

Министерство
сельского хозяйства
и продовольствия
Российской Федерации
(Минсельхозпрод России)

Утверждаю
Заместитель руководителя
Департамент ветеринарии
В.В.Селиверстов

Департамент ветеринарии

27.09.99г. №13-4-2/1742

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ по санитарно-бактериологической оценке рыбохозяйственных водоемов

1. Введение

Основным условием эффективного производства объектов аква-культуры в рыбохозяйственных водоемах является соблюдение ветеринарно-санитарных правил. Поскольку рыбохозяйственные водоемы и источники их водоснабжения зачастую находятся вблизи населенных пунктов и сельскохозяйственных предприятий, происходит поступление в них стоков (городских, животноводческих и др.), которые, наряду с накоплением в водоеме остатков не потребленного рыбой корма и их экскрементов при недостаточной проточности, приводят к загрязнению водоемов и эпизоотическому неблагополучию.

Ветеринарно-санитарный и особенно санитарно-бактериологический контроль рыбохозяйственных водоемов позволяет не только оценить степень их загрязнения, но и своевременно профилактировать инфекционные болезни.

2. Отбор и транспортировка проб воды и грунта

2.1. Отбор проб воды из больших водоемов производится в нескольких местах с учетом гидробиологических особенностей каждого участка (заросли, отмели, песчаные и заболоченные участки и т.д.). Водоемы однотипные по гидробиологическим условиям исследуют в одном-двух местах на расстоянии 3-4 м от берега. Пробы берут на глубине 10-15 см от поверхности и не менее 10-15 см от дна, в зимовальных прудах и в других водоемах в зимний период из проруби - на глубине 10-15 см от нижней поверхности льда. Для контроля над течением микробиологических процессов и состоянием рыбы в прудах отбирают также несколько проб по вертикали. Выемку проб осуществляют на притоке, в средней части и у водовыпуска. В неблагополучных по инфекционным заболеваниям водоемах пробы воды отбирают 1-2 раза в месяц через равные промежутки времени. При комплексных исследованиях сначала отбирают пробы для микробиологических, затем химических и гидробиологических исследований.

2.2. Способы отбора проб воды могут быть различными, но обязательным условием является соблюдение асептики и взятие материала в стерильную посуду. Пробы воды в количестве 500 мл отбирают в стерильную посуду с притертой каучуковой или корковой пробкой. Наполняют флаконы или склянки с таким расчетом, чтобы при транспортировке не замочить пробку. Посуду и батометры стерилизуют завернутыми в бумагу и разворачивают их непосредственно перед взятием проб воды.

2.3. Пробы воды исследуют не позднее, чем через 2 ч после отбора. При невозможности выполнения этих условий допускается проведение анализа не позднее, чем через 24 ч после отбора проб, сохраняя при этом пробы при температуре от 1 до 5°C. При этом обязательным условием является фиксация их формалином из расчета 2-3 капли (0,1 мл) 40%-ного раствора на 100 мл воды. Склянки с зафиксированными пробами плотно закрывают притертыми пробками, на которые надевают резиновые колпачки. Посуду с пробами упаковывают в сумки-холодильники или в ящики с теплоизолирующей прокладкой. При транспортировке проб избегают различных толчков, которые могут привести к намочению пробок.

2.4. Отбранные пробы сопровождаются документом, содержащим следующие сведения:

- точное месторасположение водоема;
 - дату отбора (с указанием года, месяца, числа и часа);
 - количество отобранных проб и место их отбора;
 - цель исследования: сделан ли отбор в порядке текущего санитарного надзора или по особым показаниям (сигналы об эпизоотологическом неблагополучии и т.д.);
- Сопроводительный документ подписывает лицо, отбравшее пробы, с указанием места работы и должности.

2.5. В стационарно неблагополучных по инфекционным заболеваниям рыбохозяйственных водоемах следует иметь микробиологическую характеристику грунта ложа водоема. Грунт обследуют до и после проведения оздоровительных мероприятий (дезинфекции, летования и др.).

Пробы грунта отбирают стеклянными трубочками или специальными колонками в емкости и транспортируют в лаборатории, соблюдая правила асептики. Учитывается масса ила, взятого для исследования (внесенного в емкость для разведения физраствором), для получения общепринятым методом дальнейших разведений определенной кратности (десятикратного, стократного и т.д. до 1 млрд.). Дальнейшие исследования проводят теми же методами, что и анализ воды. Расчет количества микроорганизмов ведется на 1,0 г поверхностного слоя грунта.

3. методы исследований

Санитарно-бактериологическую оценку водоема проводят по следующим показателям: МАФАНМ - мезофильно-аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы (общее микробное число - ОМЧ или сапрофитные микроорганизмы); коли-титр (определение титра бактерий группы кишечных палочек) - показатель фекального загрязнения; наличие аэромонад и псевдомонад (показатели возможного неблагополучия водоемов по аэромонаду и псевдомонаду).

3.1. Определение микробного числа (МАФАНМ КОЕ/см³ (г) воды (грунта)).

Микробное число определяют чашечным методом, методом предельных разведений или - ориентировочно, - пробой с резазурином натрия.

3.1.1. 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 резазурината натрия в фиолетовый, красный или обесцвечивание.

К 9,0 мл исследуемой воды добавляют 1,0 мл стерильного мясо-пептонного 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°C. 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 (розовый) 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.

3.1.2. Чашечный метод.

Сущность метода заключается в высеве определенного объема исследуемой воды или ее разведении в чашки Петри в глубину агара и последующем подсчете выросших колоний. При этом исходят из того, что каждая колония является результатом размножения одной клетки. Работа этим методом включает три этапа: приготовление разведений, посев в чашки Петри, 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 её 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 $s = \text{Пг}2$, где г - радиус чашки (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 исследуемой воды или разведении 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 значительные зоны, маскирует рост других колоний; в) количество колоний превышает 300.

3.1.3. 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 (см. приложение 1).

Чашечный метод определения количества микробных клеток обеспечивает большую точность по сравнению с методом предельных разведений, однако при посеве на МПА в чашки иногда происходит застывание агара микрофлорой, обладающей ползучим ростом. В этом случае метод предельных разведений является более приемлемым. Приготовление разведений производится точно так же, как и для чашечного метода. Посев в мясо-пептонный бульон производится при соблюдении условий стерильности в количестве 1,0 мл каждого разведения параллельно в 3-5 пробирок, содержащих по 5,0 мл МПБ. Результаты учитывают через 5 суток. После инкубации при температуре 27°C регистрируют наличие или отсутствие роста микроорганизмов визуально (помутнение среды, образование пленки, осадка). Наиболее вероятное количество микробных клеток в единице объема определяют с помощью таблицы, разработанной на основании методов вариационной статистики Мак-Креди (см. приложение 1).

3.2. Определение бактерий группы кишечных палочек (БГКП)

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 подрашивания при температуре 37±0,5°C с последующим 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 глюкозо-пептонную среду (ГПС) или среду ВНИИВС. Посевы инкубируют при температуре 43 ±0,5°C 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±0,5°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.б). 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 синее в течение 1-2 мин.

Определение титра БГКП (коли-титра) проводят установлением наименьшего количества воды, в котором находится одна кишечная палочка.

3.3. Индикация и количественный учет условно-патогенной для рыб микрофлоры.

3.3.1. 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 $28-30^\circ\text{C}$ в течение 42-48 ч. Характеристика колоний аэромонад на плотной дифференциально-элективной среде (среда А-2): крупные с вишневым центром и узким бесцветным ободком.

3.3.2. Индикация и количественный учет псевдомонад.

Наличие *P. fluorescens* 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.

Первый этап: из разведения 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.

Второй этап: из среды обогащения производят пересев на плотную селективно-дифференциальную среду "блеск", разлитую в чашки Петри. Для получения изолированных колоний целесообразнее производить высеивание бактериологической петлей. Засеянные чашки помещают в термостат при температуре $28-37^\circ\text{C}$ 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. Наиболее типичные колонии на среде "блеск" подвергают идентификации путем высевов: на среду Кинга-А; специальную среду для определения оксидации мальтозы с бромтимоловым синим; среду для определения теста Хью-Лейфсона (оксидация и ферментация) с феноловым красным, среду для определения нитрат-нитритредуктазы и на реакцию цитохромоксидазы по Гэби и Хедли.

4. Оценка результатов

4.1. Водоемы, используемые в рыбоводстве, условно разделяют на три категории (табл. i):

Таблица i

Категории водоемов по степени бактериальной обсемененности

Категории	Допустимый предел бактериальной обсемененности				Оценка
	Микробное число в 1 мл	Коли-индекс	Аэромонад	Псевдомонад	
Первая	$\leq 10^3$	5	0	0	Чистые
Вторая	10^3-10^5	10 П-	10 П-	10 П-	Загрязненные
Третья	$\geq 10^6$	10 П+	10 П+	10 П+	Грязные

Примечание:

П- Недопустимо наличие патогенных для рыб микроорганизмов

П+ Возможно наличие патогенных микроорганизмов

Определение патогенности выделенных штаммов - см. Методические указания по определению патогенности аэромонад по степени ДНКазной активности, утв. Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 09.12.97 г., № 13-4-2/1116.

- 4.2. Ветеринарно-санитарным требованиям отвечают водоемы первой категории (чистые). Водоснабжение рыбоводных водоемов осуществляется из водоемов первой категории.
- 4.3. Возможна эксплуатация в целях рыборазведения водоемов второй категории (загрязненные). В этой категории водоемов в течение сезона эксплуатации происходит колебание МАФАНМ от 102 - 1С)3 до 105 - 106.
- 4.4. В случае повышения МАФАНМ до 105- 106 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.
- 4.5. В водоемах с содержанием бактерий группы кишечной палочки более 10 микробных клеток в 1,0 мл (с коли-титром ниже 0,1, коли-индексом около 10.000) должны быть приняты меры к устранению причин фекального загрязнения воды.
- 4.6. Недопустимо использование для рыбоводства водоемов третьей категории (грязные), не приведенных в соответствие с санитарными требованиями. Это, как правило, стационарно неблагополучные по инфекционным заболеваниям рыб пруды, не полностью спускаемые или заполняемые водой с высокими показателями МАФАНМ и низким коли-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.
- С утверждением настоящих Методических указаний утрачивают силу "Наставление по санитарно-бактериологической оценке воды карповых рыбохозяйственных водоемов", утвержденное ГУВ МСХ СССР 19 апреля 1973 г. и "Рекомендации по санитарно-бактериологической оценке воды при содержании рыбы в зимовальных прудах", утвержденные ГУВ Госагропрома СССР 27 января 1988 г.

Приложение 1
К методическим указаниям по санитарно-
бактериологической оценке рыбохозяйственных
водоемов, утв. 27 сентября 1999 г.

Расчет количества микробных клеток в пробе воды

Для расчета наиболее вероятного количества микробных клеток в 1 мл воды методом предельных разведений по таблице Мак-Креди первоначально составляют числовую характеристику, которая включает три цифры. Первая цифра (слева) показывает число пробирок в том последнем разведении, при высеивании из которого во всех засеянных пробирках был отмечен рост. Две следующие цифры означают число пробирок, в которых отмечен рост микроорганизмов при засеивании 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 исследуемой воды	0	1:10	1:100	1:1000	1:10000
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 исследуемой 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	-	-

Наиболее вероятное количество клеток микроорганизмов в единице объема исследуемой воды (по Мак-Креди)

Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микробов при засеве параллельных пробирок				Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микробов при засеве параллельных пробирок				Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микробов при засеве параллельных пробирок			
	2	3	4	5		2	3	4	5		2	3	4	5
000	0,0	0,0	0,0	0,0	222	110	3,5	2,0	1,4	433	-	-	30,0	-
001	0,5	0,3	0,2	0,2	223	-	4,0		-	434	-	-	35,0	-
002	-		0,5	0,4	230	-	3,0	1,7	1,2	440	-	-	26,0	3,5
003	-		0,7	-	231	-	3,5	2,0	1,4	441	-	-	40,0	4,0
010	0,5	0,3	0,2	0,2	232	-	4,0			442	-	-	70,0	
011	0,9	0,6	0,5	0,4	240	-		2,0	1,4	443	-	-	140	-
012	-		0,7	0,6	241	-	-	3,0		444	-	-	160,0	-
013	-		0,9	-	300	-	2,5	1,1	0,8	451	-	-	-	4,0
020	0,9	0,6	0,5	0,4	301	-	4,0	1,4	1,1	450	-	-	-	5,0
021			0,7	0,6	302	-	6,5		1,4	500	-	-	-	2,5
022	-		0,9		303	-	-			501	-	-	-	3,0
030	-		0,7	0,6	310	-	4,5		1,1	502	-	-	-	4,0
031	-		0,9		311	-	7,5		1,4	503	-	-	-	6,0
040	-		0,9		312	-	11,5		1,7	504	-	-	-	7,5
041	-		1,2		313	-	16,5		2,0	510	-	-	-	3,5
100	0,6	0,4	0,3	0,2	313	-	9,5		1,4	511	-	-	-	4,5
101	1,2	0,7	0,5	0,4	321	-	15,0		1,6	512	-	-	-	6,0
102	-		0,8	0,6	322	-	20,0		2,0	513	-	-	-	8,5
103	-		1,0	0,8	323	-	30,0			520	-	-	-	5,0
110	1,3		0,5	0,4	330	-	25,0		1,7	521	-	-	-	7,0
111	2,0	1,1	0,8	0,6	331	-	45,0	3,5	2,0	522	-	-	-	9,5
112	-	-	1,1	0,8	332	-	110,0	4,0	-	523	-	-	-	12,0
113	-	-	1,3	-	333	-	140,0	5,0	-	525	-	-	-	15,0
120	2,0	1,1	0,8	0,6	340	-	-	3,5	2,0	524	-	-	-	17,5
121	3,0	1,5	1,1	0,8	341	-	-	4,5	2,5	530	-	-	-	8,0
122	-	-	1,3	1,0	350	-	-	-	2,5	531	-	-	-	11,0
123	-	-	1,6	-	400	-	-	2,5	1,3	532	-	-	-	14,0
130	-	1,6		0,8	401	-	-	3,5	1,7	537	-	-	-	17,5
131	-	-	1,4	1,0	402	-	-	5,0	2,0	534	-	-	-	20,0
132	-	-	1,7	-	403	-	-	7,0	2,5	535	-	-	-	25,0
140	-	-	1,4	1,1	410	-	-	3,5	1,7	540	-	-	-	13,0
141	-	-	1,7	-	411	-	-	5,5	2,0	541	-	-	-	17,0
200	2,5	0,9	0,6	0,5	412	-	-	8,0	2,5	542	-	-	-	25,0
201	5,0	1,4	0,9	0,7	413	-	-	11,0		543	-	-	-	30,0
202		2,0	1,2	0,9	414	-	-	14,0		544	-	-	-	35,0
203	-	-	1,6	1,2	420	-	-	6,0	2,0	545	-	-	-	45,0
210	6,0	1,5	0,9	0,7	421	-	-	9,5	2,5	550	-	-	-	25,0
211	13,0	2,0	1,3	0,9	423	-	-	17,0		551	-	-	-	35,0
212	20,0	3,0	1,6	1,2	422	-	-	13,0	3,0	552	-	-	-	60,0
213	-	-	2,0	-	424	-	-	20,0	-	553	-	-	-	90,0
220	25,0	2,0	1,3	0,9	430	-	-	11,5	2,5	554	-	-	-	100
221	70,0	3,0	1,6	1,2	431	-	-	16,5	3,0	555	-	-	-	180
					432	-	-	20,0	4,0					

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 рычажные общего назначения;
- весы торсионные;
- дистиллятор Д-1-4;
- компаратор;
- лупа, увеличение x5;
- микроскоп биологический МБИ или МБР;
- осветитель ОИ-19;
- пеналы металлические для пипеток;
- пластинка с сеткой для счета колоний
- потенциометр ЛПУ -01 или рН-метр;
- прибор для счета колоний бактерии;
- термостаты электрические с автоматическим терморегулятором
- холодильник электрический или газовый на 4-6°;
- штатив для пробирок;
- часы песочные на 1,2,5,15 мин;
- холодильники походные или ящики для транспортировки проб с теплоизоляцией и резиновыми мешками (для льда или теплой воды);
- шкаф сушильный лабораторный;
- марля медицинская;
- вата гигроскопическая медицинская;
- вата хлопчатобумажная негигроскопическая;
- среды: среда Эндо сухая питательная; висмут-сульфит агар;
- реактив для определения оксидазной активности бактерий (40 мг 1-нафтола растворяют в 2,5 мл спирта-ректификата, прибавляют 7,5 мл дистиллированной воды и 40-60 мг диметил-п-фенилендиамина. 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, йодистый калий 2,0, дистиллированная вода 300 мл);
- фуксин Циля (основной фуксин 1,0, этиловый спирт 96° 10 мл);
- фенол 5,0, дистиллированная вода 100 мл);
- полужидкие среды с индикатором ВР и лактозой или глюкозой готовится 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
Бромтимоловый 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 серноватистоокислый
Дрожжи прессованные
Молоко коровье пастеризованное
Агар-агар.

Приложение 3
*к Методическим указаниям по санитарно-
бактериологической оценке рыбохозяйственных
водоемов, утв. 27 сентября 1999 г.*

Рецепты основных питательных сред и реактивов для санитарно-бактериологического анализа

1. Глюкозо-пептонная среда (ГПС)

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 Андраде), 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°C (0,5 кгс/см) 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 5г

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.

Среда для индикации аэромонад:

1. Среда Эндо с молоком

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

2. Среда А-1 (жидкая среда накопления)

Воды дистиллированной 100,0 мл

Сульфата магния 0,02 г

K_2HPO_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 100 мл

Агар-агара 2,0

Сульфата магния 0,02 г

K_2HPO_4 0,1 г

Крахмала растворимого 0,5 г

Желатина 5,0 г

Стерилизация при 0,5 атм. в течение 15 мин. После этого добавляют 2,0 мл 10%-ного водного раствора трифенилтетразолхлорида, рН 7,4-7,6. Среду после остывания приблизительно до 45°C разливают в чашки Петри.

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. Калине) 15 мл

или сухих дрожжей 0,3 г

Двузамещенного фосфата калия 0,2 г

ТТХ 0,8 г

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

3. Селективно-дифференциальная среда "блеск"

Мясопептонного агара 2% (стерильного) 100,0

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.

4. 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.

**5. Среда для определения теста Хью-Лейфсона
(оксидация, ферментация)
Модификация в одной пробирке.**

Пептона 2,0 г

Хлорида натрия 5,0 г

K₂HPO₄ 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.

6. Реакция цитохромоксидазы по Гэби и Хедли.

Принят метод определения цитохромоксидазы с использованием диметилпарафенилендиамина, который в сочетании с альфа-нафтолом образует за счет оксидации 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.