

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПОЛІСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Факультет лісового господарства
та екології
Кафедра біоресурсів, аквакультури та
природничих наук

Кваліфікаційна робота
на правах рукопису

Філіпенко Петро Михайлович

УДК 637.075:579.842.1/2

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
“ВИКОРИСТАННЯ БАКТЕРІЙ ЯК ІНДИКАТОРІВ САНІТАРНОГО
СТАНУ АКВАРІУМІВ З ЗАМКНЕНОЮ СИСТЕМОЮ ОЧИСТКИ
ВОДИ”**

207 – водні біоресурси та аквакультура

Подається на здобуття наукового ступеня магістр

кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело _____ П. М. Філіпенко

Керівник роботи
Пінкіна Тетяна Василівна
к. б. наук, доцент

Житомир – 2021

АНОТАЦІЯ

Філіпенко П.М. Використання бактерій як індикаторів санітарного стану акваріумів з замкненою системою очистки води. – Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня магістра за спеціальністю 207 – «Водні біоресурси та аквакультура». – Поліський національний університет, Житомир, 2021.

Використана нами в даній роботі процедура відновлення життєздатності клітин, пошкоджених санацією води, може дати уявлення про реальну присутність *E.coli* та інших бактерій коліформних у воді акваріумів з різними гідробіонтами. Це дозволяє рекомендувати обґрунтовані мікробіологічні показники та нормативи для оцінки гігієнічного стану води акваріумів.

Особливу увагу дослідники приділяють об'єктам аквакультури. Існує безліч різних методів ведення аквакультури в усьому світі, починаючи від інтенсивних комерційних господарств у ЄС та закінчуючи численними дрібними господарствами Індії, В'єтнаму, Латинської Америки тощо. Потенційні ризики біологічної безпеки, пов'язані з аквакультурою, значні, насамперед через спалахів захворювань, пов'язаних із вживанням заражених продуктів аквакультури [1, 21] та підвищенням стійкості бактеріальних патогенів до антибіотиків в умовах аквакультури [2, 22, 23, 24].

Гігієнічний контроль таких об'єктів дуже складний. На даний момент для цих об'єктів не розроблено принципів мікробіологічного контролю води. Вода подібних об'єктів оцінюється за вимогами, що висуваються до води відкритих водойм.

Ключові слова: санітарно-мікробіологічні норми, акваріум, бактерії, аквакультура, риба, черепаха.

SUMMARY

Filipenko P.M. The use of bacteria as indicators of the sanitary condition of aquariums with a closed water purification system. - Qualification work on the rights of the manuscript.

Qualification work for a master's degree in specialty 207 - "Aquatic Bioresources and Aquaculture". - Polissya National University, Zhytomyr, 2021.

The procedure used by us in this work to restore the viability of cells damaged by water remediation, can give an idea of the real presence of *E. coli* and other coliform bacteria in aquariums with different aquatic organisms. This allows us to recommend sound microbiological indicators and standards for assessing the hygienic condition of aquarium water.

Researchers pay special attention to aquaculture facilities. There are many different methods of aquaculture around the world, from intensive commercial farms in the EU to numerous small farms in India, Vietnam, Latin America and more. The potential biosecurity risks associated with aquaculture are significant, primarily due to disease outbreaks associated with the consumption of contaminated aquaculture products [1, 21] and increased resistance of bacterial pathogens to antibiotics in aquaculture [2, 22, 23, 24].

Hygienic control of such facilities is very difficult. At present, the principles of microbiological control of water have not been developed for these facilities. The water of such facilities is assessed according to the requirements for open water.

Key words: sanitary and microbiological norms, aquarium, bacteria, aquaculture, fish, turtle.

ЗМІСТ

ВСТУП		5
РОЗДІЛ 1	АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ТА ОБГРУНТУВАННЯ ТЕМИ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ	9
	1.1 Загальна характеристика водяних об'єктів, що підлягають гігієнічному контролю	9
	1.2 Методи виділення та оцінки чисельності коліформних бактерій у водних зразках	10
РОЗДІЛ 2	УМОВИ ТА МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	13
	2.1. Місце, умови та методика проведення досліджень	13
РОЗДІЛ 3	РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГРУНТУВАННЯ	19
	3.1 Загальне мікробне число та вміст коліформних бактерій у воді акваріумів з різними гідробіонтами	19
	3.2 Виділення коліформних бактерій та створення колекції штамів	20
ВИСНОВКИ		24
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ		25
ДОДАТКИ		28

ВСТУП

Актуальність роботи. Сучасні об'єкти аквакультури конструюються із замкнутим оборотом води, її фільтрацією та санацією, наприклад, озоном та УФ-випромінюванням. Це призводить до формування специфічних мікробіоценозів у санованій воді.

У сучасній науковій літературі є багато даних про присутність у подібних біоценозах патогенних та умовно-патогенних бактерій, насамперед ентеробактерій, здатних вплинути на здоров'я об'єктів аквакультури, обслуговуючого персоналу та відвідувачів. Тому підприємства аквакультури є як ветеринарного, і санітарного нагляду.

До цього моменту щодо об'єктів аквакультури в Російській Федерації не існувало спеціально розроблених критеріїв гігієнічного стану подібних об'єктів. При оцінці безпеки води використовуються гігієнічні показники та нормативи для води поверхневих водойм рекреаційного типу (СанПін 2.1.5.980-00), зокрема загальні та термотолерантні коліформи та *E.coli*. Вимоги цього документа важко здійснити за умов аквакультури за умов замкнутих систем із постійним високим рівнем фекального зараження. Необхідно розробляти адекватніші вимоги, які враховують специфічні особливості даних водних об'єктів.

Проте групою дослідників було показано, що присутність *E.coli* у санованій акваріумній воді дуже низька, на межі виявлення [1, 2]. Безперечно, безперервний режим санації (озонування, ультрафіолетове випромінювання, лікувальні препарати для гідробіонтів, що вносяться у воду), впливають на якісний та кількісний склад коліформних бактерій. Тому основними представниками коліформних бактерій є не *E.coli*, а *Klebsiella* та *Citrobacter* [1].

Відсутність *E.coli* у складі коліформ в акваріумній воді можна пояснити їх більш високою чутливістю до процедури санації води та появи сублетальних та летальних ушкоджень, що призводить до їх витіснення із

накопичувальних культур при виявленні за офіційним методом аналізу [3, 4, 5]. Можна припустити, що склад коліформних бактерій акваріумної води може проводити тип гідробіонтів (риби, молюски, членистоногі, рептилії, теплокровні тварини).

Мета досліджень. Виявляється, що життєздатність пошкоджених бактерій можна відновити проведенням першої стадії аналізу процедури відновлення.

Розроблена процедура відновлення життєздатності коліформ дозволяє повернутися до питання про присутність *E.coli* у акваріумній воді, що санується. Це питання на сьогоднішній день є вкрай актуальним у зв'язку з нагальною необхідністю вибору адекватних, коректних і, головне, обґрунтованих гігієнічних показників акваріумної води.

У зв'язку з вище викладеною метою цієї роботи було вивчення складу коліформних бактерій у воді акваріумів з різними гідробіонтами.

Для цього було поставлено такі завдання:

1. Виділити коліформних бактерій із води акваріумів із рибами, рептиліями та теплокровними тваринами з використанням стадії відновлення життєздатності бактерій; оцінити вміст коліформних бактерій, очистити ізоляти та сформувати колекцію штамів.

2. Провести ідентифікацію штамів колекції за допомогою високоефективного набору для ідентифікації МІКРОЛАТЕСТ ENTEROtest 24N (Чехія).

3. Дати рекомендації на вибір мікробіологічних показників з метою оцінки гігієнічного стану акваріумної води.

Наукова новизна дослідження:

1. Установлено якісний склад коліформних бактерій безперервно санованої води вивчених акваріумів з рибами, черепахами та видрами практично не відрізняється. Представники пологів *Citrobacter* та *Klebsiella* є переважаючими.

2. Коліформні бактерії виду *E.coli* не характерні для акваріумів із замкнутою системою обороту води і безперервною санацією ультрафіолетовим опроміненням незалежно від типу гідробіонтів, що містяться в них.

Практична цінність:

Використана нами в даній роботі процедура відновлення життєздатності клітин, пошкоджених санацією води, може дати уявлення про реальну присутність *E.coli* та інших бактерій коліформних у воді акваріумів з різними гідробіонтами. Це дозволяє рекомендувати обґрунтовані мікробіологічні показники та нормативи для оцінки гігієнічного стану води акваріумів.

Отримані дані свідчать про відсутність специфічних пологів коліформних бактерій, пов'язаних із природою гідробіонтів. Це дозволяє застосовувати єдині критерії гігієнічної оцінки акваріумної води за мікробіологічними показниками.

Предмет досліджень. Вода акваріумів.

Об'єкт досліджень виділення коліформних бактерій із води акваріумів із рибами та рептиліями з використанням стадії відновлення життєздатності бактерій

Методи дослідження. Мікробіологічні, токсикологічні, морфометричні, фізіолого-біохімічні, статистичні.

Перелік публікацій автора за темою дослідження:

1. **Філіпенко П. М.**, Мисько Я. В., Кривенко Д. А. Загальне мікробне число та вміст коліформних бактерій у воді акваріумів з різними гідробіонтами. *Проблеми аграріїв та перспективи сільськогосподарського виробництва*: зб. тез доповідей наук.-практ. конф., 03 грудня. 2021 р. Житомир. С.72 -74.

2. Кривенко Д. А., Мисько Я. В., **Філіпенко П. М.**, Кравчук В. В. Оцінка стану фітопланктону річки Случ. *Магістерські читання – 2021: четверта студентська конференція*: зб. тез доповідей наук.-практ. конф., 10 грудня. 2021 р. Житомир. С.72 -74.

3. Кривенко Д. А., Мисько Я. В., **Філіпенко П. М.** Загальні принципи оптимізації структури об'єктів водного господарства. *Водні і наземні екосистеми та збереження їх біорізноманіття – 2021*: зб. тез доповідей наук.-практ. конф., 10 червня 2021 р. Житомир. С.115 -116.

4. Кривенко Д. А., Мисько Я. В., **Філіпенко П. М.** Екологічно орієнтоване ведення водного господарства, як умова збереження біорізноманіття водних екосистем. *Екологія. Наука. Практика – 2021*: зб. тез доповідей наук.-практ. конф., 21 травня 2021 р. Житомир. С. 93 -95.

Структура та обсяг роботи. Основний зміст кваліфікаційної роботи викладено на 27 сторінках комп'ютерного тексту, містить вступ, 3 розділи, висновки, список використаних джерел 20 найменувань, у тому числі 15 – на іноземних мовах. Текст ілюстровано 5 рисунками і 2 таблицями.

РОЗДІЛ 1. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ТА ОБГРУНТУВАННЯ ТЕМИ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ

1.1 Загальна характеристика водяних об'єктів, що підлягають гігієнічному контролю

Водні об'єкти, що підлягають гігієнічному контролю, є центральною системою міського водопостачання: відкриті водоймища, басейни, аквапарки, акваріуми та підприємства аквакультури. Причинами їхнього гігієнічного контролю є бацилоносительство людей і тварин, потрапляння збудників у каналізаційні стоки і, як наслідок, забруднення води патогенами шлунково-кишкових інфекцій сальмонелами, шигелами, вібріонами, ешерихіями.

Гігієнічними показниками зараження води патогенами є санітарно-показові бактерії шлунково-кишкового тракту людей та гідробіонтів. Санітарно-показові бактерії - це бактерії, що живуть в організмі людини та тварин (у нашому випадку гідробіонтів), у тих же органах та системах, у яких здатні існувати патогенні мікроорганізми. Санітарно-показові бактерії потрапляють у зовнішнє середовище разом з екскретами, екскрементами та каналізаційними стоками. Як санітарно-показові бактерії найчастіше використовують «загальні коліформи», «термотолерантні коліформи», *Enterobacteriaceae*, *E.coli*, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*.

Загальні коліформи - це аеробні та факультативно-анаеробні, грамнегативні, неспороутворюючі, дрібні паличкоподібні бактерії, здатні рости в живильних середовищах у присутності жовчних солей, і зброджують лактозу з утворенням кислоти і газу протягом 24-48 годин при температурі $37+10^{\circ}\text{C}$). Термотолерантні коліформні бактерії мають всі характеристики загальних коліформ, додатково вони здатні ферментувати лактозу з утворенням кислоти і газу при температурі $(44+0,5)^{\circ}\text{C}$ протягом 24 годин. Визначення коліформних бактерій у документах різних країн у цілому подібне [4, 5, 6].

E.coli є термотолерантною коліформною бактерією, яка, утворює індол

з триптофану при температурі $44 \pm 0,50\text{C}$, дає позитивний результат у тесті з метил-рот, не утворює ацетилметилкарбінол (негативна реакція в тесті Фогеса-Проскауера); вона не здатна використовувати цитрат як єдине джерело вуглецю [5, 7].

Об'єктами державного гігієнічного контролю також є великотоннажні акваріуми Океанаріумів та підприємства аквакультури. Ці об'єкти мають ряд характеристик, які принципово відрізняють їх від відкритих водойм, басейнів та аквапарків, а саме:

- вони мають замкнуту систему циркуляції води та використовують безперервний режим очищення та дезінфекції (УФ, озон) води;
- у воду цих об'єктів постійно надходять коліформні фекальні бактерії, присутні у шлунково-кишковому тракті гідробіонтів;
- у таких замкнутих умовах формуються специфічні мікробіоценози (біоплівки, обростання), здатні існувати в режимі постійної санації води;
- у воду таких об'єктів регулярно потрапляють терапевтичні препарати (антибіотики, барвники), що використовуються для лікування гідробіонтів;
- у воду таких об'єктів надходять кишкові бактерії через руки персоналу, інструменти, обладнання, корми для тварин.

Гігієнічний контроль таких об'єктів дуже складний. На даний момент для цих об'єктів не розроблено принципів мікробіологічного контролю води. Вода подібних об'єктів оцінюється за вимогами, що висуваються до води відкритих водойм [8]. Таким чином, єдиної обґрунтованої думки щодо гігієнічного контролю води подібних об'єктів на сьогоднішній день не існує.

1.2. Методи виділення та оцінки чисельності коліформних бактерій у водних зразках

Метод виділення та оцінки чисельності коліформних бактерій та *E.coli* наведено в російському державному документі – [4] та в стандартах ISO [5, 6].

Для виділення загальних коліформних бактерій обсяг води відфільтровують через мембранні фільтри. Фільтр переносять на середовище

Ендо (тверде діагностичне середовище з лактозою та сульфітом). Чашки з посівами поміщають термостат дном вгору і інкубують при температурі $(37 + 1) ^\circ\text{C}$ протягом 18 - 24 год.

Для обліку вибирають фільтри, на яких вирости ізольовані типові для лактозопозитивних бактерій колонії: темно-червоні, червоні, з металевим блиском і без нього, слизові оболонки з темно-малиновим центром з відбитком на звороті фільтра.

Виконують оксидазний тест, і за наявності оксидазонегативних колоній дають позитивну відповідь про наявність коліформ.

Термотолерантні коліформні бактерії виявляються подібним чином. Після постановки оксидазного тесту, виконують посів типових оксидазонегативних колоній на одну з підтвердних середовищ (має бути прогріта до температури $44 ^\circ\text{C}$) з лактозою. При числі колоній менше 15 вони досліджуються всі, а понад 15 - підраховують колонії різних типів і досліджують по 4 - 5 колоній кожного з них. Посіви відразу ж переносять у термостат та інкубують при температурі $(44 + 0,5) ^\circ\text{C}$ протягом $(24 + 1)$ год. При виявленні кислоти та газу дають позитивну відповідь.

Якщо зразки води є каламутними та містять велику кількість суспендованих частинок, спосіб фільтрації виконати неможливо. У цьому випадку використовують складніший титраційний метод (метод НВЧ) і засів проводять у накопичувальні середовища [4, 6]. Як типові накопичувальні середовища для виділення коліформ використовують бульйонні середовища з додаванням лактози, жовчних солей та індикатором споживання лактози (феноловий червоний, бромтимоловий синій та ін.).

Засів накопичувальних середовищ при титраційному методі проводять кількостями посівного матеріалу, що десятикратно знижуються, в потрібній повторності.

За наявності в середовищі накопичення помутніння і газоутворення, а при висіві на середовище, що підтверджує, типових для лактозопозитивних

колоній (темно-червоних з металевим блиском або без нього) виконують оксидазний тест. При виявленні оксидазонегативних колоній дають позитивну відповідь наявності загальних коліформних бактерій у цьому обсязі проби. У разі сумнівів та виявлення нетипових за кольором та морфології колоній підтверджують їх здатність до газоутворення при посіві 1 - 2 колоній кожного типу на середовище з лактозою з подальшою інкубацією посівів при температурі $(37 + 1) ^\circ\text{C}$ протягом 24 год.

Для визначення термотолерантних коліформних бактерій працюють із секторами середовища Ендо, де виростили типові лактозопозитивні колонії, а в середовищі накопичення виявлено газоутворення. Роблять посів 2 - 3 колоній кожного типу з кожного сектора в пробірки лактозний бульйон, нагрітий до $44 ^\circ\text{C}$). Посіви інкубують при температурі $(44 + 0,5) ^\circ\text{C}$ протягом 24 год. дають позитивну відповідь на наявність у цьому обсязі проби води термотолерантних коліформних бактерій.

Одночасно з термотолерантними коліформними бактеріями підтверджують наявність *E.coli*, для чого по 2 - 3 типові колонії з кожного сектора засівають паралельно в дві пробірки: з лактозним середовищем і середовищем, що містить триптофан, для встановлення здатності ферментувати лактозу до кислоти і газу при температурі $^\circ\text{C}$ та продукувати індол. Позитивну відповідь про присутність *E.coli* дають за наявності кислоти та газу в лактозному середовищі та при утворенні індолу з триптофану.

Чисельність коліформ та *E.coli* визначають за розподілом присутності чи відсутності коліформ у накопичувальних культурах. Для цього використовують статистичні таблиці МакКреді. Чисельність коліформ та *E.coli* виражають у вигляді «найбільш ймовірного числа» [4, 9].

РОЗДІЛ 2. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом дослідження служила вода прісноводного акваріума №4. Місткість акваріума – 3,3 тони. Температура води – 17-18°C. В акваріумі міститься риба. Режим годівлі – 5 разів на тиждень (жельований корм – 750 г, риба – 150 г). Чищення акваріума та ґрунту проводиться 2 рази на місяць із заміною води в обсязі 30 %.

Системи життєзабезпечення акваріума замкнута. Вода з акваріума трубопроводом надходить у мішковий фільтр для механічного очищення, і далі в буферну ємність. Далі вода подається за допомогою насоса системою трубопроводу на 2 біофільтри, заповнених пластиковими «спіралями», покритими активним мулом. Очищена вода санується шляхом постійного опромінення ультрафіолетом. Потужність УФ-стерилізатора 225Вт, інтенсивність випромінювання 65мДж/см².

Проби води (близько 0,5 л) відбирали у стерильну ємність безпосередньо з акваріума.

Акваріум №1-закритого типу. Об'єм акваріума - 600 л. Температура води 25°C. В акваріумі міститься черепахи. Режим годування - 3 рази на тиждень (по 40-80 г риби або індички). Чищення акваріума та ґрунту проводиться 2 рази на місяць із заміною води в обсязі 30%.

Система життєзабезпечення акваріума замкнута. Вода з акваріума по забірних трубках для механічного та біологічного очищення потрапляє на 2 каністрових фільтри, де проходить через кілька шарів фільтруючих матеріалів (великозерниста, дрібнозерниста губки, керамічні трубочки та кульки). Санація води проводиться за рахунок постійного опромінення ультрафіолетом. Потужність УФ-стерилізатора – 55 Вт.

Проби води відбирали безпосередньо із акваріума.

Визначення загального мікробного числа (ЗМЧ) проводили методом прямого висіву десятикратних розведень стандартний живильний агар (HiMedia, Індія). Посіви культивували при 30°C протягом 3 діб. Для

підрахунку вибирали чашки з числом колоній не вище 500.

Визначення чисельності та виділення коліформних бактерій проводили протягом перших кількох годин після відбору проб. Відновлення життєздатності бактерії здійснювали додаванням до живильного середовища триптон-соєвого бульйону з дріжджовим екстрактом (HiMedia, Індія) у співвідношенні 1:1. Час інкубації – 60 хвилин [10].

Виявлення та оцінку чисельності коліформ проводили титраційним методом відповідно до [4, 5, 6]. Чисельність коліформ виражали як найбільш ймовірного числа. Для цього з досліджуваної води після ретельного перемішування робили десятиразові розведення за допомогою стерильного фізіологічного розчину для засіву в накопичувальне середовище – лактозо-пептонний бульйон (лактоза, пептон та індикатор споживання лактози - бромтимоловий синій).

Коліформні бактерії є лактозопозитивними, в результаті їх розмноження утворюється значна кількість органічних кислот, що призводить до зниження рН та зміни кольору середовища з зеленого на жовтий (рис. 2.1).

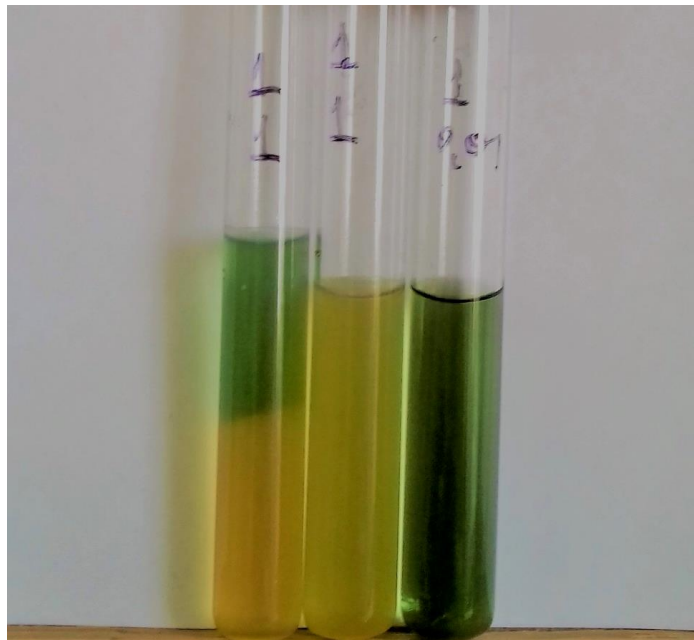


Рис. 2.1. Накопичувальні культури коліформ у лактозо-пептонному бульйоні.

Через 22-24 години при 37⁰С культивування з пожовклих накопичувальних культур робили висів на тверде діагностичне середовище

Ендо в чашках Петрі. Посіви культивували при 37⁰С 16-18 годин. Склад середовища Ендо (г/л): панкреатичний гідролізат рибного борошна – 12,0; дріжджовий екстракт – 1,0; натрію хлорид – 3,4; Д-(+)-лактоза – 10,0; натрію сульфат безводний 0,8; натрію фосфат 3-заст. 12-водний – 0,5; основний фуксин 0,2; агар - 10,0; рН 7,4±0,2.

Відповідно до [4, 5, 6] коліформні бактерії - це грамнегативні, оксидазо-негативні, що не утворюють спор палички, здатні рости на диференціальних лактозних середовищах і ферментують лактозу до кислоти та газу при температурі (37 + 1) °С протягом 24-48 год. На середовищі Ендо вони виростають у вигляді слизових колоній малинового, темно-червоного або червоного кольору, з металевим блиском і без нього, іноді з темно-малиновим центром (рис. 2.2).

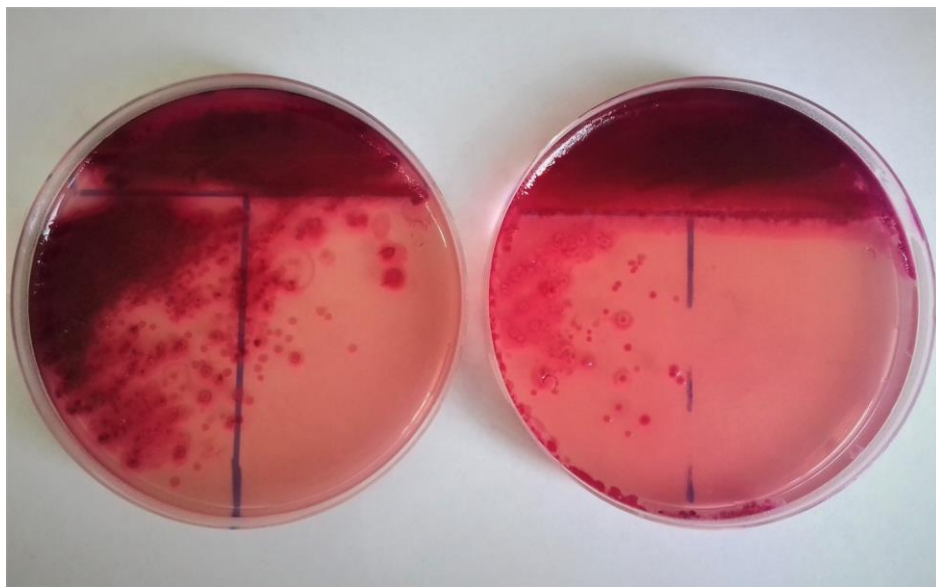


Рис. 2.2 Колонії коліформних бактерій серед Ендо.

Очищення ізолятів коліформ та створення колекції штамів. Для підтвердження належності підозрілих колоній до загальних коліформ, ставили оксидазний тест, далі перевіряли здатність утворення кислоти та газу на лактозі в рідкому середовищі Гісса з поплавцями.

Для підтвердження приналежності ізолятів до термотолерантних коліформ перевіряли здатність утворення кислоти і газу при 44⁰С в лактозо-пептонному середовищі Гісса з поплавцями.

Для віднесення ізолятів термотолерантних коліформ до виду *E.coli* перевіряли здатність утворення індолу триптофана.

Для оцінки чисельності становили остаточний розподіл присутності/відсутності коліформних бактерій у накопичувальних культурах, зашифровували його і за таблицею МакКреді розраховували вміст коліформ у воді та обростання.

Для складання колекції використовували ізоляти загальних, термотолерантних коліформ та *E.coli*. Їх очищали клонуванням на живильному агарі та використовували для ідентифікації. Штами підтримували на живильному агарі при кімнатній температурі, пересівали 1 раз на 2 тижні.

Ідентифікація штамів коліформних бактерій за допомогою МІКРОЛАТЕСТ ENTEROtest 24 N (Чехія). Набір ЕНТЕРОтест 24 Н [11] призначений для біохімічної ідентифікації мікроорганізмів без додавання реактивів після інкубації. Він являє собою пластмасові планшети, в лунках яких знаходяться висушені живильні середовища. Тестування проводиться за 24 ознаками:

- наявність ферментів: уреазі (URE), β -галактозидази (ONP), β -глюкуронідази (GLR), β -ксилоксидази (bXY), аргінін(ARG)-, орнітин(ORN)-, лізин(LYS)-декарбоксилази;

- споживання джерел вуглецю: мелібіози (MLB), целобіози (CEL), лактози (LAC), сахарози (SUC), раффінози (RAF), арабітолу (ART), сорбітолу (SOR), манітолу (MAN), дульциту (DUL), адонітолу (ADO), інозиту (INO), цитрату (SCI), трегалози (TRE), малонату (MAL), саліцину (SAL) та ескуліну (ESL);

- освіта сірководню (H_2S).

Схема проведення тестів представлена рис. 2.3. Перед аналізом вирощували 24 годинні культури досліджуваних штамів на живильному агарі при 37°C. Далі готували суспензії у фізіологічному розчині з каламутністю 1 од за шкалою Макфарланд.

Суспензію вносили у лунки стрипу по 0,1 мл. У лунки з тестами – URE, ARG, ORN, LYS, H₂S вносили по 2 краплі стерильного вазелінового масла. Інокульований стрип інкубували протягом 24 годин при температурі 37°C. Зовнішній вигляд стрипу після інкубації подано на рис. 2.4.

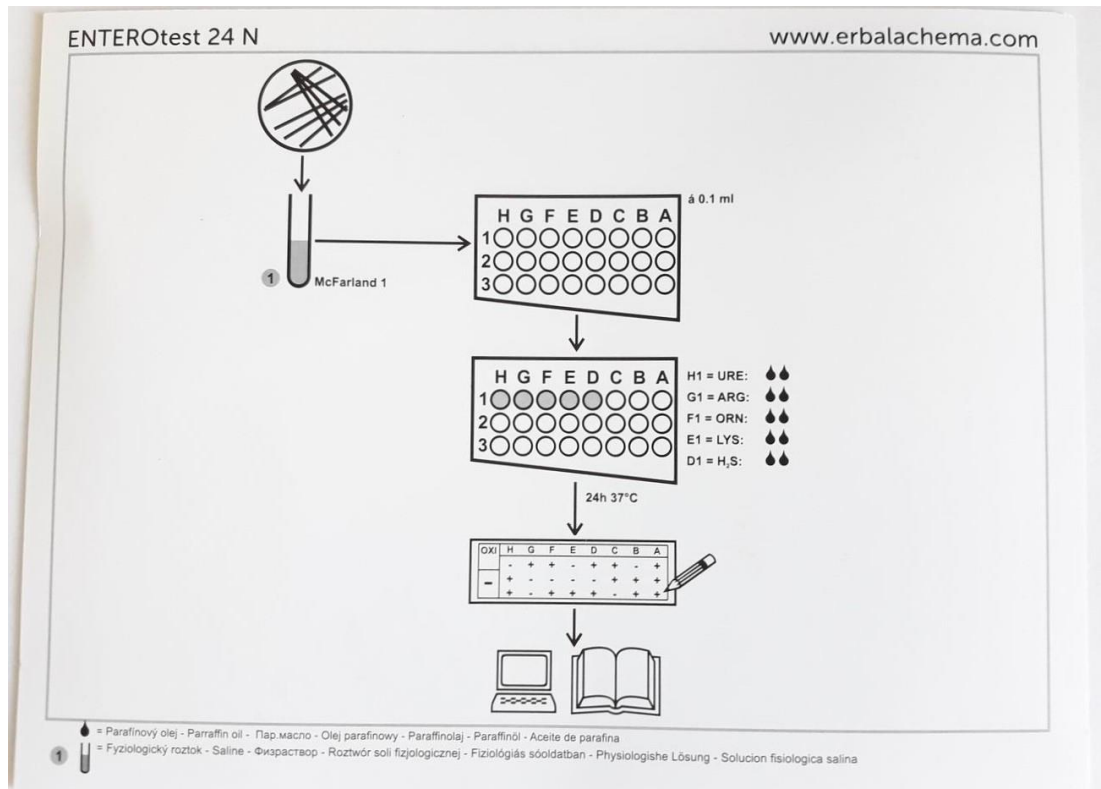


Рис. 2.3 Схема проведення тесту



Рис. 2.4 Зовнішній вигляд стрипу після інкубації

Для реєстрації результатів у тестах використовували кольорову шкалу [11] для ЕНТЕРОтесту24 Н (рис. 2.5).

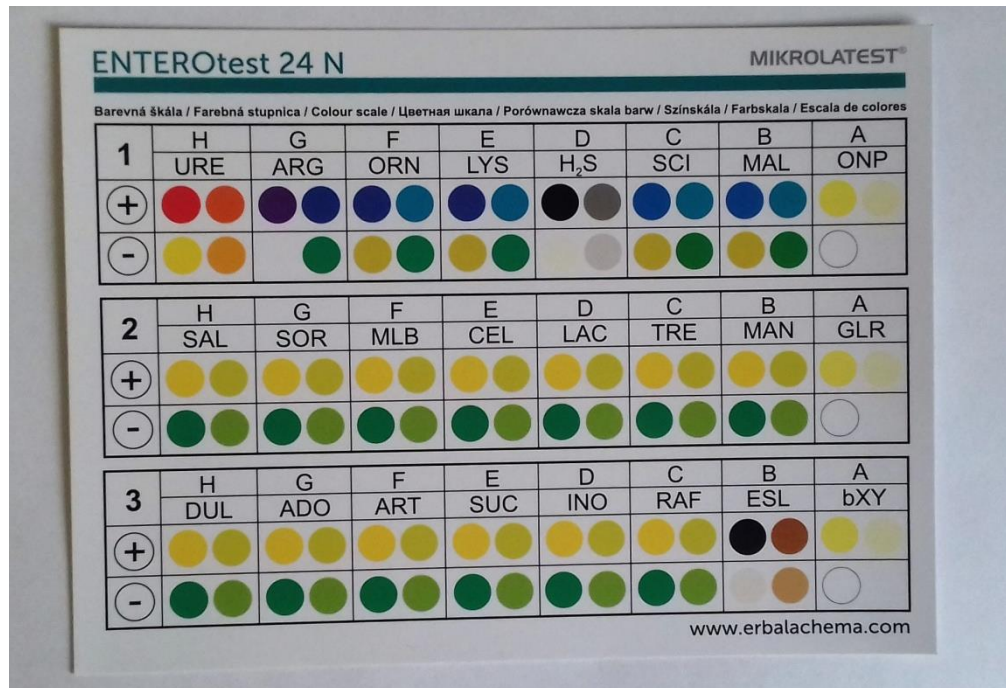


Рис. 2.5 Кольорова шкала для ЕНТЕРОтесту24 Н.

Індивідуальний профіль кожного штаму дозволяє оцінити:

- досягнутий ступінь дискримінації видів,
- процент ідентифікації (% id), який показує, наскільки близько отриманий профіль відповідає зазначеному таксону порівняно з іншими таксонами, включеними до банку даних; %id \geq 99 - таксон відмінно відрізняється від інших таксонів; %id \geq 95 - таксон дуже добре відрізняється від інших таксонів; %id \geq 90 - таксон задовільно відрізняється з інших таксонів; %id $<$ 90 - таксон незадовільно відрізняється з інших таксонів.

- Т індекс (Tin) – індекс типовості, який показує, наскільки близько встановлено профіль відповідає більшості типових реакцій зазначеного таксона. Його величина обернено пропорційна кількості атипівих тестів. Т-індекс = 0.75 - типовий штам; Т-індекс \geq 0.50 менш типовий штам; Т-індекс \geq 0.25 – атипівий штам; Т-індекс $<$ 0.25 – нетипівий штам.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1 Загальне мікробне число та вміст коліформних бактерій у воді акваріумів з різними гідробіонтами

Проведено кількісну оцінку загального мікробного числа досліджених зразків води, загальних та термотолерантних коліформних бактерій та *E.coli*. Коліформних бактерій та *E.coli* виявляли після 60-хвилинного відновлення у TSY-бульйоні [8, 12]. Отримані дані представлені у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Загальне мікробне число та вміст коліформних бактерій у воді акваріумів з різними гідробіонтами*.

№ акваріума, гідробіонти	ЗМЧ, КОЕ/мл	Вміст коліформних бактерій, кл/100мл		
		Загальні коліформи	Термотолерантні коліформи	<i>E.coli</i>
4 (риби)	$1,5 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$
1 (черепахи)	$2,1 \times 10^3$	$4,5 \times 10^1$	$4,5 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$

* - при оцінці коліформних бактерій проведено процедуру відновлення життєздатності бактерій.

Можна бачити, що ЗМЧ води у всіх трьох акваріумах низька, що відповідає вимогам внутрішнього контролю лабораторії. Причому в акваріумі з черепахою, де годування проводиться 3 рази на тиждень, загальна мікробна кількість води трохи вища. Це свідчить про стабільно високу ефективність санації води.

Вміст загальних коліформних бактерій становить: 1,1% від загального мікробного числа для акваріума з рибами, 0,02% - для акваріума з черепахами. Чисельність коліформних бактерій в акваріумі з черепахами істотно нижча, що можна пов'язати з індивідуальними особливостями гідробіонтів, але й менш інтенсивним режимом годівлі.

Чисельність коліформних бактерій, встановлена нами в акваріумній воді після відновлення життєздатності, у 3 рази вища, ніж без відновлення [1]. Ці значення перевищують у 3-10 разів допустимий рівень коліформних бактерій,

за вимогами [4, 5, 6] для води рекреаційного водокористування та в межах населених місць (не більше 500 КУО загальних коліформних бактерій і не більше 100 КУО термотолерантних коліформів). Очевидно, що вода великотоннажних акваріумів повинна контролюватись за спеціально розробленими гігієнічними вимогами.

Вірджинський Океанаріум у США [13, 14] контролює гігієнічний стан води за показником "E.coli" - не більше 235 кл в 100 мл води.

У попередніх дослідженнях [1, 15, 19] було показано переважання в групі коліформних бактерій у безперервно санованій воді представників родів *Citrobacter* і *Klebsiella* і відсутність або дуже низька присутність *E.coli*.

Використана нами в даній роботі процедура відновлення життєздатності клітин, пошкоджених санацією води, може дати уявлення про реальну присутність *E.coli* та інших бактерій коліформних у воді акваріумів з різними гідробіонтами. Це дозволить рекомендувати обґрунтовані мікробіологічні показники та нормативи для оцінки гігієнічного стану води акваріумів.

Дані щодо вивчення видового складу коліформних бактерій акваріумів з різними гідробіонтами представлені в наступних розділах.

3.2 Виділення коліформних бактерій та створення колекції штамів

Для складання колекції коліформних бактерій використовували посіви на середовище Ендо після стадії накопичення в лактозо-пептон бульйоні при 37°C. Усі слизові колонії темно-червоного, червоного кольору, з металевим блиском і без нього, з темно-малиновим центром, підозрілі на коліформи, відсівали та очищали клонуванням. Усього було відсіяно 150 ізолятів. Для підтвердження їх приналежності до коліформ проводили оксидазний тест і перевіряли здатність ізолятів зброджувати лактозу з утворенням кислоти та газу, 55 ізолятів не належали до коліформ, 2 ізоляти втрачені у зв'язку з їх низькою життєздатністю.

У результаті після очищення клонуванням та підтвердження за ознаками

утворення кислоти та газу на лактозі до коліформ було віднесено 59 штамів (62% клонів, відсіяних з середовища Ендо):

- 30 штамів з акваріума № 4 (риби),
- 29 штамів з акваріума № 1 (черепahi),

Для видової ідентифікації було взято 80 штамів: усі штами з акваріумів № 1 та № 4.

Ідентифікацію проводили за 24 фізіолого-біохімічними тестами за допомогою високо ефективного набору МІКРОЛАТЕСТ ENTEROtest 24N [11] (ErbaLahemas.r.o., 2016).

Ідентифікація коліформних бактерій у воді акваріума №4 (риби).

Видову ідентифікацію проводили для 30 штамів коліформних бактерій з акваріуму № 4. 15 штамів із 30, тобто половина, були термотолерантними коліформами. 9 штамів з 30 мали здатність утворювати індол з триптофану.

Результати тестування 30 штамів показують досить високий ступінь дискримінації: 13 штамів характеризуються відмінною, високою та дуже високою дискримінацією, 11 штамів ідентифіковані до роду і лише 4 штами мають низьку видову ідентифікацію. 2 штаму не були ідентифіковані через відсутність профілю в базі даних.

За даними ідентифікації з 28 ідентифікованих, штамів 22 штаму (79%) віднесено до роду *Citrobacter*, з них: 18 штамів - *C. freundii*, 2 штаму - *C. murlinae*, 1 штаму - *C. gillenbergii*.

4 штаму (14%) віднесено до роду *Enterobacter*: 2 штаму (7%) – *E. kobei*, по 1 штаму (3%) – *E. amnigenus* та *E. hormaechei*.

Останні два штами ідентифіковані як *Rahnella aquatilis* та *Morganella morganii* по 3%.

Ідентифікація коліформних бактерій у воді акваріума №1 (черепahi).

Результати тестування 29 штамів. Вони також характеризуються досить високим ступенем дискримінації: 4 штами характеризуються відмінною та

високою дискримінацією видів, 21 штамми ідентифіковані до роду і лише 2 штамми мають низьку видову ідентифікацію. 2 штаму не були ідентифіковані через відсутність профілю в базі даних.

За даними ідентифікації з 27 штамів, 26 штамів (96%) віднесено до роду *Citrobacter*, з них: 16 штамів – *C. murliniae*, 8 штамів – *C. freundii*, 2 штамми – *C. braakii*.

1 штам (4%) віднесено до виду *Klebsiella oxytoca*.

У табл. 3.2 наведено порівняння даних щодо ідентифікації коліформних бактерій у воді акваріумів з різними гідробіонтами.

Можна бачити, що у всіх трьох акваріумах вода характеризується переважанням конкретних пологів коліформ: у разі риб – це *Citrobacter* (79%) у випадку черепах – також *Citrobacter* (96%), у разі теплокровних тварин (видр) – *Klebsiella* (57%) та *Citrobacter* (24%). *Enterobacter* не є характерним для акваріумної води такого типу. Вигляд *E.coli* практично не зустрічається в акваріумній воді.

Таблиця 3.2

Склад коліформних бактерій у воді акваріумів із різними гідробіонтами.

Пологи коліформних бактерій та їх вміст у % від кількості штамів у колекції	
Риби (акв. № 4)	Черепахи (акв. №1)
28 штамів	27 штамів
<i>p. Citrobacter</i> – 79%	<i>p. Citrobacter</i> – 96%
<i>p. Enterobacter</i> – 14%	<i>p. Klebsiella</i> – 4 %
<i>p. Rahnella</i> – 3%	
<i>p. Morganella</i> – 3%	

У попередньому дослідженні для акваріума з рибами було показано переважання у складі коліформ представників роду *Klebsiella*. Представники роду *Citrobacter* [16, 17, 18, 20] були виявлені здебільшого в обростаннях. Ці

відмінності можуть бути відображенням динаміки зміни якісного складу коліформ у процесі годування та збирання акваріумів та відсутності процедури відновлення життєздатності бактерій.

Отримані дані свідчать про відсутність специфічних пологів коліформних бактерій, пов'язаних із природою гідробіонтів. Це дозволяє застосовувати єдині критерії гігієнічної оцінки акваріумної води за мікробіологічними показниками.

Практична відсутність *E.coli* серед ідентифікованих штамів (1 штам із 80 ідентифікованих) ставить під сумнів доцільність використання мікробіологічного показника *E.coli* при оцінці гігієнічного стану акваріумної води замкнутого циклу при безперервній санації.

ВИСНОВКИ

1. Якісний склад коліформних бактерій безперервно санованої води вивчених акваріумів з рибами та черепахами практично не відрізняється. Представники родів *Citrobacter* та *Klebsiella* є переважаючими.

2. Коліформні бактерії виду *E.coli* не характерні для акваріумів із замкнутою системою обороту води і безперервною санацією УФ незалежно від типу гідробіонтів, що містяться в них.

3. Отримані дані свідчать про відсутність специфічних пологів коліформних бактерій, пов'язаних із природою гідробіонтів. Це дозволяє застосовувати єдині критерії гігієнічної оцінки акваріумної води за мікробіологічними показниками. Практична відсутність *E.coli* серед ідентифікованих штамів (1 штам із 80 ідентифікованих) ставить під сумнів доцільність використання мікробіологічного показника *E.coli* при оцінці гігієнічного стану акваріумної води замкнутого циклу при безперервній санації.

4. Використана нами в даній роботі процедура відновлення життєздатності клітин, пошкоджених санацією води, може дати уявлення про реальну присутність *E.coli* та інших бактерій коліформних у воді акваріумів з різними гідробіонтами. Це дозволяє рекомендувати обґрунтовані мікробіологічні показники та нормативи для оцінки гігієнічного стану води акваріумів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Bebak-Williams J., Noble A., Bowser P.A., Wooster G.A. 2002. Fish health management. In: Timmons M.B., Ebeling J.M., Wheaton F.W., Summerfelt S.T., Vinci B.J. (Eds.), *Recirculating Aquaculture Systems*. second ed. Cayuga Aqua Ventures, Chapter 13, p. 427–466.
2. Blancheton, J.P. 2000. Developments in recirculating systems for Mediterranean fish species. *Aquacultural Engineering*. V. 22, p. 17–31.
3. МУК 4.2.1884-04. Методические указания. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов.
4. ISO 9308-1(2000). International Standard. Water quality. Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method.
5. ISO 9308-2 (2012). International Standard. Water quality. Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 2: Most probable number method.
6. Rompre´ A., Servais P., Baudart P., de-Roubin MR., Laurent P. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*. V. 49, p. 31–54.
7. Ramos M. & Lyon W.J. 2000. Reduction of endogenous bacteria associated with catfish fillets using the grovac process. *Journal of Food Protection*. V. 63, p. 1231-1239.
8. СанПиН 2.1.5.980-00. Водоотведение населенных мест, санитарная охрана водных объектов. Гигиенические требования к охране поверхностных вод. Санитарные правила и нормы" с изм. на 2011 г.
9. Mitchell J.C., McAvoy B.V. 1990. Enteric bacteria in natural populations of freshwater turtles in Virginia. *Virginia Journal of Science*. V. 41, p. 233–242.
10. Bartlett K.H. & Trust T.J. 1976. Isolation of Salmonellae and Other Potential Pathogens from the Freshwater Aquarium Snail *Ampullaria*. *Applied and Environmental Microbiology*. V. 31, N. 5, p. 635-639.

11. CODE BOOK. Diagnostickýseznam. Книга кодів. ErbaLachemas.r.o. M/PI/133/16/H, 12/2016.
12. Del Rio-Rodriguez R., Inglis V., Millar S. D. 1997. Survival of *Escherichia coli* in the intestine of fish. *Aquaculture Research*. V. 28, p. 257-264.
13. Virginia Aquarium Water Quality Parameters Explained, 2016.
14. White F.H., Simpson C.F. & Williams I.E. Jr. 1973. Isolation of *Edwardsiella tarda* from aquatic animal species and surface waters in Florida. *Journal of Wildlife Diseases*. V. 9, p. 204–208.
15. Simoes L.Ch., Simoes M. & Vieira J.M. 2008. Intergeneric coaggregation among drinking water bacteria: evidence of a role for *Acinetobacter calcoaceticus* as a bridging bacterium. *Applied Environmental Microbiology*. V. 74, N.4, p. 1259–1263.
16. Robinson, R. A. 1970. *Salmonella* infection: diagnosis and control. *New Zealand Veterinary Journal*. V.18, p. 259-275.
17. Pullela S., Fernandes C.F., Flick G.J., Libey G.S., Smith S.A. & Coale C.W. 1998. Indicative and pathogenic microbiological quality of aquacultured finfish grown in different production systems. *Journal of Food Protection*. V. 61, p. 205-210.
18. Oppenheimer J.A., Jacangelo J.G., Laine J.M., Hoagland J.E. 1997. Testing the equivalency of ultraviolet light and chlorine for disinfection of wastewater to reclamation standards. *Water Environment Research*. V. 69, p. 14–24.
19. Філіпенко П. М. Загальне мікробне число та вміст коліформних бактерій у воді акваріумів з різними гідробіонтами. Проблеми аграріїв та перспективи сільськогосподарського виробництва: зб. тез доповідей наук.-практ. конф., 03 грудня. 2021 р. Житомир. С.72 -74.
20. Філіпенко П. М. Загальні принципи оптимізації структури об'єктів водного господарства. *Водні і наземні екосистеми та збереження їх біорізноманіття – 2021*: зб. тез доповідей наук.-практ. конф., 10 червня 2021 р. Житомир. С.115 -116.

21. Reilly A. & Kaferstein F. 1997. Food safety hazards and the application of the principles of the hazard analysis and critical control point (HACCP) system for their control in aquaculture production. *Aquaculture Research*. V. 28, p.735-752.

22. Філіпенко П. М. Екологічно орієнтоване ведення водного господарства, як умова збереження біорізноманіття водних екосистем. *Екологія. Наука. Практика – 2021: зб. тез доповідей наук.-практ. конф., 21 травня 2021 р. Житомир*. С. 93 -95.

23. World Health Organization, 1989. Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture. Technical report series, 778, Geneva.

24. Santos D.M.S., Cruz C.F., Pereira DP., Alves L.M.C. and Moraes FR. 2012. Microbiological water quality and gill histopathology of fish from fish farming in Itapecuru-Mirim County, Maranhão State. *Acta Scientiarum*. V. 34, p. 199-205.