

РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ГИДРОМЕТЕОРОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Экологический факультет

Кафедра водных биоресурсов, аквакультуры и гидрохимии

Н.В. Попов, С.В. Королькова, А.В. Шошин

МЕТОДИКА ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ

Учебно-методическое пособие для студентов,
обучающихся по направлению
35.03.08 «Водные биоресурсы и аквакультура»

Санкт-Петербург

 **Астерион**

2022

DOI 10.53115/9785001882343

УДК 574.51+574.52

ББК 28.58

*Рекомендовано к изданию
на заседании кафедры водных биоресурсов, аквакультуры и гидрохимии
Российского государственного гидрометеорологического университета
Протокол № 9 от 16.05.2021 г*

Рецензенты:

ЛЕКОМЦЕВ П.В., доктор биологических наук, декан экологического факультета, Российский государственный гидрометеорологический университет
СКВОРЦОВА Н.Н., кандидат химических наук, доцент кафедры химии и молекулярной биологии, Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики

П58 Попов Н.В., Королькова С.В., Шошин А.В. Методика диагностики возбудителей бактериальных болезней рыб : учебно-методическое пособие для студентов, обучающихся по направлению 35.03.08 «Водные биоресурсы и аквакультура» / Н.В. Попов, С.В. Королькова, А.В. Шошин. – СПб.: Астерион, 2022. – 32 с. – DOI 10.53115/9785001882343

ISBN 978–5–00188–234–3

В учебно-методическом пособии «Методика диагностики возбудителей бактериальных болезней рыб» приведены данные по большому числу возбудителей бактериальных заболеваний у рыб, диагностируемых в бассейне Финского залива и пресноводных водоемах Ленинградской области. Также включены необходимые сведения по проведению микробиологического анализа описываемых возбудителей и приготовлению сред для него. Учебно-методическое пособие предназначено для студентов, обучающихся по направлению 35.03.08. Водные биоресурсы и аквакультура, возможно использование для студентов других биологических специальностей и направлений.

Авторы:

Попов Николай Викторович, старший преподаватель кафедры водных биоресурсов, аквакультуры и гидрохимии, Российский государственный гидрометеорологический университет

Королькова Светлана Витальевна, кандидат технических наук, заведующая кафедрой водных биоресурсов, аквакультуры и гидрохимии, Российский государственный гидрометеорологический университет

Шошин Александр Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры водных биоресурсов, аквакультуры и гидрохимии, Российский государственный гидрометеорологический университет

ISBN 978–5–00188–234–3

© Попов Н.В., 2022

© Королькова С.В., 2022

© Шошин А.В., 2022

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ.....	4
1.1. Рыбы и бактериальные болезни	4
1.2. Отбор проб.....	4
1.3. Инкубация.....	5
1.4. Проверка питательных сред.....	5
1.5. Дальнейшие исследования.....	6
2. ОСНОВНЫЕ ТЕСТЫ, ПРОВОДИМЫЕ С БАКТЕРИЯМИ.....	7
2.1. Окраска по Граму.....	7
2.2. Подвижность	7
2.3. Оксидазы.....	7
2.4. Тест О-Ф (тест Окисление-Ферментация) и образование газа	7
3. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ РЫБ.....	9
3.1. Вибриоз (<i>Listonella anguillarum</i>).....	9
3.2. Фурункулез (<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>).....	9
3.3. Болезнь рыб, вызываемая атипичными штаммами <i>Aeromonas salmonicida</i> ..	10
3.4. Болезнь рыб, вызываемая подвижными бактериями <i>Aeromonas</i>	10
3.5. Бактериальная почечная болезнь (БПБ, ВКД) (<i>Renibacterium salmoninarum</i>)	12
3.6. Флавобактериоз (<i>Flavobacterium psychrophilum</i> ja <i>F. columnare</i>)	13
3.7. Enteric Redmouth disease (ERM) <i>Yersinia ruckeri</i>	15
3.8. Другие бактерии.....	16
4. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ	19
4.1. Триптоно-соевая среда (TSA).....	19
4.2. КРОВЯНОЙ АГАР (TSA-среда, куда добавляется кровь лошади, коровы или овцы).....	20
4.3. СРЕДА Шоц-Вальтмана (SW).....	20
4.4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ СРЕДЫ ANACKER-ORDAL (АО) И АОВ-БУЛЬОНА, АОВ-САХАР И АОВ-НИТРАТ.....	21
4.5. ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИГОТОВЛЕНИЮ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУРУНКУЛЁЗА, ИНДОЛ, ЭСКУЛИН И НИТРАТНОЙ СРЕД	23
4.6. KDM-БУЛЬОН, KDM-СРЕДА И SKDM-СРЕДА	27
4.7. РАЗБАВЛЕННАЯ СРЕДА МЮЛЛЕРА-ХИНТОНА (МН-среда)	30
4.8. ¼-NUTRIENT	31

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Рыбы и бактериальные болезни

Один и тот же вид и род бактерий может быть патогенными для рыб и в пресной и в морской воде. Бактерии, вызывающие болезни рыб, встречаются также и вне тела рыбы, например в воде, донном иле и биоплёнке, находящейся на поверхности различных структур. Обычно отход рыб по причине бактериологических болезней связан с неблагоприятными для рыб условиями окружающей среды. Многие бактерии, вызывающие болезни рыб, являются обычно распространёнными в окружающей среде видами, например возбудитель вибриоза *Listonella anguillarum*. Но также имеются и виды бактерий, которые какое-то время сохраняются в окружающей среде, но размножаются только в рыбах, например возбудитель фурункулёза *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*.

Против некоторых бактериальных инфекций, например вибриоза, фурункулёза и возбудителя иерсиниоза - *Yersinia ruckeri* используют эффективную вакцину. В течение 2010 года проводятся испытания по эффективности воздействия вакцины против флавобактериоза. После вспышки бактериальной инфекции защита невакцинированного стада рыб вакцинацией больше не представляется возможной.

Первыми симптомами бактериальной болезни является снижение аппетита рыб. Точный диагноз болезни ставится на основании обнаруженных клинических изменений, результатов патологоанатомического вскрытия и бактериологического исследования органов рыб.

В этом пособии будут рассмотрены бактериальные болезни рыб и их диагностика.

1.2. Отбор проб

Для выделения возбудителя болезни бактериологический посев необходимо сделать с образцов только что умерших или умерщвлённых рыб в неспецифический агар, например кровяной агар или TSA. Целью посева является выращивание патогенных бактерий в образце в наиболее чистом виде и достаточном количестве. Поэтому бактериологический посев необходимо проводить перед дачей рыбам лекарственных препаратов.

Необходимо помнить, что многие бактериальные болезни, например БКБ и иерсиниоз могут сохраняться в рыбоводческом хозяйстве долго, (даже годы) не вызывая вспышки болезни. При проведении выборочного отбора проб у бессимптомного стада рыб никогда нельзя получить полной уверенности о том, насколько стадо свободно от болезни. Для достоверности исследования необходимо исследовать достаточно большое количество рыб, обычно не менее 60 экземпляров рыбы. Также необходимо принимать во внимание время отбора проб. Отбор проб для исследования на БКБ лучше проводить во время

прохладной воды, для других бактериальных болезней обычно летом, во время тёплой воды.

Бессимптомные экземпляры рыбы:

- Проводят бактериологический посев стерильными бактериологическими петлями из почек, селезёнки и кишечника.
- При обнаружении носителя болезни БКБ посев проводится по отдельной инструкции.

Больные или рыбы с симптомами:

- Дополнительно к вышесказанному бактериологическому посеву из почек, селезёнки и кишечника от экземпляра проводят посев из изменённых участков тела рыб (некрозы, фурункулы, другие воспалённые участки)
- Бактериологический посев в дополнение к вышесказанному с тех частей тела экземпляра рыбы, в которых обнаружены изменения (например некрозы, фурункулы, воспалённые части или раны на коже).
- Посев из ран на коже берётся с границы между нормальной и повреждённой ткани.
- При подозрении на флавобактериоз посев проводят в дополнение к обычному (кровяному) агару и на специальную питательную среду (модифицированный агар Anacker-Ordal).

1.3. Инкубация

Все бактериологические посевы для диагностики болезней рыб, перечисленных в этом пособии, термостатируются в аэробных условиях, если по-другому не упоминается. Температура инкубации немного меняется у разных видов бактерий, но в основном для бактерий вызывающих болезни рыб применяют температуру 15 - 17°C и 20 - 22°C .

1.4. Проверка питательных сред

Первый просмотр посевов на питательные среды исследуют через 48 часов со дня приготовления бактериального посева и после этого через день, в течение одной недели.

При определении вида бактерии посев делают на разные питательные среды, образовавшиеся в них колонии бактерий используются в дальнейшем исследовании. Инструкции по приготовлению питательных сред представлены в данном пособии в отдельном разделе.

Многие бактерии - возбудители болезней рыб растут медленно, поэтому получение окончательного результата от даты бактериологического посева до стадии дальнейших исследований займёт 1-2 недели, а по видам флавобактерий и *Renibacterium salmoninarum* —ещё дольше.

1.5. Дальнейшие исследования

После термостатирования посева при выполнении дальнейших исследований абсолютно важно, что исследуемый бактериологический посев был бы чистым, иначе определение вида исследуемой культуры бактерии не получится.

Разные виды бактерий различают друг от друга на основании их морфологических и биохимических особенностей. Таковыми например являются размер и форма колонии бактерий на питательной среде, характерный рост бактерии в каком-либо определённом агаре, подвижность, различные биохимические тесты (например реакции оксидаза и каталаза) и различное окрашивание.

Также используются имеющиеся в продаже готовые тесты с реагентами и инструкциями изготовителя. Нужно конечно помнить, что при тестировании различных биохимических особенностей, результат получаемый при тестировании может меняться и могут возникнуть трудности его толкования. Сейчас способ ПЦР (Полимеразной цепной реакции) в большинстве используется как орудие диагностики в бактериологии.

В бактериологии рыбных болезней используются несколько способов окрашивания, которые делаются на чистом росте бактерий. Инструкции по проведению окрашивания можно найти из многих печатных источников. Более распространен и часто применяем способ окраски мазков по Грамму, наряду с которым используют также флюоресцентное FA-окрашивание (Fluorescent Antibody) и окраску по Циль-Нилсену кислотоустойчивых бактерий (Ziehl-Neelsen).

2. ОСНОВНЫЕ ТЕСТЫ, ПРОВОДИМЫЕ С БАКТЕРИЯМИ

2.1. Окраска по Граму

Микроскопия мазков и культур - основной тест, который используется в бактериологии, также и при диагностировании возбудителей болезней рыб. Обычно его проводят первым из основных тестов. Большая часть патогенных рыбных бактерий грамотрицательные, но имеются также некоторые грамположительные патогенные бактерии, например (*Renibacterium salmoninarum*). Грамотрицательные бактерии окрашиваются в красный цвет, а грамположительные в синий/фиолетовый.

Мазки, окрашенные по Граму изучают при помощи микроскопа с 1000-кратным увеличением.

2.2. Подвижность

Изучается при помощи микроскопа по методу «висячей капли» с использованием физиологического раствора. Под подвижностью бактерий подразумевают собственное, автономное и четко направленное движение бактерий. Его не следует путать с «Броуновским движением» - колебание частиц в жидкости. Такое броуновское движение может быть и у неподвижных бактерий.

2.3. Оксидазы

Указывают на существование фермента (цитохромоксидазы), тест основывается на реакции изменения цвета. При тестировании используют готовые окси-полоски или реагенты для определения цитохромоксидазы в соответствии с рекомендациями изготовителя. Наличие оксидазоположительных бактерий вызывает окрашивание полоски или реагента в голубоватый или фиолетовый цвет. Оксидазонегативные бактерии не вызывают такой цветовой реакции.

2.4. Тест О-Ф (тест Окисление-Ферментация) и образование газа

Тестируется способность исследуемой культуры производить кислоту, окислительно и ферментативно, а также на газообразование из глюкозы. Раствор глюкозы должен быть всегда свежим при выполнении теста. Для проведения теста потребуется две одинаковых пробирки, внутри которых содержится одинаковый раствор глюкозы. При помощи стерильной бактериологической петли исследуемые бактерии помещаются в обе пробирки. Способность бактерии к газообразованию изучается поместив в пробирку газоуловительный поплавочек в обе испытательные пробирки. После этого в одну из засеянных пробирок с глюкозой наливается слой минерального масла не менее 1 см для создания

анаэробных условий. Если бактерия производит кислоту из глюкозы, цвет индикатора бульона меняется (например из зелёного в жёлтый). Реакция изменения цвета зависит от цвета используемого индикатора. Если цвет индикатора не меняется, это означает то, что бактерия не производит кислоту из глюкозы. Образование газа будет видно на верхней части пробирки газоуловительного поплавка в виде образовавшихся пузырьков газа.

3. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ РЫБ

3.1. Вибриоз (*Listonella anguillarum*)

Вибриоз наиболее часто встречается в регионах с морской и солоноватой водой в конце лета, когда температура воды высокая. Возбудитель вибриоза – маленькая, размером (0,5 х 1,5 мкм), грамотрицательная, короткая дугообразная палочка *Listonella anguillarum* (устаревшее название *Vibrio anguillarum*). Для культивации в агаре бактерии требуется соль натрия (Na^+), но выделенным из солоноватых вод Финского залива видам достаточно содержания соли в обычном кровном агаре. Прямой посев выполняют при растирании материала штрихом на поверхность чашки с кровяным агаром. Среда инкубируют в термостате при температуре 20 - 22 °С в течении 2-7 суток.

На кровяном агаре образуются полупрозрачные средних размеров колонии, вокруг которых через 1-2 суток отмечают гемолиз. Обычно гемолиз светлый, но иногда отмечается зеленоватый оттенок.

L. anguillarum – подвижная, оксидаза и каталаза положительная. При тестировании О-Ф она производит кислоту из глюкозы ферментативно и оксидативно, но газ не образуется. *L. anguillarum* чувствительна 150 мкг вибриостату О/129 (напр. Rosco 45411).

3.2. Фурункулез (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*)

Возбудитель фурункулеза – грамотрицательная неподвижная оксидазоположительная палочка *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Её размер 0,8 х 1-2 мкм. Прямую культивацию выполняют при помощи распределительной техники как на кровяной агар, также возможен посев и на SW-субстанцию (Шоц-Вальтмана), которую инкубируют 20-22 °С в термостате 2-7 суток.

Колонии на кровяном агаре маленькие, гемолизные, серо-белого цвета и легко сдвигаются бактериологической петлёй по поверхности агара. Также вокруг колоний на кровяном агаре наблюдается коричневый водорастворимый пигмент. Сейчас появляются также такие виды фурункулеза, которые не производят пигмента в кровяном агаре. Образование пигмента можно проверить в фурункулезной субстанции или TSA (Триптозно-Соевом агаре).

Колонии в питательной среде SW (Шоц-Вальтмана) имеют «звёздчатую» форму, сине-зелёные (сахарозаотрицательные) колонии, вокруг которых в агаре присутствует синяя окраска. Вокруг колоний также гидролиз/помутнение (Tween-положительные). При тестировании О-Ф образуется кислота из глюкозы как оксидативно так и ферментативно а также газ. *Aeromonas salmonicida* – штаммы легко агрегируют в физиологическом солёном растворе и не растут при температуре 37°С. Бактерии *Aeromonas*

salmonicida – сохраняются в виде инфекции как пресной и солоноватой воде в течении 15-50 суток (в зависимости от температур) и в морской воде около недели.

3.3. Болезнь рыб, вызываемая атипичными штаммами *Aeromonas salmonicida*

Эти возбудители болезни биохимически отличаются от бактерий фурункулеза. Атипичные бактерии *Aeromonas salmonicida* в кровяном агаре мелкие, серо-белые, негемолитические,двигающиеся по поверхности агара колонии, вокруг которых может быть слабое образование пигмента. В субстанции SW колонии круглые, желтые (сахарозопозитивные) и вокруг колоний нет гидролиз/помутнения (Tween-негативные). При тестировании O-F они производят кислоту из глюкозы как оксидативно так и ферментативно, но не производят газ.

Эти бактерии тоже неподвижные, оксидазоположительные палочки, размер которых 0,8 x 1-2 мкм. Наиболее важными биохимическими тестами для определения различий между бактериями фурункулеза и атипичными штаммами *Aeromonas salmonicida* являются гемолиз, производство кислоты из сахарозы, гидролиз эскулина и образование газа из глюкозы. При необходимости исследуемый тип *Aeromonas salmonicida* можно проверить имеющимися в продаже тестерами API 50 CHE.

3.4. Болезнь рыб, вызываемая подвижными бактериями *Aeromonas*

Входящие в эту группу бактерии относятся к гетерогенным. Как правило, они не являются первичными патогенами в лососевых рыбах, но могут быть патогенными при наличии факторов, снижающих иммунитет рыб. В группу входят, например, *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* и *A. caviae*. Подвижные бактерии *Aeromonas* являются грамотрицательными, мелкими палочками, резистентны 150 мкг вибриостату O/129. Они оксидазопозитивны, имеют размер 0,5 x 1,0-1,5 мкм. Образуют кислоту из глюкозы как ферментативно, так и оксидативно, образование газа меняется в зависимости от вида. Прямую культивацию проводят при помощи распределительной техники на кровяной агар и возможно в субстанцию SW, инкубация при температуре 20-22 °C в термостате в течение 2-7 суток. Подвижные бактерии *Aeromonas* хорошо растут при температуре 37 °C. Колонии бактерий круглые, выпуклые, великоватые и часто вокруг них гемолиз в кровяном огаре.

Таблица 1. Сравнение *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* и атипичного штамма *Aeromonas salmonicida*.

	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Атипичные штаммы <i>Aeromonas salmonicida</i>
Температура инкубации	20-22 °С	20-22 °С
Форма колоний в кровяном агаре	мелкие, серо-белые, круглые	мелкие, серо-белые, круглые
Гемолиз в кров.агаре	+	-
Пигмент в кров.агаре	+	- / +
Форма колоний в SW	звёздчатый, сине-зелёный	круглый, желтый
SW-среда Tween 80	+	- (нет гидролиза)
SW-среда сахара	-	+
Окрашивание по Граму	грамотрицательная, коккоподобная палочка	грамотрицательная, коккоподобная палочка
Оксидазы	+	+
Подвижность	-, aggregoituu	-, aggregoituu
О-Ф тест		
- окисление	+	+
- ферментация	+	+
- образование газа	+	-
Эскулин - гидролиз	+	-
Сахароза	-	+
Мальтоза/образов. газа	+, газ +	- / +, газ -
Салицин	+ / -	-
Арбутин	+	-
Ксилоза	-	-
Маннитол	+	+
Трегалоза	+ / -	+ / -
Нитрат	+	+ / -
Индол	-	-
Пигмент в среде TSA	+	+ / -
Пигмент в фурункулезной среде	+	+ / -

Таблица 2. Сравнение биохимических особенностей подвижных *Aeromonas*. Реакции описанные в таблицах инкубированы при температуре 30 °С.

	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. caviae</i>
Подвижность	+	+	+
Эскулин - гидролиз	+	-	+
Газ из глюкозы	+	+	-
Салицин ферментация	+	-	+
Сахароза	+	-	+
Арабиноза	+	-	+
Реакция Фогес-Проскауэра (ацетилметилкарбинол)	+	+	-
Лизиндекарбоксилаза	+	+	-

Лизин-декарбоксилазы изменяют лизин в кадаверин.

3.5. Бактериальная почечная болезнь (БПБ, BKD) (*Renibacterium salmoninarum*)

Возбудителем бактериальной почечной болезни (БКБ) является грамположительная неподвижная палочка *Renibacterium salmoninarum*, размер которой 0,5 x 1,0 мкм. Бактерия оксидазоотрицательна, каталазоположительна, которая для своего роста требует наличия цистеина в питательной среде. Таковыми являются агары KDM (Kidney Disease Medium) и SKDM (Selective Kidney Disease Medium). Колонии бактерий в обоих питательных средах белого или кремового цвета с полупрозрачными краями, круглые, гладкие, немного выпуклые, диаметром 2 миллиметра. Оптимальная температура роста бактерии 15-18 °С. Характерен медленный рост (10 суток-12 недель). Бактерии, взятые из органов больной рыбы, образуют видимые колонии средним через 2-3 недели, но у бессимптомных носителей, как упоминается в письменных источниках, рост становится заметен в агаре SKDM даже до 12 недель. Далее колонии высеивают на чистый агар KDM или SKDM и дополнительно на кровяной или агар TSA, в котором *Renibacterium salmoninarum* не растёт. Из чистых колоний выполняют дальнейшие оксидазо и каталазо- тесты, окраску по Граму, IFAT-окрашивание, PCR и на реагенты API-Zym.

Обнаружено, что бактерия остаётся живой в течение очень длительного времени (даже до нескольких лет), например в стерильной речной воде и остаётся живой также в донном иле. Борьбу с болезнью затрудняет то, что не существует методов её лечения и профилактических вакцин. Проведение дезинфекции икры не имеет эффекта, поскольку БКБ распространяется также по вертикали от маток к мальком через икру.

Инструкция по посеву Reni - бактерий

Рыбы должны исследоваться по-отдельности или не более двух образцов одновременно. Но обычно исследуемое количество рыб настолько велико (например 60 рыб), что на практике образцы пяти бессимптомных рыб приходится объединять в один. Тогда от почечной ткани отбирается не более 1,5 гр / 5 рыб и овариальной жидкости отбирается около 1 мл / маточная рыба. В случае болезни, рыб всегда изучают по-отдельности, пробы почечной ткани берут из разных частей (от передней и задней части почек), обычно 1 гр на исследуемую рыбу.

- Охлаждение в центрифуге до 4 °С.
- Из ткани передней и задней частей почек берутся маленькие кусочки (также образцы берутся и с других органов, если в них визуально обнаруживаются изменения).
- Пробирки с образцами содержат в ледовой крошке
- добавляется в соотношении 1:10 стерильный натриум-хлорид –пептон (солевой пептон) (0,85% NaCl + 0,1% пептон).
- Почки размельчают например при помощи Ultra-Thurax в течение примерно 5 секунд. Если возможно размельчение для каждой пробирки проводят отдельным ножом.

- Овариальную жидкость смешивают в миксере
- В центрифуге 2200 G, 15 минут при $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- центрифугат слить, в остаток добавить NaCl-пептон-воду 1:1, перемешать миксером.
- посев из осадка 3 x 10 мкл петлёй SKDM-среду и по возможности KDM-среду.
- SKDM- и KDM-среды инкубируются $16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение двух недель.

Если в исследуемых рыбах обнаружены типичные для ВКД очаговые изменения в почках или других органах, то с этих изменённых областей можно делать посев прямо в питательную среду при помощи бактериологической петли.

Таблица 3. Профиль бактерии *Renibacterium salmoninarum* в серийных коммерческих тестах API-Zym.

Номер теста	результат	номер теста	результат
1	-	11	+
2	+	12	+/-
3	+/-	13	-
4	+	14	-
5	-	15	-
6	+	16	+
7	-	17	-
8	-	18	-
9	+/-	19	+/-
10	-	20	-

3.6. Флавобактериоз (*Flavobacterium psychrophilum* ja *F. columnare*)

За последние десять лет ущерб, причиняемый флавобактериями, возрос и стал причиной значительных финансовых потерь в рыбоводстве. Наиболее важными возбудителями болезней рыб являются *Flavobacterium psychrophilum* и *F. columnare*. Из образцов рыб делают прямой посев из почек, селезёнки и по возможности из повреждений кожи в АО-среду, где флавобактерии вырастают в жёлтые колонии. У маленьких рыб можно вместо селезёнки или в дополнение выполнить посев из мозга или печени. Инкубация примари-сред сначала в тепловом шкафу $15-17^{\circ}\text{C}$, дальнейший посев *F. psychrophilum* $15-17^{\circ}\text{C}$ и *F. columnare* $20-22^{\circ}\text{C}$ в тепловом шкафу в течение 2-7 суток. Флавобактерии являются грамотрицательные, тонкие длинные палочки, для которых типично скользящее движение. Обнаружение скользящего движения на самом деле иногда трудно заметить.

Флавобактерии не растут в кровяном агаре и не производят кислоту из сахара. При последующих тестах проводятся также анаэробный посев в среду АО. Ни одна из вышеперечисленных флавобактерий не растёт анаэробно. Производство пигмента флексирубин исследуется путём бросания капли 20 % гидроксида кальция (KOH) на растущие бактерии. Если для этих флавобактерий проводить тест API-Zym, самое важное в профиле, чтобы тесты номеров 13-20 были отрицательными. Флавобактерии являются медленно растущими и некоторые другие бактерии, например (*Pseudomonas*) могут препятствовать их росту в среде АО.

Холодноводный флавобактериоз

Распространённое общее воспаление вызываемое бактерией *F. psychrophilum* в холодное время года. Наиболее часто болезнь встречается при температуре воды 4-12 °C, но случаи болезни зафиксированы также и при более высокой температуре. В среде АО бактерия *F. psychrophilum* вырастает в виде желтых, блестящих, круглых колоний с ровными краями, которые не увязают в агар. Колонии слегка выпуклые диаметром 1-5 миллиметра. Бактерии *F. psychrophilum* являются оксидазоположительными, слабо каталазоположительными размером 0,5 x 2,0-6,0 мкм. Бактерии производят пигмент флексирубин, при этом посев изменяет цвет окрашивания при добавлении капли KOH на тёмнооранжевый или краснокоричневый. *F. psychrophilum* не преобразует нитратов в нитриты.

Таблица 4. Сравнение бактерий *Flavobacterium columnare* и *F. psychrophilum*.

	<i>Flavobacterium columnare</i>	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>
Температура инкубации	20-22 °C	15-17 °C
Морфология колоний агара АО	желтые, по краям ризоидные, которые сильно вкрапляются в агар	жёлтые, круглые колонии с ровными краями, которые не вкрапляются в агар
Gram-окрашивание	Грамотрицательная, длинная, тонкая палочка, которая может составлять длинные "цепочки"	Грамотрицательная, длинная, тонкая палочка
Подвижность	Скользкая подвижность (не flagello)	Скользкая подвижность (не flagello)
Растёт анаэробно	-	-
Оксидазы	+	+
Каталазы	(+)	(+)
Рост в бульоне TSA	-	-
Кислота из сахара		
- глюкоза	-	-
- фруктоза	-	-
- галактоза	-	-
- манноза	-	-
- глицерин	-	-
Пигмент флексирубин	+	+
Обеднение нитратов	+	-

(+) = реакция катализа может быть очень слабой.

Флавобактериоз "серое седло"

Распространённое общее воспаление вызываемое бактерией *F. Columnare*, которое проявляется при температуре воды выше 10 °С. Большинство вспышек болезни были обнаружены когда температура воды выше 15 °С. *F. columnare* растёт в виде жёлтых колоний, которые сильно вкрапляются в агар. Эта бактерия производит пигмент флексирубин и имеет размер 0,5 x 3,0-8,0 мкм. *F. columnare* не преобразует нитратов в нитриты и является как оксидазоположительными и каталазоположительными.

3.7. Enteric Redmouth disease (ERM) *Yersinia ruckeri*

Таблица 5. Сравнение серотипов 1 и 2 бактерии *Yersinia ruckeri*.

	<i>Yersinia ruckeri</i> , серотип 1	<i>Yersinia ruckeri</i> , серотип 2
Температура инкубации	20-22 °С	20-22 °С
Морфология колоний в кровяном агаре	Светлосерые, среднего размера, нон- гемолизные колонии	Светлосерые, среднего размера, нон- гемолизные колонии
Морфология колоний в агаре SW	Небольшие сахарозо- отрицательные колонии (цвет агара становится зелёным)	Небольшие сахарозо- отрицательные колонии (цвет агара становится зелёным)
SW среда Tween 80	+ (гидролиз)	- (гидролиза нет)
Gram-окрашивание	Gram-отрицательная маленькая палочка	Gram-отрицательная маленькая палочка
Подвижность 22 °С	+	-
Подвижность 37 °С	-	-
Оксидаза	-	-
Эскулин	-	-
О-F - тест		
- оксидация	+	+
- ферментация	+	+
- образование газа	+ / -	+ / -
Использование сахаров		
- ксилоза (важно!)	-	-
- арабиноза	-	-
- рамноза	-	-
- сахароза	-	-

Иерсиниоз, болезнь ERM "красный рот" вызывается бактерией *Yersinia ruckeri*. В Ленинградской области зафиксировано два серотипа болезни: серотип 1 и серотип 2. Серотип 1 был обнаружен уже в 1980 годах, а серотип 2 – только в 2000 годах. По всей видимости болезнь проникла при перевозках рыб и пока не зафиксирована во внутренних водоёмах. Смертность рыб, вызываемая *Yersinia ruckeri* - серотип 2, в морских регионах была значительной и серотип 2 показал себя как более опасный возбудитель болезни, чем серотип 1.

Y. ruckeri – это грам- и оксидазаотрицательная подвижная (серотип 1) и неподвижная (серотип 2) короткая палочковая бактерия. Прямой посев проводят из почек, внутренностей кишечника и по-возможности из повреждений на коже на кровяной агар и агар Shotts-Waltman. Инкубация в тепловом шкафу 20-22 °C в течении 2-7 суток. В кровяном агаре бактерии образуют колонии средних размеров, светлые и негемолитические. Колонии в среде SW – сахарозоотрицательные, при этом цвет агара SW меняется на зелёный. В среде SW серотип 1 создаёт гидролиз вокруг бактериального образования, являясь таким образом Tween-положительным. Серотип 2 в среде SW - Tween-отрицательный. Также *Y. Ruckeri* имеет типичный своеобразный густосладкий запах (оба серотипа). В тестах О-Ф они вырабатывают кислоты из глюкозы как оксидативно так и ферментативно и газ (в слабом виде) или не вырабатывают его совсем. Важнейшим тестом для определения различий двух серотипов является подвижность при комнатной температуре (20-22 °C) и образование гидролиза в среде SW.

3.8. Другие бактерии

В рыбах и водоёмах, конечно, появляются и другие, чем вышеперечисленные бактерии, вызывающие болезни рыб. Некоторые из них могут быть оппортунистическими патогенами, а часть никогда не была зафиксирована на Северо-Западе России.

Йодобактерии

В последние годы в Финляндии, более всего у лещей озера Саймаа, были выявлены йодобактерии (*Iodobacter fluviatilis*), которые появляются в воде и легко распознаются из-за появления фиолетового пигмента. В Финляндии, во всяком случае, зафиксированы и беспигментные йодобактерии (*Iodobacter* sp.) в ранках на теле лещей. Их также обнаружили на коже лососевых рыб, страдающих сапролегниозом, но возможную причастность их к сапролегниозу требует ещё дополнительного изучения.

Определение бактерии *Iodobacter* sp.:

- Граммоотрицательная палочковая бактерия (крупная по размеру, равной толщины, часто наблюдаются поперечные полосы) подвижная, оксидазо- и каталазоположительная).

- вырастает в слабопитательном агаре (1/4-Nutrient) распространённо, в виде тонких колоний с неровными краями
- тип популяции *Iodobacter fluvialis* вырабатывает пигмент violacein и гемолитизный. Выделенный из леща штамм безпигментный и негемолитизный.
- факультативно анаэробные, нет образования газа.
- Рост при 4-30 °С.
- Отличие от бактерии *Aeromonas hydrophila*: нет газа при +37 °С, негативны к индолу-, галактозе-, маннитолу, сахарозе, эскулину и агринину. В Финляндии выделенный из рыб штамм был сахарозопозитивный.
- типичный запах образуется в кровяном агаре.

Взятые из повреждений на коже йодобактерии могут расти обширно или в числе других, во внутренних органах лососевых, страдающих сапролегниозом, обычно в виде отдельных колоний. В кровяном агаре колонии негемолитизные средних размеров светлые или светлосерые (коричневатые со временем). Колонии часто бывают в приподнятые в середине и распространяются по краям. Типичный запах развивается довольно медленно.

Из повреждённых участков обычно делают также посев в агар ¼ Nutrient, чтобы йодобактерии можно было легко отличить от других бактерий в микрофлоре.

Примером бактерий рыбных болезней, которые до сих пор не были обнаружены в Ленинградской области и в Финляндии, является *Vibrio salmonicida*. Вызываемая этой бактерией болезнь называется холодноводный вибриоз или болезнь Nitra. Она была обнаружена на побережье Атлантики, а, например, в Норвегии вызвало даже большие потери в производстве по выращиванию лосося *V. salmonicida* обнаружена также и у других, кроме лососевых рыб, например у трески.

Другой возбудитель до сих пор не обнаруженной в Ленинградской области и в Финляндии болезни - *Moritella viscosa* (*Vibrio viscosus*). Это бактерия, которая в морской воде во время холодной воды, является причиной ран рыбы зимой. Болезнь обычно утихает когда температура морской воды поднимается выше 10 °С или когда солёность воды падает ниже 12 промилей. В Норвегии *M. viscosa* является одной из самых больших связанных с бактериальными болезнями проблем и проблема в борьбе с болезнью - уже упомянутая неэффективность используемых антибиотиков и вакцин.

Оппортунистическими патогенами являются бактерии рода *Pseudomonas*. Бактерии *Pseudomonas*-могут быть обнаружены в ткани рыб из воспалённых областей, но очень часто рыбы могут быть уже ослаблены из-за других факторов; стадо рыб может быть слишком плотной посадки или проблемы могут быть в качестве воды. Обеспечение хороших условий для рыборазведения и является лучшим средством профилактики действия оппортунистических патогенов. В Финляндии в морских регионах было отмечена смертность лососевых рыб, вызванная бактерией *Pseudomonas anguilliseptica*.

Таблица 6. Основные тесты по определению бактерий рыбных болезней, применяемые в лабораторной диагностике.

Бактерия	Температура инкубации	Окраска по Граму	Подвижность при 20 °С	Оксидаза	Каталаза	О-Ф тест (кислота из глюкозы) окисление / ферментация и образование газа	Размер (мкм)
<i>Listonella anguillarum</i>	20-22 °С	-	+	+	+	+ / + / -	0,5 x 1,5
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	20-22 °С	-	-	+	+	+ / + / +	0,8 x 1-2
Нетипичные <i>Aeromonas salmonicida</i> - kannat	20-22 °С	-	-	+	+ / -	+ / + / -	0,8 x 1-2
Подвижные <i>Aeromonas</i> -бактерии	20-22 °С	-	+	+	+	+ / + / + tai -	0,5 x 1,0-1,5
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	15-17 °С	+	-	-	+	О-Ф тесты не делают <i>R. salmoninarum</i> -бактериям	0,5 x 1,0
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	15-17 °С	-	+	+	+	- / - / -	0,5 x 2,0-6,0
<i>Flavobacterium columnare</i>	20-22 °С	-	+	+	+	- / - / -	0,5 x 3,0-8,0
<i>Yersinia ruckeri</i> , биотип 1	20-22 °С	-	+	-	+	+ / + / (+) или -	0,75 x 1,0-3,0
<i>Yersinia ruckeri</i> , биотип 2	20-22 °С	-	-	-	+	+ / + / (+) или -	0,75 x 1,0-3,0

(+) = образование газа невелико. * = т.н. скользящая подвижность.

4. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ

В инструкциях по приготовлению готовых питательных сред упомянута только как пример, подобная продукция доступна от разных изготовителей. Питательные среды разливаются в чашки Петри диаметром 90 мм. Чашки хранят в холоде или в холодильнике ($6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) в пластиковых ящичках, которые кладутся в полиэтиленовые пакеты. Это препятствует высыханию питательных сред и немного продляет срок хранения сред. Время хранения чашек со средой основываются на полученных в ходе лабораторных работ испытаний.

4.1. Триптоно-соевая среда (TSA)

Цель применения: Общее питательное вещество, в котором достаточно питательных веществ для определения многих бактерий, вызывающих болезни рыб. Хорошо видно появление пигмента *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*.

Приготовление: В одном литре дистиллированной воды растворяют 40,0 грамм CASO-агара (напр. Merck 1.05458). Автоклавируют в течение 15 минут при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Разливают в чашки при температуре $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

pH: $7,3 \pm 0,2$ (при необходимости выравнивается).

Внешний вид: Прозрачный, с небольшой желтизной агар.

Срок хранения: В холодном месте 2 мес.

Контроль качества: Маленькие, круглые колонии *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* при более длительной инкубации приобретают коричневый цвет, пигмент диффузирует также в агар.

4.2. КРОВЯНОЙ АГАР (TSA-среда, куда добавляется кровь лошади, коровы или овцы)

Цель применения: Общее питательное вещество для определения бактерий болезней рыб, первичный и чистый посев.

Приготовление: В одном литре дистиллированной воды растворяют 40,0 граммов CASO-агара (напр. Merck 1.05458). Автоклавируют в течение 15 минут при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Питательную среду остужают до температуры $45\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$ и добавляют туда 5 % (50 мл) кровь лошадей, коров или овец асептически. Разливают в чашки при температуре $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

pH: $7,3 \pm 0,2$ (при необходимости выравнивается).

Внешний вид: Ярко-красный непрозрачный агар.

Срок хранения: В холодном месте 2 мес.

Контроль качества: Контроль стерильности. Контроль гемолиза: бактерии *Listeria monocytogenes* или *Streptococcus agalactiae*.

4.3. СРЕДА Шоц-Вальтмана (SW)

Цель применения: Используется главным образом для определения бактерий *Yersinia ruckeri*.

Приготовление: Рецепт приготовления одного литра Shotts-Waltman -агара:

Дистиллированная вода	980 мл	
Триптон	2,0 г	напр. Difco 211705
Дрожжевой экстракт	2,0 г	напр. Difco 212750
Твин 80	10 мл	напр. Merck 8.22187 tai BDH 56023 4H
NaCl	5,0 г	напр. Merck 1.06404 tai BDH 10241
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 г	напр. Merck 1.02382
Бромтимолизин	0,3 г	напр. Merck 1.03026 tai Baker 1513
Агар	15,0 г	напр. Difco 214010

Автоклавируют 15 минут при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Перед разливом в чашки добавить 10 мл стерилизованного и процеженного 50 % раствора сахарозы. Стерилизация и процеживание через фильтр 0,2 мкм. Разлив в чашки при температуре $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

САХАРОЗНЫЙ РАСТВОР:

Стерильная дис-тиллированная вода	50 мл	
Сахароза	25,0 г	напр. BDH 10274 tai Aldrich 17, 994-9

pH: $7,3 \pm 0,2$ (при необходимости выравнивается).

Внешний вид: Прозрачный желтый агар.

Срок хранения: В холодном месте 2 мес.

Источник: Waltman, W.D. & Shotts, E.B. (1984): A medium for the isolation and differentiation of *Yersinia ruckeri*. - Can. J. Fish. Aquat. Sci. 41: 804-806. **(В рецепте приготовления от Evira количество Бромтимолизина больше, чем пособию!)**

4.4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ СРЕДЫ ANACKER-ORDAL (АО) И АОВ-БУЛЬОНА, АОВ-САХАР И АОВ-НИТРАТ

Цель применения: Для выделения флавобактерий из образцов рыб.

Приготовление: Рецепт одного литра Anacker-Ordal - агара:

Дистиллированная вода	1000 мл	
Триптон	5,0 г	напр. Difco 211705
Экстракт дрожжей	0,5 г	напр. Difco 212750
Натрия ацетат х 3 H ₂ O	0,2 г	напр. Merck 1.06268
Экстракт мяса	0,2 г	напр. Difco 212610
Агар	9,0 г	напр. Difco 214010

Автоклавировать 15 минут при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Разлить в чашки при температуре $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

pH: $7,3 \pm 0,2$ (при необходимости выравнивается).

Внешний вид: Прозрачный, почти безцветный агар.

Срок хранения: В холодном месте 1 мес.

Контроль качества: *Flavobacterium psychrophilum* вырастает в виде жёлтого, влажного очага.

АОВ-бульона раствор (Anacker Ordal Broth)

Приготовление:

Дистиллированная вода	200 мл	
Триптон	1,0 г	напр. Difco 211705
Экстракт дрожжей	0,1 г	напр. Difco 212750
Натрия ацетат	0,04 г	напр. Merck 1.06268
Экстракт мяса	0,04 г	напр. Difco 212610

Растворяется при подогреве и распределяется по партиям с достаточным количеством (50 мл). Держать в автоклаве 15 минут при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Разлив на порции стерильно в достаточное количество пробирок. Например готовят 10 пробирок, остаток раствора хранить в бутылки.
pH: $7,4 \pm 0,2$ (при необходимости выравнивается).

Внешний вид: Прозрачный, но не бесцветный раствор.

Срок хранения: Пробирки и бутылки в холоде или в холодильнике 3 мес.

Источники:

1. Anacker, R.L. & Ordal, E.J. (1959): Studies on the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. I. Serological typing. - J. Bacteriol. 78: 25-32.
2. Bernardet, J.F. & Kerouault, B. (1989): Phenotypic and genomic studies of "Cytophaga psychrophila" isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. - Appl. Environ. Microbiol. 55: 1796-1800.

Сахара, тестирующие производство кислоты флавобактериями:

В 100 мл этанола 94 % растворяют 1,6 г bromtymolisina (напр. Merck 1.03026). Затем делаем 400 мл бульона АОВ, который делим на три бутылки; 50 мл/бутылка. В остаток бульона АОВ (250 мл) добавляем 200 мкл 1,6 % раствор bromtymolisina. Этот раствор разделяют на 5 частей x 45 мл. В эти пробирки добавляют каждый из сахаров.

		Отметка на пробирке
Глюкоза	напр. BDH 10117	АОВ+GLU
Фруктоза	напр. Sigma F 1019	АОВ+FRU
Галактоза	напр. Merck 1.04062	АОВ+GAL
Манноза	напр. BDH 380484V	АОВ+MANS
Глицерин	напр. BDH 10118	АОВ+GLY

АОВ-сахара:

Взвешиваем 0,5 г сахара (глицерол отмеряем 750 мкл) в стерильный декантер и добавляем 5 мл стерильной дистиллированной воды, растворяем, стерилизуем и пропускаем через фильтр 0,2 мкл в 45 мл раствора АОВ+бромтимолизин.

Разливается стерильно в подходящее количество пробирок и остаток сахарного раствора храним в бутылке. Пробирки обновляются через 1 – 2 месяца или при необходимости чаще.

pH: $7,4 \pm 0,2$ (при необходимости выравнивается).

Внешний вид: АОВ-сахара – прозрачный сине-зелёный раствор.

Срок хранения: Пробирки и бутылки в холоде или в холодильнике 3 мес.

АОВ-нитраты:

В бульон АОВ, в котором нет бромтимолизина, добавляем перед автоклавом нитрат калия, KNO_3 (0,05 g/50 мл АОВ-бульона). Коммерческий нитрат калия например Merck 1.05065. По внешнему виду нитрат АОВ – прозрачный и бесцветный бульон, хранить который в холоде или холодильнике 3 месяца.

4.5. ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИГОТОВЛЕНИЮ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУРУНКУЛЁЗА, ИНДОЛ, ЭСКУЛИН И НИТРАТНОЙ СРЕД

Цель применения: Для определения бактерий *Aeromonas salmonicida*. В среде для фурункулёза производство пигмента хорошо заметно.

Приготовление: инструкция по приготовлению одного литра агара для фурункулёза:

Дистиллир. вода	1000 мл	
Триптон	10,0 г	напр. Difco 211705
Дрожжевой экстракт	5,0 г	напр. Difco 212750
L-тирозинi	1,0 г	напр. Merck 1.08371
NaCl	2,5 г	напр. Merck 1.06404
Агар	15,0 г	напр. Difco 214010

В автоклаве при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, в течение 15 минут. Разлив в чашки при температуре $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

pH: $7,3 \pm 0,2$ (при необходимости выравнивается).

Внешний вид: прозрачный, немного желтоватый агар.

Срок хранения: В холодном месте 2 мес.

Контроль качества: нетипичный штамм *Aeromonas salmonicida*, который не производит пигмент в среде TSA, производит пигмент в фурункулёзной среде после 2-4 суток. Коричневый пигмент диффузирует в агар вокруг колоний.

Источник:

Bernoth, E-M. & Artz, G. (1989): Presence of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue may be overlooked by sole reliance on furunculosis-agar. - Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 9: 5-6.

Питательная среда Индол – и тест**Приготовление: ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ИНДОЛ:**

Дистиллированная вода	300 мл	
Казеинпептон	1,5 г	напр. Merck 1.07213
Гидрофосфаты натрия x 2 H ₂ O	0,6 г	напр. Merck 1.06580

Растворяется и помещается в автоклав при температуре 121 °C ± 2 °C, в течение 15 минут. Часть бульона в подходящие по размеру стерильные пробирки (наприм. 5 мл), остатки бульона хранить в бутылки.

pH: 7,3 ± 0,2 (при необходимости выравнивается).

Внешний вид: Прозрачный, немного желтоватый раствор.

Срок хранения: Готовые пробирки и бутылки в холоде или в холодильнике 6 мес.

ИНДОЛ - ТЕСТ:

- исследуемая бактерия помещается в пробирку и туда же добавляется 2-3 капли индоли-реагента Ковача (напр. Merck 1.09293).

- результат положительный, если реагент на поверхности питательной среды изменяет цвет на красный через 5 минут.

Питательная среда Эскулин – и тест**Приготовление: ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ЭСКУЛИН:**

Дистиллированная вода	200 мл	
Экстракт мяса	1,2 г	напр. Merck 1.03979
Пептон	2,0 г	напр. Difco 211677
NaCl	1,0 г	напр. Merck 1.06404
Эскулин	1,0 г	напр. Merck 1.00842

Растворяется и помещается в автоклав при температуре 110 °C ± 2 °C, в течение 15 минут. Разливается в бутылки напр. по 100 мл.

pH: 7,4 ± 0,2 (при необходимости выравнивается).

Внешний вид: прозрачный светлый, жёлтозелёный раствор, позже бульон горчичного цвета.

Срок хранения: Пробирки и бутылки в холоде или в холодильнике 6 мес.

ЭСКУЛИН -ТЕСТ:

- разложение эскулина осуществляем добавлением цитрата железа в питательную среду.
- результат положительный, если цвет питательной среды изменится на чёрный.

Питательная среда Нитрат – и тест

Приготовление: ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА НИТРАТ:

Дистиллированная вода	300 мл	
Нитратный бульон	2,7 г	напр. Difco 226810

Растворяется и помещается в автоклав при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, в течение 15 минут. Часть бульона в подходящие по размеру стерильные пробирки (наприм. 5 мл), остатки бульона хранить в бутылки.

pH: $7,0 \pm 0,2$ (при необходимости выравнивается).

Внешний вид: Коричнево – жёлтый, прозрачный раствор.

Срок хранения: Готовые пробирки и бутылки в холоде или в холодильнике 6 мес.

НИТРАТ - ТЕСТ:

- исследуемая бактерия помещается в пробирку с нитратом, туда же добавляется одинаковое количество сначала реагента А и затем реагента Б. Можно использовать коммерческие реагенты (напр. NIT1 и NIT2) или их можно изготовить самим (инструкции приведены ниже).
- результат положительный (нитрат разрушается) если цвет питательной среды меняется на светло-розовый или красный в течение 10 минут.
- если результат отрицательный, добавляем в культуру стружки цинка, после чего цвет питательной среды должен измениться на красный. Таким образом убеждаемся, что нитрат не превратился в нитрит и далее в аммиак и азот.

5 М УКСУСНАЯ КИСЛОТА:

Дистиллированная вода	149,5 мл	
Уксусная кислота	57,5 г	напр. Merck 1.00063

РЕАГЕНТ А:

5 М Уксусная кислота	100 мл	
Сульфаниловая кислота	0,8 г	напр. Merck 1.00686

РЕАГЕНТ В:

5 М Уксусная кислота	100 мл	
1-нафтиламин	0,5 г	напр. Sigma N 9005

4.6. KDM-БУЛЬОН, KDM-СРЕДА И SKDM-СРЕДА

KDM- БУЛЬОН (Kidney Disease Medium)

Цель применения: Для определения бактерии *Renibacterium salmoninarum* – приготовление продуктов её метаболизма.

Приготовление: Инструкция по приготовлению одного литра бульона KDM:

Дистиллированная вода	900 мл	
Пептон	10,0 г	напр. Difco 211677
Дрожжевой экстракт	0,5 г	напр. Difco 212750
L-цистеин хлорид	1,0 г	напр. Baker 1576 tai Merck 1.02839

ОСНОВА БУЛЬОНА:

Сухие компоненты смешивают с 900 мл дистиллированной воды. Добавляют 15 мл продуктов метаболизма ренибактерий (инструкция приведена ниже).

Помещаются в автоклав при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, в течение 15 мин.

ПОЛНОСТЬЮ ГОТОВЫЙ БУЛЬОН KDM:

Когда бульон остынет после автоклава до температуры дозирования ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$), добавляется асептически 100 мл овечьей сыворотки (которая хранится при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Хорошо перемешать и залить бутылках (обычно 200 мл / флакон).

ПРОДУКТ МЕТАБОЛИЗМА РЕНИБАКТЕРИЙ:

Поместить ренибактерии например в 200 мл бульона KDM (5 флаконов).

Выращивать при $16\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ примерно 4 недели. Надо удостовериться, что в бульоне нет другой микрофлоры. Поместить в центрифугу 3000 оборотов/в минуту на 30 минут. Соединить супернатанты стерильно. Разделите на подходящие партии и заморозить.

pH: $6,8 \pm 0,1$ (при необходимости выравнивается).

Внешний вид: желтоватый бульон.

Срок хранения: Основа бульона (перед добавлением овечьей сыворотки) – в холодильнике 2 мес. Полностью готовый бульон (в который добавлена сыворотка) в холодильнике не более 1 месяца.

KDM-СРЕДА (Kidney Disease Medium)

Цель применения: Выращивание бактерии *Renibacterium salmoninarum* – из образцов рыб.

В автоклаве при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, в течение 15 минут. Когда бульон остынет после автоклава до температуры дозирования ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$), добавляется асептически 100 мл овечьей сыворотки (которая хранится при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Разлив в чашки при температуре $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Приготовление: Инструкция по приготовлению одного литра агара KDM:

Дистиллирован. вода	900 мл	
Пептон	10,0 г	напр. Difco 211677
Дрожжевой экстракт	0,5 г	напр. Difco 212750
L-цистеин хлорид	1,0 г	напр. Baker 1576 tai Merck 1.02839
Агар	15,0 г	напр. Difco 214010
Дистиллиров. вода		

pH: $6,8 \pm 0,1$ (при необходимости выравнивается).

Внешний вид: Бледно-коричневый, бежевый, полупрозрачные агар.

Срок хранения: В холодном месте 1 мес.

Контроль качества: *Renibacterium salmoninarum* (светлые, сливочного цвета колонии).

Источник:

Evelyn, T.P.T. *et al.* (1990): Two new techniques for obtaining consistent results when growing *Renibacterium salmoninarum* on KDM2 culture medium. - Dis. Aquat. Org. 9: 209-212.

SKDM-СРЕДА (Selective Kidney Disease Medium)

Цель применения: Выращивание бактерии *Renibacterium salmoninarum* –из образцов рыб.

Приготовление: Инструкция по приготовлению одного литра агара SKDM:

Дистиллиров. вода	900 мл	
Пептон	10,0 г	напр. Difco 211677
Дрожжевой экстракт	0,5 г	напр. Difco 212750
L-цистеин хлорид	1,0 г	напр. Baker 1576 tai Merck 1.02839
Агар	15,0 г	напр. Difco 214010
Продукт метаболизма ренибактерий	15 мл	

В автоклаве при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, в течение 15 минут. Когда питательная среда остынет до температуры дозирования ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$), в неё добавляется асептически:

Овечья сыворотка	100 мл	
1 % D-циклосерин	1,25 мл	напр. Sigma C-6880
10 % полимиксин В-сульфат	0,25 мл	напр. Sigma P-1004
1 % оксолиновая кислота	0,25 мл	напр. Sigma O-0877
Амфотерицин В-раствор	2,2 мл	напр. Sigma A-9528

АНТИБИОТИКИ:

1 % D-циклосерин - водный раствор: 0,5 г / 50 мл стерильной дистиллированной воды. Разлить в стерильные пробирки в подходящие партии и заморозить.

10 % полимиксин В-сульфат - водный раствор: 1,0 г / 10 мл стерильной дистиллированной воды. Разлить в стерильные пробирки в подходящие партии и заморозить.

1 % оксолиновой кислоты - водный раствор: 0,1 г / 10 мл стерильной дистиллированной воды, в которой 0,5 мл 1-М NaOH. Разлить в стерильные пробирки в подходящие партии и заморозить.

Амфотерицин В - водный раствор: 0,5 г / 50 мл стерильной дистиллированной воды. Разлить в стерильные пробирки в подходящие партии и заморозить.

pH: $6,8 \pm 0,1$ (при необходимости выравнивается).

Внешний вид: Бледно-коричневый, бежевый, полупрозрачные агар.

Срок хранения: В холодном месте 1 мес.

Контроль качества: *Renibacterium salmoninarum* (светлые, сливочного цвета колонии).

Источник:

Austin, B. *et al.* (1983): Selective isolation of *Renibacterium salmoninarum*. - FEMS Microbiology Letters 17: 111-114.

4.7. РАЗБАВЛЕННАЯ СРЕДА МЮЛЛЕРА-ХИНТОНА (МН-среда)

Цель применения: Определение чувствительности культур к антимикробным препаратам.

Приготовление: Инструкция по приготовлению одного литра разбавленного агара Мюллера-Хинтона:

Дистиллиров. вода	1000 мл	
Бульон Мюллера -Хинтона	3,0 г	напр. Oxoid CM405
Агар	9,0 г	напр. Difco 214010
Сыворотка эмбриональная телячья	50 мл	напр. Gibco 10106-151

ОСНОВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ:

В один литр дистиллированной воды добавляют 3,0 г бульона Мюллера-Хинтона и 9,0 г агара. В автоклаве при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, в течение 15 минут. Охладить до $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ГОТОВАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА:

В один литр основы питательной среды нагретой до $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ добавляется сыворотка эмбриональная телячья 50 мл комнатной температуры. Если бутыл с сывороткой была открыта, сыворотку необходимо простерилизовать перед добавлением. Хорошо смешать и разлить в чашки по 20 мл.

Готовую питательную среду можно разлить по флаконам и держать в запасе. При необходимости основу питательной среды можно разморозить на водяной бане и остудить до $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Сыворотку эмбриональную телячью комнатной температуры добавить в основу питательной среды и разлить по чашкам.

pH: $7,3 \pm 0,2$ (при необходимости выравнивается).

Внешний вид: Светлый полупрозрачный агар.

Срок хранения: Основу питательной среды в холодильнике, обновляя через 6 месяцев. Готовые к употреблению питательные среды в холодильнике 1 месяц.

Контроль качества: Действенность сред контролируется *Flavobacterium psychrophilum*

Источник:

Hawke, J.P. & Thune, R.L. (1992): Systemic isolation and antimicrobial susceptibility of *Cytophaga columnaris* from commercially reared Channel Catfish. - J. Aquatic Animal Health 4: 109-113.

4.8. ¼-NUTRIENT

Цель применения: Выделение йодобактерий.

Приготовление: Инструкция по приготовлению одного литра агара ¼-Nutrient:

Дистиллиров. вода	1000 мл	
Экстракт мяса	0,75 г	напр. Difco 212610
Пептон	1,25 г	напр. Difco 211677
Агар	15,0 г	напр. Difco 214010

Автоклавируют при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, в течение 15 минут. Разлив в чашки при температуре $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

pH: $6,9 \pm 0,1$ (при необходимости выравнивается).

Внешний вид: Светлый, прозрачный агар.

Срок хранения: В холодном месте 2 мес.

Контроль качества: Тест: *Iodobacter fluviatilis* DSM 3764. Йодобактерии растут широкими колониями (контрольный вид производит фиолетовый пигмент). Для сохранения йодобактерий в живом виде, их сохраняют в бульоне ¼ Nutrient в холодильнике или вид берётся из морозильника.

Источник:

Ryall, C. & Moss, M.O. (1975): Selective media for the enumeration of *Chromobacterium* spp. in soil and water. - J. Appl. Bacteriol. 38: 53-59.

Учебно-методическое издание

ПОПОВ Николай Викторович,
КОРОЛЬКОВА Светлана Витальевна,
ШОШИН Александр Владимирович

МЕТОДИКА ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ

Учебно-методическое пособие для студентов,
обучающихся по направлению
35.03.08 «Водные биоресурсы и аквакультура»

ЦНИТ «Астерион»

Подп. в печать 05.06.2022. Формат 60×84 1/16.

Заказ № 89. Бумага офсетная. Печ. л. 2,0. Тираж 300.

191015, Санкт-Петербург, Суворовский пр., 61, пом. 23Н

✉: asterion@asterion.ru 🌐: <https://asterion.ru/>

📄: https://vk.com/asterion_izdatelstvo