



Н. А. Сидорова
Л. П. Рыжков
Е. С. Обухова

**САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ В РЫБОВОДСТВЕ**

Учебное пособие для студентов
эколого-биологического и агротехнического факультетов

Петрозаводск
Издательство ПетрГУ
2013

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего профессионального образования
ПЕТРОЗАВОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Н. А. Сидорова
Л. П. Рыжков
Е. С. Обухова

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В РЫБОВОДСТВЕ

Учебное пособие для студентов
эколого-биологического и агротехнического факультетов

Петрозаводск
Издательство ПетрГУ
2013

УДК 579.62
ББК 28.4
С347

*Издаётся в рамках реализации комплекса мероприятий
Программы стратегического развития ПетрГУ
на 2012-2016 гг.*

Р е ц е н з е н т:

кандидат медицинских наук, доцент *А. М. Образцова*

Сидорова, Н. А.

С347 Санитарно-микробиологические исследования в рыбоводстве: учебное пособие для студентов эколого-биологического и агротехнического факультетов /Н. А. Сидорова, Л. П. Рыжков, Е. С. Обухова. – Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2013. – 56 с.

ISBN 978-5-8021-1978-5

В учебном пособии рассмотрены некоторые вопросы санитарной микробиологии рыбохозяйственных водоемов, а также основные характеристики возбудителей бактериальных заболеваний рыб. Отдельные разделы посвящены особенностям микрофлоры воды, санитарно-показательным микроорганизмам воды и методам их исследования.

Пособие предназначено для студентов эколого-биологического и агротехнического факультетов вузов, специализирующихся в области водных биоресурсов и аквакультуры, а также для ряда специалистов рыбного хозяйства.

УДК 579.62
ББК 28.4

ISBN 978-5-8021-1978-5 © Сидорова Н. А., Рыжков Л. П., Обухова Е. С., 2013
© Петрозаводский государственный университет, 2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие.....	5
Раздел I	
ПРИНЦИПЫ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО И РЕТРОСПЕКТИВНОГО АНАЛИЗА НА РЫБОХОЗЯЙСТВЕННОМ ВОДОЁМЕ	6
I.1. Принципы санитарно-микробиологического анализа	6
I.2. Характеристика методов санитарно-микробиологических исследований	7
Раздел II	
ОСОБЕННОСТИ МИКРОФЛОРЫ ВОДЫ	14
II.1. Категории водоемов по степени бактериальной обсемененности	16
Раздел III	
ТИПИЧНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ АУТОФЛОРЫ ФОРЕЛИ	18
III.1. Характеристика бактерий рода <i>Pseudomonas</i>	19
III.2. Характеристика бактерий группы кишечной палочки.....	20
III.3. Характеристика аэробных спорообразующих бактерий	22
III.4. Характеристика аэробных неспорообразующих бактерий	23
Раздел IV	
ОСНОВНЫЕ ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РЫБ	25
IV.1. Аэромоназ	26
IV.2. Вибриоз.....	29
IV.3. Миксобактериоз	30
IV.4. Стрептококкоз	31
IV.5. Кишечная болезнь «красный рот»	32

IV.6. Эдвардсиеллёз.....	33
IV.7. Бактериальная почечная болезнь (БПБ).....	34
IV.8. Туберкулез.....	35
IV.9. Ботулизм.....	36

Раздел V

САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НА РЫБОХОЗЯЙСТВЕННЫХ

ВОДОЕМАХ.....	37
V.1. Показатели санитарно-бактериологической оценки водоема.....	37
V.2. Определение бактерий группы кишечной палочки.....	40
V.3. Индикация и количественный учет аэромонад.....	41
V.4. Индикация и количественный учет псевдомонад.....	42

Приложение 1

Расчет количества микробных клеток в пробе воды.....	44
--	----

Приложение 2

Необходимые для исследования аппараты, материалы, реактивы, среды.....	45
---	----

Приложение 3

Рецепты основных питательных сред и реактивов для санитарно-бактериологического анализа.....	48
---	----

Список литературы.....	52
-------------------------------	-----------

ПРЕДИСЛОВИЕ

Важным условием эффективного производства аквакультуры является соблюдение санитарного надзора за состоянием водоемов и объектов окружающей среды с целью профилактики инфекций. Учебное пособие «Санитарно-микробиологические исследования в рыбоводстве» предназначено для изучения способов проведения ретроспективного анализа с использованием данных о природных факторах, санитарном состоянии рыбохозяйственного водоема, об основных возбудителях бактериозов и мерах профилактики инфекций.

Основные разделы пособия: «Принципы санитарно-микробиологического и ретроспективного анализа на рыбохозяйственном водоеме», «Особенности микрофлоры воды», «Категории водоемов по степени бактериальной обсемененности», «Типичные представители аутофлоры рыбы», «Основные возбудители бактериальных заболеваний рыб и методы их исследования» позволят студентам и специалистам в области рыбоводства ознакомиться с подходами к решению санитарно-микробиологических проблем отрасли. Кроме того, в учебном пособии подробно изложены способы оценки санитарного и эпизоотического состояния предприятий по выращиванию ценных пород рыб. Пособие предназначено для студентов и аспирантов эколого-биологического и агротехнического факультетов вузов, специализирующихся в области водных биоресурсов и аквакультуры, а также для ряда специалистов рыбного хозяйства.

РАЗДЕЛ I

ПРИНЦИПЫ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО И РЕТРОСПЕКТИВНОГО АНАЛИЗА НА РЫБОХОЗЯЙСТВЕННОМ ВОДОЕМЕ

I.1. ПРИНЦИПЫ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

1. Отбор проб для санитарно-микробиологических исследований должен проводиться с учетом условий, регламентируемых для исследуемого объекта и правил стерильности. При упаковке и транспортировке проб нельзя допускать гибели или размножения исходной микрофлоры в исследуемом объекте. Сохранение материала допускается в холодильнике не более 6-8 часов. Каждая проба сопровождается документом, в котором указывают название материала, номер пробы, время, место отбора, характеристику объекта, подпись лица, взявшего пробу.

2. Проведение серийных анализов. Этот принцип исходит из особенностей исследуемых объектов. Как правило, вода, воздух, почва и другие объекты содержат микроорганизмы, распределение которых неравномерно. К тому же в пределах природных ценозов микроорганизмы подвергаются взаимному влиянию, что ведёт к гибели одних и активному размножению других видов. Поэтому берут серию проб из разных участков исследуемого объекта. В лаборатории пробы смешивают и точно определяют необходимое для анализа количество материала – среднее к исследуемому материалу в целом.

3. Повторный отбор проб. Позволяет более точно определить биологическую контаминацию объектов окружающей среды. Данная операция необходима для получения сопоставимых результатов. Это связано с динамичностью исследуемых объектов (вода, воздух), в

пределах которых состав микрофлоры очень быстро сменяется как во времени, так и в пространстве.

4. Применение стандартизованных методов исследования. Даёт возможность в различных лабораториях получать сравнимые данные.

5. Использование одновременно комплекса тестов для получения разносторонней санитарно-микробиологической характеристики исследуемого объекта. Применяют *прямой метод* обнаружения патогенных микроорганизмов и *косвенный*, позволяющий судить о загрязнении объектов окружающей среды выделениями человека и животных. К *косвенным тестам* относится определение общего микробного числа, количественного и качественного состава санитарно-показательных микроорганизмов. Применение косвенных методов оценки потенциальной возможности загрязнения объектов окружающей среды патогенными микроорганизмами, использование обходного пути для изучения степени обсемененности является особенностью санитарно-микробиологических исследований.

6. Проведение оценки исследуемых объектов по совокупности полученных результатов при использовании санитарно-микробиологических тестов с учетом гигиенических показателей, указанных в соответствующих нормативах (органолептических, физических, химических и других). Необходимо учитывать, что развитие микроорганизмов тесно связано с факторами среды, которые могут оказывать как благоприятное, так и неблагоприятное воздействие, усиливая или ограничивая развитие патогенных видов. Следует учитывать, что любой объект исследования имеет собственную микрофлору, которая вызывает специфические биохимические процессы.

I. 2. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для оценки санитарного состояния объектов окружающей среды используют количественные и качественные микробиологические показатели. На рисунке 1 представлен обзор методов, которые используются при санитарно-микробиологическом контроле.

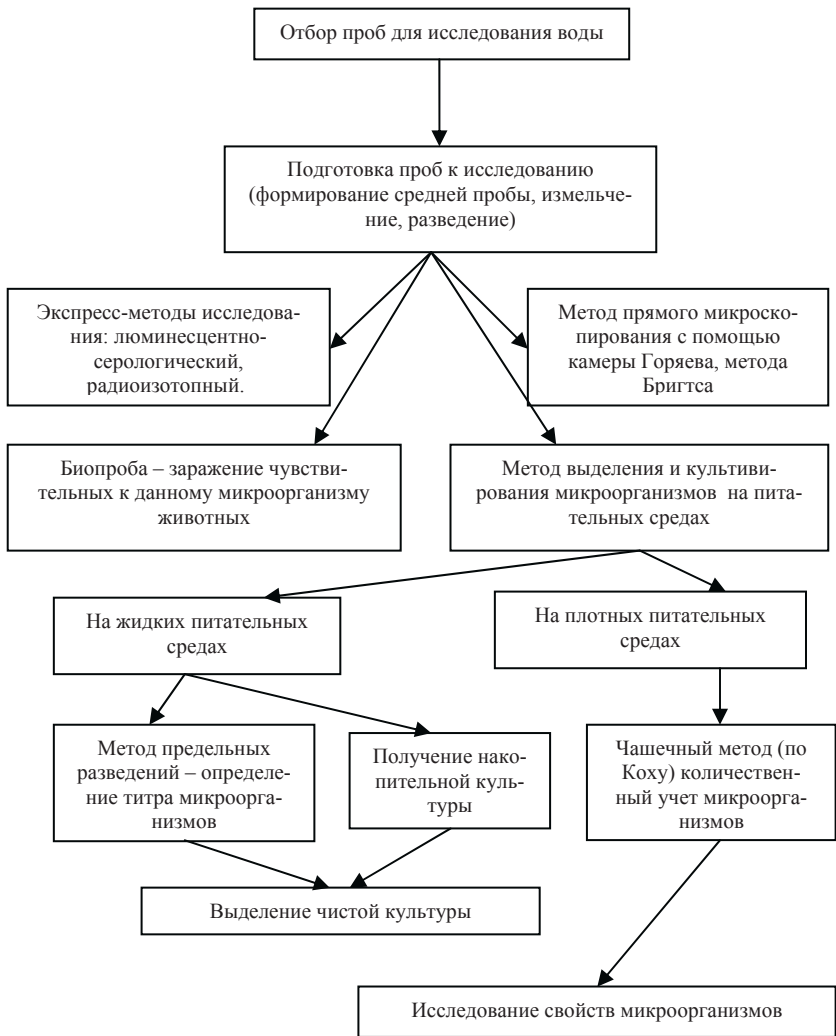


Рис. 1. Методы санитарно-микробиологического анализа

Количественные показатели характеризуют степень контаминации исследуемого объекта микроорганизмами, т. е. общее микробное число в единице веса (объёма), – обычно в 1 г (1 см³). Существует два метода определения микробной контаминации: метод прямого подсчёта и метод количественного посева проб данного объекта или его разведений на питательные среды.

Прямой подсчет микроорганизмов проводится под микроскопом в счетных камерах Горяева или в камерах, специально сконструированных для счёта бактерий. Предварительно из пробы исследуемого объекта готовят гомогенную взвесь. Для более точного учета клеток в исследуемую суспензию добавляют краситель (эритрозин). Для прямого подсчета бактерий можно использовать мембранные фильтры, через которые пропускают исследуемую жидкость или взвесь.

Метод прямого подсчета применяется в экстренных случаях, когда необходимо срочно дать ответ о количественном содержании микроорганизмов: при авариях в системе водоснабжения, при оценке эффективности работы очистных сооружений. Метод прямого подсчета имеет ряд недостатков: невозможность подсчета микроорганизмов в клеточных конгломератах; невозможность подсчета мелких микроорганизмов; отсутствие отдельного учета мертвых и живых клеток.

Создание автоматических приборов для регистрации общей микробной обсемененности, таких как фотоэлектрические и электронные счетчики, делает метод прямого подсчета более перспективным.

Метод количественного посева исследуемого материала на питательные среды применяется наиболее часто. Из приготовленных серийных десятикратных разведений исследуемой жидкости или суспензии пробу объемом 1 мл переносят в стерильные чашки Петри (начиная с большего разведения, каждую последующую пробу вносят отдельной пипеткой). Затем исследуемый раствор заливают расплавленным и остуженным до 45–50⁰ С мясопептонным агаром – МПА (глубинный посев). Содержимое чашек равномерно перемешивают и после застывания агара переносят в термостат.

После инкубации подсчитывают число выросших колоний и с учетом разведения высчитывают число жизнеспособных микро-

бов в единице объема исследуемого объекта. Если посе́вы выращивали при 30° С, то показателем общей обсемененности исследуемого материала является КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных факультативно анаэробных микроорганизмов (или МАФАнМ).

КМАФАнМ не определяют только у продуктов, при производстве которых используют заквасочные культуры. В зависимости от вида продукта и способа его производства этот показатель может свидетельствовать об общем санитарно-эпидемиологическом состоянии продукта, свежести или начальной стадии порчи внешне доброкачественного продукта. Хотя во многих случаях метод считается приблизительным из-за невозможности выявить все микроорганизмы в объекте на одной питательной среде, т. к. их физиолого-биохимические свойства различны. Кроме того, режим инкубации также не соответствует требованиям всех микроорганизмов в ассоциации. Не дают роста микробы, находящиеся в комочках исследуемого объекта, а если и наблюдается рост колоний, то, возможно, не из одной особи. Наконец, часть микроорганизмов теряет способность к размножению в силу антагонизма, конкуренции и других причин. Несмотря на недостатки этого показателя, для продуктов КМАФАнМ нормируется.

В обязательном порядке контролируются санитарно-показательные микроорганизмы, обнаружение которых является косвенным показателем биологической контаминации исследуемого материала патогенными микроорганизмами. Превышение нормативов по допустимому содержанию санитарно-показательной микрофлоры свидетельствует о возможном присутствии тех или иных патогенных микробов.

Для количественной характеристики применяются две группы методик: определение титра и индекса.

Tump – это тот наименьший объём исследуемого материала (в миллилитрах) или весовое количество (в граммах), в котором обнаружена одна особь санитарно-показательного микроорганизма. Для определения титра кишечной палочки в воде засевают несколько разных объёмов (от 100 до 0,1 или до 0,01 мл в зависимости от предполагаемой степени загрязнения объекта) в жидкие сахарные питательные среды. Размножение кишечных палочек регистрируется по наличию

брожения – расщепления углеводов до кислоты и газа. Пересев на плотные дифференциально-диагностические среды и идентификация выросших колоний позволяют выяснить объём воды, в котором присутствовала кишечная палочка. Затем по специальным таблицам рассчитывают *Coli*-титр.

Индекс – количество особей санитарно-показательного микроорганизма, обнаруженного в определённом объёме исследуемого объекта. Для воды, молока, других жидких продуктов – в 1 литре, для почвы и пищевых продуктов – в 1 грамме. Индекс – величина, обратная титру, поэтому перерасчет титра в индекс и обратно можно производить по формуле:

$$\mathit{титр} = \frac{1000}{\mathit{индекс}} \quad ; \quad \mathit{индекс} = \frac{1000}{\mathit{титр}} \quad . \quad (1)$$

Соответственно для почвы и пищевых продуктов:

$$\mathit{титр} = \frac{1}{\mathit{индекс}} \quad ; \quad \mathit{индекс} = \frac{1}{\mathit{титр}} \quad . \quad (2)$$

Индекс чаще определяют с помощью мембранных фильтров или посева различных разведений исследуемых субстратов на питательные среды.

Выбор санитарно-показательного микроорганизма (СПМ) зависит от исследуемого объекта и конкретной задачи исследования. Каждый санитарно-показательный микроорганизм должен соответствовать ряду требований:

- 1) постоянное обитание в биотопах человека и животных и выделение в больших титрах в окружающую среду;
- 2) продолжительность выживания в окружающей среде должна быть такой же или большей, чем патогенных микроорганизмов;
- 3) не должны размножаться в окружающей среде;
- 4) не должны значительно изменять свои биологические свойства при попадании в окружающую среду;
- 5) индикация, идентификация и количественный учет должны производиться современными, легко доступными и экономичными микробиологическими методами.

Часто одновременно исследуется и проводится количественный учет двух или более СПМ (табл. I. 1).

Таблица I.1

САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ,
ОПРЕДЕЛЯЕМЫЕ В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Исследуемый объект	Санитарно-показательные микроорганизмы
Вода	<i>БГКП, pp. Enterococcus, Staphylococcus</i>
Почва	<i>БГКП, термофилы, pp. Enterococcus, Clostridium (Cl. perfringens)</i>
Воздух	<i>pp. Streptococcus, Staphylococcus</i>
Предметы обихода	<i>БГКП, pp. Enterococcus, Staphylococcus</i>
Пищевые продукты	<i>БГКП, бактерии группы Proteus, pp. Enterococcus, Staphylococcus</i>

Качественные показатели указывают на отсутствие (присутствие) микробных клеток в исследуемой пробе.

Прямое выявление в пищевых продуктах патогенных, условно-патогенных микроорганизмов и их токсинов проводится в соответствии со стандартными методами микробиологических исследований. Обычно проверяют наличие микроорганизмов *pp. Salmonella, pp. Staphylococcus, Cl. botulinum* и их токсинов, *Cl. perfringens, Bac. cereus* и др. Согласно нормативным документам в определенной массе исследуемого материала (25, 50 г) должны отсутствовать патогенные микроорганизмы и их токсины.

Санитарно-микробиологические исследования объекта на присутствие патогенных микроорганизмов проводятся сотрудниками СЭС в плановом порядке и внепланово – по эпидемическим показаниям. Для определения патогенных микроорганизмов могут быть использованы следующие методы (см. рис. 1):

- 1) прямой посев исследуемого материала в питательные среды;
- 2) предварительная концентрация патогенных микроорганизмов в жидкой среде с помощью фильтрования через мембранные фильтры или посевом в среды накопления;
- 3) обнаружение патогенных микроорганизмов методом заражения чувствительных животных (биопроба);
- 4) применение серодиагностики.

Ретроспективный анализ дает исчерпывающую характеристику эпизоотического процесса в статистике (уровень и выбранный отрезок времени) и в динамике за прошедший период. Выявляет причины и ведущие тенденции их действия, которые определяли эпизоотическую ситуацию в прошлом.

Эти тенденции носят устойчивый характер, поэтому позволяют экстраполировать полученные данные на последующий период. Кроме того, при ретроспективном анализе определяется эффект действия проводимых мероприятий, особенно если за анализируемый период в них вносились какие-то изменения.

При контроле за возбудителями инфекций на рыбохозяйственных водоёмах ретроспективный анализ предлагается осуществлять ежегодно, используя данные, которые собираются и систематизируются при оперативном анализе, поэтому от качества выполнения оперативного анализа зависят результативность ретроспективного анализа и объемы выполняемой работы.

Для проведения ретроспективного анализа используется следующая информация:

1. Данные о популяционном иммунитете рыб с учетом возрастных особенностей, уровень носительства вирулентных разновидностей возбудителя; плотность и зараженность популяций аквакультуры и т. п.

2. Данные о природных факторах и их возможных изменениях (например, о различиях в отдельные годы уровня среднелетней температуры воздуха).

3. Данные о санитарно-гигиенической характеристике системы водоснабжения, питания и т. п.

4. Данные о соблюдении законодательства, о специфической профилактике и т. д.

РАЗДЕЛ II

ОСОБЕННОСТИ МИКРОФЛОРЫ ВОДЫ

Водоёмы различных систем (моря, озера, реки, водохранилища) по своим физическим свойствам и химизму воды очень разнообразны. Поэтому количественный и видовой состав микрофлоры воды также различен и в значительной степени зависит от физико-химической характеристики водоема, его сложения, наличия питательных веществ, температуры, аэрации, окислительно-восстановительных условий, рН воды и т. д. Микрофлора воды представляет собой сложное биологическое сообщество с очень разнообразными и сменяющимися видами микроорганизмов, которые группируются по признакам экологического характера.

Вода является естественной средой обитания для микроорганизмов. Основная масса микробов поступает из почвы. Количество микроорганизмов в 1 мл воды зависит от наличия в ней питательных веществ. Чем вода сильнее загрязнена органическими остатками, тем больше в ней микробов. Наиболее чистыми являются воды глубоких артезианских скважин, а также родниковые воды. Обычно они не содержат микробов. Особенно богаты микробами открытые водоёмы и реки. Наибольшее количество микробов в них находится в поверхностных слоях (в слое 10 см от поверхности воды) прибрежных зон. С удалением от берега и увеличением глубины количество микробов уменьшается. В чистой воде находится 100 – 200 микробных клеток в 1 мл, а в загрязненной – 100 – 300 тыс. и больше. Природные водоёмы часто являются естественными приемниками стоков хозяйственного и фекального происхождения, поэтому в зоне антропогенного действия на водоём резко увеличивается количество микробов. Но по мере удаления реки от города число микробов постепенно уменьшается, и через 3 – 4 десятка километров снова приближается к исходной величине. Это само-

очистление воды зависит от ряда факторов: механическое осаждение микробных тел, уменьшение в воде питательных веществ, усвояемых микробами, действие прямых лучей солнца, пожирание бактерий простейшими и др. Если считать, что бактериальная клетка имеет объем 1 мк^3 , то при содержании их в количестве 1000 клеток в 1 мл получится около тонны живой бактериальной массы в кубическом километре воды. Такая масса бактерий осуществляет различные превращения в круговороте веществ в водоемах и является начальным звеном в пищевой цепи питания рыб. Патогенные микробы попадают в реки и водоемы со сточными водами. Возбудители таких кишечных инфекций, как брюшной тиф, паратифы, дизентерия, холера и др., могут сохраняться в воде длительное время. В этом случае вода становится источником инфекционных заболеваний.

К аутохтонной (собственно водной) микрофлоре относят микроорганизмы, постоянно живущие и размножающиеся в воде: *Azotobacter*, *Nitrobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Spirillum* и др.

Аллохтонная микрофлора представляет собой совокупность микроорганизмов, случайно попавших в воду и сохраняющихся в ней сравнительно короткое время. Представители аллохтонной микрофлоры воды являются чуждыми данной экосистеме, присутствуют в ней временно, нередко в состоянии покоя. Количественные соотношения микроорганизмов в открытых водоемах варьируют в широких пределах, что зависит от типа водоема, степени его загрязнения, метеорологических условий, времени года.

Микроорганизмы воды играют значительную роль в круговороте веществ, расщепляя органические продукты животного и растительного происхождения и обеспечивая питательными веществами других гидробионтов. В воде обитают все известные группы микроорганизмов, но наиболее существенный компонент населения водоемов – бактерии. Цитоплазматическая мембрана бактерий обладает способностью активного переноса через клеточную стенку питательных веществ. Благодаря этому бактерии способны потреблять питательный субстрат, присутствующий в малых концентрациях (1–5 мг/г). Одноклеточные организмы окисляют до минеральных соединений органические вещества, в огромных количествах попадающие в водоемы.

II. 1. КАТЕГОРИИ ВОДОЕМОВ ПО СТЕПЕНИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ

Источником бактериального загрязнения воды в реках чаще всего служат бытовые и промышленные стоки. В открытые водоемы большая часть микроорганизмов попадает из почвы. Поэтому в озерах, прудах, реках наивысшее содержание микрофлоры отмечается в прибрежной зоне. По степени бактериальной обсемененности водоемы, используемые в рыбоводстве, условно разделяют на три категории (табл. II. 1).

Таблица II.1

КАТЕГОРИИ ВОДОЁМОВ ПО СТЕПЕНИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ОБСЕМЕНЁННОСТИ

Категории	Допустимый предел бактериальной обсемененности				Оценка
	МАФАН М, (кое/мл)	Сол-индекс	Аэромонад	Псевдомонад	
Первая	10^3	5	0	0	чистые
Вторая	$10^3 - 10^5$	10	10	10	
		П –	П –	П –	загрязненные
Третья	10^6	10	10	10	
		П +	П +	П +	грязные

Примечание.

МАФАНМ – мезофильные аэробные факультативно анаэробные микроорганизмы; кое/мл – колониеобразующих единиц в 1 мл воды;

«П – » – недопустимо наличие патогенных для рыб микроорганизмов;

«П + » – возможно наличие патогенных для рыб микроорганизмов.

Определение патогенности выделенных штаммов проводится по степени ДНКазной активности (МУ от 09.12.97, № 13 – 4 – 2/1116).

Санитарным требованиям отвечают водоемы первой категории – чистые. В целях рыборазведения возможна эксплуатация водоёмов второй категории – загрязненные. Однако необходимо иметь в виду, что в этой категории водоёмов в течение сезона эксплуатации происходит колебание МАФАНМ от $10^2 - 10^3$ до $10^5 - 10^6$ кое/мл. В случае повышения МАФАНМ до 10 должны быть приняты меры по его снижению за счет увеличения проточности, уменьшения кормления рыб и др. При таких показателях микробного числа нередко наступают «заморные явления», возникают инфекционные заболевания.

В водоемах с содержанием бактерий группы кишечной палочки более 10 микробных клеток в 1,0 мл (с Coli-титром ниже 0,1 мл, Coli-индексом около 10,000 кое/мл) должны быть приняты меры к устранению причин фекального загрязнения воды.

Недопустимо использование для рыбоводства водоемов третьей категории (грязные), не приведенных в соответствие с санитарными требованиями. Это, как правило, стационарно неблагополучные по инфекционным заболеваниям рыб водоемы с высокими показателями МАФАНМ и низким Coli-титром. Водоснабжение их осуществляется зачастую паводковыми водами. Такие водоемы должны иметь минимальную плотность посадки рыб, выводиться на летование. В них должны быть проведены дезинфекция и другие оздоровительные мероприятия. При возможности проводят реконструкцию системы водоснабжения, обеспечивающую удовлетворительное санитарное состояние водоема.

Эффективность дезинфектантов зависит от почвенно-климатических условий. Поэтому для каждого хозяйства рекомендуется подобрать то средство (и его количество), которое более эффективно и доступно в конкретных условиях, предварительно определив рН, буферность грунта, а также общее микробное число до и после контрольной (пробной) дезинфекции.

РАЗДЕЛ III

ТИПИЧНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ АУТОФЛОРЫ ФОРЕЛИ

В составе аутофлоры форели часто обнаруживаются спорообразующие и бесспорные палочки, микрококки, сарцины и некоторые обитающие в воде дрожжи и плесени. Преобладают – *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Proteus vulgaris*, бактерии группы кишечной палочки и др. (табл. III. 1).

Таблица III. 1

ДОМИНАНТНЫЕ ГРУППЫ БАКТЕРИЙ В СОСТАВЕ АУТОФЛОРЫ ФОРЕЛИ

Таксон	Коэффициент Симпсона
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	0,004
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,002
<i>Acinetobacter sp.</i>	0,002
<i>Arizona sp.</i>	0,012
<i>Aeromonas hygrophila</i>	0,025
<i>Citrobacter freundlle</i>	0,047
<i>Citrobacter sp.</i>	0,022
<i>Bacillus subtilis</i>	0,017
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,017
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0,013
<i>Escherichia coli</i>	0,042
<i>Moraxella sp.</i>	0,022

Таксон	Коэффициент Симпсона
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0,123
<i>Pseudomonas cichoril</i>	0,042
<i>Proteus vulgaris</i>	0,024
<i>Proteus rellgeri</i>	0,056
<i>Serratia sp.</i>	0,011

III. 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

Pseudomonas– гнилостные палочковидные неспоровые грам-отрицательные подвижные с полярными жгутиками аэробные бактерии (рис. 2), образующие на мясопептонном агаре бесцветные, просвечивающие или полупрозрачные колонии. Культуры могут быть окрашенными или бесцветными. Многие штаммы психрофильных бактерий начинают отмирать уже при 37° С. Рост бактерий задерживается при pH ниже 5,5 и при содержании хлористого натрия более 5-8%. Ряд представителей *Pseudomonas* (флуоресцирующие бактерии) изменяют цвет среды – вызывают ее позеленение или побурение.

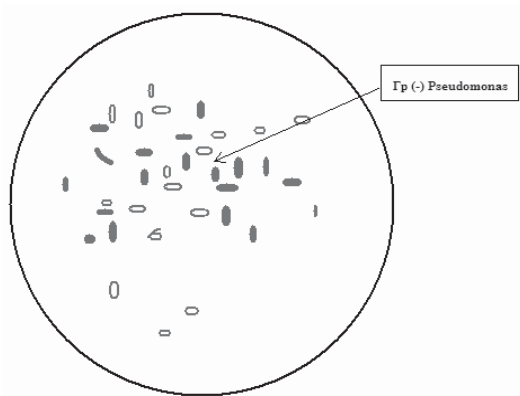


Рис. 2. *Pseudomonas alcaligenes*

Отличительным признаком *Pseudomonas* среди других грамотрицательных бактерий является их устойчивость к антибиотикам (пенициллину, стрептомицину).

III. 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ ГРУППЫ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ (БГКП)

Бактерии группы кишечной палочки имеют санитарно-показательное значение, относятся к условно-патогенным микроорганизмам. *Escherichia coli* – наиболее типичный представитель фекальных бактерий, всегда находится в кишечнике здоровых людей, животных и насекомых, представляет собой короткие подвижные полиморфные грамотрицательные палочки и является факультативным аэробом (рис. 3). Спор не образует. Оптимальная температура роста 37° С. Колонии бывают гладкой или шероховатой формы.

Escherichia coli – факультативные аэробы. Среди них встречаются холодоустойчивые мезофильные (психротрофные) бактерии, которые хорошо растут при 1,5° С (а некоторые при минус 1,5°С). Однако для большинства бактерий этой группы оптимальная температура роста около 37° С. Психротрофные *E. coli* – при инкубации в течение 48 ч при 43° С не развиваются. Поэтому при дифференцировании реко-

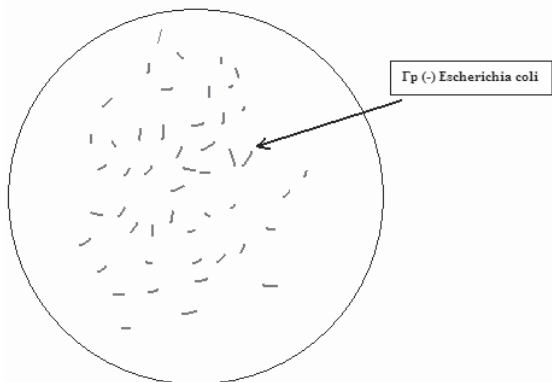


Рис. 3. *Escherichia coli*

менуется выращивать их на твердом скошенном агаре при $43 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. Не растущие при этой температуре бактерии принято относить к психротрофным *E. coli*.

Бактерии группы кишечной палочки различаются лишь по давности выделения из кишечника во внешнюю среду. *E. coli* отличается от других представителей этой группы тем, что не обладает способностью использовать цитрат в качестве источника углерода вместо глюкозы.

Бактерии группы Proteus — факультативные анаэробные грамотрицательные палочки (рис. 4), являются сапрофитами, живут в воде и почве и часто встречаются в разлагающихся остатках животного и растительного происхождения. Участие протей в гнилостных процессах начинается с разложения полипептидов. Культуры протей обычно зловонны. Колонии многих штаммов способны образовывать на влажной поверхности твердой питательной среды тонкий, серый, ползущий (вуалеобразный) рост — R-форма. O-форма — неподвижные клетки, лишённые жгутиков и образующие мелкие изолированные колонии.

Температурные границы роста бактерий группы протей лежат в пределах от 10 до 40°C . Нагревание при 60°C в течение 2 мин не убивает бактерий группы протей. Нагревание при 80°C в течение 5 мин губительно для данного вида. *Proteus vulgaris* — подвижная, полиморфная, бесспорная грамотрицательная палочка. Оптимум температуры роста 37°C . Хорошо растёт и при комнатной температуре.

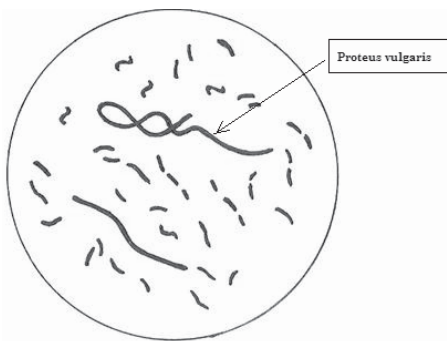


Рис. 4. *Proteus vulgaris*

III. 3. ХАРАКТЕРИСТИКА АЭРОБНЫХ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Bacillus subtilis (сенная палочка) – подвижная палочка с закругленными краями, располагающаяся одиночно или длинными цепочками. Образует овальные споры (рис. 5). Оптимальная температура роста 37 – 50° С. На агаре образует зубчатые колонии сероватого цвета. Активно расщепляет азотистые соединения с выделением аммиака.

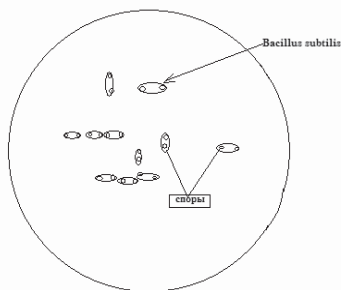


Рис. 5. *Bacillus subtilis*

Bac. mesentericus (картофельная палочка) — палочки с закругленными концами, располагающиеся одиночно, парно или короткими цепочками, перетрихальноподвижные, грамположительные. Образуют овальные споры, располагающиеся в любой части клетки. Оптимальная температура роста 36 – 45° С. На агаре растут в виде тонких, сухих, морщинистых колоний. При разложении белка образуют большое количество сероводорода.

Bac. mycoides (грибовидный) — толстые длинные палочки, располагающиеся одиночно или в цепочках, подвижные, грамположительные. Образуют овальные споры разной величины. На агаре дают ветвящиеся колонии, напоминающие мицелий гриба. При разложении белка выделяют аммиак. Оптимум температуры роста 30° С.

Bac. cereus – аэробная подвижная грамположительная палочка, по морфологическим и культуральным признакам напоминающая *Bac. mycoides*. Быстро образует центральные споры. Двухсуточная культура на 25–50% представлена спорами, которые выдерживают

прогревание при 105–125° С в течение 10–13 мин [41]. На агаре растет в виде плотных, круглых, выпуклых, преломляющих свет, воскоподобных колоний. *Bac. cereus* принадлежит к микроорганизмам, устойчивым как к температурам от 5 до 70° С, так и к другим консервирующим факторам. По данным Л. Прокоповой, может расти в средах, содержащих до 12% хлористого натрия, при рН от 4,6–6,0 до 11,0. Большое количество жира и сахара в среде, а также температура 4–6° С тормозят размножение *B. cereus*. В ряде стран Европы и в Японии отмечаются случаи пищевых отравлений, вызванные *Bac. cereus*.

Bac. megatherium – толстые, длинные, подвижные, грамположительные палочки, расположенные одиночно, цепочками и в виде нитей. Образуют овальные или продолговатые споры, располагающиеся эксцентрально. Прорастание спор полярное; оптимум температуры роста 35° С, хорошо растут при 45–50° С. На агаре образуют слизистые выпуклые колонии (рис. 6) и большое количество сероводорода.

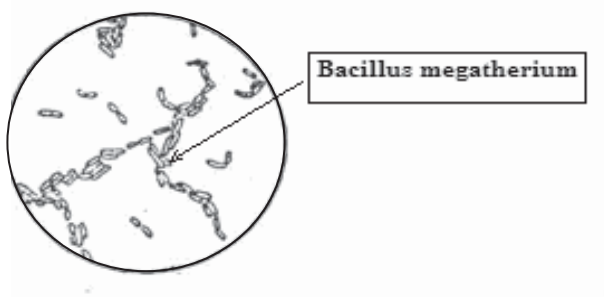


Рис. 6. *Bac. megatherium*

III. 4. ХАРАКТЕРИСТИКА АЭРОБНЫХ НЕСПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Примером типичных аэробных и факультативно анаэробных бактерий являются представители семейства микрококки. К микрококкам относят стафилококки – грамположительные, небольшие клетки

шаровидной формы, примерно одинаковой величины образуют круглые с ровными краями колонии белого, желтого или золотистого цвета (рис. 7). Оптимальная температура роста 37°C . Стафилококки устойчивы к действию физических и химических факторов, выдерживают нагревание при 70°C в течение 1 ч. Термическая обработка вызывает гибель стафилококков лишь при условии достаточной ее интенсивности и продолжительности – при температуре $75\text{--}80^{\circ}\text{C}$ отмирают лишь через 20–30 мин, а в некоторых случаях требуется прогрев продукта даже при 85°C . Известно, что стафилококки выдерживают нагревание при 100°C в течение 35 мин (консервы в масле). Стафилококки по максимальной и минимальной температуре роста отличаются от микрококков. Хотя стафилококки не растут при 0°C , они устойчивы к холоду и выживают длительное время в замороженных средах. Размножение стафилококков задерживается при понижении pH среды до 6,2 или повышении ее до 7,4. Стафилококки устойчивы к высокой концентрации хлористого натрия (до 10% и более). Хорошо переносят высушивание.

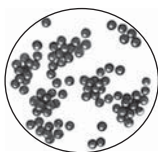


Рис. 7. Стафилококк

РАЗДЕЛ IV

ОСНОВНЫЕ ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РЫБ

Проблема выяснения особенностей течения и характера проявления заразных болезней стала особенно актуальной в условиях антропогенного загрязнения водоемов и индустриального рыбоводства. В результате этого на организм рыб нередко воздействует целый комплекс факторов: неблагоприятные условия среды, токсические вещества, вирусные и бактериальные агенты, паразитические организмы, а также многочисленные биотехнологические приемы, связанные с интенсификацией рыборазведения. Понимание механизма влияния различного сочетания перечисленных факторов как на возбудителей, так и на организм выращиваемых объектов служит важной предпосылкой успешной профилактики и борьбы с заразными болезнями рыб. Основные возбудители бактериозов рыб представлены в таблице IV. 1.

Таблица IV.1

ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИОЗОВ РЫБ

Заболевание	Возбудитель
Аэромоназ (фурункулез)	<i>Aeromonas salmocida</i>
Вибриоз	<i>p. Vibrio</i>
Столбчатая болезнь	<i>Flexibakter columnaris</i>
Холодноводная болезнь	<i>Cytofaga psychrophila</i>
Кишечная болезнь «красный рот»	<i>Yersinia ruskerei</i>
Эдвардсиеллез	<i>Edwardsiella tarda</i>
Бактериальная почечная болезнь (БПК)	<i>Renibacterium almoninarum</i>
Туберкулез	<i>Mycobacterium salmophilum</i>
Ботулизм	<i>Clostridium botulinium</i>
Стрептококкоз	<i>Streptococcus sp.</i>

IV. 1. АЭРОМОНОЗ

Вызывают бактерии рода *Aeromonas salmocida* (подвиды *salmocida*, *achromogenes* и *masoucida*). Аэромоназ (фурункулез) характеризуется септициемией, образованием нарывов в мышечной ткани, которые вскрываются и превращаются в красноватые язвы. Болезнь протекает молниеносно, остро, подостро и хронически, и в зависимости от течения может быть быстрое развитие патологического процесса, сопровождающееся массовой гибелью рыб.

Аэромонады дают положительную реакцию на цитохромоксидазу. При применении диметил-п-фенилендиамина все оксидазоположительные колонии через 25-30 секунд дают синее окрашивание, а при применении метилпарааминфенола – светло-коричневое. Изменившие цвет колонии пересевают на среды Олькеницкого и лактосахарозную для дальнейшего изучения. Через 18 часов выросшие субкультуры пересевают на среду Хью – Лейфсона для определения оксидации или ферментации глюкозы (O-F – тест). Аэромонады дают O+F+. Дальнейшая их дифференциация (в случае отсутствия феномена газообразования) проводится по лизину и аргинину: аэромонады обладают аргининдегидрогеназой и не обладают лизиндекарбоксилазой. Окончательная идентификация возбудителей с помощью дифференциально-диагностических сред с маннитом, мальтозой, арабинозой, желатином и среды Кларка. Эта методика позволяет выявлять также атипичные, не образующие пигмента штаммы *A. salmocida*.

При изучении свойств возбудителя установлено, что температура инкубации (11, 18 и 28° С) по существу не влияет на биохимические реакции как вирулентных, так и авирулентных форм *A. salmocida subsp. Salmocida*, однако при более высоких температурах увеличивается устойчивость к новобиацину. Патогенность бактерии, ее аутоагглютинацию связывают с наличием дополнительной оболочки (А-слоя). Изменение питательной среды может приводить к почти полному исчезновению белка дополнительной оболочки и одновременно – к потере свойств аутоагглютинации. После болезни, как и после экспериментального заражения, у рыб образуются агглютинины, наличие которых в сыворотке крови не служит показателем устойчивости рыб к заражению, но позволяет предполагать их контакт со специфическим возбудителем.

Разрабатывали стандартизированную и воспроизводимую модель экспериментального фурункулеза у радужной форели, при которой в качестве инфекционной дозы ($LD_{50} = 200 - 2000$ микробных клеток, вводимых внутримышечно) использовали штаммы *A. salmocida*, вирулентность которых поддерживали или повышали путем пассажей на сеголетках массой 10 – 15 грамм (здоровой рыбе вводили 0,1 мл зараженной ткани внутримышечно). Количество жизнеспособных клеток определяли путем посева на агаровую среду, при этом выяснили, что точное их количество можно определить только в начале экспонентной фазы роста в бульонных культурах. Методика заражения состояла в том, что 30 рыбам, содержащимся при температуре 15°C, вводили внутримышечно по 10 LD_{50} *A. salmocida* и учет гибели вели в течение 10 дней. При внутрибрюшном введении результаты заражения были хуже. Протективные тесты показали ценность этой модели.

Разрабатывался также метод экспериментального заражения лососевых бактерией *A. salmocida* путем обработки рыбы в ванне. Отмечается необходимость выращивания бактерии в такой среде, в которой не появляются авирулентные варианты. Вирулентность бактерии резко падает при длительной инкубации, поэтому следует использовать 24-часовые культуры. Инкубация при температуре 25°C приводит к резкой потере вирулентности, однако при хранении при -60°C вирулентность сохраняется до 743 дней. Мелкая молодь более чувствительна к заражению, чем крупная рыба. Радужная форель более устойчива к заражению, чем другие лососевые.

Пути внедрения *A. salmocida* *subsp. Salmocida* определяли в опытах с годовиками сига. При внутрибрюшном и внутримышечном введениях бактерии (10^5 клеток на рыбу) погибали все зараженные рыбы. При погружении на 30 минут в суспензию бактериальных клеток гибель наступала у 80% с отрезанным хвостовым и 60% с отрезанным спинным плавником, тогда как не поврежденные годовики оставались здоровыми. При введении бактериальной культуры (10^8 клеток на рыбу) в желудок погибало 50%, в кишечник – 10% рыб. Таким образом, эта бактерия не проникает в организм рыб через неповрежденные жабры и кожу. Заражение возможно лишь через пищеварительный тракт и кожу. Заражение скарифицированных участков кожи радужной форели ахромогенной культурой *A. salmocida* вызывает синдром, сходный с таковым у карпов (изъязвления, кровоизлияния

во внутренних органах). Гистологические исследования показали, что присутствие этих бактерий полностью подавляет миграцию клеток эпидермиса, а впоследствии приводит к слущиванию эпидермиса и образованию язвы.

Локализацию живой и убитой формалином культуры *A. salmocida* в тканях радужной форели прослеживали в течение 5 дней после заражения. После внутрибрюшинной инъекции живые и убитые клетки находили в селезенке, печени и кишечнике, после орального введения – почти исключительно в кишечнике, а после прямого погружения – в селезенке и почках.

Разрабатываются средства и методы специфической профилактики фурункулеза.

Изучали лечебные свойства флюомеквина с применением модели экспериментального фурункулеза. Опыты проводили на ручьевой и радужной форели и использовали два патогенных штамма LD₅₀ *A. salmocida*, доза которых первоначально составляла 400-800 бактерий на рыбу массой 5-13 грамм при внутримышечном заражении. Подопытных рыб делили на 3 группы и давали им с кормом флюмикс (порошок с 3% флюомеквина) в количестве 20, 40 и 80 грамм на 100 кг массы рыбы в день в течение 6 дней. Форель содержали в проточных бассейнах при температуре воды 15° С и вводили внутримышечно 10 LD₅₀ бактерий. Профилактическое действие отмечали при внесении препарата одновременно с заражением рыбы. При даче флюмикса через 20 часов после внутримышечного заражения эффективность лечения была очень низкой. Практически рекомендуется вносить флюмикс в корм в дозе 40 г/кг и скармливать его двумя дачами в течение дня из расчета 1% от массы рыбы. В опытах *in vitro* на 25 штаммах бактерий установлено, что флюомеквин, нитрофурантион и ампициллин проявляют значительную бактериостатическую активность против *A. salmocida*, тогда как хлорамфеникол не эффективен, а цетримид, хлоргексидин, йодированный поливидон и мертиолат в разной степени обладали антисептическими и дезинфекционными свойствами. Оксолиновая кислота оказалась эффективной для предупреждения фурункулеза у радужной форели. При дозе 5 мг/кг рыбы/день в течение 10 дней выживаемость зараженных рыб составляла 96-98% против 69-74% в контроле.

IV. 2. ВИБРИОЗ

Возбудителем является род *Vibrio*. Наиболее распространены вид *Vibrio anguillaum Bergman* и вид *Vibrio ordalii*. Различаются они по серологическим свойствам. Оба вида весьма инфекционны и вызывают бактериальную геморрагическую септицемию с обширными геморрагиями и некрозом внутренних органов, некротическими очагами в мускулатуре. Вирулентность вибрионов ассоциируется с наличием железосвязывающих плазмид, способствующих росту бактерий в организме рыбы.

Вибрионы, как и аэромонады, дают положительную реакцию на цитохромоксидазу. При применении диметил-п-фенилендиамина все оксидазоположительные колонии через 25-30 секунд дают синее окрашивание, а при применении метилпарааминофенола – светло-коричневое. Изменившие цвет колонии пересевают на среды Олькеницкого и лактосахарозную для дальнейшего изучения. Через 18 часов выросшие субкультуры пересевают на среду Хью – Лейфсона для определения оксидации или ферментации глюкозы (O-F-тест). Вибрионы дают O⁺F⁺. Дальнейшая их дифференциация проводится по лизину и аргинину: вибрионы не обладают аргининдегидрогеназой и обладают лизиндекарбоксилазой. Окончательная идентификация возбудителей с помощью дифференциально-диагностических сред с маннитом, мальтозой, арабинозой, желатином и среды Кларка.

Вибриоз может быть причиной гибели 40-70% рыб, выращиваемых в рыбоводствах. Учитывая важность этой болезни, проводятся изыскания средств лечения и методов специфической профилактики.

В лабораторных условиях испытаны различные химиопрепараты и антибиотики. Вибрионы чувствительны к стрептомицину, канамицину, аминобензил-пенициллину и очень – к колистину. Часто устойчивы к хлорамфениколу, тетрациклину и сульфамонетоксину.

Многочисленные работы по вакцинации рыб против вибриоза имеют положительные результаты. Установленная высокая иммуногенность вибрионов позволяет готовить вакцины из свежесыведенных изолятов. Вакцины можно готовить из экстрактов бактерий и из целых клеток, причем наиболее широко используются формолвакци-

ны из клеток бактерии. Введение вакцины рыбам возможно внутробрюшинно, орально, через анальное отверстие, методами погружения в ванну и обрызгивания.

Введение убитых вакцин через рот приводит к частичному их инактивированию желудочными соками, что установлено на опытах с радужной форелью массой 9,5 г. При иммунизации повышаются фагоцитарная активность макрофагов и опсоническое действие антител.

Особое значение имеют массовые методы вакцинации – простое погружение в раствор вакцины, метод гиперосмотической фильтрации, метод обрызгивания. Изучено влияние различных факторов на иммунизацию радужной форели методом прямого погружения в ванну с формализированной вакциной, приготовленной из меченных *Vibrio anguillaum*, а также в растворимые антигены вибрионов. Рыб массой 5-25 г погружали в ванну индивидуально, затем промывали в чистой воде, измельчали и определяли степень радиоактивности в пробах тканей. Установили, что время более 10 с не увеличивало всасывание вакцины. Предварительная гиперосмотическая обработка рыб (погружение на 5 с в 5%-ный раствор хлористого натрия) не влияла на степень всасывания даже при низких концентрациях вакцины в ванне. Отмечена вдвое большая всасывающая способность головного конца рыб по сравнению с туловищем. Всасывание вакцины уменьшается при низкой температуре. Крупная рыба больше всасывает вакцины, чем мелкая.

Вторым методом массовой вакцинации является обрызгивание рыб. При этом рыб обрабатывают в сетчатом садке на воздухе с помощью пескоструйного насоса. При перемещении рыб в лотке устройство устанавливают таким образом, чтобы обрызгивание было постоянным. С целью лучшего проникновения в вакцину добавляют небольшое количество бентонита или другого адсорбента, а также абразивный порошок.

IV. 3. МИКСОБАКТЕРИОЗ

Миксобактериальные инфекции отличаются большим разнообразием клинического проявления, охватом многих видов рыб и тяжестью течения вспышек.

Столбчатая болезнь

Вызывается миксобактерией *Flexibacter columnaris*. Возникает при температуре воды 13°C и выше. Вначале наступает разволокнение плавников, затем на поверхности головы и тела появляются мелкие некротические участки, покрытые серым налетом, обычно с красными краями. Нередко наблюдают обширные некрозы жабр, начинающиеся от дистальных концов жаберных лепестков. У лососевых и других холодноводных рыб болезнь иногда протекает без внешних симптомов, при этом бактерии обычно выделяют из почек.

Холодноводная болезнь (болезнь хвостового стебля)

Вызывается возбудителем *Cytofaga psychrophila*.

Наблюдается среди лососевых при температуре воды 10°C и ниже и характеризуется некрозом и отторжением мягких тканей стебля хвоста.

Бактериальная жаберная болезнь

Распространена среди молоди лососевых на рыбзаводах. У больных рыб отмечают отек жабр, пролиферацию жаберного эпителия, а затем его расплавление, что приводит к нарушению дыхательной функции и в конечном счете к гибели рыбы. При гниении плавников происходит их разволокнение, а затем разрушение.

Часто в развитии миксобактериозов участвуют другие микроорганизмы, такие как аэромонады, псевдомонады и вибрионы.

IV. 4. СТРЕПТОКОККОЗ

Возбудителем заболевания является *Streptococcus sp.*

У больных рыб отмечают экзофтальмию, помутнение роговицы и покраснение глазного яблока, гиперемию и гнойные узелки на внутренних поверхностях жаберных крышек и нёба, а также на хвостовом стебле и у основания плавников. Внутренние органы увеличены, печень бледная, эпикард и брюшина воспалены. При хроническом течении глаза у некоторых рыб отсутствуют, глазные впадины заполнены соединительной тканью и покрыты пигменти-

рованной кожей. При поражении обоих глаз тело рыбы становится черным. В крови увеличивается количество нейтрофилов, лимфоцитов, глюкозы, количество гемоглобина и эритроцитов резко снижается.

Бактерии растут при температурах 10-45° С в средах с концентрацией хлористого натрия до 7% (лучше 0%) и рН 3,5-10,0 (оптимум 7,6) Является каталазно-отрицательным, грамположительным стрептококком, растет на агаре с 40% желчи; не гидролизует соли гиппуровой кислоты, но гидролизует эскулин и аргинин; редуцирует нитраты; ферментирует манит, салицин, трегалозу и не ферментирует лактозу, арабинозу, глицерин, раффинозу, сорбит и сахарозу. Продуцирует эндотоксины и экзотоксины.

IV. 5. КИШЕЧНАЯ БОЛЕЗНЬ «КРАСНЫЙ РОТ»

Возбудителем болезни является *Yersinia ruckeri*.

Это грамтрицательный подвижный перитрих, который дает на твердой среде круглые, гладкие, выпуклые, маслянистые, беспигментные колонии. Бактерия имеет размер 2-7*1 мкм и представляет прямую или изогнутую палочку. Сбраживает глюкозу, манит, маннозу и глицерин, не изменяет лактозу и сахарозу. Не образует индола и сероводорода.

Радужная форель наиболее восприимчива к заболеванию. Болезнь протекает в форме септицемии. Рыба становится вялой, теряет аппетит, поверхность тела чернеет. У нее отмечаются кровоизлияния вокруг рта и в ротовой полости, на жаберных крышках, у основания плавников и в области ануса. У отдельных рыб брюшко вздутое. Наблюдается односторонняя, затем двусторонняя экзофтальмия и часто наступает разрушение глаз. При вскрытии обнаруживаются кровоизлияния в печени, поджелудочной железе, плавательном пузыре, жировой ткани и брюшине, пилорических придатках, гонадах и мышцах тела.

Хроническая инфекция протекает среди товарной форели и дает около 10% отхода рыб. Скрытое бактерионосительство в неблагополучных хозяйствах может быть у 2-3% популяции радужной форели,

а наличие антител – до 38%. Считается, что возбудитель выделяется из кишечника и передается через воду.

Профилактическим и лечебным действием обладает оксолиновая кислота.

IV. 6. ЭДВАРДСИЕЛЛЁЗ

Вызывается бактерией *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri* – граммотрицательные слабо подвижные палочки с перитрихальным жгутикованием. Они являются цитохромоксидазоотрицательными, не образуют пигмента, ферментируют глюкозу, фруктозу, галактозу, маннозу и мальтозу с образованием кислоты и газа. Продуцируют индол и сероводород. Оптимум роста в агаре с мозго-сердечным экстрактом – при температуре 36°C, но растут медленно.

Заболевание проявляется в виде крупных абсцессов со зловонным содержимым и кровоизлияниями вокруг них. У пораженной рыбы отмечают опухоли, сопровождающиеся мелкими гемorragиями и перфорациями в области печени и почек, в селезенке и почках, выделены колонии бактерий в виде серовато-белых пятен. На голове, особенно на жаберных крышках, и на поверхности тела наблюдают кровоточащие язвы. В настоящее время различают две формы эдвардсиеллеза: нефротическую и гепатическую. При нефротической форме отмечают некротические поражения в гемопозитической ткани почек, в дальнейшем развивающиеся в обширные язвы. В язвенных поражениях бактерии размножаются и вызывают расплавление окружающих тканей. Хорошо заметны метастатические поражения в различных органах. При гепатической форме эдвардсиеллеза обширные поражения с расплавлением тканей в начальных стадиях появляются в печени. При прогрессировании болезни в печени формируются обширные язвенные абсцессы, гнойный перитонит и распространение воспаления на другие органы. Кроме культивируемых угрей эпизоотия эдвардсиеллеза была зарегистрирована среди популяции кефали в Японии. Пораженная рыба отличалась нарушением координации движения, держалась у поверхности воды. На теле наблюдались многочисленные обширные абсцессы с резким зловонным запахом, гемorragическими краями. У пораженной рыбы *E. tarda* в большом количестве выде-

лялась из почек. *E. ictaluri* ассоциируется с двумя заболеваниями — септическим энтеритом канального сома (ESC) и «дыркой в голове» (дырявая голова). Острая, или кишечная, форма, сопровождающаяся высокой летальностью, протекает или с незначительными клиническими признаками, или без таковых. Бактерии можно изолировать из почек. При хронической, или нейрогенной, форме, приводящей к заболеванию, известной как «дырявая голова», микроорганизм, находящийся в воде, попадает в обонятельную ямку и мигрирует к мозгу по каналу обонятельного нерва. Классические поражения головы являются результатом разрушения хрящей экстрацеллюлярным энзимом хондриотиназой. Болезнь также может протекать в молниеносной форме, без проявления вышеуказанных признаков.

IV. 7. БАКТЕРИАЛЬНАЯ ПОЧЕЧНАЯ БОЛЕЗНЬ (БПБ)

Возбудителем является *Renibacterium salmoninarum*. Бактерия представляет собой грамположительную, неспоровую, неподвижную палочку, которая медленно растет на обогащенных питательных средах.

На основании физиологических и биохимических свойств *R. salmoninarum* делят на два биотипа. Все они имеют оптимум роста при температуре 16 °С и слабо положительную реакцию на каталазу, растут в среде с тиллуридом калия, чувствительны к ряду антибиотиков, биотоп – 2 устойчив к эритромицину. Таким образом, вид *R. Salmoninarum* не является однородным.

Больные рыбы вялые, у них отмечают пучеглазие, кровоизлияния у оснований плавников, вздутия и подкожные рубцы на боковой поверхности тела. При разрезе вздутий обнаруживают гнойное содержимое. При вскрытии регистрируют брюшную водянку, бледный цвет печени, воспаление брюшины. На почках появляются беловатые узелки, иногда они крупные и сливаются, при этом почки заметно набухают. Отмечают также резкое снижение гематокрита и количества белков сыворотки крови. Эти симптомы не всегда наблюдаются у каждой больной рыбы, часто единственным являются серовато-белые пузырьки на почках.

Возбудитель БПБ может находиться в больших количествах в кишечнике и рассеиваться в воде. Он находится также внутри икры и расположен в желтке. Йод (500 мг/л в качестве йодного повидона) надежно уничтожает бактерию на поверхности икры и совсем не действует внутри икринок. Поэтому для инкубации нецелесообразно использовать икру лососевых с мутной целомической жидкостью.

Бактериологическая диагностика БПБ сложна в связи с медленным ростом возбудителя и его требовательностью к составу питательных сред. Разработано несколько питательных сред, среди которых рекомендуется следующая: триптоза – 1,0%, мясной экстракт – 0,3%, хлористый натрий – 0,5%, дрожжевой экстракт – 0,05%, цистеин гидрохлорид – 0,1%, кровь человека – 20%, агар – 1,5%.

Для селективного выделения возбудителя БПБ рекомендуется также питательная среда с антибиотиками.

У переболевших и иммунизированных рыб образуются антитела. При инъекции клеток БПБ в солевом растворе или вакцинации гиперосмотическим погружением иммунная реакция отсутствует или слаба.

IV. 8. ТУБЕРКУЛЁЗ

Возбудитель *Mycobacterium salmophilum* – кислотоустойчивые, грамположительные, неподвижные прямые или изогнутые бактерии размером 1,1-3,3×0,3-0,6 мкм, которые плохо растут на питательных средах.

Симптомы туберкулёза довольно разнообразны и зависят от течения болезни и характера патологических изменений. При остром течении и развитии септицемии рыбы погибают без каких-либо признаков болезни. При хроническом течении рыбы долгое время выглядят здоровыми, а затем отказываются от корма, их окраска бледнеет, движения становятся медленными, плавники смятые. На теле появляются пятна, затем выпадает чешуя и образуются плоские поверхностные язвы. Возникает одно- или двусторонняя экзофтальмия, позади глаз нередко формируются туберкулезные узелки.

На вскрытии отмечают туберкулезные узелки разного размера. Туберкулы имеют серовато-белый или желтоватый цвет, располага-

ются одиночно или группами, образуя гроздь на серозных оболочках. Они состоят из некротизированного центра с казеозной массой и разным количеством кислотоустойчивых бактерий и из оболочки, образуемой эпителиальными клетками. Характерной особенностью является отсутствие гигантских клеток.

Бактериологическое исследование редко заканчивается выделением микобактерий (туберкулезных) вследствие их слабого и медленно-го роста при быстром и обильном развитии другой микрофлоры.

При установлении диагноза на туберкулез рыб следует уничтожить и провести тщательную дезинфекцию, так как лечение больных рыб длительное и не всегда дает положительные результаты. Для лечения в воду добавляют доксициклин или миноциклин, окситетрациклин или тетрациклин. Язвы можно смазывать тетрациклиновой или пенициллиновой мазью.

IV. 9. БОТУЛИЗМ

Возбудитель ботулизма – палочковидная бактерия *Clostridium botulinium* – является обычным обитателем почв. С паводковыми водами она сносится в водоем и там же попадает в рыб как через кишечник, так и через поврежденные кожные покровы. Носителями *C. botulinium* чаще всего оказываются осетровые, но отмечены случаи заражения радужной форели. Когда человек съедает соленую, вяленую или недостаточно проваренную рыбу, в которой бактерии сохраняются, наступает тяжелый токсикоз, чаще всего заканчивающийся смертью уже через 1-2 суток после отравления.

РАЗДЕЛ V

САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НА РЫБОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ВОДОЕМАХ

V. 1. ПОКАЗАТЕЛИ САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ВОДОЕМА

Санитарно-бактериологическую оценку водоема проводят по следующим показателям:

- МАФАНМ – мезофильно-аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы (общее микробное число – ОМЧ или сапрофитные микроорганизмы);
- *Coli* – титр (определение титра бактерий группы кишечных палочек) – показатель фекального загрязнения;
- Наличие аэромонад и псевдомонад (показатели возможного неблагополучия водоемов по аэромонаду и псевдомонаду).

МАФАНМ определяют чашечным методом, методом предельных разведений, ориентировочно – пробой с резазурином натрия.

Чашечный метод

Сущность метода заключается в посеве определенного объема исследуемой воды или ее разведений в чашки Петри «глубинным» методом с последующим подсчетом выросших колоний. При этом исходят из того, что каждая колония является результатом разложения одной клетки.

Работа этим методом включает три этапа: 1) приготовление

разведений; 2) посев в чашки Петри; 3) подсчет выросших колоний. Разведения готовят в стерильном физрастворе, пользуясь постоянным коэффициентом разведения, равным 10. Для приготовления разведений физраствор разливают по 9,0 (4,5) мл в стерильные сухие пробирки. Затем 1,0 (0,5) мл исследуемой воды, взятой стерильной пипеткой, переносят в пробирку с физраствором – это первое разведение 1:10. Полученную в первом разведении суспензию тщательно перемешивают стерильной пипеткой. Этой же пипеткой берут 1,0 (0,5) мл полученного разведения и переносят во вторую пробирку с физраствором – это второе разведение 1:100. Таким же образом готовят и последующие разведения. Заранее приготовленный МПБ подогревают на водяной бане до 45°C. Стерильные чашки Петри раскладывают на столе и подписывают на крышках номер пробы, дату посева и степень разведения. Из каждой пробы воды и ее разведений производят посев по 1,0 мл параллельно на две чашки с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний.

С флаконов, содержащих исследуемую воду, снимают бумажные колпачки, вынимают пробки, горлышки фламбируют, после чего воду тщательно перемешивают осторожным продуванием воздуха через стерильную пипетку. Эту операцию производят перед приготовлением разведений. Стерильной пипеткой отбирают 1 мл воды (и ее разведений), вносят в стерильные чашки, слегка приоткрывая крышку. При этом для каждой пробы воды и для каждого разведения используется отдельная стерильная пипетка. Посевы из разведений можно делать одной пипеткой, но начинать следует обязательно из большего разведения. После внесения воды (и ее разведений) в эти чашки, с соблюдением условий стерильности, заливают остуженный питательный агар в количестве 10,0 – 12,0 мл. Воду быстро смешивают с агаром, осторожно наклоняя или вращая чашку. Необходимо полностью заливать дно чашки, избегая попадания среды на края и образования пузырьков воздуха. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности до застывания среды. Чашки с посевом помещают в термостат вверх дном. Посевы выращивают при температуре 27°C в течение 5 суток.

Подсчет колоний, выросших на поверхности и в глубине агара,

производят при помощи лупы. Если в чашке с наиболее высоким разведением выросло свыше 300 колоний и анализ нельзя повторить, то допускается подсчет колоний при помощи счетной пластинки с лупой при сильном боковом освещении. Подсчитывают не менее 20 квадратов площадью в 1 см² в разных местах чашки, выводят среднее арифметическое число колоний на 1 см², величину которого умножают на площадь чашки по формуле:

$$S = \pi \times r^2, \text{ где } r - \text{ радиус чашки Петри, см}$$

Результат подсчета колоний на каждой чашке выражают в количестве бактерий в 1, 0 мл с учетом произведенных разведений. За окончательное количество бактерий в 1, 0 мл исследованной воды или разведений принимают среднее арифметическое из результатов подсчета на двух параллельных чашках.

Учет количества колоний можно вести, ориентируясь на одну чашку, в случаях если на другой: а) при посеве из разведения выросло менее 20 колоний; б) ползучий рост бактерий, распространившийся на всю поверхность чашки или значительной зоны, маскирует рост других колоний; в) количество колоний превышает 300.

Метод предельных разведений

Метод включает приготовление разведений, посев в жидкую питательную среду МПБ, регистрацию наличия или отсутствия роста после инкубации и расчет наиболее вероятного числа клеток в единице объема исследуемой воды по таблице Мак-Креди (приложение 1).

Проба с резазурином натрия

Метод используют как ориентировочный, не исключающий определение микробного числа чашечным методом или методом предельных разведений. В зависимости от количества микроорганизмов в исследуемой пробе через определенное время происходит изменение синего цвета раствора резазурина натрия в фиолетовый, красный или обесцвечивание.

К 9,0 мл исследуемой воды добавляют 1,0 мл стерильного

мясопептонного бульона (МПБ) и 1,0 мл 0,01%-ного водного раствора резазурината натрия (резазурина). Содержимое пробирок перемешивают и пробы помещают в термостат при температуре 37° С. Одновременно ставится контроль – 9 мл дистиллированной воды + 1,0 мл МПБ + 1, 0 мл 0,01%-ного водного раствора резазурината натрия. Через каждый час визуально учитывают результаты. Изменение цвета в фиолетовый через 2 – 3 часа и в красный через 3 – 4 часа свидетельствует о неудовлетворительном, а в фиолетовый через 4 – 5 и красный (розовый) через 6 – 7 часов о сомнительном, в более поздние сроки – об удовлетворительном качестве воды. Цвет среды в контрольных пробирках должен быть синим. Раствор резазурината натрия готовят перед использованием.

У. 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ ГРУППЫ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ

Обнаружение в воде кишечных палочек следует рассматривать как показатель поступления в пруды животноводческих или городских сточных вод, а их количество позволяет судить о степени этого загрязнения. Наличие и количественный учет кишечных палочек определяют бродильным методом. Сущность метода заключается в посеве определенных объемов анализируемой воды в среды накопления и подращивания при температуре 37 +/- 0,5°С с последующими пересевом на плотную питательную среду Эндо и дифференциацией выросших бактерий. Пробы воды и их разведения высевают по 1,0 или 0,5 мл (в зависимости от количества среды в соотношении 1:10) в глюкозопептонную среду (ГПС) или среду ВНИИВС. Посевы инкубируют при температуре 43 +/- 5°С в течение 24 ч. Отсутствие помутнения, образование кислоты и газа в ГПС или помутнение и изменение цвета среды ВНИИВС из сиреневого в салатный дают основание предположить наличие бактерий группы кишечной палочки. В этих случаях производят пересев на среду Эндо. Посевной материал следует брать с таким расчетом, чтобы

выросли изолированные колонии. Для этого производят пересев бактериологической петлей штрихами по поверхности среды. Чашки с посевами помещают в термостат и инкубируют при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 24 – 48 ч.

При росте на среде Эндо темно-красных колоний с металлическим блеском их принадлежность к БГКП подтверждают микроскопированием мазков, окрашенных по Граму, и постановкой оксидазного теста. Наличие мелких неспорообразующих грамотрицательных палочек в мазках и отрицательный оксидазный тест позволяют дать заключение о содержании кишечной палочки в анализируемой пробе воды.

Для постановки оксидазного теста берут петлей 2 – 3 изолированные колонии, выросшие на среде Эндо, и наносят штрихом на фильтровальную бумагу, смоченную соответствующим реактивом (см. Приложение 3, п. 6). При отрицательной реакции на оксидазный тест фильтровальная бумага не изменяет цвета в течение 1–2 мин после нанесения бактериальной массы. При активной реакции на оксидазу фильтровальная бумага синееет в течение 1 – 2 мин.

Определение Coli-титра проводят установлением наименьшего количества воды, в котором находится одна кишечная палочка.

V. 3. ИНДИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ АЭРОМОНАД

Наличие *A. hydrophila* определяют следующим образом. Пробы воды и их разведения высевают по 0,2 мл на среду Эндо с молоком. Посевы инкубируют в термостате при температуре $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 24 – 48 ч. Рост матовых, слегка выпуклых колоний с зоной просветления позволяет предположить наличие аэромонад. Для подтверждения производят микроскопирование мазков, окрашенных по Граму, и проверяют на оксидазную активность. Наличие мелких неспорообразующих грамотрицательных палочек в мазках и положительный оксидазный тест позволяют дать заключение о содержании в исследуемой воде аэромонад.

Двухэтапный метод. Пробы воды и их разведения высевают по 0,5 мл в жидкую среду накопления, в состав которой входят сульфат магния, K_2HPO_4 , желатин, крахмал (среда А–1). Через 24 ч инкубирования посевов в термостате при температуре 30°C производят пересев на плотную дифференциально-элективную среду, в состав которой кроме перечисленных компонентов (среда А–1) входят водный раствор кристаллического фиолетового и трифенилтетрахлорид (среда А–2). Посевы на плотной элективной среде инкубируют в термостате при температуре 28–30°C в течение 42 – 48 ч. Характеристика колоний азромонад на плотной дифференциально-элективной среде (среда А–2): крупные с вишневым центром и узким бесцветным ободком.

V. 4. ИНДИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ ПСЕВДОМОНАД

Наличие псевдомонад определяют трехэтапным методом:

1. Накопление в жидкой среде обогащения.
2. Выделение на плотной селективно-дифференциальной среде.
3. Идентификация с использованием ограниченного набора наиболее необходимых тестов.

I этап: из разведений проб воды производят посев в среду обогащения – жидкую среду с трифенилтетразолхлоридом (ТТХ) (состав среды см. в Приложении 3). 8%-ный водный раствор ТТХ в дистиллированной воде прибавляют к среде в соотношении 1:10. Посевы инкубируют при температуре 42°C в течение 24 – 42 ч.

II этап: из среды обогащения производят пересев на плотную селективно-дифференциальную среду «блеск», разлитую в чашки Петри. Для получения изолированных колоний целесообразнее производить высев бактериологической петлей. Засеянные чашки помещают в термостат при температуре 28–37°C на 24 – 42 ч. Колонии *P. fluorescens* либо сплошь покрыты золотистым налетом, либо имеют многочисленные вкрапления, обрамленные светло-красным ободком или бесцветным венчиком. Характерным

признаком является появление золотистого или металлического блеска.

III этап: наиболее типичные колонии на среде "блеск" подвергают идентификации путем посевов на:

- 1) среду Кинга–А;
- 2) специальную среду для определения оксидации мальтозы с бромтимоловым синим;
- 3) среду для определения теста Хью – Лейфсона (оксидация и ферментация) с феноловым красным;
- 4) среду для определения нитрат-нитритредуктазы;
- 5) среду на реакцию цитохромоксидазы по Гэби и Хедли.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Расчет количества микробных клеток в пробе воды

Для расчета наиболее вероятного количества микробных клеток в 1 мл воды методом предельных разведений по таблице МакКреди первоначально составляют числовую характеристику, которая включает три цифры. Первая цифра (слева) показывает число пробирок в том последнем разведении, при высеве из которого во всех засеянных пробирках был отмечен рост. Две следующие цифры означают число пробирок, в которых отмечен рост микроорганизмов при посеве из двух последующих разведений. Затем по таблице находят наиболее вероятное число микроорганизмов, соответствующее данному значению числовой характеристики. Количество микробных клеток в 1 мл исследуемой воды получают путем умножения наиболее вероятного числа микроорганизмов на разведение, которое было взято для получения первой цифры числовой характеристики.

Пример 1

Разведения воды	0	1:10	1:100	1:1000	1:10 000
Число засеянных пробирок	4	4	4	4	4
Число пробирок, в которых обнаружен рост	4	4	3	1	0
Числовая характеристика	431	—	—	—	—
Наиболее вероятное число клеток микроорганизмов	16,5	—	—	—	—
Количество клеток микроорганизмов в 1 мл исследуемой воды	165	—	—	—	—

Пример 2

Разведения воды	1:100	1:1000	1:10000	1:100000
Число засеянных пробирок	3	3	3	3
Число пробирок, в которых обнаружен рост	3	3	2	0
Числовая характеристика	320	–	–	–
Наиболее вероятное число клеток микроорганизмов	9, 5	–	–	–
Количество клеток микроорганизмов в 1 мл исследуемой воды	9, 5	1000	–	–

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Необходимые для исследования аппараты, материалы, реактивы, среды

Для проведения испытания должны применяться следующие аппаратура, материалы, среды:

- банки широкогорлые с притертыми пробками;
- воронки стеклянные;
- колбы конические вместимостью 250 и 500 мл;
- склянки стеклянные вместимостью 100, 250 мл;
- посуда мерная лабораторная;
- пипетки на 1, 2, 5, 10 мл, градуированные через 0,2 мл;
- пипетки Мора на 50 и 100 мл;
- цилиндры на 100, 250 и 500 мл;
- пробирки бактериологические;
- поплавки для пробирок;
- мензурки на 250, 500 и 1000 мл;

- склянки для отбора проб с притертыми пробками или без них емкостью 250 и 500 мл;
- спиртовки;
- стаканы лабораторные;
- стекла предметные для микропрепаратов;
- чашки бактериологические (Петри);
- автоклав электрический;
- аппарат для стерилизации текучим паром с термометром до 110–120°C;
- весы аптечные;
- весы торзионные;
- дистиллятор Д-1-4;
- компаратор;
- лупа, увеличение x 5;
- микроскоп биологический МБИ или МБР;
- пеналы металлические для пипеток;
- пластинка с сеткой для счета колоний;
- потенциометр ЛПУ-01 или рН-метр;
- прибор для счета колоний бактерий;
- термостаты электрические с автоматическим терморегулятором;
- холодильник на 4–6°C;
- штатив для пробирок;
- часы песочные на 1, 2, 5, 15 мин;
- марля медицинская;
- вата гигроскопическая медицинская;
- вата хлопчатобумажная негигроскопическая;

СРЕДЫ:

- среда Эдо сухая питательная;
- висмут-сульфит агар;
- реактив для определения оксидазной активности бактерий (40 мг 1-тнафтола растворяют в 2,5 мл спирта-ректификата, прибавляют 7,5 мл дистиллированной воды и 40–60 мг диметил-п-фенилендсиамина. Готовят непосредственно перед употреблением. Хранить можно 2 – 3 дня в холодильнике во флаконе темного стекла с притертой пробкой. Темно-синий цвет реактива свидетельствует о его непригодности)

РЕАКТИВЫ:

- спирт этиловый;
- резазуритат натрия – 0,01%-ный водный раствор;
- раствор Люголя (йод 1, 0 мл, йодистый калий 2, 0 мл, дистиллированная вода 300 мл);
- фуксин цilia (основной фуксин 1, 0 мл, этиловый спирт 96° 10 мл; фенол 5, 0 мл, дистиллированная вода 100 мл);
- полужидкие среды с индикатором ВР и лактозой или глюкозой, готовятся согласно прописи на этикетке;
- диметил-пара-фенилендиамин;
- гидроокись калия;
- карбонат кальция;
- калий азотнокислый;
- калий сернокислый;
- магний сернокислый;
- 2-3-5 трифенилтетразол хлористый;
- калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный;
- натрий-аммоний фосфорнокислый двузамещенный 4-водный;
- магний хлористый 6-водный;
- индикатор бромтимоловый зеленый;
- индикатор розоловая кислота;
- индикатор бриллиантовый зеленый;
- генциан-фиолетовый метиленовый синий ~ ромтимоловый синий;
- фуксин основной;
- фуксин кислый;
- фенол;
- глюкоза, х.ч.;
- вода дистиллированная;
- йод кристаллический;
- йодистый калий;
- калий фосфорнокислый однозамещенный;
- кислота соляная;
- лактоза;
- масло иммерсионное для микроскопии;
- натрий гидроокись;
- натрий серноватистокислый;
- дрожжи прессованные;

- молоко коровье пастеризованное;
- агар-агар

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Рецепты основных питательных сред и реактивов для санитарно-бактериологического анализа

1. Глюкозопептонная среда

Среду готовят двух видов: нормальную и концентрированную.

Среда нормальной концентрации содержит:

Пептона	10 г
Натрия хлористого	5 г
Глюкозы	5 г
Воды дистиллированной	1000 мл

После растворения указанных ингредиентов добавляют индикатор (2 мл 1, 6%-ного спиртового раствора бромтимолового синего или 10 мл индикатора Андрaде), устанавливают рН, который должен быть в пределах 7,4 – 7, 6, и разливают среду в пробирки по 5 или 10 мл с поплавками или комочками ваты, стерилизуют при 112°С (0,5 кгс/см²) в течение 12 мин.

При приготовлении концентрированной среды количество всех ингредиентов, кроме воды, увеличивают в 10 раз.

2. Среда ВНИИВС

Пептона	10 г
Натрия хлористого	5 г
Лактозы	4 г
Воды дистиллированной	1000 мл

Смесь доводят до кипения, затем фильтруют и после остывания определяют рН, который должен быть в пределах 7,6 – 7,8. После этого добавляют индикаторы: 1 мл 5%-ного спиртового раствора розоловой кислоты и 2,3 мл 0, 1 %-ного водного раствора метиленовой сини.

Цвет готовой среды сиреневато-малиновый. Среду разливают в пробирки по 5 – 10 мл и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм или в аппарате Коха – дважды по 20 мин или путем трехкратного кипячения по 5 мин с интервалом 30 мин.

СРЕДЫ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ АЭРОМОНАД

1. Среда Эндо с молоком

К готовой среде Эндо, приготовленной по прописи на этикетке флаконов, добавляют 10%-ного стерильного обезжиренного молока.

2. Среда А-1 (жидкая среда накопления)

Воды дистиллированной	100, 0 мл
Сульфата магния	0, 02 г
К 2НРО ₄	0, 1 г
Натрия хлористого	0, 5 г
Желатина	1, 0 г
Крахмала растворимого	0, 2 г

Стерилизация при 0,5 атм. 15 мин.

После стерилизации добавляют 2,0 мл 0,01%-ного водного раствора кристаллического фиолетового, рН 7,2 – 7,4. При посевах больших объемов применяют концентрированную среду, в которой все ингредиенты, кроме воды, увеличены в 10 раз и которую прибавляют в исследуемый объект в соотношении 1:10.

3. Среда А-2 (плотная дифференциально-элективная)

Воды дистиллированной	
Агар-агара	
Сульфата магния	
К НР ₄	
Крахмала растворимого	0, 5 г
Желатина	5, 0 г

Стерилизация при 0,5 атм. в течение 15 мин.

СРЕДЫ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ПСЕВДОМОНАД

1. К готовой среде А-2 (плотная дифференциально-элективная для индикации аэромонад) добавляют 40000 ед. пенициллина.

2. Среда с трифенилтетразолхлоридом (ТТХ)

Пептона	2,0 г
Дрожжевого экстракта (по Г. К. Клине) или сухих дрожжей	15 мл 0,3 г
Двузамещенного фосфата калия	0,2 г

3. Глюкозопептонная среда (ГПС)

Среду готовят двух видов: нормальную и концентрированную.

Среда нормальной концентрации содержит:

Воды дистиллированной до 100,0 мл

Стерилизация при 0,5 атм. 15 мин, рН 7,1.

8%-ный водный раствор ТТХ в дистиллированной воде прибавляют в среду в соотношении 1:10.

4. Селективно-дифференциальная среда "блеск"

Мясопептонного агара 2% (стерильного)	100,0 мл
Молока нормализованного	10,0 мл
10%-ного водного раствора ТТХ	8,0 мл
Аргинина гидрохлорида	0,3 г

В расплавленный МПА прибавляют аргинин, раствор ТТХ и стерильное обезжиренное молоко. Все размешивают, затем разливают в чашки Петри.

5. Среда Кинг-А

Пептона	2,0 г
Агара	1,5 г
Глицерина	1,0 мл
Сульфата калия	1,0 г
Хлорида магния	0,14 г
Воды дистиллированной	до 100,0 мл

рН 7,2. Стерилизация при 0,5 атм. 15 мин. Разливают в чашки Петри.

6. Среда для определения теста Хью – Лейфсона

(оксидация, ферментация).

Модификация в одной пробирке.

Пептона	2,0 г
Хлорида натрия	5,0 г
K_2HPO_4	0,3 г
Агара	4,0-6,0 г
1,6% раствора фенолового красного	2,5 мл
Воды дистиллированной	1000,0 мл

После растворения ингредиентов в водяной бане или автоклаве разливают в пробирки ровно высотой столбика 6 см (независимо от диаметра пробирки), стерилизуют при 0,5 атм. 15 мин, застуживают столбиком.

7. Реакция цитохромоксидазы по Гэби и Хедли

Принят метод определения цитохромоксидазы с использованием диметилпарафенилендиамина, который в сочетании с альфа-нафтолом образует за счет окисдации цитохрома индофеноловый синий. 1%-ный раствор указанного реактива смешивают с 1%-ным спиртовым раствором альфа-нафтола в пропорции 2:1 непосредственно перед применением. Хранение обоих реактивов обязательно раздельно в холодильнике. Смесь реактивов наносят петлей на периферический участок макроколонии на среде Кинг-А или изолированную колонию на среде "блеск". Пигментированные колонии на среде Кинг-А и покрытые золотистым налетом на среде "блеск" предпочтительно наносить на фильтровальную бумагу, смоченную смесью реактивов. Положительный результат – посинение колонии или мазка на фильтровальной бумаге в течение 20 – 40 секунд. Позднюю реакцию не учитывают.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ихтиология. Итоги науки и техники. М.,1985: Т. 2. С. 93-183.
2. Вопросы паразитологии и патологии рыб. Л.,1987. С.14 - 20.
3. Бауер О. Н., Мусселиус В. А., Стрелков Ю. А. Ихтиопатология М.: Пищевая промышленность, 1977. С. 93-148.
4. Бауер О.Н. Инфекционные болезни лососевых в условиях искусственного выращивания (обобщение зарубежного опыта по этиологии, эпизоотологии, диагностике, профилактике и терапии за 1976 – 1982 гг.): обзорная информация, серия «Рыбохоз. использ. внутрен. водоемов». М.,1983. Вып.1. С. 1-21.
5. Бауер О. Н., Мусселиус В. А., Стрелков Ю. А. Болезни прудовых рыб. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. С. 30-35.
6. Вихман А. А. Биологические основы рыбоводства: паразиты и болезни рыб. М.: Наука 1984. С. 63-65.
7. Васильев Д. А. Микробиология рыбных продуктов: учебное пособие. Ульяновск, 2006. 12 с.
8. Гончаров Г. Д. Лабораторная диагностика болезней рыб. М.: Колос, 1973. С.119.
9. Методические указания по определению патогенности аэронад по степени ДНКазной активности, утв. Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 09. 12.97, № 13-4-2/1116.

Учебное издание

**Сидорова Наталья Анатольевна
Рыжков Леонид Павлович
Обухова Елена Сергеевна**

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В РЫБОВОДСТВЕ

Учебное пособие для студентов
эколого-биологического и агротехнического факультетов

Корректор *Л. П. Соколова*
Компьютерная верстка – *С. Г. Неёлова*

Подписано в печать 20.12.2013. Формат 60×84 1/16.
Бумага офсетная. 2,3 уч.-изд. л. Тираж 100 экз. Изд. № 403.

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего профессионального образования
ПЕТРОЗАВОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Отпечатано в типографии Издательства ПетрГУ
185910, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33

ISBN 978-5-8021-1978-5



9 785802 119785

Для заметок