидону и левомицетину.

Микробиоценоз воды в прудах отличался большой бактериальной пестротой. На фоне значительной общей бактериальной обсемененности (более 3000 КОЕ/мл) большое видовое разнообразие – от 5 до 9 видов микроорганизмов, основная часть которых представлена аэромонадами, энтеробактериями и псевдомонадами.

Неблагоприятная экологическая обстановка в прудах способствовала снижению резистентности рыбы, что приводило к контаминации внутренних органов сапрофитной флорой, аэромонадами, флавобактериями, псевдомонадами.

Для повышения резистентности организма рыб на Центральном и Образцовском участках в 1999-2000 гг. было начато применение субалина производства ОАО



"Днепрофарм", что позволило получить положительные результаты. В 2001 г. эти испытания были продолжены.

При первом обследовании рыбы в мае из нагульных прудов №№ 2 (рыба №№ 1-10), 3 (рыба №№ 11-19 и 1 б (рыба №№ 20-28), Центрального участка – у рыб №№ 1-5, 11-14, 20-24 отмечали клинические проявления различной степени (экзофтальмия, локальные геморрагические и гиперемированные участки тела, вздутие брюшка, ерошение). Внутренние органы анемичны, гидремичны, у некоторых особей – мажущейся консистенции.

По уровню бактериальной контаминации только в посевах от одной (№3) рыбы был отмечен обильный рост из печени (П) и почек (ПП). У 16 рыб (51%) рост бактериальной флоры не обнаружен. В остальных посевах рост единичных колоний или умеренный. Уровень бактериальной обсемененности воды от 2420 КОЕ/мл. до 12400 КОЕ/мл.

Из паренхиматозных органов рыбы выделялись аэромонады *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. sp. 2* с ДНКазной активностью 0-6 мм. из воды – *A. sobria*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sp. 1, 2* и 4.

Всего за летний сезон проведено 4 курса лечебно - профилактического кормления 9.06-10.06; 18.06-22.06; 12.07-17.07 и 17.08-23.08. При проверке приживаемости препарата в посевах из кишечника рыб их разных прудов колонии *Vac.subtilis* (субалина) обнаруживались от 10 до 67% посевов. При этом уровень контаминации аэромонадами внутренних органов снижался.

При последнем в сезоне обследовании (27.08.01.) из 13 рыб от 3-х были выделены – *A. sobria*, *A. hydrophila*, *A. cavia*, *A. sp. 8* с ДНКазной активностью 4-6 мм.

У остальных рыб рост микрофлоры из органов не отмечен. На Образцовском участке при первом обследовании в июне обсемененность воды составила 4400-6340 КОЕ/мл. При обследовании рыбы (двухлетки карпа) в 8 из 20 посевах - обильный и сливной рост, в 5-и умеренный, в 4-х – единичный, в 3-х рост бактериальной флоры не обнаружен.

Лечебно - профилактические кормления рыбы субалином проводились 18-22.06, 14-17.07, 3-12.08 и 13.17.09. При последнем контрольном обследовании (6.10.01.) от всех 16 рыб рост бактериальной флоры не обнаружен.

Таким образом, результаты проводимого испытания пробиотика субалина в Бисеровском р/к позволяют дать положительную оценку его применения на Образцовском участке и в меньшей степени на Центральном участке.

Учитывая более сложную экологическую обстановку на Центральном участке, в дальнейшем необходимо увеличить кратность и продолжительность курсов кормления рыбы комбикормом с субалином.

Главный рыбовод

Бисеровского рыбокомбината

А.В. Разумный

Ихтиопатолог рыбокомбината

Л.А. Алексанян

Зав. лаб ихтиопатологии,

ВНИИПРХ, к.б.н.

П.П. Головин

Ст. н.с. лаб. ихтиопатологии,

к.б.н.

Л.Н. Юхименко



ЭПО "Якоть"  
Дмитровский р-н  
Московской обл.



С УТВЕРЖДАЮ  
зам. директора ВНИИПРХ

Ю.И. Илясов  
2002 г.

### АКТ

#### по применению комбикорма с субалином на прудах ЭПО "Якоть"

Мониторинг эпизоотической ситуации ЭПО "Якоть" выявил существенную контаминацию паренхиматозных органов карпов после зимовки и при выращивании в нагульных прудах: от 19,4% до 32,5%, причём степень контаминации от единичных колоний до обильного роста даже при умеренных показателях общей микробной обсеменённости воды в прудах. Учитывая неблагоприятные условия, для повышения иммунофизиологического статуса рыб было проведено их кормление комбикормом с субалином.

Комбикорм был заказан на комбикормовом заводе ОАО "Ассортимент – АГРО" (г. Сергиев Посад) на базе рецептуры ПК – 111 с субалином ОАО "Днепрофарм" (Вектор-Евро) из расчёта 8г/т.

При контрольном исследовании комбикорма 31.07.02 г. рост посторонней микрофлоры не был обнаружен, вокруг всех гранул отмечался характерный рост колоний *Bacillus subtilis*.

Во всех прудах провели 1-го, 2-го и 5-го августа кормление комбикормом с субалином согласно технологическим нормативам.

Проверка содержимого кишечника карпов показало 100%-ую приживаемость субалина у всех рыб.

Последующие исследования разновозрастных рыб из пяти прудов показало отсутствие контаминации внутренних органов. Таким образом, рыба на зимовку ушла в удовлетворительном состоянии.

Зав. ЭПО "Якоть"

Ермошкин М.П.

Главный рыбовод  
ЭПО "Якоть"

Евстигнеева А.Г.

Зав. лаб. ихтиопатологии, к.б.н.

Головин П.П.

Ст.н.с., к.б.н. лаборатории  
ихтиопатологии

Юхименко Л.Н.

п. Рыбхоз  
Ногинского р-на  
Московской области

"УТВЕРЖДАЮ"

Директор ОАО "Бисеровский  
рыбокомбинат"

Семёнов А.К.

2002 г.



### АКТ

#### по проверке эффективности применения субалина в "Бисеровском рыбокомбинате" против бактериальной геморрагической септицемии (аэромоназа) карпа в 2002 г.

В 2002 г. были продолжены исследования по эффективности применения субалина на Образцовском и Центральном участках.

Первое визуальное обследование хозяйства было проведено 7.05.02 г. Вся рыба была в удовлетворительном состоянии. Первые клинические признаки у трёхлеток из 2-го пруда были отмечены 16.05.02 г., в связи с чем была внесена хлорная известь по береговой линии.

При проведении бактериологического обследования 21.05. из 12-ти карпов – трёхлеток из 2-го пруда у 3-х клинические признаки отсутствовали, у 6-ти отмечена экзофтальмия, асцит, диффузное ерошение чешуи, геморрагии на теле, у остальных 3-х рыб образующиеся язвы на поверхности тела. От всех рыб с клиническими проявлениями выделены аэромонады, бактерии группы кишечной палочки (БГКП) и неферментирующие щелочеобразователи (НФЩ). У этих же рыб отмечена анемичность печени и почек, их рыхлая консистенция.

Кормление с субалином было проведено с 30.06. – 4 дня и через два дня – ещё однократное кормление.

Уровень обсеменённости воды низкий: ОМЧ – 60 КОЕ/мл (после обработки хлорной известью).

В августе было проведено ещё два кормления с субалином – 3-х дневное и 8-ми дневное. Однако, учитывая нарастание уровня ОМЧ с 4100 КОЕ/мл до 16.800 КОЕ/мл, нормализовать состояние рыбы не удалось: у 60% обследованных рыб в посевах печени и почки отмечали рост бактериальной флоры от единичных колоний до обильного.

Более удовлетворительная ситуация отмечалась в прудах 1А и 1Б с двухлетками карпа – выраженные клинические признаки отсутствовали, но отмечали анемичность печени и почек. ОМЧ воды от 3200 КОЕ/мл до 5300 КОЕ/мл в пруду 1Б, и от 1500 КОЕ/мл до 6020 КОЕ/мл в пруду 1А. Рост бактериальной флоры в посевах паренхиматозных органов от единичных колоний до сливного.

Первое кормление с субалином проведено с 13.07. – 6 дней, второе с 2.08. прерывистым курсом.

При бактериологическом обследовании 22.08. в посевах от 70% рыб из 1А пруда и в 30% от рыб из 1Б пруда отмечали рост единичных колоний.

На Образцовском участке первое кормление с субалином провели 12.06. – 16.06.

При обследовании 30.07. в 80% проб отмечен рост единичных колоний, в 20% – умеренный.



После повторного 10-ти дневного курса в августе в посевах 40% проб отмечен рост единичных колоний, в 60% - рост бактериальной флоры не обнаружен.

При обследовании 25.09. отмечено улучшение состояния паренхиматозных органов в посевах рост единичных колоний.

Следует отметить, что условия очень жаркого лета, дефицит воды значительно осложнили экологическую ситуацию в хозяйстве, что в свою очередь сказалось и на состоянии рыбы. В связи с этим необходимо было увеличить частоту курсов кормления и длительность курсов применения субалина для получения лучших результатов. На это указывалось и в акте по проверке эффективности субалина в 2001 г.

Кроме того, ручное внесение препарата в комбикорм снижает результативность его применения, повышая его расход. Экономически более выгодным является промышленное изготовление комбикорма с субалином.

Проведённые исследования показали, что несмотря на очень сложные условия жаркого лета, технологические погрешности применения субалина позволило снизить уровень клинических проявлений, (с 58% до 5%) улучшить состояние паренхиматозных органов, уменьшить степень бактериальной контаминации рыб.

Для предупреждения развития заболеваний следует обязательно проводить кормление с субалином после зимовки, при повышении температуры воды и перед зимовкой, что позволит избежать активации патогенной и условно-патогенной микрофлоры и направить энергию, которую рыба затрачивает на борьбу с контаминантами, на её продукционный рост

Главный рыбовод  
Бисеровского р/к

А.В. Розумный

Ихтиопатолог р/к

Л.А. Алексанян

Зав. лаб. ихтиопатологии  
ВНИИПРХ, к.б.н.

П.П. Головин

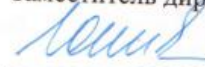
Ст.н.с. лаб. ихтиопатологии,  
ВНИИПРХ, к.б.н.

Л.Н. Юхименко

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО РЫБОЛОВСТВУ  
Федеральное государственное унитарное предприятие  
"Всероссийский научно-исследовательский институт  
пресноводного рыбного хозяйства ФГУП "ВНИИПРХ"

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора ФГУП "ВНИИПРХ"



д.б.н., проф. Ю.И. Илясов

" 30 " 12 2002 г.

РЕКОМЕНДАЦИИ

Наставление по применению гранулированного комбикорма  
с субалином в рыбоводстве

п. Рыбное

2002 г.

## 1 Общие сведения

1.1 Корм гранулированный лечебно-профилактический для карпа и других видов рыб должен соответствовать дополнению к ТУ по комбикормам.

Корм изготавливается на базе стандартных рецептур гранулированных рыбных кормов и включает в себя пробиотик - субалин (Subalinum).

1.2 Основу препарата субалина составляет штамм *Bacillus subtilis* 2335 (105 лиофилизированный в защитной среде, содержащей сахарозу и желатин. Он представляет собой пористую массу от светло-серого до коричневого цвета или порошок желто-коричневого цвета, которые легко растворяются в воде.

1.3 Выпускают в ампулах по 1, 2, 3, 5 и 10 доз, а так же в градуированных флаконах по 5 доз и запаянных полиэтиленовых пакетах по 100-400 доз. В одной дозе препарата содержится  $50 \times 10^9$  микробных тел (спор и вегетативных клеток).

1.4 Хранят в сухом, защищенном от света месте при температуре не выше  $30^{\circ} \text{C}$ . Срок годности субалина 2 года со дня изготовления.

## 2 Фармакологические свойства.

2.1 Субалин характеризуется широким спектром антагонистической активности в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

2.2 Важной особенностью субалина является его способность при пероральном применении повышать неспецифическую резистентность организма, а так же регулировать и стимулировать пищеварение, ускорять регенерационные процессы в тканях.

## 3 Применение

3.1 Лечебно-профилактический корм с субалином применяют для профилактики и лечения бактериальной геморрагической септицемии (БГС), аэромоназа, желудочно-кишечных инфекций бактериальной этиологии.

3.2 С профилактической целью, для предупреждения эндогенной БГС, субалин с кормом дают после выхода рыбы из зимовки и начала питания рыбы искусственным кормом, а также в течение рыбоводного сезона при резком повышении температуры воды, появлении сухости жаберных покровов, патологических изменениях внутренних органов товарной рыбы в дозе 30-70 млн. микробных клеток сеголеткам, 70-140 млн. микробных клеток на 1 кг массы рыбы 2-4 раза в сутки в течение 5-7 дней.

3.3 С лечебной целью дозировку субалина в корме удваивают и продолжительность применения увеличивают до 10 дней.



3.4 В некоторых случаях допускается внесение субалина в уже готовые гранулированные рыбные комбикорма. Для этого перед кормлением препарат разводят дехлорированной водой равномерно смачивают гранулированный комбикорм (примерное соотношение водного раствора препарата и корма 1: 20 – 1: 25).

3.5 Расчет необходимого количества пробиотика в корме в зависимости от нормы кормления рыб приведен в таблице.

Таблица - Расчет необходимого количества пробиотика в корме

Суточная норма корма (% от массы рыбы)	2	3	5	8	10	12	15
Количество корма в день на 1 т рыбы (кг)	20	30	50	80	100	120	150
Количество спор бактерий в корме (млрд/кг корма)	1,75	1,2	0,7	0,43	0,35	0,29	0,23
Масса препарата в корме (мг/кг корма)	20	13,3	8	5	4	3,3	2,7

Чаще всего используют градуированные флаконы, в которых примерно 4,0 г препарата (3 доз, 350 млрд. микробных тел). При 5 % суточном кормлении берут 2 флакона/т комбикорма.

3.6 Использование готового гранулированного комбикорма с субалином, которое изготавливают на комбикормовом заводе более эффективно. Это сокращает технологические трудности ручного приготовления комбикорма и непроизводительные затраты субалина.

3.7 Побочных реакций и осложнений при применении субалина не отмечается.

3.8 Рыбу, получавшую комбикорм с субалином, можно использовать в пищу без всяких ограничений.

3.9 В случае необходимости проведения курса лечения антибактериальными препаратами спустя 5 – 7 дней рекомендуется прокормить рыбу комбикормом с субалином.

4 Гранулированный комбикорм с субалином необходимо хранить в мешках в сухом прохладном помещении.