

Санкт-Петербургский государственный университет

Аламмар Виждан Ахмед

**Разнообразие колиформных бактерий в непрерывно санируемой
аквариумной воде**

Выпускная квалификационная работа магистра

Работа выполнена на кафедре
микробиологии СПбГУ

Научный руководитель – старший
преподаватель каф. микробиологии
СПбГУ, к.б.н. Е.Ю.Дмитриева

Санкт-Петербург

2017 г.

Содержание

		Стр.
1.	Введение	3
2.	Обзор научной литературы «Колиформные бактерии как гигиенический показатель объектов аквариумистики и аквакультуры с рециркуляцией воды»	5
2.1.	Колиформные бактерии – гигиенический показатель безопасности воды, пищевых продуктов, объектов внешней среды. Структура гигиенического контроля водных объектов в РФ	5
2.2.	Методы выделения и оценки численности колиформных бактерий из водных образцов	8
2.3.	Гигиенические проблемы объектов аквариумистики и аквакультуры	10
2.3.1.	Общая характеристика водных объектов с рециркуляцией воды	10
2.3.2.	Колиформные бактерии в воде, обрастаниях и рыбе открытых водоемов	11
2.3.3.	Колиформные бактерии в аквариумистике и в аквакультуре с рециркуляцией воды	13
3.	Объекты и методы исследования	16
3.1.	Характеристика образцов аквариумной воды и обрастаний	16
3.2.	Подготовка образцов к анализу	18
3.3.	Определение общего микробного числа исследуемых образцов	18
3.4.	Определение численности и выделение колиформных бактерий, очистка изолятов, создание коллекции штаммов, ее поддержание	18
3.5.	Методы идентификации колиформных бактерий в рамках семейства <i>Enterobacteriaceae</i> .	19
4.	Результаты и их обсуждение	24
4.1.	Общее микробное число и содержание колиформных бактерий в аквариумной воде и обрастаниях	24
4.2.	Выделение колиформных бактерий и создание коллекции штаммов	24
4.3.	Идентификация колиформных бактерий, выделенных из аквариумной воды	25
4.4.	Идентификация колиформных бактерий, выделенных из обрастаний	25

4.5. Обсуждение и заключение	31
5. Выводы	34
6. Список научной литературы	35
7. Приложение Фенотипические признаки лактозоположительных родов семейства <i>Enterobacteriaceae</i>.	41

1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все большее внимание уделяется микробиологическим рискам, связанным с аквакультурой, то есть с искусственным разведением гидробионтов. Современные объекты аквакультуры все чаще конструируются с замкнутым оборотом воды, ее фильтрацией и санацией. На таких объектах создаются условия для формирования специфических биоценозов, в первую очередь, микробиоценоза биофильтров и различных типов обрастаний, включающих как автотрофных, так и гетеротрофных микроорганизмов. Появляется все больше литературных данных о присутствии в подобных биоценозах патогенных и условно-патогенных бактерий, способных повлиять на здоровье объектов аквакультуры и обслуживающего персонала. По этой причине предприятия аквакультуры являются объектами не только ветеринарного, но и санитарно-микробиологического надзора. До настоящего момента в отношении объектов аквакультуры не существовало специально разработанных критериев гигиенического состояния. При оценке безопасности воды до сих пор используются микробиологические показатели и нормативы для воды поверхностных водоемов рекреационного типа (МУК 4.2.1884-04). В соответствии с требованиями данного документа содержание колиформных бактерий в воде не должно превышать 500 клеток на 100 мл воды. Это требование является трудно выполнимым и, возможно, необоснованно завышенным для замкнутых водных систем с постоянным высоким уровнем фекального заражения.

Для разработки адекватных микробиологических показателей безопасности объектов аквакультуры следует проводить дополнительные исследования на модельных системах. Одной из таких моделей могут быть объекты крупнотоннажной аквариумистики. Действительно, крупногабаритные аквариумы также конструируются с замкнутой системой циркуляции воды, ее очистки и санации. Контроль гигиенического состояния подобных объектов осуществляется по тем же жестким гигиеническим требованиям.

До сих пор не сформированы четкие представления о различиях состава колиформных бактерий желудочно-кишечного тракта людей и гидробионтов, объектов аквакультуры и аквариумистики. В канализационных стоках городов в составе колиформных бактерий преобладает *Escherichia coli* (95%). Представители родов *Enterobacter* и *Citrobacter* составляют лишь 5-18%. По литературным данным (Калина, 1969; Цесулис, 2008) в воде аквариумов представительство энтеробактерий может быть иным, что определяется особенностью микробиоты кишечника водных организмов, а также возможностью внесения колиформных бактерий в воду самим персоналом через руки, инструменты, корма. Установлено, что возбудители острых желудочно-кишечных инфекций могут существовать в таких системах не только в воде, но в составе обрастаний, а также инфицировать гидробионтов без признаков заболевания.

Непрерывный режим санации (озонирование, ультрафиолет, лечебные препараты для гидробионтов, вносимые в воду), безусловно, должны влиять на качественный и количественный состав колиформных бактерий, как в воде, так и в составе биопленок (биофильтры, обрастания). Тем не менее, подобные исследования в необходимом объеме не проводились.

В 2008 г. силами нашей исследовательской группы были проведены первые эксперименты по изучению качественного состава колиформных бактерий Санкт-Петербургского Океанариума (Цесулис, 2008). Данная магистерская работа является продолжением этих исследований.

В связи с вышеизложенным целью данной работы было изучение состава колиформных бактерий в воде и обрастаниях одного из пресноводных аквариумов Санкт-Петербургского океанариума. Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Выделить колиформных бактерий из воды и обрастаний аквариума с помощью накопительных сред, оценить их содержание, очистить изоляты и создать коллекцию штаммов колиформных бактерий.

2. Провести идентификацию штаммов коллекции по фенотипическим признакам в соответствии с Руководством по систематике бактерий Берги.

2. ОБЗОР НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

«Колиформные бактерии как гигиенический показатель объектов аквариумистики и аквакультуры с рециркуляцией воды»

2.1. Колиформные бактерии – гигиенический показатель безопасности воды, пищевых продуктов, объектов внешней среды. Структура гигиенического контроля водных объектов в РФ

Колиформные бактерии (колиформы) – это искусственная, не имеющая отношения к систематике группа санитарно-показательных бактерий. Принято считать, что присутствие этих бактерий свыше установленной нормы, указывает на высокий недопустимый риск заражения объекта (воды, почвы, пищевых продуктов) фекалиями людей, животных, канализационными или сточными водами, потенциально содержащими возбудителей желудочно-кишечных инфекций (Калина, 1969). Колиформные бактерии (колиформы) в качестве конкретной группы санитарно-показательных бактерий, показателя фекального загрязнения были введены в практику в 1937 году (Калина, 1969). Традиционно в эту группу

входили, в первую очередь, представители 3-х родов семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia (E.coli)*, *Enterobacter* и *Citrobacter*. *E.coli* является наиболее многочисленным представителем этой группы, населяющим желудочно-кишечный тракт теплокровных животных (до 95%). Поэтому наряду с колиформами для оценки микробиологической безопасности используется дополнительный показатель “*E.coli*” с нормативом для питьевой воды - «отсутствие в 100 мл».

Границы группы определяются не таксономической принадлежностью, а биохимическими свойствами (в частности способностью сбраживать лактозу), проявляющимися при выделении, поэтому в группу колиформ могут попасть и представители других родов энтеробактерий, например *Serratia*, *Klebsiella* и др.

В соответствии с новым вторым изданием Руководства по систематике бактерий Берги (Brenner and Farmer, 2005) в семействе *Enterobacteriaceae* насчитывается уже 44 рода и 176 видов. Лактозо-положительными в той или иной степени являются 17 родов. Поэтому можно ожидать выявление в составе колиформ представителей новых родов энтеробактерий, до сих пор не упоминавшихся в составе этой группы, таких как: *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Ewingella*, *Kluuyvera*, *Ledercia*, *Moellerella*, *Pantoea*, *Pahnella*.

Определение колиформных бактерий в документах разных стран в целом сходно (Rompre' et al., 2002; МУК 4.2.1884-04). Колиформными бактериями являются аэробные и факультативно-анаэробные, грамотрицательные, неспорообразующие, мелкие палочковидные бактерии, способные расти в питательных средах в присутствии желчных солей, и сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа в течение 24-48 часов при температуре 35°C (в РФ – при 37±1°C). Эту группу колиформ называют общими колиформными бактериями. Дополнительно выявляют группу «термотолерантных колиформных бактерий», которые входят в число общих колиформных бактерий, обладают всеми их признаками и, кроме того, способны ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре (44 +/- 0,5) °C в течение 24 ч. Этот показатель подтверждает фекальное происхождение колиформ в зараженной воде (Калина, 1969).

В связи с интенсивным антропогенным воздействием и неблагоприятной экологической обстановкой водных объектов, широким распространением энтеробактерий во внешней среде значение показателей «общие и термотолерантные колиформы» стало

снижаться. В настоящий момент ряд стран использует дополнительные показатели – «*E.coli*» и «энтерококки» (МУК 4.2.1884-04). В системе гигиенического контроля *E.coli*– это индикаторная группа бактерий, включающая термотолерантные колиформы, ферментирующие лактозу при температуре 44 °С и образующие индол из триптофана.

Колиформы, как гигиенический показатель, используется всеми цивилизованными странами мира для государственного надзора за микробиологической безопасностью питьевой воды, пищевых продуктов, объектов внешней среды. В табл. 1 представлены рекомендации ВОЗ по содержанию колиформ и *E.coli* в питьевой воде в сравнении с гигиеническими показателями и нормативами ряда стран (Rompre' et al., 2002), включая Российскую Федерацию.

Таблица 1.

Рекомендации ВОЗ и требования ряда стран по предельному содержанию колиформных бактерий в питьевой воде

	Предельное содержание		Источник
	Колиформных бактерий	<i>E.coli</i>	
ВОЗ	0/100 мл (95% проб в год)	0/100 мл (100% проб в год)	WHO, 1994
США	0/100 мл (95% проб в год), последующие пробы не должны содержать колиформ	0/100 мл (100% проб в год)	US Environ. Protection Agency, 1990.

Канада	0/100 мл (90% проб в год), при обнаружении не более 10 КОЕ/100 мл, последующие пробы не должны содержать колиформ	0/100 мл (100% проб в год)	Ministe`re de la sante´, 1996.
ЕС	0/100 мл мониторинг	0/100 мл (100% проб в год)	Council Directive 98/83/ЕС
РФ	0/100 мл (95% проб в год)	Не нормирована	СанПиН 2.1.4.1074-01

В РФ введен ряд гигиенических требований по охране поверхностных водоемов (СанПиН 2.1.5.980-00.), а также водных бассейнов и аквапарков (СанПиН 2.1.2.1331—03) - табл.2.

Таблица 2.
Гигиенические требования РФ к воде поверхностных водоемов, бассейнов и аквапарков

Водные объекты	Предельное содержание		Источник
	Общие колиформы	Термртолерантныеколиформы	
Водоемы хозяйственно-бытового водоснабжения и водоснабжения пищевых предприятий	1000 КОЕ в 100 мл	100 КОЕ/100 мл	СанПиН 2.1.5.980-00
Водоемы рекреационного водопользования, атакже водоемы в черте населенных мест	500 КОЕ в 100 мл	100 КОЕ/100 мл	СанПиН 2.1.5.980-00
Вода бассейнов и аквапарков	в 100 мл отсутствие	в 100 мл отсутствие	СанПиН 2.1.2.1331-03

Крупнотоннажные аквариумы Океанариумов и предприятия аквакультуры также являются объектами государственного гигиенического контроля. Подобные водные объекты имеют ряд особенностей, отличающих их от вышеперечисленных, в первую очередь это:

- замкнутая система оборота воды и непрерывный режим ее очистки и обеззараживания (УФ, озон)
- периодическое поступление в замкнутую систему преимущественно специфических фекальных колиформных бактерий, присутствующих в желудочно-кишечном тракте холоднокровных гидробионтов;
- формирование в замкнутой системе специфических микробоценозов (био пленок, обрастаний, в том числе в составе биофильтров);
- введение лечебных препаратов (антибиотиков, красителей) при необходимости лечения гидробионтов;
- ограниченные масштабы инфицирования объектов колиформными бактериями людей через руки персонала, инструменты, инвентарь, корма.

Несмотря на несомненную уникальность подобных объектов для их гигиенического контроля не разработаны соответствующие показатели и нормативы. В режиме рутинного контроля используются требования, предъявляемые к водоемам рекреационного типа.

2.2. Методы выделения и оценки численности колиформных бактерий из водных образцов

Границы группы «колиформы» определяются методами их выделения. Используемые методы применяются в соответствии с происхождением исследуемых образцов и их свойствами.

Для образцов питьевой воды наиболее предпочтительным является метод фильтрации (МУК 4.2.1884-04, ISO 9308-1). Он выполняется за один пассаж культивирования, при этом бактериальный фильтр (диаметр пор 0,4 мкм) с отфильтрованными бактериями помещается непосредственно на твердую диагностическую среду с лактозой и сульфитом (агар Эндо). При обнаружении типичных для колиформ лактозоположительных колоний (темно-красных с металлическим блеском или без него), выполняют оксидазный тест и при наличии оксидазоотрицательных колоний дают положительный ответ о присутствии колиформ.

Если исследуемые образцы воды мутные, содержат большое количество взвешенных частиц, а также в случае высокой численности сопутствующих слизеобразующих бактерий фильтрацию проводить не удастся. В этом случае используют более сложный титрационный метод (multiple-tube fermentation technique) и накопительные среды (МУК 4.2.1884-04, ISO 9308-2).

В качестве типичных накопительных сред для выделения колиформ используют бульонные среды с добавлением лактозы, желчных солей и индикатором потребления лактозы (феноловый красный, бромтимоловый синий и др.). Подкисление и газообразование в накопительных культурах при 18-24 часовом культивировании посевов при 37°C свидетельствует о вероятном присутствии колиформ. При слабом газообразовании или его отсутствии присутствие колиформ подтверждают высевом на накопительных культур на агар Эндо и проверкой газообразования в жидкой лактозной среде с поплавками.

Засев накопительных сред при титрационном методе проводят десятикратно понижающимся количеством посевного материала в тройной повторности. Численность колиформ определяют статистическим «методом наиболее вероятных чисел» по таблице МакКреди по присутствию или отсутствию колиформ в накопительных культурах.

Отмечается, что действующие интернациональные методы имеют ограничения (Rompre', 2002): продолжительность инкубации, негативное воздействие сопутствующей микробиоты, потеря свойств, присущих колиформам (Лас- варианты), низкий уровень выявления медленно-растущих и стрессированных колиформ. Последнее обстоятельство может приводить к потере более 90% численности бактерий при выделении титрационным методом (Amann et al., 1990; Davies et al., 1995; Colwell and Grimes, 2000).

В случае неблагоприятной обстановке на водоеме и загрязнении воды агрессивными химическими соединениями может иметь место выявление нетипичных колоний колиформ. В российских нормативно-методических документах по выявлению колиформ (МУК 4.2.1884-04) отмечается возможность обнаружения на среде Эндо нетипичных для колиформ мелкоточечных и/или мелких плоских колоний, розового цвета, а не малинового, как это характерно для колиформ. Такие колонии наряду с типичными темно малиновыми колониями проверяют на способность сбраживать лактозу с образованием кислоты и газа.

2.3. Гигиенические проблемы объектов аквариумистики и аквакультуры

Гигиенические проблемы аквариумистики и аквакультуры связаны с рисками заражения гидробионтов, воды и самих объектов возбудителями желудочно-кишечных инфекций - сальмонеллами, шигеллами, вибрионами. Поэтому подобные объекты подлежат внутреннему производственному и внешнему государственному контролю по содержанию санитарно-показательных бактерий, индикаторов фекального заражения, то есть колиформ. Микробиологические критерии безопасности на сегодняшний день очень жесткие и трудно выполнимые, особенно в условиях замкнутой аквакультуры с высокой плотностью посадки рыбы. Поэтому вопросы, связанные с распространением колиформ, степенью зараженности рыбы и объектов аквакультуры и аквариумистики, способы санации интенсивно изучаются во всем мире.

2.3.1. Общая характеристика водных объектов с рециркуляцией воды

К водным объектам с рециркуляцией воды (полной или частичной) относят объекты аквариумистики (океанариумы и профессиональные аквариумы), а также объекты аквакультуры по выращиванию продуктовой рыбы, других гидробионтов, в том числе вместе с растениями (аквапоника) (Helfrich and Libey, 2015; Bregnballe, 2015).

Масштабы искусственного выращивания продуктовых пресноводных и морских видов рыб в европейских странах ежегодно значительно увеличиваются. Четко прослеживается тенденция к развитию более экологически чистой аквакультуры с рециркуляцией воды (Martinsa et al., 2010; Bregnballe, 2015).

Важной конструкционной особенностью таких объектов является наличие блоков очистки и санации воды. Основной частью системы очистки воды является биофильтр, заселенный нитрифицирующими бактериями, которые превращают аммоний, продукт метаболизма рыб, в нитрат. Аммоний токсичен для рыб при концентрации 0,2-2,0 мг/л, нитрат менее токсичен (начиная со 100 мг/л).

В замкнутых системах происходит формирование специфических биоценозов. Не только в биофильтре, но и в воде, в грунте, обрастаниях (био пленках) также формируются

устойчивые ассоциации микроорганизмов. Поверхность тела рыб и их внутренние органы также характеризуются специфическим микробным населением. В такие ассоциации могут включаться патогенные микроорганизмы, опасные как для гидробионтов, так и для людей. Поэтому вода в таких замкнутых системах постоянно подвергается механической фильтрации, озонированию и УФ-облучению с целью санации, а также регулярному микробиологическому контролю.

2.3.2. Колиформные бактерии в воде, обрастаниях и рыбе открытых водоемов

Показано, что колиформные бактерии, в том числе *E.coli*, попадая в пресноводные водоемы, способны приживаться в новой для них среде. Имеется обширный литературный материал по выявлению колиформных бактерий и патогенных энтеробактерий в природных и искусственных водных системах для разведения рыб, как в пресной, так и в морской воде (Moore et al., 2003). Подтверждено присутствие колиформ и в зоопланктоне (Maugeri et al., 2004).

Многочисленными исследованиями показано, что наибольшее количество колиформ находится в составе биоценоза придонных отложений, где содержание органических веществ, потенциальных питательных субстратов, выше. Содержание колиформных бактерий в осадках рек, озер и искусственных водоемов может достигать 10^5 КОЕ/г сухого веса (Pachersky and Shelton, 2011). Патогенные варианты энтеробактерий могут выявляться в осадках даже через несколько месяцев после заражения (Walketal., 2007; Berthe et al, 2013).

На водоемах Франции было проведено исследование филогенетических групп выявленных изолятов *E.coli*. Было показано, что свободноживущая популяция *E.coli* имеет несколько источников происхождения, в том числе экскременты птиц, собак, фекалии людей. Фекальные колиформы людей характеризовались высокой скоростью отмирания, мультирезистентностью к антибиотикам, наличием ряда вирулентных факторов (Berthe et al, 2013).

Приведенные данные снижают значимость показателей «колиформы» и «*E.coli*» для оценки гигиенического состояния водных объектов. Все чаще обсуждаются вопросы о необходимости применения наряду с классическими микробиологическими показателями

молекулярно-биологических тестов для выявления присутствия в воде генов вирулентности патогенных энтеробактерий (Meays et al, 2004; Fielda and Samadpourb, 2007).

Присутствие колиформных бактерий в рыбе открытых водоемов охарактеризовано достаточно полно в связи с высоким риском заражения потребителей рыбной продукции возбудителями желудочно-кишечных инфекций (WHO, 1989; Reilly and Kaferstein 1997).

В настоящий момент считается доказанным (Кузьмина и др., 2016), что микробиота тела рыб формируется под воздействием микробиоты воды и кормов. Наиболее существенной стадией является стадия личинки, когда заселение проходит за счет микроорганизмов планктона в естественной среде обитания или за счет микроорганизмов искусственных кормов. В результате этого мальки, сеголетки, рыбопосадочный материал уже содержат определенную микробиоту, характеризующую гигиеническое состояние водоема или состояние предприятия по их выращиванию и реализации.

Численность микрофлоры желудочно-кишечного тракта взрослых свободно живущих рыб может достигать $10^7 - 10^{11}$ клеток/г кишечного содержимого с максимальными значениями для травоядных тропических рыб (Sugita et al., 2005; Nayak, 2010). Увеличение интенсивности питания рыб вызывает увеличение общего количества выделяемых бактерий, поэтому при искусственном содержании перекармливание рыб не допускают.

В литературе имеются обширные сведения о составе энтеральной микробиоты рыб. Экологическое состояние водоемов играет решающую роль в заселении рыб патогенными, условно-патогенными и санитарно-показательными бактериями. Так, по данным обзора Кузьминой и др. (2016) в энтеральном содержимом даже свободноживущих пресноводных рыб имеет место преобладание представителей семейства *Enterobacteriaceae*, в частности: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter (C.freundii)*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Moraxella*, *Serratia*, *Hafnia (H.alvei)*. В пищеварительном тракте морских рыб также выявлены этеробактерии родов *Escherichia* и *Enterococcus*. У многих видов морских рыб в числе доминирующих отмечены представители р. *Vibrio*.

В последние два десятилетия резко возросло производство продукции аквакультуры, выращенной в прибрежной зоне и открытых естественных и искусственно созданных водоемах. Это способствует интенсивному распространению колиформных бактерий в окружающей водной среде. Так, например, при выращивании рыбы (теляпии) в естественных

водоемах в сетях (Северная Бразилия) установлена зараженность колиформными бактериями всех исследованных предприятий аквакультуры (Gorlach-Liraetal., 2013). Степень заражения воды составила от 70 до 4600 клеток колиформных бактерий в 100 мл воды, что в среднем соответствует местным гигиеническим требованиям к фермам по разведению рыбы и для ирригации (1000 клеток колиформ в 100 мл воды).

В развивающихся странах (в первую очередь, Южной и Юго-Восточной Азии) для выращивания рыбы используются пруды, наполненные сточными водами, ливневыми стоки, поля орошения, пруды с одновременным разведением водоплавающей птицы. В этих регионах имеет место массовое инфицирование колиформами воды, придонных отложений и выращиваемой рыбы (WHO, 1989; ReillyandKaferstein, 1997). В таких водоемах отмечается у микроорганизмов воды и рыбы возрастание устойчивости к антибиотикам (WHO, 1989; Del Rio-Rodriguez and Millar 1997), что является дополнительным высоким фактором риска для здоровья людей.

В развитых странах (США, Канада, Япония и др.) также были зарегистрированы вспышки заболеваний, связанных с инфицированием продукции аквакультуры, выращенной в естественных незащищенных водоемах, патогенами, в частности сальмонеллами (Reilly and Kaferstein, 1997). Поэтому в этих странах предприятия аквакультуры конструируются по типу замкнутого или полужамкнутого оборота воды с соблюдением гигиенических мер высокого уровня.

2.3.3. Колиформные бактерии в аквариумистике и в аквакультуре с рециркуляцией воды

Объекты крупнотоннажной аквариумистики – океанариумы находятся под контролем государственных органов здравоохранения. В этой связи становится актуальным вопрос о путях занесения в аквариумы колиформных бактерий. Очевидно, что закупленные для подобных объектов гидробионты содержат колиформных бактерий, приобретенных ими в естественных местах их обитания, в центрах разведения, передержки и реализации.

Так, в работах канадских исследователей Троста и Барлетта (Trust and Bartlett, 1974) отмечается высокий риск передачи патогенов через любительские аквариумы, зоомагазины и центры разведения декоративных рыб. Этими авторами были обследованы 13 зоомагазинов

Канады и США. Все образцы воды, в которой продавались декоративные рыбки (золотые рыбки, гуппи, гурами, данио-рерио и др), содержали колиформных бактерий в концентрации от 10^2 до 10^5 кл/100 мл. В воде были выявлены *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonasaeruginosa* и *Edwardsiellatarda*. Этими же авторами показано присутствие колиформных бактерий на водных растениях аквариумов в количестве $2,3 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ кл/10 г сырого веса растений (Trust and Bartlett, 1976).

В качестве дополнительного аргумента в пользу важности контроля гигиенического состояния гидробионтов на этапе интродукции можно привести данные Велса (Wells, 1973) о многочисленных вспышках кишечных заболеваний у населения Северной Америки и Канады, связанных с водными домашними черепашками, инфицированными сальмонеллами и шигеллами, что даже побудило государственные органы этих стран ограничить продажу и распространение этих домашних животных (Mitchelletal, 1990; Marinetal, 2013).

В настоящий момент при профессиональном крупнотоннажном разведении гидробионтов обязательно осуществляют санацию воды. Для этого ее фильтруют через мешочные фильтры, а затем обрабатывают озоном и облучают УФ. Эффективность таких обработок для аквакультуры неоднократно доказана в отношении основных бактериальных и вирусных патогенов рыб, как в пресной, так и в морской воде (Liltvedetal., 1995; Summerfelt, 1997; Summerfelt, 2003; Summerfeltetal, 2004; Liltved et al, 2006).

Лабораторными экспериментами показано, что патогены рыб в воде более чувствительны к УФ-облучению, чем бактерии желудочно-кишечного тракта людей и санитарно-показательные бактерии (Liltved and Cripps, 1999).

Тем не менее, эффективность дезинфицирующих процедур резко снижается при наличии в воде механических частиц. Бактерии сохраняют жизнеспособность, находясь внутри этих частиц, или адсорбируясь на их поверхности. Ряд авторов отмечают прямую корреляцию между содержанием частиц и выживанием колиформ в воде, облучаемой УФ (Scheible et al., 1985; Whitby and Palmateer, 1993).

Установлено, что снижение численности бактерий в воде после УФ-облучения после фильтрации через материал с диаметром ячеек 355 мкм возможно лишь в 10 раз, уменьшение диаметра ячеек фильтрующего материала до 50 мкм резко повышает эффективность УФ

облучения, при этом численность бактерий снижается на 3-5 порядков (LiltvedandCripps, 1999).

Шерпер и Саммерфельд (SharrerandSummerfelt, 2007) показали, что наиболее эффективным в аквакультуре замкнутого типа является озонирование, предшествующее облучению УФ-облучению. Комбинация дозы озона 0,1–0,2 мг/л мин и дозы УФ-облучения 50 мJ/см², как заявляют авторы, может снизить численность гетеротрофных бактерий и колиформ в воде практически до нуля.

На практике персонал предприятий аквакультуры испытывают большие трудности при соблюдении требований по уровню колиформ в воде (не выше 500 КОЕ/100 мл воды) в связи с их регулярным поступлением в воду с фекалиями рыб и необходимости активного кормления при плотной посадке. При этом содержание колиформных бактерий в экскрементах рыб, например лососевых, может достигать 10⁴ КОЕ/г (Pullela et al., 1998).

В аквариумистике эта проблема тоже решается с трудом, в основном за счет разрежения посадок и умеренным кормлением. Тем не менее, в ряде случаев удается выполнить даже более жесткие гигиенические нормативы. Так, в американской крупнотоннажной аквариумистике соблюдаются требования, совпадающие с гигиеническими требованиями для плавательных бассейнов – не более 235 клеток *E.coli* в 100 мл воды (Virginia Aquarium Water Quality Parameters Explained, 2016).

Шарером и Саммерфелтом (Sharrerand Summerfelt, 2005) выдвинуто предположение, что рециркулирующие водные системы с непрерывной санацией способствуют селекции бактериальной популяции в том числе и колиформ по признаку активного склеивания и способности прикрепляться к механическим частицам и поверхностям. В этом случае источниками колиформных бактерий в замкнутых санируемых водных системах могут стать не только гидробионты, но и различные типы биопленок. Тем не менее, до сих отсутствуют данные о возможном присутствии колиформных бактерий в обрастаниях (биопленках), в биофильтрах профессиональных аквариумов

В научной литературе имеются данные о специфическом взаимодействии представителей разных родов в биопленках систем питьевого водоснабжения. Отмечается ведущая роль бактерии *Acinetobactercalcoaceticus* в склеивании бактерий в составе биопленки (SimoesandVieira, 2007; Simoesetal, 2008). Более того, показана возможность присутствия

гетеротрофных бактерий в составе нитрифицирующего активного ила (Kindaichi et al, 2004). На основании этого можно предположить присутствие определенных родов колиформных бактерий в биофильтрах и в обрастаниях профессиональных аквариумов с непрерывным режимом санации.

3. Объекты и методы исследования

3.1. Характеристика образцов аквариумной воды и обрастаний

Выделение колиформных бактерий проводили из воды и обрастаний пресноводного аквариума № 4 Санкт-Петербургского Океанариума (ТРК «Планета Нептун»).

Вместимость аквариума № 4 - 3,3 тонны. Температура воды – 17-18°C. В аквариуме содержится рыба среднего размера: Сом европейский 30-40 см – 3 шт., Форель радужная 40-60 см – 2 шт., Форель золотая 40-50 см – 5 шт., Карп кои 30 -40 см – 6 шт. Режим кормления - 5 раз в неделю (желированный корм - 750 г, рыба - 150 г в неделю). Чистка аквариума и грунта проводится без участия водолазной службы - 2 раза в месяц с подменой воды в объеме 30 %.

Аквариум № 4 (рис. 1) - открытого типа (водная поверхность не изолирована от экспозиционного помещения), представляет собой имитацию реки с перекатом в центре, разделяющим аквариум на 2 части. Левую часть населяют радужная, золотая форель, карпы кои, правую – сомы. Левая часть аквариума декорирована небольшим водопадом, вода которого с высоты примерно 2,5 м по стене поступает в аквариум. Наличие водопада является

дополнительным источником аэриотической опасности не только для сотрудников, но и посетителей океанариума за счет разбрызгивания воды и образования водного аэрозоля.

Системы жизнеобеспечения аквариума является замкнутой. Вода из аквариума по трубопроводу поступает в мешочный фильтр для механической очистки, и далее в буферную емкость. Из буферной емкости с помощью насоса по системе трубопровода вода подается на 2 биофильтра, заполненных пластиковыми «спиралями», покрытыми активным илом. Очищенная вода санируется путем постоянного облучения ультрафиолетом. Мощность УФ-стерилизатора 225Вт, интенсивность излучения 65мДж/см².

Пробы воды (около 0,5 л) отбирали в стерильную емкость непосредственно из аквариума, под водопадом (рис. 2). Обрастания, сформировавшиеся на синтепоне, отбирали из левого биофильтра, с глубины 30 см. Внешний вид образца обрастаний представлен на рис. 2.



Рис. 1. Внешний вид аквариума № 4.



Рис. 2. Внешний вид образца обрастаний.

3.2. Подготовка образцов к анализу

Определение численности и выделение колиформных бактерий проводили в течение первых нескольких часов после отбора проб. Из исследуемой воды после тщательного перемешивания делали десятикратные разведения с помощью стерильного физиологического раствора для засева в накопительную среду.

Образец обрастаний помещали в стерильное металлическое ситечко, осторожно промывали несколько раз физиологическим раствором. Промытый образец подсушивали стерильной фильтровальной бумагой, отвешивали навеску 500 мг и суспендировали в стеклянном гомогенизаторе двумя порциями физиологического раствора по 5 мл. Осадок (синтепон) высушивали и взвешивали, его вес составил 170 мг. Таким образом, была получена суспензия обрастаний – 330 мг/10мл, из которой готовили десятикратные разведения для анализа.

3.3. Определение общего микробного числа исследуемых образцов

Определение общего микробного числа (ОМЧ) проводили методом прямого высева десятикратных разведений на стандартный питательный агар ГРМ. Посевы культивировали при 30°C в течение 3 суток. Для подсчета выбирали чашки с числом колоний не выше 500.

3.4. Определение численности и выделение колиформных бактерий, очистка изолятов, создание коллекции штаммов, ее поддержание

Оценку численности колиформных бактерий проводили методом наиболее вероятных чисел (НВЧ). Для этого десятикратные разведения воды и суспензии засеивали по 1 мл в среду накопления (бульон МакКонки) в трехкратной повторности и инкубировали при 37°C 22-24 часа.

Состав бульона МакКонки (г/л): пептон — 20,0; лактоза — 10,0; бычья желчь, сухая — 5,0; нейтральный красный — 0,01. Колиформные бактерии являются лактозоположительными, в результате их размножения образуется значительное количество органических кислот, что приводит к снижению рН и изменению цвета среды с красного на желтый (рис. 3).

Через 22-24 часа культивирования из пожелтевших накопительных культур делали высев на твердую диагностическую среду Эндо в чашках Петри. Посевы культивировали при 37°C 18-24 часа. Состав среды Эндо (г/л): панкреатический гидролизат рыбной муки – 12,0; дрожжевой экстракт – 1,0; натрия хлорид – 3,4; Д-(+)-лактоза – 10,0; натрия сульфит, безводный 0,8; натрия фосфат 3-зам. 12-водный – 0,5; фуксин основной 0,2; агар – 10,0±3,0; рН 7,4±0,2.

В соответствии с МУК 4.2.1884-04 колиформные бактерии - это грамотрицательные, оксидазо-отрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах и ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 - 48 ч. На среде Эндо они вырастают в виде слизистых колоний малинового, темно-красного или красного цвета, с металлическим блеском и без него, иногда с темно-малиновым центром (рис. 4).

Для подтверждения принадлежности подозрительных колоний к колиформам проводили окраску по Граму, ставили оксидазный тест, далее проверяли способность образования кислоты и газа на лактозе в жидкой среде Гисса с поплавками. Составляли

окончательное распределение присутствия/отсутствия колиформных бактерий в накопительных культурах, зашифровывали его и по таблице МакКреди рассчитывали содержание колиформ в воде и обрастаниях.

Для составления коллекции, изоляты от типичных колоний колиформ из воды и обрастаний очищали клонированием на питательном агаре ГРМ. Штаммы поддерживали на питательном агаре при комнатной температуре, пересевали 1 раз в месяц. Для проведения тестов с целью идентификации использовали 1-2 суточные культуры на питательном агаре.

3.5. Методы идентификации колиформных бактерий в составе семейства *Enterobacteriaceae*

В соответствии с Руководством по систематике бактерий Берги (Brenner and Farmer, 2005), ключевыми фенотипическими признаками для родовой идентификации лактозоположительных энтеробактерий в составе семейства *Enterobacteriaceae* являются:

- образование кислоты и газа на глюкозе;
- тест с метил-рот (метиловым красным);
- образование ацетона в реакции Фогес-Проскауера;
- образование индола из триптофана;
- образование сероводорода;
- использование цитрата на среде Симмонса;
- наличие уреазы (на среде с мочевиной).

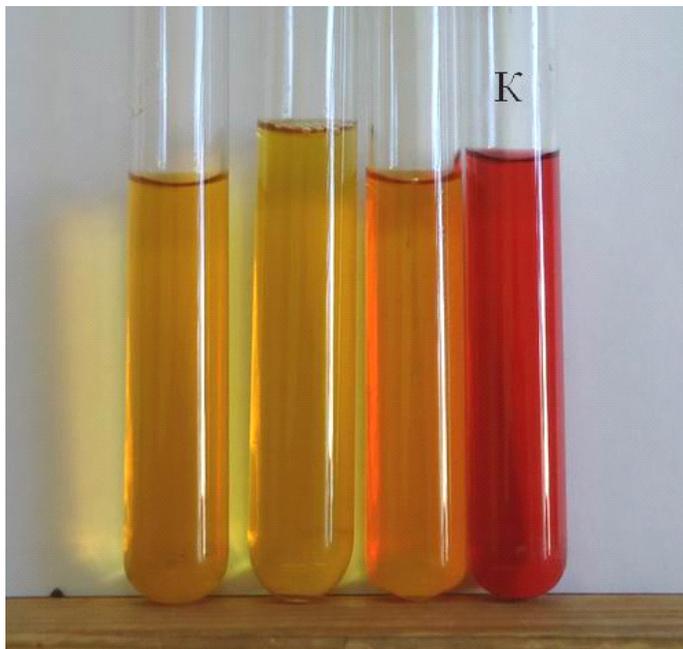


Рис. 3. Накопительные культуры колиформ в среде МакКонки.

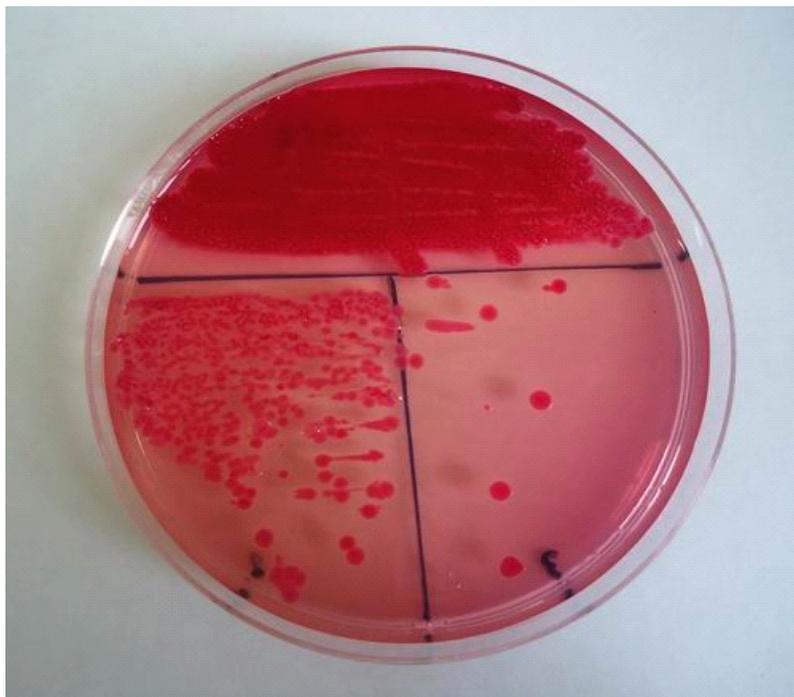


Рис.4. Колонии колиформных бактерий на среде Эндо.

Образование кислоты и газа на глюкозе проверяли на 24-48 часов культивирования при 37°C в полужидкой среде Гисса с индикатором бромтимоловым синим (1% пептона; 0,5% хлорида натрия; 0,1% бромтимолового синего (исх. спиртовой раствор 1,6%); 1,0% лактозы). Образование кислоты регистрировали по изменению цвета индикатора с зеленого на желтый (рис.5), газообразование приводило к образованию пузырьков и раскола питательной среды.

Тест с метил-рот проводили на культурах, выращенных в 5 мл среды Кларка (0,5% пептона; 0,5% глюкозы; 0,5% калия фосфорнокислого двузамещенного). На 2-4 сутки в накопительные культуры добавляли 3-5 капель 0,04% раствора метилового красного (1 мл 1,6% спиртовой раствор разбавляли 39 мл этанола). Положительные пробы окрашивались в красный цвет ($\text{pH} \leq 4,2$), отрицательные – в желтый (Герхардт, 1984).

Реакцию Фогес-Проскауера на ацетон ставили на 4-5 суточных культурах в среде Кларка. Для этого к 5 мл культуры добавляли равный объем 20% едкого кали. Через 4 часа инкубации при 37°C при наличии ацетилметилкарбинола культура окрашивалась в розовый цвет (Биргер, 1982).

Для проверки способности образования индола из триптофана выращивали 2-4 суточные жидкие культуры на 1% пептоне с 0,1% триптофана. Для выявления триптофана на 5 мл культуры наслаивали 0,2-0,5 мл реактива Ковача (п-диметиламинобензальдегид – 3 г, концентрированная соляная кислота – 25 мл, н-бутанол – 75 мл). При наличии триптофана на границе реактива и культуры в течении минуты появляется ярко малиновое кольцо (рис.5).

Способность потреблять цитрат проверяли на твердой среде Симмонса (г/л): цитрат натрия - 3; аммоний фосфорнокислый трехзамещенный -1,5; натрий хлорид – 3,0; агар - 20,0; бромтимоловый синий - 10 мл 1,5% спиртового раствора; магний сернокислый – 0,2; pH 7,2. Потребление цитрата сопровождается посинением среды вокруг бактериальных штрихов (рис. 6).

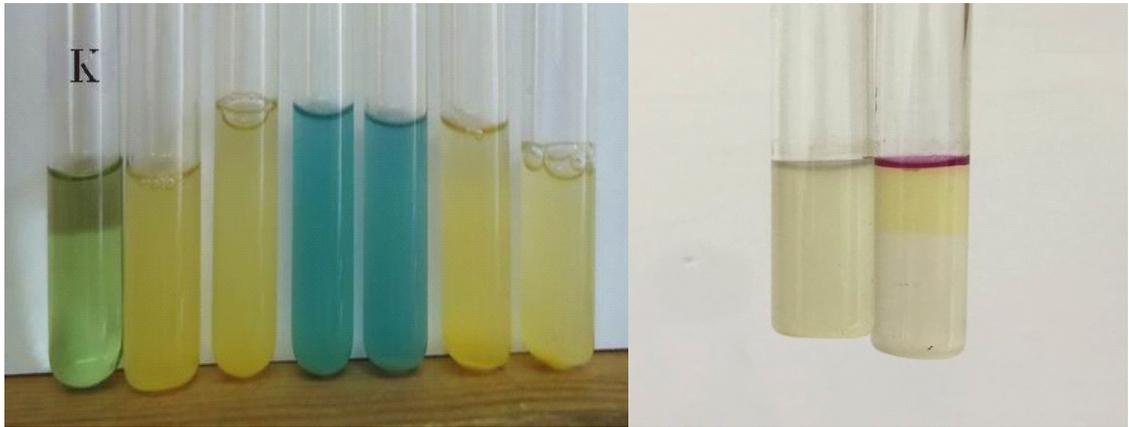


Рис. 5. Рост на среде Гисса с лактозой (слева), реакция на способность образовывать индол из триптофана (справа).

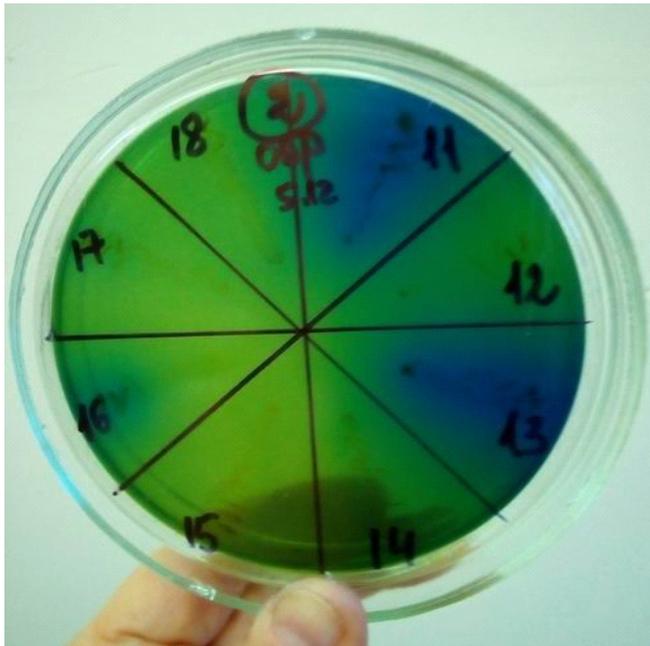


Рис. 6. Тест на способность потребления цитрата на агаре Симмонса.

Образование сероводорода и разложение мочевины проверяли на агаре Олькеницкого (г/100 мл): питательный агар – 1,0; лактоза -1,0; сахароза -1,0; глюкоза – 0,1; мочевина - 1,0; соль Мора – 0,02; тиосульфат натрия – 0,03; феноловый красный 0,4% спиртовой раствор – 0,4 мл. Разложение мочевины вызывает покраснение среды, а образование сероводорода вызывает образование черных зон сульфида железа. Подщелачивание среды за счет расщепления мочевины может быть нейтрализовано сильным кислотообразованием. Поэтому активность уреазы перепроверяли на следующем этапе при использовании тест-системы Рапид-Энтеро.

При затруднениях в постановке окончательного идентификационного диагноза использовали тест-систему для ускоренной биохимической идентификации энтеробактерий «Рапид-Энтеро 50 М» (рис.7) со следующим дополнительным набором фенотипических признаков:

- потребление: эскулина, маннозы, арабинозы, лактозы, сахарозы, адонита, маннита;
- образование индола из триптофана;
- наличие ферментов: уреазы, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, триптофандезаминазы, нитратредуктазы.

Засеянные планшеты инкубировали при 37⁰С, результаты регистрировали по истечении 4 часов и 22-24 часов инкубации.

Результаты тестов использовали для уточнения диагнозов в соответствии с Руководством по систематике бактерий Берги (BrennerandFarmer, 2005).

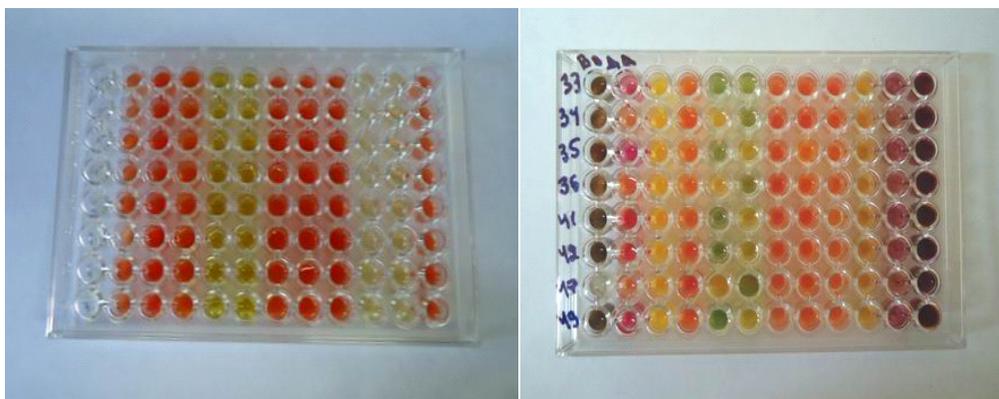


Рис. 7. Внешний вид тест-системы «РАПИД-ЭНТЕРО 50 М»: до постановки тестов (слева), после засева и 4-х часового инкубирования при 37⁰С (справа).

4. Результаты и их обсуждение

4.1. Общее микробное число и содержание колиформных бактерий в аквариумной воде и обрастаниях

Общее микробное число воды и обрастаний составило $7,3 \times 10^2$ КОЕ/мл и $4,8 \times 10^6$ КОЕ/г сырого веса, соответственно. Содержание колиформных бактерий – 6,4 кл/мл воды и $3,5 \times 10^3$ кл/г обрастаний. Таким образом, колиформные бактерии составляют - 1,1% и 0,1% от общего микробного числа воды и обрастаний, соответственно.

По требованиям СанПиН 2.1.5.980-00 в воде рекреационного водопользования и в черте населенных мест содержание общих колиформных бактерий не должно превышать 500 КОЕ в 100 мл воды. Исследованная вода характеризуется небольшим превышением установленного норматива.

4.2. Выделение колиформных бактерий и создание коллекции штаммов

Для составления коллекции колиформных бактерий использовали посеvy на среду Эндо после стадии накопления. Все слизистые колонии темно-красного, красного цвета, с металлическим блеском и без него, с темно-малиновым центром, подозрительные на колиформы, отсевали и очищали клонированием. Всего отсеяно и очищено – 97 штаммов из воды и 101 штамм из обрастаний.

Для подтверждения их принадлежности к колиформам проводили окраску по Граму и оксидазный тест, проверяли способность штаммов сбраживать лактозу с образованием кислоты и газа. В итоге по признаку газообразования на лактозе к колиформам отнесены – **25 штаммов из 97**, выделенных из воды, то есть всего **25,7% штаммов**, исходно подозрительных на колиформы. Дальнейшие этап работы проводили с **24 штаммами**. 1 штамм был исключен по причине низкой жизнеспособности.

При исследовании штаммов, выделенных из обрастаний, по признаку кислото- и газообразования на лактозе к колиформам отнесены - **59 штаммов из 101**, то есть **58,4% штаммов**, исходно подозрительных на колиформы.

4.3. Идентификация колиформных бактерий, выделенных из аквариумной воды

В табл. 3 представлены ключевые фенотипические признаки 24 водных штаммов колиформ в коллекции.

Установлено, что представители рода *Escherichia*, то есть штаммы метил-рот (+), ацетоин (-), индол (+), цитрат (-), сероводород (-) в коллекции колиформ отсутствуют. Все штаммы колиформ, выделенные из воды, были индол (+), что позволило исключить род *Enterobacter*.

Все 24 штамма были метил-рот-отрицательные, не образующие сероводород, способные образовывать ацетоин и индол из триптофана. Для дальнейшей идентификации штаммы раздели на 2 группы – цитрат (+) и цитрат (-) штаммы - 6 и 18 штаммов соответственно (Табл. 3). Предполагаемые роды – для первой группы – *Klebsiella*, *Pantoea*, *Kluuvera*. Для второй группы – предполагаемые диагнозы – *Klebsiella* и *Pantoea*.

Для окончательной идентификации были использованы признаки, установленные с помощью тест-системы Рапид-Энтеро. Результаты тестов и окончательные идентификационные диагнозы представлены в табл. 4.

Таким образом, 24 штамма, выделенные из воды и подтвержденные как колиформные бактерии, представлены преимущественно представителями рода *Klebsiella* – **20 штаммов, 3**

штамма отнесены к роду *Pantoea*, для 1 штамма остался межродовой диагноз – *Klebsiella/Kluuvera*.

4.4. Идентификация колиформных бактерий, выделенных из обрастаний

При тестировании 59 штаммов колиформ, выделенных из обрастаний, по ключевым фенотипическими признаками (табл. 5) установлено, что 27 штаммов из 59 являются сероводород-образующими, что позволило отнести их к роду *Citrobacter* (табл. 5).

Оставшиеся 22 штамма(табл. 5) были разделены на группы по результатам теста с метил-рот и образованию ацетона (реакция Фогес-Проскауера). 1 штамм – метил-рот (-) и Фогес-Проскауер (-) отнесен к роду *Pantoea*. 3 штамма метил-рот (+) и ацетон (+) или (-) отнесены к родам: *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia*. 18 штаммов метил-рот (-) и ацетон (+) также отнесены к родам: *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia*.

В коллекции отсутствовали штаммы метил-рот (+), ацетон (-), индол (+), цитрат (-), сероводород (-), то есть присутствие представителей рода *Escherichia* не установлено.

Таблица 3

Ключевые признаки штаммов колиформ, выделенных из пресной воды аквариума № 4

№ шт	Лактоза	Глюкоза	Метил-рот	Индол	Фогес-Проскауер	Цитрат	H ₂ S	Диагноз
6	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>
11	кГ	кГ	—/+	—	—	—	—	<i>Сл рост</i>
12	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>
15	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>
19	кГ	кГ	—	+	+	+	—	<i>Kl/Pan/Klu</i>
21	кГ	к	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>
22	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>
25	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>
26	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>
33	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>
34	кГ	к	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>

35	кГ	кГ	—	+	+	+	—	<i>Kl/Pan/Klu</i>
36	кГ48 ч	к	+/-	+	+	+	—	<i>Kl/Pan/Klu</i>
41	кГ	кГ	—	+	+	+	—	<i>Kl/Pan/Klu</i>
42	кГ	кГ	—	+	+	—	—?	<i>Kl/Pan</i>
47	кГ	к	—	+	+	+	—	<i>Kl/Pan/Klu</i>
49	кГ	к	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>
50	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>
67	кГ	кГ	—	+	—	—	—	<i>Kl/Pan</i>
76	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>
77	кГ	к	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>
78	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>
79	кГ	к	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>
80	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan</i>
81	кГ	к	—	+	+	+	—	<i>Kl/Pan/Klu</i>

Kl – *Klebsiella*; *Pan* – *Pantoae*; *Klu* – *Kluyvera*.

Таблица 4

Признаки, установленные с помощью тест-системы Рапид-Энтеро и окончательные идентификационные диагнозы штаммовколиформных бактерий, выделенных из воды аквариума № 4

№ шт	Лизин-декарбоксилаза	Орнитинде карбоксил	Эскулин	Уреаза	Адонит	Диагноз
------	----------------------	---------------------	---------	--------	--------	---------

6	+	+	+	+	+21 ч	<i>Klebsiella</i>
12	+	+	+	+	+ 21 ч	<i>Klebsiella</i>
15	+	+	+	+	+ 21 ч	<i>Klebsiella</i>
19	—	-4ч, + 21 ч	+	+/-	+ 21 ч	<i>Pantoea</i>
21	+	+	+	+	+ 21 ч	<i>Klebsiella</i>
22	+	+	+	+	+ 21 ч	<i>Klebsiella</i>
25	+	+	+	+	+ 21 ч	<i>Klebsiella</i>
26	+	+	+	+	+ 21 ч	<i>Klebsiella</i>
33	+	+	+	+	+ 21 ч	<i>Klebsiella</i>
34	—	+	+	+/-	—	<i>Pantoea</i>
35	+	-/+	+	+	+ 21 ч	<i>Klebsiella</i>
36	—	+	+	+	—	<i>Klebsiella/ Kluyvera</i>
41	+	-/+	+	+	+ 21 ч	<i>Klebsiella</i>
42	+	- 4 ч + 21 ч	+	+	+ 21 ч	<i>Klebsiella</i>
47	—	+	—	+	—	<i>Pantoea</i>
49	+	—	+	+	+ 21 ч	<i>Klebsiella</i>
50	+	—	+	+	+ 48 ч	<i>Klebsiella</i>
67	+	- 4 ч + 48 ч	+	+/-	+ 48 ч	<i>Klebsiella</i>
76	+	—	+	+/-	+ 48 ч	<i>Klebsiella</i>
77	+	—	+	+	+ 48 ч	<i>Klebsiella</i>
78	+	—	+	+	—	<i>Klebsiella</i>
79	+	—	+	+	—	<i>Klebsiella</i>
80	+	—	+	+	—	<i>Klebsiella</i>
81	+	—	+	+	—	<i>Klebsiella</i>

Таблица 5

**Ключевые признаки штаммов колиформных бактерий, выделенных
из образцов**

№ шт	Лактоза	Глюкоза	Метил-рот	Индол	Фогес-Проскауер	Цитрат	H ₂ S	Диагноз
18	кГ	к	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
19	кГ	кГ	+	+	—	+	+	<i>Citrobac</i>
20	кГ	к	—	+	—	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
22	кГ	к	—	+	—	+	—	<i>Cit/Kl/Klu/Pan</i>
23	кГ	к	—	+	—	+	—	<i>Cit/Kl/Klu/Pan</i>
25	кГ	кГ	+	+	+	+	—	<i>Cit/Kl/Klu/Pan</i>
28	кГ	кГ	+	+	+	+	—	<i>Cit/Kl/Klu/Pan</i>
30	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
31	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
32	кГ	к	+	+	—	+	+	<i>Citrobac</i>
33	кГ	к	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
34	кГ	к	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
35	кГ	к	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
36	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
37	кГ	к	+	—	—	+	+	<i>Citrobacter</i>
52	кГ	к	—	+	—	—	—	<i>Pantoea</i>
55	кГ	кГ	+	+	—	+	+	<i>Citrobacter</i>
56	кГ	кГ	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter</i>

57	кГ	к	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
59	кГ	кГ	+	—	—	+	+	<i>Citrobacter</i>
61	кГ	кГ	+	—	—	+	+	<i>Citrobacter</i>
62	кГ	кГ	+	—	—	+	+	<i>Citrobacter</i>
63	кГ	к	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter</i>
64	кГ	к	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter</i>
66	кГ	кГ	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter</i>
67	кГ	к	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter</i>
68	кГ	к	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter</i>
69	кГ	кГ	+	—	—	+	+	<i>Citrobacter</i>
70	кГ	к	+	—	+	—	+	<i>Citrobacter</i>
71	кГ	кГ	—	+	+	—	+	<i>Citrobacter</i>
72	кГ	к	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
73	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
74	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>

Kl – Klebsiella; Pan – Pantoeae; Klu – Kluyvera; Cit – Citrobacter; Ser – Serratia.

Таблица 5 (продолжение)

№ шт	Лактоза	Глюкоза	Метил-рот	Индол	Фогес-Проскауер	Цитрат	H ₂ S	Диагноз
75	кГ	к	—	+	+	+	—	<i>Cit/Kl/Klu/Pan</i>
76	кГ	к	+	—	—	—	+	<i>Citrobac</i>
77	кГ	к	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
78	кГ	к	+	+	+	+	+	<i>Citrobac</i>
79	кГ	кГ	+	+	+	+	+	<i>Citrobac</i>
80	кГ	к	+	+	+	+	+	<i>Citrobac</i>

81	кГ	кГ	+	+	+	+	+	<i>Citrobac</i>
82	кГ	к	+	+	—	+	+	<i>Citrobac</i>
83	кГ	кГ	+	+	+	+	+	<i>Citrobac</i>
84	кГ	к	+	—	+	+	+	<i>Citrobac</i>
85	кГ	кГ	+	—	+	+	+	<i>Citrobac</i>
86	кГ	к	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
87	кГ	к	+	+	+	?	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
88	кГ	кГ	+	—	—	+	+	<i>Citrobac</i>
89	кГ	к	+	+	+	+	+	<i>Citrobac</i>
90	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
91	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
92	кГ	к	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
93	кГ	кГ	—	+	+	+	—	<i>Cit/Kl/Klu/Pan</i>
95	кГ	к	—	+	+	+	—	<i>Cit/Kl/Klu/Pan</i>
96	кГ	к	—	—	+	+	+	<i>Citrobac</i>
97	кГ	кГ	—	—	+	+	+	<i>Citrobac</i>
98	кГ	кГ	+	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
99	кГ	к	+	+	—	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
100	кГ	кГ	—	+	+	—	—	<i>Kl/Pan/Ser</i>
101	кГ	к	+	+	—	+	—	<i>Cit/Kl/Klu/Pan</i>

Kl – Klebsiella; Pan – Pantoae; Klu – Kluvera; Cit – Citrobacter; Ser – Serratia.

Для окончательной идентификации штаммов колиформ, не образующих сероводород, использовали тест-систему Рапид-Энтеро. Результаты тестов и окончательные идентификационные диагнозы представлены в табл. 6.

Таблица 6

**Признаки, установленные с помощью Рапид-Энтеро а и окончательные
идентификационные диагнозы штаммовколиформных бактерий,
выделенных из обрастаний воды аквариума № 4**

№ шт	Лизиндекарбоксилаз а	Орнитинде карбоксил	Эскулин	Уреаза	Адонит	Диагноз
18	+	—	+	+	+	<i>Klebsiella</i>
20	+	—	+	—	+/-	<i>Klebsiella</i>
22	+	—	+	+	+	<i>Klebsiella</i>
23	+	—	+	+	+/-	<i>Klebsiella</i>
25	+	—	+	+	+	<i>Klebsiella</i>
28	+/-	—	+	—	+	<i>Klebsiella</i>
30	+	—	+	+	+/-	<i>Klebsiella</i>
31	+	—	+	+	+/-	<i>Klebsiella</i>
33	+	—	+	+	— 4 ч + 48 ч	<i>Klebsiella</i>
34	+	—	+	+	— 4 ч + 48 ч	<i>Klebsiella</i>
35	+	—	+	+	- 4ч +/- 48ч	<i>Klebsiella</i>
36	— 4 ч + 48 ч	—	+	—	- 4ч +/- 48ч	<i>Serratia</i>
57	+	—	+	+	- 4ч +/- 48 ч	<i>Klebsiella</i>
72	+	—	+	+	- 4 ч + 48 ч	<i>Klebsiella</i>
73	+	—	+	+	—/+	<i>Klebsiella</i>
74	+	—	+	+	- 4 ч + 48 ч	<i>Klebsiella</i>
75	+/-	+	+	+	—	<i>Kluyvera/Serratia</i>
77	+	—	+	+	—	<i>Klebsiella</i>
86	+	—	+	+	—	<i>Klebsiella</i>

87	+	—	+	+/-	—	<i>Klebsiella</i>
90	+	—	+	+	—	<i>Klebsiella</i>
91	+	—	+	+	—	<i>Klebsiella</i>
92	+	—	+	+	—	<i>Klebsiella</i>
93	+	+	+	+	—	<i>Kluyvera/Serratia</i>
95	+	+	+	+/-	—	<i>Kluyvera</i>
98	+	+	+	+	—	<i>Klebsiella/Serratia</i>
99	+	—	+	+	—	<i>Klebsiella</i>
100	+	—	+	+	—	<i>Klebsiella</i>
101	+	+	—	+	—	<i>Kluyvera/Serratia</i>

Таким образом, из 59 штаммовколиформ, выделенных из обрастаний, 29 штаммов отнесены к роду *Citrobacter*, 23 штамма - к роду *Klebsiella*, по 1 штамму - к родам *Pantoea*, *Kluyvera*, *Serratia*. 4 штамма до рода идентифицировать не удалось, они получили лишь межродовые диагнозы: 3 штамма - *Kluyvera/Serratia* и 1 штамм - *Klebsiella/Serratia*.

4.5. Обсуждение и заключение

Сводные данные по идентификации коллекций колиформных бактерий представлены в табл. 7.

Таблица 7

Представительство родов колиформных бактерий в воде и обрастаниях аквариума №4

Роды колиформных бактерий и их содержание в % от штаммов в коллекции	
Вода – 24 штамма	Обрастания – 59 штаммов
<i>Klebsiella</i> – 83,3%	<i>Citrobacter</i> – 49,2%
<i>Pantoea</i> – 12,5 %	<i>Klebsiella</i> – 39,0%
<i>Klebsiella/Kluyvera</i> – 4,2%	<i>Pantoea, Kluyvera, Serratia</i> – по 1,7%
	<i>Kluyvera/Serratia</i> – 5,1%

<i>Klebsiella/Serratia</i> - 1,7%

Можно отметить, что в коллекции штаммов колиформных бактерий из исследованной воды отсутствует *E.coli*, но в значительной степени преобладают представители рода *Klebsiella*. Обогащение воды клебсиеллами можно объяснить наличием у них способности образовывать слизь, что способствует сохранению клетками жизнеспособности при воздействии УФ-излучения.

Подавляющее количество штаммов водных колиформ (22 из 24 штаммов) в тесте с метил-рот дает отрицательную реакцию (рН культуры выше 4,8), в тесте Фогес-Проскауера они демонстрируют способность образовывать ацетон. Это указывает на обогащение водной среды колиформами, способными трансформировать кислые продукты брожения в нейтральные и тем самым более эффективно выживать в агрессивной водной среде. Данное свойство популяции водных колиформ отражается в более светлой окраске колоний на среде Эндо (красные, светло-красные, розовые).

Представители родов *Escherichia*, *Enterobacter* и *Citrobacter*, традиционно считающиеся колиформами, в санируемой УФ воде не обнаружены. Это может быть объяснено жесткими рамками определения границ группы «колиформ» в методике их выявления, а именно потреблением лактозы с образованием кислоты и газа. Действительно, лишь 24 водных изолята из 97, подозрительных на принадлежность к колиформам, были подтверждены по кислото- и газообразованию на лактозе. В числе штаммов, оставшихся за пределами установленной группы колиформ, только 3 штамма не были энтеробактериями. Остальные 70 штаммов оказались способными сбраживать не лактозу, а глюкозу с образованием кислоты или кислоты и газа. 1 штамм сбраживал лактозу с подкислением, но без газообразования. Возможно, в этой многочисленной группе лактозо-отцательных штаммов и находятся представители классических родов колиформ, потерявшие способность сбраживать лактозу в условиях непрерывной УФ-санации.

Коллекция колиформные бактерии из обрастаний (табл. 7) на 88% состоит из штаммов р. *Citrobacter* (49,2%) и р. *Klebsiella* (39,0%). В воде при непрерывном УФ-облучении бактерии р. *Citrobacter* гибнут, но в обрастаниях в соседстве со слизиобразующими клебсиеллами они стали доминировать в группе колиформ. При этом в условиях

конкуренции, возможно именно с клебсиеллами, бактерии р. *Citrobacter* прошли селекцию на способность образовывать сероводород.

Обрастания, образующие сероводород, безусловно, негативно сказываются на состоянии гидробионтов и бактерий в биофильтрах. Поэтому следует организовать обслуживание аквариумов и биофильтров таким образом, чтобы минимизировать масштабы подобных обрастаний.

С целью соответствия воды аквариумов действующим требованиям по показателю «колиформы» можно рекомендовать повысить эффективность фильтрации воды в замкнутых водных системах. Уменьшение размера механических частиц в воде должно заметно повысить эффективность УФ-облучения.

Немаловажным является контроль гигиенического состояния гидробионтов, поступающих в океанариум из торгующих организаций. Карантинный период, по-видимому должен сопровождаться и микробиологическими анализами на присутствие ряда патогенов.

Данные, полученные в работе, являются доказательством необходимости пересмотра гигиенических показателей для объектов профессиональной аквариумистики. В первую очередь необходимо сделать обоснованный выбор в пользу тех или иных индикаторных групп микроорганизмов, присутствие которых в воде аквариумов с непрерывной санацией указывает на высокий риск присутствия возбудителей желудочно-кишечных инфекций.

Действительно режим постоянной санации снижает физиологическую активность бактерий и уменьшает надежность гигиенических показателей. В МУК 4.2.1884-04 в разделе «2.7.2. Значение показателей и область применения» указано, что при высоком антропогенном, в частности, химическом загрязнении водоемов возможно снижение индикаторного значения лактозоположительных колиформ. В таких случаях «следует» обратить внимание на рост лактозоотрицательных колоний, определить их принадлежность к бактериям семейства *Enterobacteriaceae* (по отрицательному оксидазному тесту и ферментации глюкозы до кислоты и газа) и включить их в число колиформ при выдаче результата.

Увеличение числа колиформ за счет лактозоотрицательных вариантов делает требования к воде еще более жесткими. Поэтому рекомендуемый пересмотр гигиенических требований к аквариумистике должен затронуть и нормативы выбранных индикаторных групп. Для этого необходимы масштабные микробиологические исследования воды всех аквариумов одновременно по показателям: «общее микробное число», «колиформы» (общие и термотолерантные), «*E.coli*», возможно «энтерококки». Анализы необходимо провести до и после

кормления рыбы (после дефекации), когда уровень колиформ вероятнее всего будет в воде максимальным.

5. Выводы

1. Качественный состав колиформных бактерий воды пресноводного аквариума с замкнутой системой санации воды облучением УФ на 80% представлен слизеобразующими энтеробактериями рода *Klebsiella*.
2. Постоянное облучение воды УФ приводит к накоплению в обрастаниях энтеробактерий рода *Klebsiella* и сероводород-образующих вариантов рода *Citrobacter*, снижающих эффективность работы биофильтров и опасных для здоровья гидробионтов.

3. Впервые в составе колиформ аквариумной воды и обрастаниях выявлены новые роды энтеробактерий *Pantoea* и *Kluuyvera*.

6. Список научной литературы

1. Биргер М.О. 1982. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. «Медицина», М.
2. Герхардт Ф. 1984. Методы общей бактериологии, т.3, 20.1. Рутинные тесты. С. 10-97.
3. Калина Г.П. Санитарная микробиология. Издательство «Медицина», М., 1969.
4. Кузьмина В.В., Золотарева Г.В., Шептицкий В.А., Филипенко С.И. 2016. Роль объектов питания и микробиоты в процессах пищеварения рыб из разных экосистем. Тирасполь, Изд-во Приднестровского университета.

5. МУК 4.2.1884-04. Методические указания. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов.
6. СанПиН 2.1.5.980-00. 2.1.5. Водоотведение населенных мест, санитарная охрана водных объектов. Гигиенические требования к охране поверхностных вод. Санитарные правила и нормы" с изм. на 2011 г.
7. СанПиН 2.1.4.1074-01 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества.
8. СанПиН 2.1.2.1331—03. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды аквапарков.
9. Цесулис А. В. 2008. Колиформные бактерии пресноводных аквариумов. Выпускная работа бакалавра, СПбГУ.
10. Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.*, V. 172, p. 762–770.
11. Berthe T., M. Ratajczak, O. Clermont, E. Denamur, F. Petite. 2013. Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic environments and their survival in estuary water. *Appl Environ Microbiol*, V. 79, N 15, p. 4684–4693.
12. Boehm A.B., F uherman J.A., Mrse R.D., Grant S.B. 2003 Tiered approach for identification of a human fecal pollution source at a recreational beach: case study at Avalon Bay, Catalina Island, California. *Environ. Sci. Technol.* V. 37, p. 673-680.
13. Bregnballe J. 2015. A guide to recirculation aquaculture. An introduction to the new environmentally friendly and highly productive closed fish farming systems. FAO.
14. Brenner D.J., Farmer J.J. III. 2005. Family I. Enterobacteriaceae. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, vol. 2 The Proteobacteria, Part B, The Gamma-proteobacteria*, p.587-850.

15. Burton G. A. JR., Gunnison D., Lanza G.R. 1987. Survival of pathogenic bacteria in various freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol.*, V. 53, N. 4, p. 633-638.
16. Colwell, R.R., Grimes, D.J. (Eds.), 2000. Nonculturable microorganisms in the environment. ASM Press, Washington, DC, USA.
17. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption .
18. Davies, C.M., Apte, S.C., Peterson, S.M., 1995. β -D-galactosidase activity of viable, non-culturable coliform bacteria in marine waters. *Lett. Appl. Microbiol.* V. 21, p. 99– 102.
19. Del Rio-Rodriguez R., V. Inglis, S. D. Millar. 1997. Survival of *Escherichia coli* in the intestine of fish. *Aquaculture Research*, V. 28, p. 257-264.
20. Fielda K.G., Samadpourb M. 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Reseach*, V. 41, p. 3517 – 3538.
21. Gerba Ch., McLeod J. 1976. Effect of sediments on the survival of *Escherichia coli* in marine waters. *Appl Environ Microbiol.*, V. 32, N 1, p. 114-112.
22. Gorlach-Lira, K., Pacheco, C., Carvalho, L.C.T., MeloJúnior, H.N. and Crispim, M.C. 2013. The influence of fish culture in floating net cages on microbial indicators of water quality. *Braz. J. Biol.*, V. 73, N. 3, p. 457-463 457.
23. Harwood V.J., Butler J., Parish D., Wagner V. 1999. Isolation of fecal coliform bacteria from the Diamondback Terrapin (*Malaclemys terrapin centrata*). *Appl Environ Microbiol.*, V.65, N 2, p. 865-867.
24. Helfrich, L., Libey, G. 2015. Fish farming in recirculating aquaculture systems.
www.aces.edu/dept/fisheries/aquacultur/documents/recirculatingVT.pdf
25. ISO 9308-1. International Standard. Water quality. Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method. Part1. Second edition 2000-09-15.

26. ISO 9308-2. International Standard. Water quality. Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 2: Most probable number method. Second edition 2012-07-01.
27. Kindaichi T., Ito T., Okabe S. 2004. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol.*, V. 70, N. 3, p. 1641–1650.
28. Liltved H., S J Cripps 1999. Removal of particle-associated bacteria by prefiltration and ultraviolet irradiation. *Aquaculture Research*, V. 30, p. 445-450.
29. Liltved H., Hektoen H., Efraimsen H. 1995. Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquacultural Engineering*, V. 14, p.107-122.
30. Liltved, H., Vogelsang, C., Modahl, I., Dannevig, B.H., 2006. High resistance of fish pathogenic viruses to UV irradiation and ozonated seawater. *Aquacultural Engineering*, V. 34, p. 72–82.
31. Marin C., Ingesa-Capaccioni S., González-Bodi S., Marco-Jiménez F. , Vega S. 2013. Free-living turtles are a reservoir for *Salmonella* but Not for *Campylobacter*. *Plos One* www.plosone.org V.8, Issue 8, e72350.
32. Martinsa C.I.M., Edinga E.H., Verdegema M.C.J., Heinsbroeka L.T.N., Schneiderc O., Blanchetond J.P., Roque d'Orbcasteld E. and Verreththa J.A.J. 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural Engineering*, V. 43, Issue 3, p. 83-93.
33. Maugeri T.L., Carbone M., Fera M.T., Irrera G.P. and Gugliandolo C. 2004. Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton associated in a marine coastal zone. *J. Appl. Microbiol.* V. 97, p.354–361.
34. Meaysa C. L., Broersmab K, Nordina R, Mazumdera A. 2004. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *J. Environ. Management*, V. 73, p.71–79.

35. Ministère de la santé, 1996.Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada, 6ième edn., Centre d'édition du gouvernement du Canada, Approvisionnements et services Canada.
36. Mitchell J.C. and McAvoy B.V. 1990. Enteric bacteria in natural populations of freshwater turtles in Virginia.Virginia Journal of Science, V.41, N 3, p.233-242.
37. Moore B.C., Martinez E., Gay J.M., Rice D.H. 2003, Survival of *Salmonella enterica* in freshwater and sediments and transmission by the aquatic midge *Chironomus tentans* (Chironomidae: Diptera). Appl Environ Microbiol., v. 69, N 8, p. 4556–4560.
38. Nayak S.K. 2010.Role of gastrointestinal microbiota in fish .Aquaculture Research, V. 41, p. 1553- 1573.
39. Pachersky Y. A and Shelton D. R.. 2011. *Escherichia coli* and fecal coliforms in freshwater and estuarine sediments. Critical reviews in environmental science and technology, V. 41, p. 1067–1110.
40. 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. J. Food Protection, V. 61, N 2, p. 205-210.
41. Reilly A. and 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.
42. Rompre' A., Servais P., Baudart P., M-Rene'e de-Roubin c, P. Laurent. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. Journal of Microbiological Methods, V. 49, p. 31–54.
43. Sargeant D. 1999.Fecal contamination source identification methods in surface water.Washington State Department of Ecology, Ecology Report, p.99-345.

44. Scheible O.K., Casey M.C. and Forndran A. 1985. Ultraviolet disinfection of wastewaters from secondary effluent and combined sewer overflows. EPA 600/2-86-05. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.
45. Sharrer, M.J., Summerfelt, S.T., Bullock, G.L., Gleason, L.E., Taeuber, J., 2005. Inactivation of bacteria using ultraviolet irradiation in a recirculating salmonid culture system. *Aquacultural Engineering*, V. 33, p. 135–149.
46. Sharrer M.J., Summerfelt S.T. 2007. Ozonation followed by ultraviolet irradiation provides effective bacteria inactivation in a freshwater recirculating system. *Aquacultural Engineering*, V.37, p. 180–191.
47. [Sugita](#) Haruo , [Nakamura](#) Hiroshi, [Shimada](#) Taku. 2005. Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. *Aquaculture*, V. 243, issues 1-4, p.403-409.
48. Simoes L. C., M, and M. J. Vieira. 2007. Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. *Appl Environ Microbiol*, V. 73, p.6192–6200.
49. Simoes L Ch, Simoes M, and Vieira J.M. 2008. Intergeneric coaggregation among drinking water bacteria: evidence of a role for *Acinetobacter calcoaceticus* as a bridging bacterium. *Appl Environ Microbiol*, V. 74, N.4, p. 1259–1263.
50. Summerfelt, S.T., Hankins, J.A., Weber, A.W., Durant, M.D., 1997. Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system. II. Effects on microscreen filtration and water quality. *Aquaculture*. V. 158, p. 57–67.
51. Summerfelt, S.T., 2003. Ozonation and UV irradiation — an introduction and examples of current applications. *Aquacultural Engineering*, V. 28, p.21–36.
52. Summerfelt, S.T., Sharrer, M., Hollis, J., Gleason, L., Summerfelt, S.R., 2004. Dissolved ozone destruction using ultraviolet irradiation in a recirculating salmonid culture system. *Aquacultural Engineering*, V 32, p.209–224.

53. Trust T.J. and Barlett K. H. 1974. Occurrence of potential pathogens in water containing ornamental fishes. *Appl Microbiol.*, V. 28, N. 1, p.35-40.
54. Trust T.J. and Barlett K. H. 1976. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species from ornamental aquarium plants. *Appl Environ Microbiol.*, V. 31, N. 6, p. 992-994.
55. US Environmental Protection Agency, 1990. Total coliform rule and surface water treatment rules. Federal Regulations. Government Printing Office, Washington, DC.
56. Virginia Aquarium Water Quality Parameters Explained, 2016.
57. Walk S.T., Alm E.W., Calhoun L.M., Mladonicky J.M., Whittam Th.S. 2007. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environmental Microbiology*, V. 9, N 9, p. 2274–2288.
58. Wells, J. G., G. McC. Clark, and G. K. Morris. 1973. Evaluation of methods for isolating *Salmonella* and *Arizona* organisms from pet turtles. *Appl. Microbiol.*, V. 27, p. 8-10.
59. Whitby G.E. and Palmateer G. 1993. The effect of UV transmission, suspended solids and photoreactivation on microorganisms in wastewater treated with UV. *Water Science and Technology*, V. 27, p.379-386.
60. World Health Organization, 1989. Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture. Technical report series, 778, Geneva.
61. World Health Organisation, 1994. Guidelines for Drinking Water Quality, 2nd ed. World Health Organisation, Geneva.

7. ПРИЛОЖЕНИЕ

«Фенотипические признаки лактозоположительных родов семейства *Enterobacteriaceae*» (Brenner and Farmer, 2005)

Число положительных реакций при инкубации посевов в течение 2 –х дней при 36 ⁰ С

	Лакто-за	Глюкозакислота, газ	Метил-рот	Индо-л	Реакция Фогес-Проскауэра	Цитрат	H ₂ S	Лизин-декарбоксилаза	Орнитинде-карбоксилаза	Эскулин	Уреаза	Адонит
<i>Escherichia coli</i>	95	100/95	99	98	0	1	1	90	65	35	1	5
<i>Escherichia coli, inactive</i>	25	100/5	95	80	0	1	1	40	20	5	1	3
<i>Escherichia hermannii</i>	45	100/97	100	99	0	1	0	6	100	40	0	0
<i>Escherichia vulneris</i>	15	100/97	100	0	0	0	0	85	0	20	0	0
<i>Budvicia aquatica</i>	87	100/53	93	0	0	0	80	0	0	0	33	0
<i>Buttiauxella agrestis</i>	100	100/100	100	0	0	100	0	0	100	100	0	0
<i>Buttiauxella gaviniae</i>	60	100/40	100	0	0	20	0	0	0	100	0	100
<i>Buttiauxella izardii</i>	100	100/100	100	0	0	0	0	0	100	100	0	0
<i>Cedeceae davisae</i>	19	100/70	100	0	50	95	0	0	95	45	0	0
<i>Cedeceae lapagei</i>	60	100/100	40	0	80	99	0	0	0	100	0	0
<i>Cedeceae neteri</i>	35	100/100	100	0	50	100	0	0	0	100	0	0
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	35	100/97	100	100	0	95	5	0	95	5	85	0
<i>Citrobacter freundii</i>	78	100/89	100	33	0	78	78	0	0	0	44	0
<i>Citrobacter braakii</i>	80	100/93	100	33	0	87	60	0	93	0	47	0
<i>Citrobacter farmeri</i>	15	100/96	100	100	0	10	0	0	100	0	59	0
<i>Citrobacter gillienii</i>	67	100/100	100	0	0	33	67	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter koseri (C. diversus)</i>	50	100/98	100	99	0	99	0	0	99	1	75	99

<i>Citrobacter murlinae</i>	67	100/100	100	100	0	100	67	0	0	0	67	0
<i>Citrobacter rodentium</i>	100	100/100	100	0	0	0	0	0	100	0	100	0
<i>Citrobacter sedlakii</i>	100	100/100	100	83	0	83	0	0	100	17	100	0

Число положительных реакций при инкубации посевов в течение 2 –х дней при 36°C												
	Лакто-за	Глюкозакислота, газ	Метил-рот	Индо-л	Реакция Фогес-Проскауэра	Цит-рат	H ₂ S	Лизин-декарбоксилаза	Орнитиндекарбоксилаза	Эскулин	Уреаза	Адонит
<i>Citrobacter werkmanii</i>	17	100/100	100	0	0	100	100	0	0	0	100	0
<i>Citrobacter youngae</i>	25	100/75	100	15	0	75	65	0	5	5	80	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	93	100/100	5	0	100	100	0	0	96	30	65	25
<i>Enterobacter aerogenes</i>	95	100/100	5	0	98	95	0	98	98	98	2	98
<i>Enterobacter amnigenus biogr. 1</i>	70	100/100	7	0	100	70	0	0	55	91	0	100
<i>Enterobacter amnigenus biogr. 2</i>	35	100/100	65	0	100	100	0	0	100	100	0	0
<i>Enterobacter asburiae</i>	75	100/95	100	0	2	100	0	0	95	95	60	0
<i>Enterobacter cancerogenus (E.taylorae)</i>	10	100/100	5	0	100	100	0	0	99	90	1	0
<i>Enterobacter gergoviae</i>	55	100/98	5	0	100	99	0	90	100	97	93	0
<i>Enterobacter hormaechei</i>	9	100/83	57	0	100	96	0	0	91	0	87	0
<i>Enterobacter intermedius</i>	100	100/100	100	0	100	65	0	0	89	100	0	0

<i>Enterobacter pyrinus</i>	14	100/100	29	0	86	0	0	100	100	100	86	0
<i>Enterobacter sakazakii</i>	99	100/98	5	11	100	99	0	0	91	100	1	0
<i>Ewingella americana</i>	70	100/0	84	0	95	95	0	0	0	50	0	0
<i>Hafnia alvei</i>	5	100/98	40	0	85	10	0	100	98	7	0	0
<i>Klebsiella pneumonia subsp. ozaenae</i>	30	100/50	98	0	0	30	0	40	3	80	10	97
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	98	100/97	10	0	98	98	0	98	0	99	95	90
<i>Klebsiella oxytoca</i>	100	100/97	20	99	95	95	0	99	0	100	90	99
<i>Klebsiella oxytoca, ornithine positive</i>	100	100/100	96	100	70	100	0	100	100	100	100	100
число положительных реакций при инкубации посевов в течение 2 –х дней при 36°С												
	Лакто-за	Глюкозакислота, газ	Метил-рот	Индо-л	Реакция Фогес-Проксауэра	Цит-рат	H ₂ S	Лизин-декарбоксилаза	Орнитиндекарбоксилаза	Эскулин	Уреаза	Адонит
<i>Klebsiella planticola</i>	100	100/100	100	20	98	100	0	100	0	100	98	100
<i>Klebsiella terrigena</i>	100	100/80	60	0	100	40	0	100	20	100	0	100
<i>Kluyvera ascorbata</i>	98	100/93	100	92	0	96	0	97	100	99	0	0
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	95	100/95	100	90	0	80	0	23	100	100	0	0
<i>Kluyvera georgiana</i>	83	100/17	100	100	0	100	0	100	100	100	0	0
<i>Ledercia adecarboxylata</i>	93	100/97	100	100	0	0	0	0	0	100	48	93

<i>Moellerella wisconsensis</i>	100	100/0	100	0	0	80	0	0	0	0	0	100
<i>Pantoea aglomerans</i>	40	100/20	50	20	70	50	0	0	0	60	20	7
<i>Rahnella aquatilis</i>	100	100/98	88	0	100	94	0	0	0	100	0	0
<i>Salmonella enterica subsp. arizonae</i>	15	100/99	100	1	0	99	99	99	99	1	0	0
<i>Salmonella enterica subsp. diarizonae</i>	85	100/99	100	2	0	98	99	99	99	1	0	0
<i>Salmonella enterica subsp. Indica</i>	22	100/100	100	0	0	89	100	100	100	0	0	0
<i>Serratia ficaria</i>	15	100/0	75	0	75	100	0	0	0	100	0	0
<i>Serratia fonticola</i>	97	100/79	100	0	9	91	0	100	97	100	13	100
<i>Serratia liquefaciens</i>	10	100/75	93	1	93	90	0	95	95	97	3	5
<i>Serratia marcescens biogroup 1</i>	4	100/0	100	0	60	30	0	55	65	96	0	30
<i>Serratia odorifera biogroup 1</i>	70	100/0	100	60	50	100	0	100	100	95	5	50
<i>Serratia odorifera biogroup 2</i>	97	100/13	60	50	100	97	0	94	0	40	0	55
<i>Serratia plymthica</i>	80	100/40	94	0	80	75	0	0	0	81	0	0
<i>Serratia rubidaea</i>	100	100/30	20	0	100	95	0	55	0	94	2	99
число положительных реакций при инкубации посевов в течение 2 –х дней при 36°C												
	Лактоза	Глюкоза, кислота, газ	Метилрот	Индо-л	Реакция Фогес-Проксауэра	Цитрат	H ₂ S	Лизин-декарбоксилаза	Орнитиндекарбоксилаза	Эскулин	Уреаза	Адонит

<i>Yersinia bercovieri</i>	20	100/0	100	0	0	0	0	0	80	20	60	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	5	100/5	97	50	2	0	0	0	95	25	75	0
<i>Yersinia frederiksenii</i>	40	100/40	100	100	0	15	0	0	95	85	70	0
<i>Yersinia intermedia</i>	35	100/18	100	100	5	5	0	0	100	100	80	0
<i>Yersinia kristensenii</i>	8	100/23	92	30	0	0	0	0	92	0	77	0
<i>Yersinia mollaretii</i>	40	100/0	100	0	0	0	0	0	80	0	20	0