

# **Plunge Drone**

**Отбор проб**

## Отбор проб

### Воды

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

### 2. Отбор и транспортировка проб воды и грунта

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

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

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

пробами упаковывают в сумки-холодильники или в ящики с теплоизолирующей прокладкой. При транспортировке проб избегают различных толчков, которые могут привести к намоканию пробок.

2.4. Отобранные пробы сопровождаются документом, содержащим следующие сведения:

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

Сопроводительный документ подписывает лицо, отбиравшее пробы, с указанием места работы и должности.

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

Пробы грунта отбирают стеклянными трубочками или специальными колонками в емкости и транспортируют в лаборатории, соблюдая правила асептики. Учитывается масса ила, взятого для исследования (внесенного в емкость для разведения физраствором), для получения общепринятым методом дальнейших разведений определенной кратности (десятикратного, стократного и т.д. до 1 млрд.).

Дальнейшие исследования проводят теми же методами, что и анализ воды. Расчет количества микроорганизмов ведется на 1,0 г поверхностного слоя грунта.

### 3. Методы исследований

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

3.1. Определение микробного числа (МАФАНМ КОЕ/см<sup>3</sup> (г) воды (грунта).

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

#### 3.1.1. Проба с резазурином натрия

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

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

#### 3.1.2. Чашечный метод.

Сущность метода заключается в высеивании определенного объема исследуемой воды или ее разведении в чашки Петри в глубину агара и последующем подсчете выросших колоний. При этом исходят из того, что каждая колония является результатом размножения одной клетки. Работа этим методом включает три этапа: приготовление разведений, посев в чашки Петри, подсчет выросших колоний.

Разведения готовят в стерильном физрастворе, пользуясь постоянным коэффициентом разведения, равным 10.

Для приготовления разведений физраствор разливают по 9,0 (4,5) мл в стерильные сухие пробирки. Затем 1,0 (0,5) мл исследуемой воды, взятой стерильной пипеткой, переносят в пробирку с физраствором - это первое разведение 1:10. Полученную в первом разведении суспензию тщательно перемешивают стерильной пипеткой. Этой же пипеткой берут 1,0 (0,5) мл полученного разведения и переносят во вторую пробирку с физраствором - это второе разведение 1:100. Таким же образом готовят и последующие разведения.

Заранее приготовленный МПБ подогревают на водяной бане до 45°C.

Стерильные чашки Петри раскладывают на столе и подписывают на крышках номер пробы, дату посева и степень разведения. Из каждой пробы воды и её разведений производят посев по 1,0 мл параллельно на две чашки с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний.

С флаконов, содержащих исследуемую воду, снимают бумажные колпачки, вынимают пробки, горлышки фламбируют, после чего воду тщательно перемешивают осторожным продуванием воздуха через стерильную пипетку. Эту операцию производят перед приготовлением разведений.

Стерильной пипеткой отбирают 1 мл воды (и её разведений) вносят в стерильные чашки, слегка приоткрывая крышку. При этом для каждой пробы воды и для каждого разведения используется отдельная стерильная пипетка. Посевы из разведений можно делать одной пипеткой, но начинать следует обязательно из большего разведения.

После внесения воды (и её разведений) в эти чашки, с соблюдением условий стерильности, заливают остуженный питательный агар в количестве 10,0-12,0 мл. Воду быстро смешивают с агаром, осторожно наклоняя или вращая чашку. Необходимо полностью заливать дно чашки, избегая попадания среды на края и образования пузырьков воздуха. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности до застывания среды. Чашки с посевом помещают в термостат вверх дном. Посевы выращивают при температуре 27°C в течение 5 суток.

Подсчет колоний, выросших на поверхности и в глубине агара, производят при помощи лупы. Если в чашке с наиболее высоким разведением выросло свыше 300 колоний и анализ нельзя повторить, то допускается подсчет колоний при помощи счетной пластинки с лупой при сильном боковом освещении. Подсчитывают не менее 20 квадратов площадью в 1 см<sup>2</sup> в разных местах чашки, выводят среднее арифметическое число колоний на 1 см<sup>2</sup>, величину которого умножают на площадь чашки по формуле  $S = \pi R^2$ , где R - радиус чашки (см).

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

Учет количества колоний можно вести, ориентируясь на одну чашку в случаях, если на другой: а) при посеве из разведения выросло менее 20 колоний; б) ползучий рост бактерий, распространившийся на всю

поверхность чашки или значительные зоны, маскирует рост других колоний; в) количество колоний превышает 300.

### 3.1.3. Метод предельных разведений.

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

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

### 3.2. Определение бактерий группы кишечных палочек (БГКП)

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

с посевами помещают в термостат и инкубируют при температуре  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  в течение 24-48 ч.

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

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

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

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

#### 3.3.1. Индикация и количественный учет аэромонад.

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

Двухэтапный метод. Пробы воды и их разведения высевают по 0,5 мл в жидкую среду накопления, в состав которой входят: сульфат магния,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , желатин, крахмал (среда А-1). Через 24 ч инкубирования посевов в термостате при температуре  $30^{\circ}\text{C}$  производят пересев на плотную дифференциально-элективную среду, в состав которой кроме перечисленных компонентов (среда А-1) входят: водный раствор кристаллического фиолетового и трифенилтетрахлорид (среда А-2). Посевы на плотной элективной среде инкубируют в термостате при температуре  $28-30^{\circ}\text{C}$  в течение 42-48 ч. Характеристика колоний аэромонад на плотной

дифференциально-элективной среде (среда А-2): крупные с вишневым центром и узким бесцветным ободком.

### 3.3.2. Индикация и количественный учет псевдомонад.

Наличие *P. fluorescens* определяют трехэтапным методом:

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

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

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

Характерным признаком является появление золотистого или металлического блеска. Наиболее типичные колонии на среде "блеск" подвергают идентификации путем высевов: на среду Кинга-А; специальную среду для определения оксидации мальтозы с бромтимоловым синим; среду для определения теста Хью-Лсйфсона (оксидация и ферментация) с феноловым красным, среду для определения нитрат-нитритредуктазы и на реакцию цитохромоксидазы по Гэби и Хедли.



## Грунта

В приведенной таблице продемонстрированы возможные для взятия дроном пробы, в соответствии с гостами, как прибор для взятия грунта было решено использовать дночерпатель

Вид анализа	Как отбирать	Объем пробы, необходимый для анализа	Условия хранения – сроки хранения
<b>ДОННЫЕ ОТЛОЖЕНИЯ</b>			
Химический	Для отбора проб в зависимости от задач исследования и схем отбора проб применяются дночерпатели, драги и др. Материал рабочих органов	Масса пробы должна быть не менее 1 кг.	Хранить в емкостях из химически нейтрального материала. При температуре выше 4-5 °С – 2 суток. При температуре ниже - 20 °С – до 30 суток.
Сухой остаток, Прокаленный сухой остаток	устройств для отбора проб донных отложений (непосредственно контактирующих с пробой) не должен изменять состав пробы. Сосуды для хранения проб должны герметически закрываться. Для хранения проб могут быть использованы широкогорлые сосуды из химически стойкого стекла или пластмасс типа тефлона и полиэтилена высокого давления с герметически закрывающимися крышками или термосы.	Масса пробы должна быть не менее 1 кг.	Отобранные пробы хранят в стеклянных сосудах с плотно закрывающейся крышкой не более 3 суток при температуре (4-8)°С.
Щелочность общая Щелочность свободная		Масса пробы должна быть не менее 1 кг.	Определение проводят не позднее чем через 6 часов после отбора пробы. Пробу не консервируют. При отборе жидких проб емкость заполняют доверху, чтобы не осталось пузырьков воздуха. При транспортировке предохраняют от нагревания.
Цианиды		Пробы отбирают в емкости (банки) из темного стекла с Хранить в емкостях из химически нейтрального 2 Отбор проб донных отложений LABCLUSTER притертой или плотно закручивающейся крышкой, заполняя емкости под горло.	Хранить в емкостях из химически нейтрального материала. При температуре выше 4-5 °С – 2 суток. При температуре ниже - 20 °С – до 30 суток.

		Масса отобранной пробы должна составлять не менее 100 г.	
Бактериологический, Паразитологический		Масса пробы должна быть не менее 1 кг.	При температуре от 4 °С до 5 °С не более 24 ч.
Радиологический		Масса пробы должна быть не менее 1 кг.	Хранить в емкостях из химически нейтрального материала. При температуре выше 4-5 °С – 2 суток. При температуре ниже - 18 °С – до 30 суток.
Токсикологический		Масса пробы должна быть не менее 1 кг.	Пробы анализируют не позднее 12 ч с момента отбора. Если данное условие нельзя выполнить, то пробы хранят в холодильнике в емкостях с плотно закрытой крышкой до одной недели при температуре от (+2) до (+4)°С. Консервирование не допускается

Для определения необходимых проб и замеров использовались следующие госты:

ГОСТ 17.1.5.01-80

ГОСТ 12071—2014

ГОСТ 5180-2015

ГОСТ 17.1.5.04-81

Р 52.24.353-2012

ГОСТ 31861-2012

ГОСТ 31942-2012

ГОСТ Р 70282-2022

ГОСТ 31861-2012

ГОСТ 31942-2012