

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

Е. В. АВДЕЕВА

ИХТИОПАТОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие по лабораторным работам (лабораторный практикум) для студентов, обучающихся в бакалавриате по направлению подготовки 35.03.08 Водные биоресурсы и аквакультура

Калининград
2023

УДК 574.63(076)

Рецензент

кандидат биологических наук, доцент кафедры водные биоресурсы
и аквакультура ФГБОУ ВО «КГТУ» О.Е. Гончаренок

Авдеева, Е. В.

Ихтиопатология: учеб.-методич. пособие по лабораторным работам для студ. бакалавриата по напр. подгот. 35.03.08 Водные биоресурсы и аквакультура / **Е. В. Авдеева.** – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», – 61 с.

В учебно-методическом пособии по выполнению лабораторных работ по дисциплине «Ихтиопатология» представлены методические материалы по подготовке к лабораторным занятиям.

Список лит. – 20 наименований

Локальный электронный методический материал. Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ. Рекомендовано к использованию в учебном процессе методической комиссией института рыболовства и аквакультуры ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 8 июня 2023 г., протокол № 14

УДК 574.63(076)

© Федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Калининградский государственный
технический университет», 2023 г.
© Авдеева Е.В., 2023 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Лабораторная работа 1. Контроль за состоянием здоровья рыб. Эпизоотологическое обследование рыбоводных предприятий и рыбохозяйственных водоемов	5
Лабораторная работа 2. Методы вирусологических исследований.....	9
Лабораторная работа 3. Первичный бактериологический посев патологического материала.....	12
Лабораторная работа 4. Выделение чистых культур бактерий, их идентификация по культуральным, морфологическим и физиолого-биохимическим признакам.....	15
Лабораторная работа 5. Микологические методы исследования рыб.....	27
Лабораторная работа 6. Методика полного паразитологического анализа рыбы	30
Лабораторная работа 7. Жгутиконосцы, паразитирующие у рыб.....	36
Лабораторная работа 8. Миксоспоридии, паразитирующие у рыб.....	38
Лабораторная работа 9. Инфузории, паразитирующие у рыб	40
Лабораторная работа 10. Моногенеи рыб.....	43
Лабораторная работа 11. Цестоды рыб	45
Лабораторная работа 12. Трематоды рыб	49
Лабораторная работа 13. Скребни рыб	51
Лабораторная работа 14. Нематоды, паразитирующие у рыб	53
Лабораторная работа 15. Профилактика болезней рыб на рыбоводных предприятиях	55
Заключение.....	58
Список рекомендуемой литературы.....	60

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методическое пособие разработано для направления подготовки 35.03.08 Водные биоресурсы и аквакультура (для очной и заочной форм обучения) по дисциплине «Ихтиопатология».

Дисциплина «Ихтиопатология» входит в общепрофессиональный модуль образовательной программы для бакалавриата по направлению подготовки 35.03.08 Водные биоресурсы и аквакультура.

Целью освоения дисциплины является формирование знаний, умений, навыков по основам общей патологии, общей паразитологии, общей эпизоотологии, по методам изучения инфекционных, инвазионных незаразных болезней рыб, по методам профилактики и лечения болезней рыб.

Задачи:

- освоение основных понятий общей патологии, общей паразитологии, общей эпизоотологии;
- формирование базовых знаний по методам изучения инфекционных, инвазионных, незаразных болезней рыб;
- приобретение умений и навыков по методам профилактики и лечения болезней рыб.

В результате изучения дисциплины студент должен:

знать:

о развитии патологического процесса у рыб и о характеристике патогенных агентов; вирусные, бактериальные, микозные болезни рыб; особенности строения и жизненные циклы возбудителей болезней рыб; основы профилактики и лечения рыб;

уметь:

разрабатывать систему профилактических и лечебных мероприятий в рыбоводных хозяйствах;

владеть:

методами идентификации возбудителей болезней рыб.

Лабораторная работа 1. Контроль за состоянием здоровья рыб. Эпизоотологическое обследование рыбоводных предприятий и рыбохозяйственных водоемов

Цели лабораторного занятия:

1. Ознакомиться с делопроизводством и документооборотом по охране здоровья рыб на рыбоводном предприятии.
2. Освоить навыки составления актов эпизоотологического обследования рыбоводных предприятий и рыбохозяйственных водоемов.

План проведения занятия:

1. Ознакомиться с теоретической частью и ходом работы.
2. Ознакомиться с документами по делопроизводству и документооборотом по болезням рыб, используемым на рыбоводных предприятиях.
3. Записать в тетрадь схему составления актов эпизоотологического обследования рыбоводных предприятий или рыбохозяйственных водоемов.

Оборудование и материалы: образцы ихтиопатологического журнала, ветеринарного свидетельства, акта эпизоотологического обследования рыбоводного предприятия, актов о гибели рыбы, акта эпизоотологического обследования рыбохозяйственного водоема.

Теоретическая часть

Эпизоотологическое обследование – один из методов диагностики болезней рыб, позволяющих изучить течение заболевания, собрать анамнез, выяснить причину ее возникновения, динамику развития и пути распространения. Для возникновения болезни в водоеме необходимо наличие источника заразного начала, факторов передачи возбудителя и восприимчивых организмов. Источником заразного начала в водоеме в большинстве случаев является больная рыба, выделяющая в воду возбудителей заболевания. Элементы внешней среды, которые способствуют передаче возбудителя от больной рыбы к здоровой, называются факторами передачи. К ним относятся рыба, икра, вода и почва водоемов, птицы, беспозвоночные, а также рыбоводный инвентарь, орудия лова и т. д. Очень часто проявлению и распространению болезней способствуют и другие причины. Наиболее значимыми из них являются перевозки посадочного материала и оплодотворенной икры для рыборазведения. Факторы, провоцирующие возникновение болезни или усиливающие ее, называются стрессорами, или стрессфакторами. К ним относятся резкое изменение температуры, нарушение гидрохимического режима, воздействие на рыб токсикантов, переуплотненные посадки, плохое качество корма, обловы рыбы и др. Эпизоотическая ситуация по заболеваниям культивируемых рыб в стране нестабильная и весьма напряженная. Экономический ущерб от болезней рыб в мировой аквакультуре может составлять 15–20 %. В соответствии с Федеральным законом РФ «О ветеринарии» от 14.05.1993 № 4979 (www.mcsx.ru), руководители рыбоводных предприятий обязаны своевременно обеспечивать контроль за состоянием

здоровья рыб, проведение мероприятий по профилактике и ликвидации болезней рыб. На рыбноводном предприятии делопроизводство и документооборот, связанный с контролем за здоровьем выращиваемой рыбы, имеет свои требования. Эту работу проводят специалисты хозяйства. Они ведут следующие документы:

1 – регулярно заполняют журнал ихтиопатологического состояния рыбноводного хозяйства, журнал учета гидрохимических показателей, журнал учета гибели;

2 – составляют годовой план проведения лечебно-профилактических мероприятий;

3 – ведут делопроизводство, то есть сохраняют в отдельных папках акты эпизоотологического обследования рыбноводного хозяйства, ветеринарные свидетельства о завозе рыбы или икры с целью рыборазведения, акты о гибели рыбы, акты о проведении ветеринарно-санитарных и лечебно-профилактических мероприятий, сертификаты на используемые в хозяйстве комбикорма, удобрения, дезинфекционные средства и лечебные препараты. Работа проводится в тесном контакте с районными ветеринарными специалистами. Ихтиопатологический журнал заполняют на всех рыбноводных предприятиях (прудовое, садковое, озерно-товарное, рыбопитомник, нерестово-выростное, репродуктор, племрассадник, рыбноводный завод) или их отделениях (участок, рыбцех, рыбхоз), если они находятся на другом источнике водоснабжения. Он заполняется ихтиопатологом или главным рыбноводом хозяйства и является постоянно действующим документом. Журнал состоит из 7 разделов. В разделе I даются общие сведения о рыбноводном предприятии, прикладывается схематический план-карта хозяйства с нанесенными на ней прудами и сельскохозяйственными угодьями. В разделе II указывают санитарное состояние хозяйства: зарастаемость водной растительностью, состояние гидротехнических сооружений, заболоченность, заиленность, наличие бочагов, спускные и неспускные пруды, а также заносят данные о проводимых мероприятиях по дезинфекции и дезинвазии с указанием конкретных дат проведения и объема работ (площадь обработанных прудов; количество обработанных садков, инкубационных аппаратов, бассейнов, лотков и др.). В разделе III (рыбноводно-мелиоративные мероприятия) указывают видовые и возрастные посадки рыб (тыс. шт./га); проводимые мелиоративные работы; устройство и восстановление на прудах водосборной и осушительной сети канав (в м); засыпка бочагов на ложе прудов; засев прудов сельскохозяйственными культурами и травами; вспашка и культивирование ложа прудов. В разделе IV (эпизоотическое состояние хозяйства) регистрируют заболевания, время возникновения болезней, гибель рыбы (в штуках и %), причины возникновения болезни. В разделе V (лечебно-профилактические мероприятия в хозяйстве) указывают название препарата, метод обработки, количество обработанной рыбы, каким методом ведется оздоровление хозяйства (летование, комплексный), эффективность применяемых препаратов и методов. В этот раздел заносят данные о проведении весной и осенью при пересадках, соответственно на нагул и зимовку, профилактической обработки

племенного и рыбопосадочного материала (количество обработанных рыб и чем проведена обработка).

Раздел VI (сведения о завозе племенного и рыбопосадочного материала) заполняют при поступлении материала. В разделе VII (гидрохимические данные) заносятся результаты полного гидрохимического анализа на основании лабораторных исследований, выполненных в сертифицированных лабораториях, занимающихся качеством воды. Результаты ежедневного контроля за температурой воды и содержанием кислорода во всех прудах и рыбоводных емкостях заносятся в специальный гидрохимический журнал, при этом обязательно приводятся данные по поступающей и сбросной воде. Один раз в год, а также в случаях массовой гибели рыб, выполняется полный гидрохимический анализ поступающей воды. Регулярный контроль за здоровьем рыб, включающий клинический осмотр, патологоанатомическое вскрытие и неполный паразитологический анализ, проводится в прудовых хозяйствах при контрольных обловах. В вегетационный период их проводят на выростных прудах 2 раза в месяц, на нагульных – ежедекадно. Обследование рыбы из садков и бассейнов проводят аналогично, но просмотр и учет погибшей рыбы проводится ежедневно. Данные о погибшей рыбе заносятся в специальный журнал учета погибшей рыбы, а также составляется акт о гибели. Акты хранятся в отдельной папке, а итоговые цифры гибели заносятся в журнал о гибели рыбы и в ихтиопатологический журнал. Государственные ветеринарные инспектора, проводя мониторинг эпизоотологического состояния хозяйства, посещают предприятия два раза в год, а также в случаях возникновения заболевания. По результатам контрольного облова и ихтиопатологического обследования рыбы составляется акт эпизоотологического обследования рыбоводного хозяйства. Он пишется в произвольной форме, но включает ряд обязательных данных. Пример составления такого 40 акта вынесен в Приложение 3. Акты эпизоотологического состояния хозяйства хранят в отдельной папке, а основные выводы или результаты заключения заносят в ихтиопатологический журнал. Для предупреждения заноса в хозяйство или водоем возбудителей заразных заболеваний, в соответствии с ветеринарным законодательством, осуществляется систематический контроль за перевозками живой рыбы, икры и других гидробионтов, в частности кормовых беспозвоночных. Завоз можно проводить только при наличии ветеринарного свидетельства. Оно выдается главным государственным ветинспектором района, в нем указывается эпизоотическое благополучие рыбоводного хозяйства-репродуктора и условия перевозки живой рыбы с целью рыборазведения, в соответствии с «Инструкцией по ветеринарному надзору за перевозками живой рыбы, оплодотворенной икры, раков и других водных организмов». На каждую партию перевозимой рыбы и икры необходимо иметь ветеринарное свидетельство или ветеринарную справку, если перевозка осуществляется внутри района.

Образец ветеринарного свидетельства представлен в Приложении 4.

Все ветеринарные свидетельства о завозе рыбы в хозяйство сохраняют в отдельной папке. В рыбоводные хозяйства и рыбохозяйственные водоемы и завозят рыб, выловленных только из водоемов и хозяйств, благополучных по инфекционным и инвазионным болезням. Из хозяйств, неблагополучных по вирусной виремии карпа, аэромонозу, бранхиомикозу, фурункулезу, миксосомозу (вертеж форели), вирусным болезням лососевых рыб и другим заболеваниям, при которых предусмотрено карантинирование, запрещается вывоз не только рыбы, но и икры и беспозвоночных. При других заболеваниях на водоем или рыбоводное предприятие накладывают ограничения, и вопрос о перевозках решается в соответствии с действующей инструкцией по борьбе с этими болезнями. Рыба, пораженная эктопаразитами (например, хилодонеллами, гиродактилюсами и др.), может быть допущена к перевозке только после соответствующей тщательной противопаразитарной обработки. Во всех случаях рыба допускается к перевозке только после выборочного ихтиопатологического обследования нескольких экземпляров из отправляемой партии, оценки физиологического состояния и соответствия размерно-весовому стандарту. Плотности посадки, температура воды и содержание кислорода в воде, то есть условия перевозки, должны соответствовать физиологическим потребностям рыбы. Особое внимание уделяется качеству проводимых оздоровительных мероприятий.

Все мероприятия проводятся согласно годовому плану проведения лечебно-профилактических мероприятий. Органам ветеринарного надзора вменено в обязанности проводить мониторинг эпизоотического состояния и рыбохозяйственных водоемов, выявлять эпизоотически и эпизоотически опасных возбудителей. Эту работу они проводят в тесном контакте с ветеринарными и рыбохозяйственными научными институтами. В случаях гибели рыб в этих водоемах создается специальная комиссия, которая, прежде всего, собирает анамнез, то есть проводит опрос рыбаков-любителей, местного населения и других очевидцев для выяснения эпизоотической ситуации. Проводит ихтиопатологический анализ рыбы, отбирает пробы для дальнейших лабораторных исследований и составляет акт эпизоотологического состояния обследуемого водоема. В акте отражают причины гибели, рассчитывается ущерб и разрабатываются возможные меры по ликвидации очага заболевания. Акт составляется в произвольной форме.

Ход работы

1. Ознакомиться с образцами документов, имеющихся на рыбоводном предприятии и касающихся болезней рыб.
2. Записать в тетрадь перечень основных входящих и хранящихся на рыбоводном хозяйстве документов.
3. Заполнить образец акта эпизоотического обследования рыбохозяйственного водоема или рыбоводного предприятия.

Лабораторная работа 2. Методы вирусологических исследований

Цели лабораторного занятия:

1. Изучение цитопатического действия (ЦПД) вирусов.
2. Определение титра вируса.

План проведения занятия:

1. Определить цитопатическое действие (ЦПД) вирусов на зараженной клеточной культуре или готовых окрашенных препаратах при микроскопии.
2. Ознакомиться с расчетом титра вируса.

Оборудование и материалы: клеточная культура, зараженная вирусосодержащим материалом, микроскоп, готовые окрашенные препараты клеточных культур с ЦПД и не зараженные вирусами.

Теоретическая часть

После заражения клеточных культур, как исход взаимодействия вируса и клетки, на монослое появляются очаги деструкции, характеризующиеся разнообразными морфологическими изменениями клеток – цитопатическое действие (эффект) вирусов (ЦПД или ЦПЭ). ЦПД как специфический признак используется для диагностики, идентификации и количественного определения вирусов. Цитопатическое действие зависит от вида и дозы вирусов, чувствительности той или иной клеточной культуры. ЦПД вирусов можно наблюдать непосредственно при рассмотрении монослоя зараженных клеток под малым увеличением микроскопа. Монослой зараженных клеток сравнивают с контролем. В контрольных культурах обычно в течение недели морфологических изменений не отмечают. В зараженных культурах под воздействием вируса видимые изменения в клетках наступают через несколько часов и дней. Характер цитопатических изменений позволяет судить о природе обнаруженного агента. Степень поражения клеточного монослоя оценивается по 4-крестовой системе:

- при поражении 25 % клеток монослоя – (+),
- при поражении 50 % клеток монослоя – (++) ,
- при поражении 75 % клеток монослоя – (+++) ,
- при поражении 100 % клеток монослоя – (++++).

Кроме того, степень поражения можно оценить по деструкции клеток (типы ЦПД):

1. Очаговая мелкозернистая деструкция клеток с тяжами неизменных клеток между ними.
2. Очаговые гроздевидные скопления округлившихся клеток.
3. Равномерно распределенная крупнозернистая деструкция клеток, клетки округлившиеся, увеличенные в размере.
4. Гигантские многоядерные клетки – симпласты.

При микроскопии наблюдают три основных типа ЦПД:

I тип: – набухание инфицированных клеток, они приобретают неправильную, округлую форму, появляется зернистость цитоплазмы; – пикноз

(уплотнение)-фрагментация ядра; – разрушение клетки; – отделение монослоя от стекла. Цитопатогенное действие вируса на культуре ЕРС

II тип: – появляются цитоплазматические и внутриядерные включения; – разрушение клетки.

III тип: – образование гигантских клеток – симпластов, слияние нескольких клеток в синцитиальные образования с включениями в цитоплазме и ядрах.

Для того чтобы убедиться в специфичности действия вирусов и исключить дегенерацию, вызванную действием токсических веществ, из зараженных пробирок стерильной пипеткой отсасывают культуральную жидкость и заражают ею свежую культуру, то есть проводят пассаж. Если ЦПД наблюдают при первичном заражении, а в пассажах он отсутствует, это свидетельствует о присутствии в заражающем материале токсигенных веществ. При отсутствии ЦПД в зараженной культуре проводят не менее двух дополнительных пассажей, так как есть вирусы со слабо выраженным ЦПД. При слабо выраженных цитопатических изменениях в клетках проводят микроскопические исследования окрашенных препаратов на обнаружение телец-включений. Параллельно исследуют и контрольные культуры. С этой целью покровные стекла с монослоем извлекают из пробирки, трижды промывают в растворе Хенкса и фиксируют в течение 10–15 мин в смеси Дюбоск-Бразиль-Буэна. После этого препарат переносят в 70°-ный спирт на 5–7 мин (при необходимости в спирте можно хранить долго). Последующую обработку препаратов проводят таким образом: промывают в дистиллированной воде и окрашивают раствором гематоксилина 3–10 мин. Промывают водопроводной водой, затем подщелоченной водой (3–4 капли нашатырного спирта на 10 мл воды) до посинения препарата, затем вновь дистиллированной водой. Окрашивают эозином в течение 1–5 мин и ополаскивают водопроводной водой. Проводят последовательно в спиртах возрастающей концентрации (70 %, 96 % и 100 %). Обрабатывают карбол-ксилолом в течение 1 мин, затем ксилолом 5–15 мин. Заклаивают в канадский бальзам на предметном стекле слоем клеток к стеклу, придавливают пинцетом и исследуют под микроскопом. Активность выделенного вируса и его количество определяют титрованием. За единицу количества вируса принимают его инфекционную дозу, способную вызвать цитопатический эффект у 50% клеточных культур и выражают в тканевой цитопатической дозе (ТЦД₅₀). Титр вируса выражается количеством ТЦД₅₀, находящимся в единице объема вирусосодержащего материала. Для определения титра вируса готовят 10-кратные разведения вируса и каждым разведением заражают 4–6 клеточных культур в пробирках. Для расчета титра вируса часто пользуются методами Рида и Менча. Согласно этому методу процент положительных результатов рассчитывают, исходя не из действительных частот ответов, наблюдаемых при различных разведениях, а из так называемых аккумулярованных сумм положительных и отрицательных результатов, используемых затем для расчета величины ТЦД₅₀ путем интерполяции. В основе метода лежит допущение, согласно которому каждый испытуемый

объект, ответивший положительно на введение вируса данного разведения, ответит положительной реакцией и на введение более концентрированного вируса. И наоборот, в случае если данное разведение дало отрицательную реакцию, постулируется, что при введении пробы большего разведения также будет получена отрицательная реакция. Примерный расчет ТЦД₅₀. Будем считать, что вирусом каждого разведения заражено 6 пробирок с культурой клеток, причем для заражения в пробирки вносили по 0,2 мл вирусосодержащего материала. Столбец 2 – количество пробирочных культур клеток с признаками ЦПД из 6 зараженных. Столбец 3 – количество пробирочных культур клеток без признаков ЦПД из 6 зараженных. Столбец 4 составляют по данным графы 2 на основании следующих рассуждений. Пробирочная культура клеток, в которой обнаружено ЦПД при заражении разведением вируса 10-6, будет иметь признаки ЦПД при заражении ее любой большей концентрацией вируса. Добавляя к одной пробирочной культуре с признаками ЦПД из зараженных разведением 10-5 одну пробирочную культуру с ЦПД из зараженных разведением 10-6, в сумме получаем, что при заражении разведением 10-5 ЦПД появится в 2 пробирках. Соответственно при заражении разведением 10-4 ЦПД появится в 4 пробирках и т. д. На основании аналогичных рассуждений и данных графы 3 составляют графу 5. Таким образом, пробирка без признаков ЦПД из зараженных разведением 10-2 не будет иметь признаки ЦПД при заражении любым более высоким разведением вируса. Добавляя к двум пробирочным культурам без признаков ЦПД из зараженных разведением 10-3 пробирку без ЦПД из зараженных разведением 10-2, в сумме получаем, что при заражении разведением 10-3 ЦПД будет отсутствовать в 3 пробирках. Соответственно при заражении разведением 10-4 ЦПД будет отсутствовать в 7 пробирках и т. д. 115 В столбце 6 показано отношение количества пробирок с ЦПД (данные графы 4) к общему количеству зараженных пробирок (сумма данных столбца 4 и 5). В столбце 7 приведен процент пробирок с признаками ЦПД, рассчитанный по данным столбца 6. В нашем примере искомый 50%-ный показатель ТЦД₅₀ находится между разведениями 10-3 и 10-4. Для подсчета lg ТЦД₅₀ находим фактор пропорциональности, соответствующий величине, на которую lg разведения 10-4 отличается от искомого значения (выраженного также через lg): $(50 - A)/(B - A) = (50 - 36,4)/(72,7 - 36,4) = 0,374$, где А – % пробирок с признаками ЦПД из зараженных разведением 10-4, то есть разведением, при заражении которым ЦПД появится меньше чем в 50 % зараженных пробирочных культур; В – % пробирок с признаками ЦПД из зараженных разведением 10-3, то есть разведением, при заражении которым ЦПД появляется более чем в 50 % зараженных пробирочных культур. Зная фактор пропорциональности, находим десятичный логарифм искомого разведения (lg ТЦД₅₀): $-4,000 - (-0,374) = -3,626$; lg ТЦД₅₀ = -3,626; $1 \text{ ТЦД}_{50} = 10^{-3,626}$. Следовательно, 1 ТЦД₅₀ содержится в 0,2 мл вирусной суспензии разведения 10-3,626. Титр вируса выражается количеством ТЦД₅₀ в единице объема исходной вирусной суспензии, то есть равен $10^{-3,626} \text{ ТЦД}_{50}/0,2 \text{ мл}$.

Ход работы

1. Просмотреть под малым увеличением микроскопа готовые окрашенные препараты клеточных культур, не зараженных вирусами.
2. Рассмотреть под малым увеличением микроскопа готовые окрашенные препараты клеточных культур, зараженные определенными вирусами, опасными для рыб.
3. Зарисовать в рабочую тетрадь структуру незараженного монослоя клеток и выявленные изменения в клеточных культурах под воздействием вирусов.
4. Определить степень поражения клеточного монослоя в процентах и крестах. Данные записать в рабочую тетрадь.
5. Изучить расчет определения титра вируса.

Лабораторная работа 3. Первичный бактериологический посев патологического материала

Цели лабораторного занятия:

1. Освоение методики проведения первичного бактериологического посева патологического материала от рыб.
2. Ознакомление с селективными питательными средами для выявления различных патогенных и условно-патогенных групп бактерий для рыб.

План проведения занятия:

1. Осуществить первичный бактериологический посев органов и тканей рыб.
2. Изучить селективные питательные среды для выявления патогенных и условно-патогенных групп бактерий для рыб.

Оборудование и материалы: аквариум, живая рыба, газовая горелка или спиртовка, кювета, водяная баня, штативы для пробирок, стерильные чашки Петри, пипетки градуированные, пастеровские пипетки, скальпель, ножницы, пинцет, бактериологическая петля, препаровальные иглы, шпатели Дригальского, предметные стекла, стерильные ватные тампончики, сосуд с дезинфицирующей жидкостью (3–5%-ным раствором хлорамина или карболовой кислоты), спирт 96о -ный, карандаши по стеклу, селективные питательные среды.

Теоретическая часть

Первичный бактериологический посев проводят в стерильном боксе при соблюдении правил асептики. Патологический материал отбирают от живой рыбы на стерильные питательные среды, так как у погибшей рыбы увеличивается проницаемость стенок кишечника и кровеносных сосудов, и микрофлора быстро проникает во все органы и ткани, затрудняя, а иногда делая невозможным выделение возбудителя заболевания. Отбор органов от рыбы проводят согласно правилам отбора проб при диагностике инфекционных

болезней рыб. Для обнаружения бактерий используют органы и ткани рыб, содержащие максимальное количество возбудителя.

Исследованию также подвергают кровь, экссудат, содержимое абсцессов, опухолей, инфильтратов, отделяемое от язв. При необходимости также производят бактериологические посевы головного мозга, половых желез, плавательного пузыря. Первичные посевы из органов и тканей проводят в следующем порядке: кожа, жабры, содержимое брюшной полости (экссудат), кровь из сердца, желчь из желчного пузыря, печень, селезенка, содержимое нижнего отдела кишечника, почки. Для правильного выбора методов выделения и культивирования возбудителя большое значение имеет сбор сведений о клинических признаках заболевания и эпизоотологических данных (вид рыбы, температура, при которой возникло заболевание, массовость поражения, условия содержания рыбы и др.). Например, при наличии большого количества слизи на жабрах, в области спинного или хвостового плавников возможно подозрение на миксобактериоз, а обнаружение на жабрах и в слизи большого количества длинных, тонких, грамотрицательных палочковидных бактерий подтверждает этот диагноз. В этом случае патологический материал засевают на чашки с цитофага-агаром или средой Анакера-Ордала. При подозрении на эритродерматит карпа язвы промывают стерильной водой, хорошо протирают стерильным ватным тампоном гиперемизированный участок кожи вокруг язвы, острым скальпелем с помощью пинцета срезают пораженный участок кожи, измельчают стерильными ножницами и помещают в ступку с кварцевым песком. Кусочки кожи тщательно растирают, постепенно приливая изотонический раствор хлорида натрия (примерно десятикратный объем) и после 20-минутного отстаивания несколько капель надосадочной жидкости с помощью пипетки переносят на чашки Петри с агаром «Д» и тщательно растирают шпателем.

Посев материала проводят на плотные пластинчатые питательные среды в чашках Петри. Материал для посевов отбирают пастеровской пипеткой или кусочком с помощью стерильных инструментов. Использованные инструменты стерилизуют фламбированием. Кусочки исследуемого материала помещают на поверхность среды и растирают при помощи пинцета с изогнутыми браншами или шпателем. При таком способе посева получается истинная картина уровня микробной контаминации внутренних органов. Первичный посев проводят на рыбо-пептонный или мясо-пептонный агары (МПА, РПА) или эритритагар (для определения уровня общей обсемененности), среду Эндо (для выделения бактерий кишечной группы, аэромонад и псевдомонад), Риппея-Кабели (для выделения аэромонад), Анакера-Ордала (для выделения миксобактерий), дифференциально-диагностический агар (для выделения вибрионов, аэромонад и псевдомонад), элективные среды для выделения возбудителей бактериальной почечной болезни и др. Чашки Петри с посевами подписывают и ставят в термостат. Посевы инкубируют в термостате при температуре 25 или 37 °С и ежедневно просматривают, отмечая характер роста бактерий в рабочей тетради. После инкубирования посевов при соответствующей температуре подозрительные колонии бактерий пересевуют на

первичнодифференцирующую среду Клиглера (или Олькеницкого) или скошенный агар. Исследуемый патологический материал следует сохранять в холодильнике или консервирующей жидкости до окончания экспертизы, затем его утилизируют сжиганием или автоклавированием. Количественные исследования. Следует помнить, что многие возбудители болезней рыб являются обитателями водной среды, поэтому в некоторых случаях могут выделяться и от совершенно здоровой рыбы. Это в значительной мере осложняет диагностику и в некоторых случаях заставляет прибегать к количественным исследованиям. Для этого изолированные кусочки паренхиматозных органов помещают в маленькие стерильные бюксы известной 132 массы и взвешивают. Затем пробы переносят в фарфоровые ступки, приливают десятикратное количество стерильного изотонического раствора хлорида натрия и тщательно растирают. После 10–20-минутного отстаивания 0,1 мл надосадочной жидкости высевают на поверхность питательного агара и тщательно растирают шпателем. В качестве контроля для сравнения аналогичным способом делают посевы из органов здоровой рыбы. После инкубирования посевов, зная массу исследуемой пробы, количество внесенного в ступку изотонического раствора хлорида натрия и посевную дозу (0,1 мл), делают перерасчет количества выросших колоний микроорганизмов на 1 г исследуемого органа.

Приготовление мазков и клятч-препаратов. Стерильно взятый кусочек или соскоб пораженного органа (ткани) помещают на предметное стекло ближе к узкому краю, накрывают другим предметным стеклом, стекла прижимают друг к другу, разводят в противоположные стороны и получают мазки с равномерно распределившимся материалом. Для изучения взаимного расположения структурных элементов пораженного органа (ткани) и патогенных микроорганизмов делают мазки-отпечатки (клятчпрепараты). Вырезают из органа небольшой кусочек, прикладывают поверхностью среза к предметному стеклу несколько раз, получая ряд мазков-отпечатков.

Высушенные на воздухе или над пламенем спиртовки мазки и клятч-препараты фиксируют 96о -ным спиртом 10 минут и окрашивают по методу Грама. На мазки через фильтровальную бумагу наносят раствор генцианвиолета на 2 минуты. Затем бумагу снимают и на стекло наносят раствор Люголя. Краску выдерживают в течение 2 минут. После этого на мазки наносят 96о -ный спирт на 30 секунд, который смывают водой. Мазки докрашивают раствором фуксина Пфейффера 2 минуты, промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионным маслом.

Ход работы:

1. Подготовить питательные среды для осуществления первичного бактериологического посева рыбы.
2. Подписать чашки Петри для проведения посева.
3. Провести первичный бактериологический посев рыбы.
4. Поместить посевы в термостат. Приготовить клятч-препараты (мазки-отпечатки) из органов рыбы, окрасить мазки по методу Грама, микроскопировать.

5. Результаты микроскопии записать в рабочую тетрадь.

Лабораторная работа 4. Выделение чистых культур бактерий, их идентификация по культуральным, морфологическим и физиолого-биохимическим признакам

Цели лабораторного занятия:

1. Ознакомление с основными принципами выделения бактерий для получения чистой культуры.

2. Изучение выделенных культур

3. Идентификация бактерий до рода и вида.

План проведения занятия:

1. Выделить бактерии из первичных бактериологических посевов и получить чистую культуру.

2. Изучить выделенные чистые культуры бактерий по культуральным, морфологическим и физиолого-биохимическим признакам.

3. Определить бактерии с помощью Определителя до рода и вида.

Оборудование и материалы: термостат, газовая горелка, первичные бактериологические посевы на чашках Петри с РПА, бактериологические краски: раствор генцианвиолета, Люголя, фуксина, спирт, штатив для пробирок, предметные стекла, карандаши по стеклу, сухое мыло, марлевые салфетки, вата, лупа, микроскоп, бактериологические петли, пипетки градуированные на 1–10 мл, фильтры бумажные, индикаторная лакмусовая бумага, полоски фильтровальной бумаги, пропитанные 10%-ным раствором уксуснокислого свинца, 12%-ным раствором щавелевой кислоты, реактив на выявление цитохромоксидазы, стерильное вазелиновое масло, стерильные питательные среды: скошенный РПА (МПА), РПБ (МПБ), полужидкий агар, РПЖ (МПЖ), среда Клиглера или Олькеницкого, среда Хью-Лейфсона, среды Гисса с глюкозой, сахарозой, арабинозой, лактозой, маннитом, мальтозой, среда Кларка, бульон с KNO_3 , среда с эскулином, среды с аминокислотами (аргинином, лизином, орнитином); стерильная пробирка; 16%-ный раствор едкого калия, 10%-ный раствор серной или уксусной кислоты, раствор крахмала с йодистым калием, 0,04%-ный раствор метилового красного, 6%-ный раствор альфанафтола.

Теоретическая часть

Выделение чистых культур бактерий является обязательным условием для их идентификации и в конечном итоге для диагностики инфекционных болезней рыб. Чистой называется культура, состоящая из бактерий одного вида. Такие культуры выделяют из смешанных, состоящих из бактерий двух или нескольких видов, а также непосредственно из патологического материала от больной рыбы. Чистые культуры из смешанных выделяют механическим и биологическим способами. Механический способ основан на изоляции одной бактериальной клетки. На практике изоляция бактериальной клетки

осуществляется путем разведения их при посеве на плотные питательные среды истощающим мазком с помощью шпателя Дригальского или путем дробного разведения (1:100, 1:1000 и т. д.) смешанной культуры на физиологическом растворе с последующим посевом суспензии бактерий различных концентраций. С увеличением кратности разведения количество микробных единиц в суспензии пропорционально уменьшается, и при посеве больших разведений на плотной питательной среде вырастают изолированные колонии бактерий. Биологический способ выделения чистых культур основан на создании условий селективности и использовании физиологических свойств микробов – чувствительности их к различным температурам, рН, концентрациям солей, антибиотикам и др. При селективном выделении развитие одних бактерий подавляется, другие растут беспрепятственно, в результате на питательной среде развиваются однотипные бактерии. Колонии бактерий в первые сутки морфологически мало отличаются одна от другой, поэтому чистую культуру бактериальной флоры рыб рекомендуется выделять через 2–3 суток, когда колонии достигнут определенной конфигурации и структуры. Так как клетки различных видов бактерий могут располагаться на агаре близко одна от другой и при развитии сливаться в одну колонию, то очистку культуры следует повторять выше описанными методами 2–3 раза.

Однородность и чистоту бактериальных культур проверяют макроскопически, исследуя структуру колоний на агаре через лупу, и микроскопически – исследуя мазки суточных культур, окрашенные по методу Грама. Проверенные на чистоту штаммы бактериальных культур пересевают на скошенный агар для получения рабочей культуры и на полужидкий агар в целях сохранения дубликатной культуры. Культуры выдерживают в термостате до появления обильного роста и затем ставят в холодильник при температуре 1–3 °С. Рабочую культуру при необходимости пересевают каждые 2–3 суток, дубликатную культуру – 1 раз в месяц. В дальнейшем проводят идентификацию чистых культур бактерий.

Идентификация – это комплекс исследований, направленных на определение таксономической принадлежности бактерий. Идентификацию осуществляют изучением культуральных, морфологических, физиологических, биохимических, антигенных и других признаков бактерий.

Культуральные признаки – это характер роста бактерий на различных питательных средах общего назначения. Учитывают их через сутки после посева и далее в течение недели.

При культивировании бактерий на жидких средах (МПБ, РПБ) отмечают степень помутнения среды, наличие и характер поверхностной пленки и осадка (пленка тонкая, толстая, слизистая, морщинистая, окрашенная, кольцо на стенке пробирки; осадок точечный, зернистый, хлопьевидный, слизистый, дымчатый, беловато-желтый).

При культивировании бактерий на плотных средах (МПА, РПА) учитывают: а) степень развития и характер роста (отсутствие, скудный, умеренный, хороший, отдельными колониями, сливной, нитевидный, распространяющийся, корневидный);

б) форму колоний (круглая, овальная, звездчатая, корневидная, волокнистая, хлопьевидная);

в) размер колоний (росинчатые, точечные – диаметр меньше 1 мм, мелкие – 1–2 мм, средние – 2–4 мм, крупные – более 4 мм);

г) край колоний (ровный, волнистый, изрезанный, зубчатый, бахромчатый, локонообразный, бухтообразный, лопастной, изъеденный, ворсинчатый, ползучий);

д) поверхность колоний (гладкая, шероховатая, складчатая, волнистая, блестящая, матовая, узорчатая, зернистая, изрытая, сухая, влажная);

е) рельеф колоний (плоский, приподнятый, выпуклый, вогнутый, вдавленный);

ж) консистенцию колоний (слизистая, вязкая, крошковатая);

з) прозрачность колоний (прозрачная, полупрозрачная, опалесцирующая или мутная, темная);

и) внутреннюю структуру колоний (однородная, зернистая, радиально или концентрически исчерченная);

к) пигментообразование (окраска среды вокруг колонии или самой колонии);

л) цвет колоний (бесцветные, синеватые, серые, белые, желтые, оранжевые и др.).

При культивировании бактерий на средах с желатином (МПЖ, РПЖ), помимо характера роста, определяют наличие протеолитических ферментов бактерий. Учитывают следующие признаки:

а) рост по уколу (в виде ленты, нити, гвоздя со шляпкой, равномерный, прерывистый, поверхностный);

б) разжижение желатина (чашечкой, воронкой, гвоздем, цилиндром, кратером, чулком, послойное, пузырчатое в глубине, поверхностное);

в) скорость разжижения (быстро, медленно);

г) изменение окраски среды (зеленая, синяя и др.).

Тест на протеолитическое разжижение желатина проводят следующим образом. Посев суточной культуры бактерий производят уколом в столбик среды с рыбо-пептонным желатином, погружая петлю до дна пробирки. Бактерии, способные расти при низкой температуре, оставляют стоять в комнате при 20–22 °С. Остальные посеы инкубируют в термостате при 36 °С. При температуре 36 °С желатин плавится, поэтому после инкубации пробирки опускают в холодную воду или ставят в холодильник. Если под действием фермента желатиназы произошло расщепление белков желатина, отмечается разжижение питательной среды. Затвердение желатина в пробирке свидетельствует об отсутствии у бактерий протеолитического фермента.

При изучении морфологических признаков описывают форму бактериальной клетки и ее структуры. Морфологические признаки бактерий претерпевают изменения с возрастом культуры, поэтому их изучают у суточных культур. К основным морфологическим признакам относят:

– величину клетки бактерий;

– форму; – наличие спор;

- наличие капсулы;
- отношение бактерий к окраске по Граму.

Выявляют морфологические признаки микроскопией живых бактерий (методы висячей и раздавленной капли) и окрашенных препаратов. Традиционным методом окраски бактериальных клеток является метод окраски по Граму. Методика окраски бактериальных культур по Граму. На обезжиренное предметное стекло наносят каплю воды и вносят в нее бактериальную культуру. Растирают культуру в капле воды на площади примерно 4 см². Мазок высушивают на воздухе до полного удаления влаги. Затем мазок фиксируют. Для этого предметное стекло с расположенным сверху мазком проводят трижды через пламя горелки или спиртовки. На остывший мазок накладывают кусочек фильтровальной бумаги и наливают раствор генцианвиолета на 2 мин. Затем бумагу убирают и обрабатывают мазок раствором Люголя в течение 1–2 мин до его почернения. Далее наносят на мазок несколько капель 96% -ного спирта и выдерживают 30 сек. Промывают водой и докрашивают фуксином Циля в течение 2 мин. Промывают водой до чистой капли. На высушенные окрашенные препараты наносят каплю иммерсионного масла, просматривают под микроскопом (при увеличении объектива микроскопа ×90 или ×100).

Физиологические признаки. В процессе физиологической жизнедеятельности микроорганизмов осуществляется непрерывный обмен веществ микробной клетки с естественной или искусственной средой обитания (окружающая среда, организм человека и животных, питательные среды). Основные физиологические функции клетки заключаются в питании, дыхании, росте и размножении. Определяющее значение при выборе питательных сред для выделения и идентификации имеют особенности питания и дыхания микроорганизмов. Микроорганизмы характеризуются разной способностью использовать органические и неорганические источники питания и энергии. Чем больше готовых соединений получает микроорганизм, тем ниже его способность к биосинтезу основных клеточных макромолекул.

По способности усваивать углерод бактерии подразделяют на две группы: автотрофов (аутотрофов) (от греч. *autos* – сам, *trophe* – питание) – усваивают углерод из CO₂ (например, почвенные нитрифицирующие бактерии) и гетеротрофов (от греч. *heteros* – другой) – усваивают углерод из готовых органических соединений. Гетеротрофные микроорганизмы разделяют на сапрофитов (от греч. *sapros* – гнилой, *phyton* – растение) и паразитов (от греч. *parasitos* – нахлебник). К сапрофитам относится наибольшая часть существующих бактерий. Паразиты (около 0,1 % видов бактерий) существуют за счет органических веществ живых клеток. Различают облигатных и факультативных паразитов. Однако не всегда между ними, а также сапрофитами, можно сделать четкое разделение, так как в зависимости от условий обитания патогенные бактерии могут существовать в окружающей среде как сапрофиты и вызывать заболевания у человека и животных.

Совокупность биохимических процессов, при которых высвобождается энергия, обеспечивается жизнедеятельность бактерий, называется дыханием.

По типу дыхания микроорганизмы подразделяют на несколько групп:

- облигатные (строгие) анаэробы. Рост и развитие в среде происходят при отсутствии свободного кислорода. К облигатным анаэробам относятся, например, споровые клостридии;

- облигатные (строгие) аэробы. Рост и развитие происходят в атмосфере кислорода (около 20 %). К облигатным аэробам относятся бактерии родов *Pseudomonas*, *Alcaligenes* и др. Они растут на поверхности жидких и плотных питательных сред;

- микроаэрофилы. Бактерии требуют для своей жизнедеятельности существенно меньшего количества кислорода. Некоторые из них («капнофильные микроорганизмы» от греч. *karnos* – дым, *philos* – любящий) хорошо растут при повышенном содержании CO₂. К микроаэрофилам относятся, например, актиномицеты, молочнокислые бактерии;

- факультативные анаэробы. Размножение может происходить как при наличии, так и в отсутствие молекулярного кислорода. К факультативным анаэробам относится большинство патогенных, условно-патогенных и сапрофитных бактерий (энтеробактерии, стрептококки и др.).

На полужидких средах выявляют, кроме того, подвижность бактерий. Подвижные бактерии вырастают на всей поверхности среды или вызывают ее диффузное помутнение, неподвижные – растут строго по уколу. Бактерии значительно различаются между собой по отношению к абиотическим факторам внешней среды. Для целей идентификации или прогнозирования вспышки того или иного инфекционного заболевания определяют, прежде всего, отношение микроорганизмов к температуре. С этой целью посевы на подходящих жидких или плотных питательных средах выдерживают при различных температурах. Биохимические признаки характеризуются особенностями обмена веществ бактерий. Они обусловлены наличием в клетках набора ферментов, с помощью которых происходит расщепление или синтез различных химических веществ. Биохимические признаки определяют при выращивании бактерий на дифференциально-диагностических средах. Наличие некоторых ферментов бактерий, а также ряда продуктов обмена выявляют, кроме того, с помощью различных реактивов и индикаторных бумажек. Для определения биохимических признаков следует использовать только суточные культуры бактерий.

При первичной ориентировочной идентификации выделенных изолятов бактерий используют оксидазный тест. Отбор колоний бактерий для выявления фермента цитохромоксидазы можно осуществить в первичных посевах патологического материала с помощью реактива, состоящего из равных частей 1%-ного спиртового раствора α -нафтола и 1%-ного водного раствора диметилпарафенилендиамина. Для этого часть колонии бактерий снимают бактериологической петлей, переносят на кусочек фильтровальной бумаги и слегка растирают в капле смешанного реактива. Реакцию учитывают в течение трех минут. При наличии оксидазы колония окрашивается в синий цвет, при ее отсутствии – цвет колонии не меняется.

Для целей идентификации грамположительных бактерий проводят тест на наличие каталазы. Это фермент, катализирующий разложение перекиси водорода на воду и газообразный кислород. Для выявления каталазы на предметное стекло наносят каплю 3,5%-ной перекиси водорода. Вносят в нее бактериологическую петлю с подозрительной колонией и выдерживают несколько секунд. При наличии каталазы вследствие выделения газообразного кислорода колония бактерий начинает «пениться» (выделяются пузырьки газа), при отсутствии каталазы – выделение пузырьков газа отсутствует.

Дальнейшая идентификация выделенной культуры бактерий подразумевает проведение теста окисления-ферментации и определения способности бактерий разлагать углеводы. Тест окисления-ферментации (OF-тест). Исследуемую культуру высевают уколом в две пробирки со средой Хью-Лейфсона. В одну из пробирок после внесения культуры бактерий наливают стерильное вазелиновое масло слоем не менее 0,5 см. Обе пробирки инкубируют в термостате при температуре, оптимальной для данной бактериальной культуры (как правило, 22–28 °С). В зависимости от включенного в состав среды углевода (обычно глюкозы) определяют способность бактерий осуществлять его разложение. По пробирке без масла определяют окисление (способность бактерий разлагать углеводы в аэробных условиях), по пробирке с маслом – ферментацию (способность бактерий разлагать углеводы в анаэробных условиях). Об окислении или ферментации свидетельствует изменение цвета среды в соответствующей пробирке с травянисто-зеленого на желтый. Возможны четыре варианта разложения бактериями углеводов (на примере глюкозы) на среде Хью-Лейфсона (табл. 8). Характер разложения бактериями различных углеводов определяют на полужидких средах Гисса, в состав которых входит какой-либо углевод (глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза, маннито, арабиноза, рамноза и др.) и индикатор. В качестве индикаторов могут быть использованы индикатор бромтимоловый синий, индикатор Андреде, индикатор ВР. На среде Гисса учитывают способность бактерий разлагать углеводы до смеси кислот (молочной, уксусной, углекислоты и др.) и газа (H₂, CO₂). Образование кислоты определяют по изменению цвета среды, образование газа – по ее разрыву, вспениванию или растрескиванию. Посев в среду производят уколом, термостатируют в течение суток.

Ход дальнейшего процесса идентификации бактерий определяется отдельно для каждой таксономической группы. Для видовой идентификации штамма бактерий определенного рода необходим набор различных питательных сред и реактивов. Способность бактерий ферментировать некоторые углеводы (глюкозу, лактозу, сахарозу), образовывать газ и сероводород определяют на дифференцирующих средах, содержащих сахара и соль железа. Это агар Клигера, железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной, трехсахарный агар с солями железа, среда Олькеницкого. Решающее значение данные питательные среды имеют при идентификации бактерий семейства Enterobacteriaceae. Готовые среды должны иметь скошенную часть и столбик. Исследуемые культуры высевают на скошенную среду штрихом, а в столбик –

уколом. Термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение суток, после чего приступают к учету результатов. Характер ферментативных процессов определяется составом используемой среды.

Агар Клиглера. Среда предназначена для дифференциации бактерий по способности их ферментировать глюкозу, лактозу и образовывать сероводород. Принцип действия. При расщеплении сахаров образуется кислота, что улавливается с помощью индикатора (фенолового красного, окрашивающего среду в желтый цвет). В первые часы роста (в аэробных условиях) бактерии, ферментирующие только лактозу, утилизируют ее полностью в скошенной части агара. К моменту учета реакции (18–24 ч) они используют в качестве питательного субстрата пептоны, содержащиеся в питательной среде. При этом в скошенной части среды образуется аммиак и происходит подщелачивание среды – скошенная часть среды приобретает красный цвет. В столбике желтый цвет сохраняется, хотя глюкоза за этот срок ферментирована, кислые продукты ее расщепления в анаэробных условиях еще сохраняются и поддерживают низкое значение рН. Получаются желтый столбик и красный скос среды. Учет результатов на агаре Клиглера производят каждые сутки, но не позднее 48 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С по способности бактерий ферментировать лактозу (пожелтение скошенной части среды), глюкозу (пожелтение столбика), образовывать газ (наличие пузырьков или разрыва среды в столбике) и продуцировать сероводород (почернение среды в столбике). При слабом образовании сероводорода наблюдается почернение на границе столбика и скошенной части среды или реже – на дне пробирки. В случае отрицательной реакции среда остается красной, либо скошенная поверхность приобретает малиновый оттенок.

Среда Олькеницкого (трехсахарный агар с мочевиной). Среда предназначена для дифференциации бактерий по способности ферментировать сахара: глюкозу, лактозу и сахарозу, так же, как в среде Клиглера. Присутствие в среде мочевины позволяет определить наличие у бактерий фермента уреазы. Принцип работы среды Олькеницкого такой же, как агара Клиглера в отношении углеводов и выявления сероводорода. Расщепление мочевины завершается выделением аммиака ($\text{pH} = 8,1$), под воздействием которого скошенная часть и столбик среды приобретают красную окраску. Поэтому для уреазоположительных штаммов бактерий учет ферментации углеводов на этой среде невозможен. Бактерии, сбраживающие глюкозу и лактозу, вызывают подкисление во всей среде: желтого цвета столбик и скошенная часть. Лактоза, концентрация которой в среде в 10 раз выше, чем глюкозы (1 %), через 18–24 ч еще не исчерпана и в скошенной части, и в столбике среды. Вследствие этого вся среда окрашивается в желтый цвет. После 48 ч инкубации посева в среде также будет наблюдаться щелочение скошенной части агара за счет расщепления пептонов и покраснение скошенной части. Если бактерии при ферментации углеводов в качестве конечного продукта метаболизма образуют газ (H_2 и CO_2), появляются разрывы среды и скопление газа на дне пробирки, вследствие чего столбик агара приподнимается. Некоторые бактерии продуцируют тиосульфат-редуктазу, вследствие чего способны образовывать

сероводород из неорганических соединений серы. При образовании сероводорода в среде появляется черное окрашивание.

Образование сероводорода и аммиака можно определить также другим способом. Для этого под ватно-марлевые пробки пробирок с посевами суточной культуры бактерий на мясо- или рыбо-пептонном бульоне (МПБ или РПБ) подвешивают индикаторные бумажки. Для индикации сероводорода используют полоску фильтровальной бумажки, смоченной 10%-ным раствором уксуснокислого свинца, аммиака – смоченную водой лакмусовую бумажку. При образовании сероводорода бумага чернеет, аммиака – синее.

Образование индола. Под ватно-марлевую пробку пробирки с МПБ (РПБ), засеянной исследуемой культурой бактерий, подвешивают полоску фильтровальной бумажки, смоченной 12%-ным водным раствором щавелевой кислоты. При образовании индола бумажка розовеет.

Образование ацетилметилкарбинола (тест Фогеса–Проскауэра или тест VP) и реакция на метилрот (тест MR). Культуру бактерий на среде Кларка через 3–5 суток инкубирования разливают поровну в две пробирки. В одну пробирку добавляют 0,5 мл 6%-ного спиртового раствора α -нафтола и 1 мл 16%-ного раствора едкого калия. Пробирку встряхивают и ставят в штатив. При образовании ацетилметилкарбинола через 3–5 мин появляется вишневое окрашивание всей среды или ее поверхностного слоя. В другую пробирку добавляют несколько капель 0,04%-го спиртового раствора метилового красного. При положительной реакции появляется красное окрашивание среды, при отрицательной реакции – среда становится желтого цвета. Редукция нитратов в нитриты. К культуре бактерий на МПБ (РПБ) с калийной селитрой (KNO_3) через 3–4 дня инкубации приливают 0,5 мл 10%-го раствора серной или 20%-го раствора уксусной кислоты и 0,5 мл раствора крахмала с йодистым калием. Появление коричневой или черной окраски смеси показывает на переход нитратной соли в нитритную. Состав раствора: крахмала – 1 г, йодистого калия – 0,5 г, дистиллированной воды – 10 мл.

Декарбоксилирование аминокислот. Суточную культуру бактерий засевают в пробирку с питательной средой, содержащей аминокислоту (лизин, аргинин, орнитин). После высева бактерий пробирки со средой заливают слоем вазелинового масла толщиной 0,5 см. Параллельно ставят контрольную незасеянную пробирку со средой, залитую вазелиновым маслом. Посевы термостатируют в течение 3–5 суток. Бактерии, обладающие декарбоксилазной (по лизину и орнитину) или дегидролазной (по аргинину) активностью, изменяют цвет среды от оранжевого до сиреневого (щелочная, положительная реакция). При отрицательной (кислой) реакции среда желтеет. Гидролиз эскулина (дифференциальный тест на бактерии рода *Enterococcus*).

На полужидких средах с эскулином определяют способность бактерий гидролизовать эскулин с образованием эскулетина и глюкозы. Тест является определяющим при идентификации стрептококков группы D, аэромонад и некоторых других бактерий. Посев в среду производят уколом. Гидролиз эскулина определяют по почернению среды за счет распада эскулина в присутствии ионов железа. С этой же целью используют плотную среду – агар с

желчью и эскулином (bile esculin agar). На данной среде хорошо растут стрептококки группы D, поскольку, в отличие от грамположительных бактерий, желчь не подавляет их рост. Гидролиз эскулина проявляется как покоричневение среды вокруг темно-коричневых или черных колоний. Толерантность к желчи и способность гидролизовать эскулин составляет тест для предварительной идентификации стрептококков группы D. Коричневая окраска (положительная реакция) вокруг колоний проявляется через 18–24 ч при инкубации при 35–37 °С.

Характеристика возбудителей бактериальных болезней рыб:

1. Оксидазоположительные грамотрицательные бактерии – возбудители болезней рыб. К этой группе заболеваний относят фурункулез, этиологическим агентом которого являются неподвижные бактерии *Aeromonas salmonicida*, аэромоназ, вызываемый подвижными аэромонадами, псевдомоназ, вибриоз. *Aeromonas salmonicida* – возбудители фурункулеза лососевых рыб. Поражаются также золотой карась, карп, плотва, елец, голавль, линь, щука, окунь, канальный сом, хариус, сиг и другие пресноводные и аквариумные виды рыб. *Aeromonas salmonicida* – короткие грамотрицательные палочки, не обладающие подвижностью (коккоиды). На мясо-пептонном агаре, агаре «Д», триптиказосоевом агаре растут в виде небольших, слегка уплощенных (R-форма) или влажных выпуклых (S-форма) колоний. При первичном посеве рост замедленный (36–48 ч), температурный оптимум 20–25 °С. При 37 °С не растет. На мясо-пептонном бульоне имеют характерный придонный рост. На агаровых средах и МПБ на 2–4-е сутки *A. salmonicida* образуют коричневый, диффундирующий в среду пигмент различной интенсивности. Обладают слабой резистентностью к антагонистическому действию сапрофитной микрофлоры, поэтому нужна особая внимательность при просмотре первичных посевов. *A. salmonicida* обладают цитохромоксидазой и ДНК-азой. На средах с глюкозой и глицерином растут с газообразованием; другие ферментативные характеристики могут варьировать. В настоящее время выделены три подвида: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* (возбудитель эритродерматита карпа) и *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, различающиеся по пигментообразованию, ферментативной характеристике и вирулентности. *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* не ферментируют лактозу и сахарозу, активно вырабатывают коричневый водорастворимый пигмент и обуславливают выраженную картину острого фурункулеза с поражением внутренних органов рыбы. *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* и *A. salmonicida* subsp. *masoucida* характеризуются отсутствием или замедленным пигментообразованием, ферментацией сахарозы.

Род *Aeromonas* (подвижные *A. caviae*, *A. schubertii*, *A. eucrenophila*, *A. hydrophila*, *A. media*, *A. sobria*, *A. veronii*) – возбудители аэромоназа рыб; встречается повсеместно и поражает все виды рыб. Это грамотрицательные короткие (1,2–1,8×0,6 мкм) палочки, с одним полярным жгутиком, спор и капсул (как правило) не образуют, оксидазоположительные факультативные анаэробы.

Род *Pseudomonas* (*Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. cyprinisepticum*, *Ps. intestinalis*, *Ps. dermoalba*, *Ps. chlororaphis*, *Ps. aureofaciens*, *Ps. anguilliseptica*) – возбудители псевдомоноза тепловодных, холодноводных и аквариумных рыб. Заболевание карповых видов рыб чаще всего вызывают *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. cyprinisepticum*, *Ps. intestinalis*, *Ps. dermoalba*; лососевых рыб – *Ps. fluorescens* и *Ps. chlororaphis*; угрей – *Ps. aureofaciens*, *Ps. anguilliseptica*.

Бактерии рода *Pseudomonas* – грамотрицательные, прямые, оксидазоположительные палочки. Большинство видов подвижные, некоторые виды неподвижные. Спор не образуют. Некоторые из них образуют капсулы и желто-зеленый флуоресцирующий пигмент. *Ps. fluorescens* var. *capsulate* – неподвижные палочки, образующие мощные капсулы, которые при инкубировании в виде тяжелой стекают на крышки чашек Петри.

Род *Vibrio* (*V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. ordalii*) – возбудители вибриоза лососевых, угрей и других видов рыб при выращивании в садках и бассейнах с морской и солоноватой водой. *V. anguillarum* – маленькие, слегка изогнутые палочки с одним полярным жгутиком, грамотрицательные, оксидазоположительные. Они являются галофильными бактериями, факультативными анаэробами, обладают протеолитическими и гемолитическими ферментами, чувствительны к птеридиновому агенту. Для их нормального роста необходимо достаточное содержание NaCl и низкие концентрации катионов Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺. Оптимальная концентрация хлорида натрия 1,5–3,3 %

2. Оксидазоотрицательные грамотрицательные бактерии – возбудители болезней рыб. Важную роль в патологии рыб играют представители семейства *Enterobacteriaceae*, к которым относятся *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella ictaluri*, *E. tarda*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*. *Yersinia ruckeri* – возбудитель иерсиниоза («enteric red mouth, ERM», болезнь «красный рот») – септического заболевания, поражающего лососевых рыб, особенно радужную форель. (Это грамотрицательные подвижные палочки, перитрихи, размером 1–3 мкм, оксидазоотрицательные, каталазоотрицательные, сбраживают глюкозу до кислоты без газа. Индол и сероводород не образуют, не образуют ацетилметилкарбинол, дают положительную реакцию с метиленовым красным. Не ферментируют лактозу, сахарозу, раффинозу, арабинозу, рамнозу, дульцит, сорбит, инозит, салицин; разжижают желатин, редуцируют нитраты в нитриты, декарбоксилируют орнитин и лизин, не обладают аргининдегидролазой и фенилаланиндезаминазой, проявляют сильную липолитическую активность. На агаровых средах растут в виде круглых, беловатых, сливающихся колоний. На питательном бульоне вызывают равномерное помутнение. Род *Edwardsiella* (*E. tarda*, *E. ictaluri*) – возбудители эдварсиеллеза угря и канального сома. К бактериям чувствительны также золотая рыбка, большеротый окунь, американский сомик-кошка, ручьевая форель, некоторые виды аквариумных рыб. Это мелкие прямые палочки, размером 1×2–3 мкм. Подвижные за счет перитрихальных жгутиков. Клетки *E. ictaluri* подвижны при 25 °С, при 37 °С – нет. Оптимальная температура для роста *E. tarda* 37 °С, для *E. ictaluri* предпочтительна более низкая температура. Бактерии каталазоположительные,

оксидазоотрицательные, спор и капсул не образуют. *E. tarda* ферментирует глюкозу и некоторые другие углеводы с образованием кислоты и часто газа. *E. ictaluri* к углеводам практически инертна.

Род *Proteus* (*Pr. rettgeri*, *Pr. vulgaris*, *Pr. mirabilis*) – возбудители протеоза рыб. Заболеванию подвергаются многие виды рыб в рыбоводных хозяйствах различного типа (прудовых, садковых и с замкнутым водоснабжением). Протеи – грамтрицательные прямые палочки (0,4–0,8×1–3 мкм), подвижные за счет перитрихальных жгутиков. На плотных средах у большинства штаммов отмечается «феномен роения», благодаря чему они растут в виде однородной пленки на поверхности среды или обширных колоний с образованием концентрических зон. Хорошо растут на обычных средах. На МПА образуют роящиеся вуалевидные колонии серого цвета с резким гнилостным запахом.

3. Болезни рыб, вызываемые миксобактериями. Миксобактериозы – широко распространенные заболевания пресноводных и некоторых видов морских рыб, отличающиеся большим разнообразием клинических проявлений и разной тяжестью течения болезни. В нашей стране заболевания зарегистрированы практически во всех бассейновых и садковых хозяйствах, выращивающих лососевых и осетровых рыб. Возбудители миксобактериозов – грамтрицательные, палочковидные, скользящие бактерии родов *Cytophaga*, *Flexibacter* и др. Миксобактерии вызывают три самостоятельных заболевания: – флексибактериоз (колумнарис-болезнь, столбиковая болезнь, «серое седло»), возбудитель *Flexibacter columnaris*. Поражают многие виды культивируемых рыб. Бактерии грамтрицательные, нитевидные, длинные, легко различаются под микроскопом. Завершающим этапом диагностики является выделение *F. columnaris* на среде Анакера-Ордала, содержащей триптон, дрожжевой и мясной экстракты, ацетат натрия, хлористый кальций и агар. При отсутствии среды Анакера- Ордала посев можно произвести на мясо-пептонный желатин. На простом питательном агаре бактерии не растут. На цитофага-агаре или триптоно-дрожжевом агаре бактерии растут в виде колоний с желтым центром и белым ободком; – бактериальная жаберная болезнь, возбудитель *F. branchiophila*. Встречается у лососевых, а также карповых при выращивании в тепловодных хозяйствах. Бактерии – удлиненные, тонкие, грамтрицательные палочки, совершающие колебательные движения и на полужидких средах формирующие желтые колонии с расплывающимися краями. На цитофага-агаре или триптоно-дрожжевом агаре бактерии вырастают в виде желтых с нечетким, расплывчатым краем колоний; – стебельковая, или холодноводная болезнь, возбудитель *Cytophaga psychrophila*. Встречается у лососевых (кижуча, балтийского лосося, форели), сомовых и некоторых аквариумных рыб. Это грамтрицательные палочки, содержащие желтый пигмент, протеолитические ферменты и выделяющие эндотоксин. На цитофага-агаре или триптоно-дрожжевом агаре *C. psychrophila* вырастают в виде желтовато-зеленых колоний. В развитии холодноводной и бактериальной жаберной болезни участвуют наряду с миксобактериями аэромонады, псевдомонады и вибрионы.

4. Болезни рыб, вызываемые грамположительными бактериями. Наиболее распространены бактериальная почечная болезнь, стрептококкоз лососевых и

микобактериозы. *Renibacterium salmoninarum* – возбудитель бактериальной почечной болезни у культивируемых лососевых. Представляют собой грамположительные, неспоровые, неподвижные палочки, которые медленно растут на обогащенных питательных средах. При температуре 16 °С через 28 дней на плотных средах вырастают мелкие, круглые, выпуклые, матово-белые колонии с ровными краями, диаметром около 1 мм. При последующих пересевах такие колонии начинают формироваться в течение недели. Бактерии рода *Mycobacterium* (*M. piscium*, *M. marinum*, *M. platypocilus*, *M. anabantid*, *M. fortuitum*, *M. balnei*) вызывают системное заболевание многих пресноводных, морских и аквариумных рыб (особенно в крупных морских аквариумах). Это грамположительные, кислотоустойчивые, неподвижные палочки обычно длиной 1–4 мкм, шириной 0,3–0,7 мкм.

Бактерии рода *Streptococcus* (*S. milleri*, *S. difficile*, *S. shioli* и *S. sp.*, близкие по биохимическим свойствам к *S. faecalis* и *S. faecium*) – возбудители стрептококкоза пресноводных и морских рыб. Это грамположительные кокки, неподвижные, некислотоустойчивые, диаметром 0,62–0,65 мкм, в окрашенных по методу Грама препаратах, располагающиеся попарно или в виде коротких цепочек. На пластинчатых средах, содержащих соли желчных кислот, растут в виде небольших беловатых колоний. Имеют экзо- и эндотоксины.

Ход работы:

1. Изучить характер роста бактерий на питательных средах в чашках Петри: выделить изолированные колонии бактерий, описать их культуральные признаки, подсчитать количество типичных колоний.

2. Исследовать характерные типы колоний на наличие фермента цитохромоксидазы. Для дальнейшего изучения отобрать 5–6 однотипных оксидазоположительных колоний.

3. Сделать мазки с отобранных колоний, окрасить мазки по методу Грама, микроскопировать с иммерсионным объективом, описать морфологические признаки бактерий, определить грампринадлежность, проконтролировать чистоту культуры.

4. Перенести с помощью бактериологической петли колонии с чистой культурой бактерий в пробирку с небольшим количеством стерильной водопроводной воды или физиологическим раствором для получения бактериальной смеси для дальнейших пересевов.

5. Сделать пересев с полученной суспензии бактерий вначале в две пробирки на скошенный РПА (МПА) для получения «рабочей» и дубликатной культуры. Затем пересеять бактерий на полужидкий агар (ПЖА), дифференциально-диагностические среды: Клигlera (Олькеницкого), Хью-Лейфсона (в одну из пробирок Хью-Лейфсона прилить стерильное вазелиновое масло с высотой столбика на 0,5 см), Гисса с углеводами (глюкозой, сахарозой, арабинозой, лактозой, мальтозой, маннитом), Кларка, среду с эскулином, РПБ с нитратом калия (KNO₃), а также в РПБ (МПБ) и РПЖ (МПЖ). Под пробку пробирки с РПБ (МПБ) поместить влажные индикаторные бумаги для

обнаружения аммиака, индола и сероводорода. Посевы поместить в термостат при температуре 22–25 °С.

6. На следующем занятии провести учет результатов роста бактерий на дифференциально-диагностических средах, провести качественные реакции на среде Кларка по выявлению ацетилметилкарбинола (VP), реакцию на метилрот (MR), на среде с нитратом калия определить нитратредуктазу. Все полученные данные свести в таблицу.

7. По совокупности культуральных, морфологических, физиолого-биохимических признаков определить бактерий до вида с помощью Определителей. Сделать предварительное заключение о возможной этиологической роли выделенных бактерий в возникновении заболевания рыбы.

8. Все пробирки с культурами бактерий, кроме «рабочей» и дубликатной культуры, сдать на обеззараживание в автоклавную.

5. Лабораторная работа 5. Микологические методы исследования рыб

Цель лабораторного занятия:

1. Ознакомление с методами микологического исследования рыбы.
2. Изучение культуральных и морфологических признаков чистых тест-культур плесневых грибов и культур плесневых грибов, выделенных от пресноводной и морской рыбы.

План проведения занятия:

1. Освоить методику микологического исследования рыбы.
2. Определить культуральные и морфологические признаки чистых тест-культур плесневых грибов и культур плесневых грибов, выделенных от пресноводной и морской рыбы.

Оборудование и материалы: микроскоп, термостат, спиртовка, микологическая игла, препаровальная игла, пинцет, предметные и покровные стекла, стерильный физиологический раствор, чашки Петри с тест-культурами грибов *Saprolegnia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*.

Среди микроскопических грибов имеется немало видов, являющихся возбудителями заболеваний человека и животных. Заболевания, вызываемые грибами, называются микозами. Вегетативное тело гриба представлено мицелием, или грибницей, состоящей из сильно разветвленных нитей – гиф. Гифы грибов бывают одноклеточными с большим числом ядер, представляющих собой одну гигантскую клетку, и многоклеточными, или септированными, то есть разделенными перегородками – септами – на отдельные клетки, содержащие от одного до множества ядер. Гифы большинства грибов, паразитирующих у рыб, не разделены внутренними перегородками. Клетка большинства грибов – это часть гифы, она состоит из хорошо выраженной клеточной стенки и цитоплазмы. В цитоплазме

располагаются ядра, мембранные структуры (цитоплазматическая мембрана, эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи), рибосомы, лизосомы, лемасомы, митохондрии, вакуоли. Размножение грибов происходит вегетативным (отдельными участками мицелия или путем деления многоклеточного таллома), бесполом (образование специализированных структур размножения, в которых формируются споры) и половым путем (слияние специальных клеток с последующим объединением или слиянием ядер). Грибы – факультативные паразиты и являются, как правило, возбудителями вторичных инфекций. Возникновение заболевания зависит от патогенности и вирулентности гриба, устойчивости макроорганизма и условий внешней среды. Большинство грибов, возбудителей микозов, поражают органы и ткани рыб, сообщаемые с внешней средой. Возбудители микозов часто обнаруживаются в свежих очагах некроза тканей, экссудате, полости плавательного пузыря рыб. К наиболее изученным микозам рыб относятся сапролегниоз, бранхиомикоз, ихтиофноз.

Возбудителями сапролегниоза могут быть грибы из родов *Saprolegnia*, *Achlya*, *Aphanomyces* и другие. Грибы *Branchiomyces sanguinis* выделяют от пораженных бранхиомикозом карпов, а у линей и щук отмечают другой вид гриба – *B. demigrans*. Многие виды рыб поражает гриб *Ichthyophonus hoferi*, вызывая у них ихтиофноз. В настоящее время описаны также грибы *Phoma herbarum*, вызывающие глубокий микоз у форели и других лососевых (ранее заболевание называлось микозом плавательного пузыря). Размягчение оболочки икры лососевых или лопание икры вызывается грибом из класса *Archymycetae*, близким к роду *Rizophidium*. Микологические исследования при диагностике болезней рыб. При постановке диагноза заболевания необходимо исключить или подтвердить его грибковую природу. Микологические исследования проводят в микробиологической лаборатории. Пробы патологического материала для микологических исследований берут асептически от только что погибающих или погибших животных. Если пробы сразу обработать невозможно, то их можно хранить в холодильнике в замороженном виде от 1 до 3 суток. Для предохранения проб от загрязнения бактериями их можно консервировать на срок до 1 суток в растворе антибиотиков (пенициллина или стрептомицина) по 100 ЕД на 1 мл раствора.

Подготовка посуды и приготовление питательных сред для проведения микологического исследования основывается на правилах, принятых в микробиологии. Инструменты, посуда, приборы для микологических исследований аналогичны применяемым при бактериологических исследованиях. Методы исследования сходны с методами, принятыми в бактериологии. Патологический материал исследуют микроскопически, выделяют чистую культуру возбудителя, проводят его идентификацию и изучают патогенные свойства (биологическая проба).

Методика микологического посева рыбы. Рыбу извлекают из воды, обездвигивают, осматривают наружные покровы, проводят стерильное вскрытие и отмечают характерные патологоанатомические изменения. При соблюдении правил асептики вырезают пораженные кусочки органов и тканей. Часть отобранного материала помещают на предметное стекло и используют

для микроскопии. Другую часть помещают на 20 минут в чашку Петри с раствором антибиотиков (пенициллина, биомицина или стрептомицина по 100 ЕД на 1 мл) или антисептиков (7–10%-й раствор серной кислоты). Обработанный антибиотиками патологический материал измельчают и переносят асептически на поверхность селективных питательных сред в чашках Петри. Для выявления микроскопических грибов используют агар Сабуро или Чапека. С одного патологического материала делают не менее 5 посевов. Чашки с посевами помещают в термостат при температуре 15–24 °С.

Состав среды Сабуро: глюкоза (декстроза) – 4 г, пептон – 1 г, агар-агар – 1,8 г на 100 мл дистиллированной воды.

Состав среды Чапека: глюкозы – 3 г, натрия азотнокислого – 0,2 г, калия фосфорнокислого одноосновного – 0,1 г, магния сернокислого – 0,05 г, калия хлористого – 0,05 г, железа сернокислого – 0,001 г, агарагара – 2 г на 100 мл дистиллированной воды. Среда стерилизуют автоклавированием при 0,5 атм. 20 мин и разливают в стерильные чашки Петри или пробирки (скошенный агар). При выделении грибов из патологического материала в среду после стерилизации добавляют антибиотики (пенициллин, стрептомицин) в концентрации 100 ЕД на 1 мл. Микроскопический метод исследования часто является основным при диагностике микозов. Для микроскопии патологического материала используют неокрашенные препараты в капле стерильной воды, физиологического раствора, глицерина с 10%-ным едким кали или натра (раздавленная капля) и фиксированные препараты (мазки), окрашенные 1%-ным водным раствором метиленового синего, лактофуксином (0,1 г кислого фуксина и 100 мл молочной кислоты), по методу Грама и другими методами. При незначительном количестве и слабой контрастности структурных элементов гриба в препаратах из нативного материала микроскопическое исследование бывает затруднительно. Следует учитывать также, что паразитарные (тканевые) формы многих грибов представлены однообразными спорами или мицелием, резко отличающимся от культуральных форм. Поэтому необходимо проводить микроскопию выделенной чистой культуры гриба. Для этого часто используют метод раздавленной капли или микроскопию изучаемой колонии на месте ее роста. Препарат в виде раздавленной капли изготавливают путем переноса части мицелия на предметное стекло в каплю воды или раствора красителя. Каплю накрывают покровным стеклом и исследуют при малом и среднем увеличении микроскопа. Одним из способов изучения колоний на месте их роста является получение микрокультуры исследуемого гриба на плотной питательной среде. Для этого можно использовать предметное стекло с лункой, наполовину заполненной средой. После посева гриба на среду лунку закрывают стерильным покровным стеклом. Элементы строения колоний гриба, образующегося в пространстве между покровным стеклом и слоем агара, исследуют при малом и большом увеличении микроскопа.

Полученные чистые культуры описывают по культуральным и морфологическим признакам. Из культуральных признаков микроскопических грибов учитывают размеры колоний, форму, строение края и центра,

поверхность (гладкая, пушистая, рыхлая, бархатистая, войлочная, паутинистая, хлопьевидная, мелкозернистая, крупнобугристая и т. д.), консистенцию (плотная, хрупкая, слизистая, порошковидная и т. д.), цвет колоний, пигментацию среды и обратной стороны колоний. Из морфологических признаков учитывают своеобразие ветвления мицелия, размеры и форму конидиеносцев, направление роста и отношение к главной (материнской) гифе, степень ветвления воздушного мицелия (нити 1–3-го порядков), длину и ширину клеток мицелия, характер спорообразования. Все характерные признаки используют для определения семейства, рода, вида гриба с помощью Определителей. Постановка биологической пробы. В том случае, если выделенный гриб является возбудителем микоза рыб, то проводят биологическую пробу для определения его патогенности. Выбор подопытных рыб при этом должен соответствовать виду и возрасту больных рыб, от которых выделена культура гриба.

Методика постановки биопробы аналогична принятой в бактериологии. Для заражения можно использовать как патологический материал, так и чистые агаровые культуры микроскопических грибов. Патологический материал (пораженные органы и ткани) используют в виде суспензии на физиологическом растворе, обработанной антибиотиками для избегания бактериального загрязнения. Обработку антибиотиками проводят так же, как при микологическом посеве. Суспензии грибов с чистых, агаровых 48–72-часовых культур получают смыванием спор и мицелия физиологическим раствором. Смывы затем центрифугируют, надосадочную жидкость сливают, а осадок разводят до 1 мл физиологическим раствором. Подсчитывают количество клеток гриба в камере Горяева, затем разводят до получения суспензии с нужным количеством клеток в 1 мл физиологического раствора (от 250 тыс. до 1–2 млн в 1 мл). Для определения патогенности и вирулентности гриба рыб заражают рядом возрастающих доз методами аналогичными, как в бактериологии. Биопроба считается положительной, если рыба заболела и отмечается ее гибель (50 % рыб) с характерными клиническими (изменение поведения и наружных покровов) и патологоанатомическими (абсцессы, гранулемы в органах и тканях) признаками, и если при микроскопическом выделении чистой культуры и гистологическом исследовании патологического материала обнаружены микроскопические грибы в организме рыбы.

Лабораторная работа 6. Методика полного паразитологического анализа рыбы

Цели лабораторного занятия:

1. Ознакомление с методикой полного паразитологического анализа рыбы.
2. Освоение методики полного и неполного паразитологического вскрытия рыбы.
3. Освоение методов фиксации паразитических организмов.

План проведения занятия:

1. Ознакомиться с порядком полного и неполного паразитологического вскрытия рыбы.
2. Провести паразитологическое обследование органов и тканей рыбы.
3. Зафиксировать выделенных паразитов.
4. Провести паразитологический анализ и статистическую обработку по результатам обследования.

Оборудование и материалы: живая рыба, биноклярный стереоскопический микроскоп (МБС), биологический микроскоп, осветители, штативная лупа, инструменты для вскрытия (ножницы, скальпели, пинцеты, препаровальные иглы), пипетки, весы, сантиметровые линейки или рулетки, парафиновые кюветы, марлевые салфетки, предметные и покровные стекла, компрессорий или давящие стекла размером 9x12 см, чашки Петри, солонки, часовые стекла, пробирки уленгута с пробками, материальные банки с притертыми пробками, кристаллизаторы, спиртовки, бумага фильтровальная, вата, дистиллированная вода, реактивы для фиксации паразитов и приготовления постоянных препаратов (жидкость Шаудина, жидкость Калецкой, глицеринжелатин, жидкость Барбагалло, спирт 70°).

Теоретическая часть

Видовой состав фауны паразитов и численность ее отдельных представителей являются важными показателями эпизоотического благополучия рыбоводного предприятия или водоема, характеризуют биразнообразие и биоценоз водных объектов. Паразитофауна конкретного вида рыбы включает совокупность всех видов паразитов, обнаруженных у нее в онтогенезе в пределах ареала. Для выяснения паразитофауны проводится паразитологический анализ, который можно выполнить только по результатам статистической обработки данных, полученных при паразитологическом вскрытии. Метод полного паразитологического вскрытия рыб разработан В. А. Догелем, Э. М. Ляйманом, А. П. Маркевичем, позднее усовершенствован многими другими исследователями и является основным в ихтиопатологии. Полному паразитологическому исследованию подвергают не менее 15 рыб каждого вида и возраста, личинок и мальков исследуют не менее 25 экземпляров. Для исследования необходимо брать только живую рыбу. В рыбоводных хозяйствах, для обнаружения только эпизоотически опасных видов и проведения регулярных исследований, число вскрываемых рыб может быть сокращено до 10 экземпляров и использован метод неполного паразитологического вскрытия. При проведении эколого-фаунистических исследований и обнаружении паразитов определенных систематических групп также применяется метод неполного паразитологического вскрытия, при котором обследуются не все, а только некоторые, заранее определенные органы и ткани рыбы. После любой манипуляции с рыбой ее помещают в кювету и накрывают влажной марлевой салфеткой для того, чтобы она не обсыхала.

Паразитологическое вскрытие начинается с биологического анализа: измерения зоологической и промысловой длины тела рыбы, высоты тела, взвешивания, отбора чешуи для определения возраста. Далее придерживаются

следующей схемы: внешний осмотр рыбы, кровь, кожа, плавники, носовые и ротовая полости, жабры, желчный и мочевой пузыри, брюшная полость, плавательный пузырь, почки, сердце, пищеварительный тракт, печень, селезенка, гонады, половые органы, глаза, головной и спинной мозг, хрящи, мышцы. Вначале рыбу осматривают визуально, обращая внимание на любые отклонения от нормы (язвы, пятна, опухоли, выпадение чешуи, белый налет и крупные паразиты). Тупой стороной скальпеля в направлении от головы к хвосту берется соскоб слизи на предметное стекло и разбавляется каплей воды. Соскоб накрывается покровным стеклом и исследуется под микроскопом. Количество соскобов с поверхности тела зависит от размера рыбы. Здесь могут быть обнаружены простейшие, миксоспоридии, инфузории, моногенеи, паразитические ракообразные. При выполнении полного паразитологического анализа у рыбы проводят отбор крови, делают мазок, высушивают его на воздухе и окрашивают по Романовскому – Гимзе. Плавники исследуют, сделав соскобы по всей их длине тупой стороной скальпеля. Соскобы помещают на предметное стекло, разбавляют водой, накрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом. Затем все плавники срезают, помещают на давящее стекло и просматривают под МБС. Здесь тоже могут быть обнаружены указанные выше группы паразитов. Далее обследуют носовые полости. В пипетку набирают воду, вводят в носовую полость, аккуратно оттягивают содержимое и помещают на предметное стекло. Просматривают под микроскопом. Внимательно осматривают ротовую полость на наличие паразитов, делают соскоб и просматривают под микроскопом. Для исследования жабр ножницами удаляют жаберную крышку и вырезают каждую жаберную дугу отдельно. Помещают их на давящее стекло, смачивают водой и просматривают под МБС, перебирая препаровальными иглами жаберные лепестки, выявляя цисты миксоспоридий, моногеней, паразитических рачков.

Затем с каждой жаберной дуги делают соскоб на предметное стекло, добавляют каплю воды, покрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом для обнаружения более мелких паразитов. Вскрытие брюшной полости проводят в определенном порядке. Особенностью ее паразитологического обследования является то, что вначале выделяется комплекс внутренних органов и проводится их визуальный осмотр.

Мочевой пузырь выделяют глазным пинцетом и помещают на предметное стекло в каплю воды. Препаровальными иглами разрывают его, накрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом под малым и большим увеличением. При крупных размерах мочевого пузыря дополнительно делают соскоб с его внутренних стенок и также просматривают под микроскопом. В мочевом пузыре могут паразитировать миксоспоридии, трематоды, триходины. Выделенный комплекс внутренних органов, разделяют на желчный пузырь, печень, желудок, отделы кишечника. Если кишечник не разделен на отделы, то он вскрывается ножницами по всей длине. Содержимое кишечника соскабливают в чашку Петри или на давящее стекло и просматривают под биноклем. Со стенок кишечника и части содержимого кишечника берутся пробы для микроскопирования. Если кишечник

дифференцирован на отделы, то каждый отдел исследуется отдельно. Кишечник – обычное место паразитирования трематод, цестод, скребней, некоторых простейших.

Желчный пузырь вскрывается в часовом стекле или в чашке Петри и просматривается под МБС. Затем содержимое переносится на предметное стекло, накрывается покровным стеклом и просматривается под малым и большим увеличением микроскопа. Если желчный пузырь крупный, берется соскоб с его внутренней стенки.

Печень осматривается визуально. При наличии цист паразитов их выделяют с помощью препаровальных игл, помещают на предметное стекло и просматривают под микроскопом. Если печень крупная, то ее исследуют, разрезая на продольные части и просматривая поверхность каждого разреза, затем берутся маленькие кусочки для микроскопирования. Если печень небольшая, то ее просматривают компрессорно, то есть всю продавливают на давящем стекле, отобрав кусочек для исследования под микроскопом. Так же, как печень, исследуют селезенку и почки, сердце.

Гонады. Исследуют компрессионным методом и просматривают под микроскопом при малом и большом увеличении (видны цисты и споры миксо- и микроспоридий, полиподиумы, плероцеркоиды ленточных червей, метацеркарии трематод). Икринки осетровых рыб, зараженные полиподиумом, крупнее и темнее здоровых, а пораженные микроспоридиями рода *Scolecospora* – крупнее здоровых, грязновато-белого цвета. Содержимое зараженной микроспоридиями икринки представляет собой белую мутную жидкость. Плавательный пузырь осматривают, разрезают и делают соскоб с внутренней поверхности, который просматривают под микроскопом МБС при малом и большом увеличении. Обнаруживают микроспоридий, метацеркарий трематод, нематод.

Глаза вырезают, помещают на давящее стекло, вскрывают, выделяя хрусталик и стекловидное тело, просматривая отдельно под микроскопом все его структуры. После вскрытия черепной коробки вынимают головной мозг, помещают на давящее стекло и исследуют, микроскопируя.

Исследование хрящей проводят с целью обнаружения микроспоридий (*Myxosoma cerebralis*, *Myxobolus arcticus* и др.) – паразитов молоди первого года жизни лососевых рыб – компрессионным методом исследуют черепные и межпозвонковые хрящи. Для этого хрящи необходимо мелко раскрошить и растереть в ступке. Содержимое залить водой и просмотреть вытяжку под микроскопом. Для исследования мускулатуры сзади жаберных крышек делается поперечный разрез и с помощью ножниц и пинцета снимается кожа со всей длины тела. Сначала визуально осматривается подкожная клетчатка, отбирается несколько кусочков для микроскопирования.

Затем проводят глубокие поперечные разрезы до позвоночника от головы до хвоста и внимательно осматривают их поверхность. Видны цисты микроспоридий, личинки гельминтов. При микроскопии обнаруживают цисты трематод и др. паразиты. Результаты паразитологического вскрытия регистрируют в рабочей тетради или в журнале. Простейших фиксируют

жидкостью Шаудина. Приготовленные на покровных стеклах мазки, содержащие простейших, опускают слизью вниз в широкую пробирку или бюкс с жидкостью Шаудина и выдерживают в течение 15–20 мин. Затем их промывают в 70%-м спирте и на 20–30 мин помещают в йодированный спирт для удаления остатков сулемы. После этого мазки снова промывают в 70%-м спирте и опускают в цилиндр с притертой пробкой с 70%-м спиртом, где они и хранятся длительное время. Для лучшей сохранности мазка стекла кладут мазком вниз и отделяют друг от друга кружочками, вырезанными из плотной бумаги, которые являются и этикетками. Инфузорий хранят на сухом мазке. Делают мазки на покровном или тонком предметном стекле, с участков тела рыбы, где обнаружены инфузории. Кладут их в чашку Петри слизью вверх и прикрывают сверху стеклом или бумагой во избежание загрязнения. После высыхания они становятся пригодными для дальнейшего приготовления постоянных препаратов. Фиксация червей. Мелких моногенетических сосальщиков снимают с кожи или жабр иглами, тонким пинцетом, тонко оттянутой пипеткой, остро заточенным гусиным пером или глазным скальпелем. Паразитов очищают от слизи на предметном стекле и заключают в глицерин-желатин. Для изучения и определения до вида паразитических плоских червей (трематод, цестод) и скребней используют 70%-й спирт.

Извлеченных червей, прежде чем фиксировать, помещают в солонки с физиологическим раствором или водой для промывания. Паразитов промывают следующим образом: солонку с червями помещают на столик МБС и устраняют с помощью препаровальных игл, стараясь не повредить паразитов, приставшие к ним сгустки слизи и кусочки тканей; затем, направляя пипеткой сильную струю воды на паразитов, отмывают приставшие к ним слизь и мелкие частицы. Загрязненную воду осторожно отсасывают пипеткой, а в солонку к паразитам наливают чистой воды. Только после многократной смены воды, добившись полной очистки паразитов, их фиксируют. Для морфологического изучения инцистированных гельминтов их предварительно извлекают из цист. Для этого цисты с живыми паразитами помещают на предметное (или покровное) стекло в каплю физиологического раствора и, наблюдая под лупой, осторожно надрывают острыми препаровальными иглами их стенки; далее цисты накрывают покровным стеклом и, слегка нажимая на последнее, выдавливают из них паразитов. Личинки червей (особенно трематод) очень нежны и при сильном нажиме на покровное стекло их можно раздавить; во избежание этого надавливание на стекло производят осторожно, наблюдая под лупой за выходом личинки. Нужно следить, чтобы при этом под покровным стеклом было достаточное количество воды, предохраняющей паразитов от раздавливания. Личинок, извлеченных из цист, промывают и фиксируют, как и взрослых червей. Трематод и круглых червей с толстой кутикулой (аскаридат, спирурат и др.) желательно фиксировать сразу же после их гибели в воде (момент прекращения движений), так как в это время они хорошо расправляются. Ленточных червей и скребней, наоборот, нужно фиксировать живыми, предупреждая этим выпадение из их хоботков крючьев, имеющих большое систематическое значение, и добиваясь фиксации паразитов с

вытянутыми хоботками. Трематод, извлеченных из печени, почек и кровеносных сосудов, а также круглых червей со сравнительно тонкой кутикулой фиксируют тоже живыми и как можно быстрее, так как паразиты могут лопнуть от долгого пребывания в воде. Чтобы зафиксировать червей в расправленном состоянии, для трематод и ленточных червей, кроме фиксации подогретыми фиксаторами, применяется фиксация под стеклом. С этой целью червей помещают на предметное стекло и накрывают в зависимости от величины объекта покровным или предметным стеклом; затем, слегка надавливая на верхнее стекло пипеткой, подпускают под него 70%-й спирт или другую фиксирующую жидкость. Черви между стеклами должны находиться в фиксаторе не менее 1–2 часов. Для дальнейшего хранения зафиксированных гельминтов помещают в пробирки Уленгута с этикетками и в материальные банки с притертыми крышками, залив 70%-м спиртом. Для круглых червей лучшим фиксатором является горячая жидкость Барбагалло. Отмытых и очищенных червей помещают в солонку или чашку Петри и заливают жидкостью Барбагалло, подогретой почти до кипения. После фиксации червей помещают в пробирки Уленгута с этим же фиксатором. Пиявок и ракообразных можно фиксировать как в 70%-м спирте, так и в жидкости Барбагалло. Паразитологический анализ проводят после видовой идентификации обнаруженных паразитов. Для этого необходимо приготовить постоянные препараты. Определение паразитов проводят в соответствии с определительными ключами, разработанными исходя из его систематического положения. Количественные показатели зараженности учитывают по каждой вскрываемой рыбе и заносят в рабочую тетрадь. Расчет показателей зараженности исследованной группы (выборки) ведут по ниже указанным показателям, используя специальные формулы.

Ход работы:

1. Провести визуальный осмотр рыбы и ее биологический анализ.
2. Приготовить соскоб слизи с поверхности тела рыбы и исследовать его на наличие паразитов.
3. Взять мазок крови и провести его фиксацию.
4. Исследовать плавники, носовые ямки, ротовую полость и жабры на наличие паразитов.
5. Вскрыть брюшную полость, выделить внутренние органы.
6. Провести исследование внутренних органов на наличие паразитов.
7. Исследовать глаза на наличие паразитов.
8. Исследовать головной мозг.
9. Исследовать мускулатуру.
10. Зафиксировать найденных паразитов.
11. Провести статистическую обработку собранного материала.

Лабораторная работа 7. Жгутиконосцы, паразитирующие у рыб

Цели лабораторного занятия:

1. Изучение морфологических особенностей строения жгутиконосцев, их систематическое положение.
2. Освоение навыков определения жгутиконосцев.
3. Ознакомление с методами приготовления временных микропрепаратов.

План проведения занятия:

1. Изучить морфологические и биологические особенности жгутиконосцев.
2. Освоить навыки определения жгутиконосцев, используя постоянные препараты.
3. Зарисовать жгутиконосцев в рабочую тетрадь, отметив особенности их строения.
4. Освоить метод выделения и приготовления временных микропрепаратов из жгутиконосцев.

Оборудование и материалы: рыба живая или охлажденная, кюветы для вскрытия рыбы, вода дистиллированная, скальпели, пинцеты, ножницы, глазные пипетки, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, микроскопы, лабораторная коллекция микропрепаратов жгутиконосцев, Определители паразитов рыб.

Теоретическая часть

Из типа жгутиконосцев – *Sarcomastigophora* у рыб паразитируют представители отрядов *Diplomonadida* и *Kinetoplastida*. Представители отряда *Diplomonadida* – жгутиконосцы с двойным симметричным набором органелл: 2 ядра, 8 жгутиков и т. д. В рыбах водоемов России паразитирует один род *Hexamita* и один вид – *H. truttae*. Локализуется в кишечнике и желчном пузыре лососевых рыб. Мелкий паразит овальной формы, размером 7–14х3–10 мкм. Имеет четыре пары жгутиков, при помощи которых передвигается: три пары расположены на переднем конце тела и одна пара на заднем. Возле переднего конца находится два продолговатых ядра. В жгутиковой стадии паразит размножается простым делением в клетках эпителия кишечника. Жгутиконосец способен образовывать цисты, которые могут существовать некоторое время вне организма хозяина. Болезнь может проявляться в острой и хронической формах, широко распространена в форелевых хозяйствах и лососевых заводах. У больных рыб отмечается гиперемия слизистой кишечника, особенно в передней части. Желчный пузырь наполнен красноватым содержимым. Из ануса выделяются слизеобразные тяжи белого цвета. Представители отряда кинетопластыды (*Kinetoplastida*) – мелкие бесцветные жгутиконосцы, имеющие от 1 до 2–4 жгутиков, связанных с кинетопластом – особым органоидом митохондриальной природы, содержащим большое количество ДНК. Жгутиконосец *Ichtiobodo necator* (*Costia necatrix*) относится к сем. *Bodonidae*, отр. *Kinetoplastida*. Имеет характерную форму тела с двумя жгутиками, направленными назад. Паразиты жабр и кожи рыб. Вызывают серьезные

заболевания молоди. По бокам тела молоди рыб образуются сначала пятна, а затем сплошной сероватый налет. Часто наблюдается разрушение плавников. Пораженные жабры приобретают бледную окраску и покрываются слизью. К этому же отряду и семейству относится род *Trypanosoma*. Представители этого рода имеют удлиненное тело, заостренное на обоих концах. Базальное тельце и кинетопласт находится на заднем конце клетки. Жгутик, направленный вперед, прирастает по всей длине клетки, образуя ундулирующую мембрану, которая на переднем конце переходит в свободно свисающий жгутик. Имеется одно крупное ядро в центре клетки. У рыб трипаносомы паразитируют в крови, вызывают анемию, отеки, которые хорошо видны в подкожной клетчатке и на респираторном эпителии жабр. Размножаются со сменой хозяев. Основным хозяином, в организме которого проходит большая часть жизненного цикла, служат кровососущие пиявки. Жгутиконосцы рода *Cryptobia* паразитируют на поверхности жабр и в кровяном русле рыб. Для криптобий известны 2 типа жизненных циклов: прямой (без промежуточного хозяина) и сложный (с участием пиявок). *C. branchialis*, паразитирующие на жабрах, вызывают их ненормально яркую красную окраску. Паразиты разрушают жаберные лепестки, затрудняя дыхание рыб. Кожные покровы сильно ослизнены. Больные рыбы отказываются от корма. *C. cyprini* – мелкие бесцветные жгутиконосцы с неясно выраженным ядром. Сильное заражение приводит к истощению рыбы, которая слабо реагирует на раздражение. Иногда наблюдается гиперемия кожных покровов и образование подкожных пузырей с розоватым экссудатом. *C. salmositica* имеет характерные морфологические признаки криптобий. Ее развитие происходит с участием пиявок, в которых жгутиконосцы размножаются бесполом путем. В дальнейшем они проникают во влагалище хоботка пиявки. При укусе пиявки паразиты попадают в кровь рыбы. Для этого вида описан также прямой жизненный цикл, то есть паразит передается от рыбы к рыбе через воду без пиявки. В России паразиты выявлены в бассейне реки Терек у каспийского лосося и его пресноводной формы – ручьевой форели. Криптобиоз каспийского лосося протекает у молоди в возрасте от одного года и старше. Рыбы старше двух лет являются паразитоносителями. Больная рыба держится в толще воды, слабо реагирует на человека, не питается и гибнет. При невысоком заражении годовики плохо питаются и отстают в росте. Зараженная рыба очень чувствительна к уменьшению содержания в воде кислорода. При сильной инвазии у больных рыб возникают водянка, экзофтальмия, ярко выраженная анемия жабр и внутренних органов. Кровь бледно-розового цвета, плохо свертывается. В полости тела и в сердечной сумке скапливается прозрачный розоватый экссудат.

1. Сбор материала.

Живую рыбу обездвигивают и кладут в кювету. Можно использовать охлажденную рыбу. Делают соскобы с поверхности тела, ротовой полости, носовых ямок (лабораторная работа № 19). Помещают их на отдельные покровные стекла, добавляя 1–2 капли воды. Готовят мазок крови, как указано в лабораторной работе № 4. Мазок подсушивают, накрыв чашкой Петри. Каплю

крови помещают на предметное стекло и накрывают покровным стеклом. Выделяют жаберные дуги, делают соскоб на стекле для вскрытия и добавляют несколько капель воды. Вскрывают рыбу с соблюдением требований. Извлекают желчный и мочевой пузыри, вскрывают их и содержимое помещают на предметное стекло. Затем вскрывают кишечник, делают клятвч-препараты и соскобы с внутренней стенки кишечника. Соскобы помещают на предметное стекло, добавляют 1–2 капли воды. Пипеткой берут каплю жидкости из брюшной полости, помещают на предметное стекло и накрывают покровным стеклом. Соскобы просматривают под малым и большим увеличением микроскопа и, найдя паразитов, рассматривают их и зарисовывают.

2. Определение паразитов.

Изготовленные или готовые препараты помещают под микроскоп и изучают под масляной иммерсией. Рассматривают и зарисовывают расположение ядерного аппарата, жгутиков и других органелл. С помощью определителя выясняют видовую принадлежность жгутиконосцев. Результаты работы оформляют в тетради для лабораторных занятий.

Ход работы:

1. Ознакомиться с ходом работы и морфологическими признаками жгутиконосцев, являющимися определительными ключами.
2. Записать в тетрадь систематическое положение жгутиконосцев.
3. Изготовить временные препараты, выделенные из представленных на анализ рыб.
4. На постоянных препаратах рассмотреть, измерить и зарисовать основных представителей жгутиконосцев.
5. Пользуясь определителями паразитов рыб, провести родовую идентификацию жгутиконосцев из представленной коллекции микропрепаратов.

Лабораторная работа 8. Миксоспоридии, паразитирующие у рыб

Цели лабораторного занятия:

1. Изучение морфологических особенностей строения спор миксоспоридий, их систематическое положение.
2. Освоение навыков определения миксоспоридий.
3. Ознакомление с методом приготовления постоянных микропрепаратов из миксоспоридий.

План проведения занятия:

1. Используя микропрепараты, изучить морфологические особенности строения спор миксоспоридий рыб.
2. Научиться определять миксоспоридий до рода.
3. Освоить методы выделения и приготовления постоянных препаратов из миксоспоридий.
4. Зарисовать строение спор миксоспоридий, отметив особенности строения

Оборудование и материалы: рыба охлажденная, живая, чашки Петри, кюветы для вскрытия рыбы, вода дистиллированная, скальпели, пинцеты, ножницы, глазные пипетки, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, микроскопы, лабораторная коллекция микропрепаратов миксоспоридий, Определители паразитов рыб.

Теоретическая часть

Миксоспоридии относятся к типу *Myxozoa*, класс *Myxosporea*. Они насчитывают свыше 700 видов и относятся к многочисленным группам простейших, паразитирующим в рыбах. Существуют в 2 формах: вегетативной и в виде споры. Вегетативная форма миксоспоридий достаточно сложна в строении. У полостных миксоспоридий (паразиты желчного, мочевого, плавательного пузыря, почечных канальцев, мочеточников, желчных протоков) вегетативные формы представлены многоядерными плазмодиями различной формы, в котором затем формируются отдельно лежащие споры. У тканевых (паразитов жабр, эпителиальной и других тканей) вегетативные формы при спорообразовании приобретают вид цист, покрытых соединительнотканной капсулой. Иногда вегетативная стадия миксоспоридий представлена в виде бесформенной протоплазматической массы, заполняющей промежутки между элементами тканей хозяина – инфильтрата (некоторые представители отряда *Multivalvulea*). Класс *Myxosporea* делится на 2 отряда: *Multivalvulea* и *Bivalvulea*. В отряд *Bivalvulea* входят 3 подотряда: *Bipolaria*, *Eurysporea*, *Platysporea*. В основе систематики миксоспоридий лежит строение спор. Споры миксоспоридий состоят из 2, реже 3–6 створок, в споре располагается амебоидный зародыш и 2–4 полярные капсулы у *Bivalvulea*, или до 6 у *Multivalvulea*. Споры служат для сохранения и расселения вида

1. Сбор материала и изготовление постоянных препаратов.

Рыбу кладут в кювету. Делают соскобы с тканей в порядке, указанном в методике полного паразитологического анализа. Соскобы просматривают под большим увеличением микроскопа и при наличии в них спор миксоспоридий изготавливается глицерин-желатиновый препарат

2. Определение паразитов.

Просматривают препарат под большим увеличением микроскопа или с использованием масляной иммерсии, лучше в фазовоконтрастном свете. Зарисовывают строение спор миксоспоридий и измеряют.

Ход работы:

1. Ознакомиться с ходом работы и морфологическими признаками миксоспоридий.
2. Записать в тетрадь систематическое положение миксоспоридий.
3. Изготовить глицерин-желатиновые препараты из обнаруженных на рыбе миксоспоридий.
4. Изучить у найденных паразитов строение спор: количество створок, полярных капсул, расположение амебоидного зародыша.
5. Ознакомиться с методикой измерения миксоспоридий.
6. Оформить результаты работы в тетради для лабораторных занятий.

Лабораторная работа 9. Инфузории, паразитирующие у рыб

Цели лабораторного занятия:

1. Изучение морфологических особенностей паразитических инфузорий, их систематического положения.
2. Освоение навыков определения различных инфузорий.
3. Ознакомление с методами приготовления временных микропрепаратов.

План проведения занятий:

1. Приготовить мазки с покровов живой рыбы и изучить их под микроскопом.
2. Рассмотреть строение найденных инфузорий на мазках и микропрепаратах.
3. Освоить навыки определения инфузорий, используя постоянные препараты.
4. Научиться определять найденных на препарате инфузорий до рода.
5. Зарисовать найденных инфузорий в рабочей тетради

Оборудование и материалы: живая рыба, кюветы для вскрытия рыбы, вода дистиллированная, скальпели, пинцеты, глазные пипетки, предметные и покровные стекла, микроскопы, лабораторная коллекция микропрепаратов инфузорий, определители паразитов рыб.

Теоретическая часть

Из типа ресничных инфузорий (*Ciliophora*) у рыб паразитируют представители 6 классов: *Pleurostomata*, *Cyrtostomata*, *Rimostomata*, *Hymenostomata*, *Peritricha*, *Suctorina*. Тип ресничных – *Ciliophora* наиболее сложно устроенная группа среди простейших. Размеры их колеблются от 20 до 80 мкм, и только ихтиофтириус достигает 1–2 мм в диаметре. Они имеют постоянную форму тела благодаря наличию оболочки. Органоидами движения служат многочисленные реснички, которые покрывают тело клетки целиком или частично. Реснички расположены рядами – кинетами. У большинства инфузорий есть постоянное ротовое отверстие – цитостом, располагающийся в особом углублении – перистоме. Вокруг цитостома имеется система околотротоваых кинет (рядов ресничек) или их производных – мембранелл и мембран. Ротовое отверстие ведет в клеточную глотку (цитофаринкс), которая у некоторых инфузорий (например, хилодонелл) снабжена особым палочковым аппаратом, способным выворачиваться наружу. На дне глотки по мере поступления пищи образуется пищеварительная вакуоль. Непереваренные остатки пищи выбрасываются через постоянное отверстие – порошицу. У сосущих инфузорий питание осуществляется с помощью щупальцевого аппарата. В эндоплазме инфузорий находятся 2 (иногда больше) ядра. Одно крупное, ведающее соматическими процессами – макронуклеус, и второе генеративное – микронуклеус.

Размножение инфузорий происходит на теле рыбы, реже в воде делением пополам или многократно повторяющимся делением надвое (палинтомия). У некоторых инфузорий наблюдается половой процесс (конъюгация). При

неблагоприятных условиях многие инфузории образуют цисты покоя, некоторые длительное время могут сохраняться в водоеме. Некоторые инфузории образуют цисты в период размножения или перестройки ядерного аппарата. Инфузории паразитируют у рыб на поверхности тела, в жабрах, носовых ямках, ротовой полости, мочевом пузыре и очень редко в пищеварительном тракте. Инфузории *Chilodonella piscicola* и *Ch. hexasticha* имеют важное эпизоотическое значение и нередко вызывают большие отходы сеголетков карпа в рыбоводных хозяйствах).

Паразит питается за счет клеток эпителия. Размножается прямым делением в поперечном направлении. Заболевание чаще поражает ослабленную рыбу. Встречается у очень многих пресноводных рыб, как у молоди, так и у взрослых, во все сезоны года. При серьезной форме заболевания у рыб на поверхности тела появляется голубовато-серый налет, связанный с раздражением кожи рыбы паразитом и сопровождающийся усиленным слизиотделением. Патогенное воздействие паразита проявляется в нарушении дыхательных функций поверхности тела и жабр вследствие сильного повреждения их паразитом.

Ихтиофтириоз – заболевание многих пресноводных рыб, широко распространен в рыбоводных хозяйствах различного типа. Часто вызывает массовую гибель рыб. Возбудитель – *Ichthyophthirius multifiliis* (сем. *Ichthyophthiriidae*, отр. *Hymenostomatida*), тело паразита округлое, на поверхности располагаются ряды ресничек. Имеется крупный подковообразный макронуклеус и небольшой микронуклеус, а также сократительные вакуоли. Паразит обитает под эпителием кожи и жабр хозяина. Размножение происходит вне тела хозяина. Зрелые паразиты (трофонты), разрывая эпителиальный бугорок, выходят в воду. Опустившись на дно, они приклеиваются к различным подводным предметам. Вокруг паразита образуется нежная студенистая циста, внутри которой происходит многократное деление паразита надвое. По окончании деления из трофонта образуется большое количество дочерних клеток, называемых бродяжками. При помощи фермента гиалуронидазы бродяжки растворяют стенку цисты и выходят в воду, плавая с помощью ресничек. Попав на рыбу, бродяжки внедряются под эпителий, где растут и созревают. Бродяжки, не нашедшие хозяина, погибают. При заражении рыбы крупные паразиты хорошо видны в виде небольших белых бугорков. В случае сильного заражения с больной рыбы сходит эпителий, рыбы задыхаются, идут к притоку и гибнут.

Патологический процесс захватывает внутренние органы, особенно печень и селезенку, что свидетельствует о значительном токсическом воздействии паразита. У переболевших рыб вырабатывается постинвазионный иммунитет. Инфузории из семейства *Trichodinidae* (класс *Oligohymenophora*, подкласс *Peritricha*), паразитирующие у рыб, относятся к нескольким родам: *Trichodina*, *Tripartiella*, *Trichodinella*, *Paratrichodina*, *Dipartiella*. Заболевания, вызываемые этими инфузориями, называются триходиниозами. Инфузории чаще локализуются на коже и жабрах рыб, реже встречаются во внутренних органах (мочевой пузырь, мочеточники) и не обладают строгой

специфичностью, однако имеется некоторая приуроченность определенных видов инфузорий к конкретным хозяевам. Тело инфузорий блюдцеобразной формы, с расположенным внутри округлым опорным диском, состоящим из кольца хитиноидных крючьев различной величины и формы. Макронуклеус подковообразный, микронуклеус – округлый. Форма и размеры крючьев макронуклеуса и микронуклеуса и их взаимное расположение – важные систематические признаки. Тело окружено венчиком ресничек, с помощью которых инфузории передвигаются по рыбе и плавают в воде. Размножаются простым делением.

Триходин по отношению к температуре можно разделить на теплолюбивых, холодолюбивых и эвритермных. К триходиниозам восприимчивы разные виды и разные возрастные группы рыб. Наиболее подвержены заболеванию рыбы младших возрастных групп, выращиваемых на рыбоводных заводах. Тело зараженных рыб покрывается беловатой слизью, в тяжелых случаях слизь отделяется клочьями. Сильно зараженные рыбы подходят к притоку. Триходины разрушают эпителиальные клетки кожи и жабр хозяина, затрудняют газообмен и нарушают дыхательную функцию. Сидячие инфузории из отряда *Peritichida* родов *Apiosoma*, *Ambiphrya*, *Scyphidia*, *Epistylis* поражают молодь рыб в рыбоводных хозяйствах. Тело сидячих инфузорий обычно имеет форму бокала или конуса, на верхнем конце расположено ротовое отверстие – перистом, окруженное венчиком ресничек. На нижнем конце имеется подошва, которой инфузория прикрепляется к хозяину. Ядерный аппарат состоит из макронуклеуса и микронуклеуса. Форма и расположение ядер, размеры, форма тела – важные систематические признаки. Размножаются эти инфузории простым делением. Сильно зараженная рыба покрывается белым налетом, иногда наблюдается покраснение кожного покрова, слизееотделение увеличивается. Больная рыба беспокойна. Отмечается слабое ерошение чешуи. Прикрепляясь к хозяину подошвой, инфузории разрушают клетки эпителия, нарушая кожное дыхание. Мальки сильно истощаются и отстают в росте. Из других инфузорий эпизоотическое значение имеют инфузории *Balantidium ctenopharyngodoni* из отр. *Trichostomatida*, паразитирующий в кишечнике белого амура, и *Capriniana piscium*, паразитирующая на жабрах сиговых, лососевых, сомов и некоторых других рыб.

1. Сбор инфузорий, приготовление временных и постоянных препаратов. Для обнаружения инфузорий готовят временные препараты. Живую рыбу обездвиживают и помещают в кювету. Для изучения живых инфузорий делают соскобы с поверхности тела и просматривают под малым и большим увеличением микроскопа. На отдельных стеклах делают препараты соскобов со стенок ротовой полости, обонятельных ямок и жабр. При обнаружении паразитов просчитывают количество каждого рода инфузорий в 25 полях зрения микроскопа. Данные подсчета записывают в тетрадь. Постоянные препараты готовят следующим образом: делают соскобы с участков тела, где обнаружены инфузории, высушивают их и окрашивают азотнокислым серебром.

2. Определение инфузорий. Для видовой идентификации инфузорий используют постоянные препараты. Под большим увеличением рассматривают паразитов и зарисовывают их общий вид. У хилодонелл просчитывают количество ресничных рядов в обеих системах, обращают внимание на расположение сократительных вакуолей и их количество, измеряют длину и ширину инфузории, то есть признаки, являющиеся ключами для определения вида. У триходин измеряют зубцы прикрепительного диска.

Ход работы:

1. Сделать мазки с живой рыбы.
2. Изучить найденных на мазке и микропрепаратах инфузорий под малым и большим увеличением микроскопа.
3. Зарисовать и выяснить их видовую принадлежность, используя Определитель.
4. Результаты работы оформить в тетради для лабораторных занятий.

Лабораторная работа 10. Моногенеи рыб

Цели лабораторного занятия:

1. Изучение морфологических особенностей строения моногеней, их систематическое положение.
2. Освоение навыков определения моногеней.
3. Ознакомление с методами приготовления временных и постоянных микропрепаратов из моногеней.

План проведения занятия:

1. Изучить морфологические и биологические особенности моногеней различных систематических групп.
2. Изучить систематику моногеней.
3. Освоить навыки определения моногеней, используя постоянные препараты.
4. Освоить метод выделения и приготовления микропрепаратов из моногеней.
5. Зарисовать моногеней в рабочей тетради, отмечая особенности их строения

Оборудование и материалы: рыба живая, кюветы для вскрытия рыбы, вода дистиллированная, скальпели, пинцеты, ножницы, глазные пипетки, препаровальные иглы, солонки, паразитологические пробирки, предметные и покровные стекла, микроскопы, лабораторная коллекция микропрепаратов моногеней, Определители паразитов рыб.

Теоретическая часть

Моногенеи – плоские черви (тип *Plathelminthes*, класс *Monogenea*), в основном паразитирующие у рыб на коже, плавниках, ротовой полости, жабрах, изредка в мочеточниках и мочевом пузыре. Это мелкие черви размером от долей миллиметра до 30 мм, внутреннее строение которых характерно для

плоских червей. У моногеней очень хорошо развиты органы прикрепления, расположенные на переднем конце тела, и особенно мощные на заднем, где находится прикрепительный диск. На переднем конце они представлены головными выростами, валиками, лопастями, ямками и присосками. На всех этих образованиях в большом количестве присутствуют железистые клетки, выделяющие клейкий секрет. Эти органы служат для прикрепления паразита к хозяину во время питания. На заднем конце прикрепительный диск служит для прочной фиксации червя на теле хозяина.

Строение диска у моногеней очень разнообразно и является важнейшим систематическим признаком. На диске фиксаторные органы могут быть представлены хитиноидными крючьями различной формы и размера, прикрепительными хитиноидными клапанами, присосками, часто встречаются сочетания крючьев с клапанами или присосками. Моногеней – гермафродиты. Строение половой системы типично для всех плоских червей, но имеются и особенности. Так, для мужской половой системы характерно строение копулятивного аппарата – цирруса. У низших моногеней он состоит из хитиновой трубки и хитиновой же поддерживающей части. Все это имеет важное диагностическое значение. Большинство моногеней откладывают яйца, хотя встречаются и живородящие (например, гиродактилюсы). Яйца моногеней разнообразны по форме, но практически всегда снабжены выростами (филаментами) и крышечкой. Развитие прямое без промежуточных хозяев. Из яйца вылупляется личинка (онкомирацидий) с тремя рядами ресничек и зародышевым прикрепительным диском. Она свободно плавает в воде, отыскивая своего хозяина. Оседает на поверхности тела, сбрасывает реснички. Постепенно формируются настоящий прикрепительный диск и половые органы. Молодая особь перемещается к месту постоянной локализации и превращается во взрослого червя. Класс моногеней делится на два подкласса: низшие моногеней *Polyonchoinea* и высшие моногеней – *Oligonchoinea*. Низшие моногеней чаще встречаются на пресноводных, высшие – на морских рыбах. Моногеней являются возбудителем многих серьезных заболеваний рыб в рыбоводных хозяйствах всех типов и в естественных водоемах. Особенно опасны они для молоди. Возбудители дактилогирозов карпа относятся к семейству *Dactylogyridae*. Для них характерны небольшие размеры тела, наличие глаз на переднем конце. В состав прикрепительного диска входят 14 краевых крючьев, два средних крючка и одна соединительная пластинка. Представители семейства – яйцекладущие организмы. Яйца у разных видов различаются по форме. Представители семейства – узкоспецифичные паразиты – локализуются чаще на жабрах, реже – на поверхности тела и в носовых ямках. На жабрах карпов, сазанов и их гибридов паразитируют 5 видов дактилогирозов, однако эпизоотическое значение имеют только *Dactylogyrus vastator* и *D. extensus*.

1. Сбор и выделение моногеней.

Живую рыбу обездвигивают и кладут в кювету. Делают соскоб с поверхности тела, отделенных от тела плавников, жаберных дуг, а также из ротовой полости и носовых ямок. Соскобы просматривают под микроскопом и

подсчитывают количество паразитов. Ткани плавников и жабр продавливают на давящем стекле и просматривают под биноклем. С помощью препаровальных игл и тонко оттянутой пипетки отбирают обнаруженных червей, переносят их на предметное стекло в каплю чистой воды, освобождают от остатков тканей и слизи и заключают в глицерин-желатин. Крупных моногеней специально окрашивают квасцовым кармином, чтобы рассмотреть строение их внутренних органов.

2. Определение паразитов.

Форма и размеры тела, прикрепительных органов, пищеварительной и половой систем служат определительными признаками, на которых основана систематика моногеней. Препараты изучают под малым и большим увеличением микроскопа, внимательно рассматривают строение внутренних органов, половой системы и прикрепительного диска, измеряют и зарисовывают. С помощью Определителя выясняют вид паразита. Результаты работы оформляют в тетради для лабораторных работ.

Ход работы:

1. Ознакомиться с морфологическими признаками моногеней, являющимися определительными ключами.

2. Записать в тетрадь систематическое положение моногеней.

3. Изготовить временные и постоянные препараты из моногеней, выделенных из рыбы, взятой на анализ.

4. На постоянных препаратах рассмотреть особенности строения органов прикрепления и половой системы, измерить и зарисовать основных представителей моногеней.

5. Пользуясь Определителями паразитов рыб, провести видовую идентификацию моногеней из коллекции микропрепаратов.

6. Зарисовать в тетради для лабораторных занятий основных представителей, выделив особенности их строения.

Лабораторная работа 11. Цестоды рыб

Цели лабораторного занятия:

1. Изучение морфологических особенностей цестод, их систематического положения.

2. Освоение навыков определения цестод.

3. Ознакомление с методами приготовления временных и постоянных препаратов.

План проведения занятия:

1. Изучить морфологические и биологические особенности цестод

2. Освоить навыки определения цестод, используя постоянные препараты.

3. Освоить метод выделения и приготовления временных и постоянных препаратов из цестод.

4. Зарисовать цестод в рабочей тетради, отмечая особенности их строения

Оборудование и материалы: рыба охлажденная, живая, чашки Петри, кюветы для вскрытия рыбы, вода дистиллированная, скальпели, пинцеты, ножницы, глазные пипетки, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, микроскопы, лабораторная коллекция препаратов цестод, определители паразитов рыб.

Теоретическая часть

Цестоды – ленточные черви (класс *Cestoda*), могут паразитировать у рыб на личиночной стадии (плероцеркоид) или половозрелого гельминта, то есть используют их в качестве промежуточного или дифинитивного хозяина. Класс ленточных червей включает в себя 9 семейств, из которых в пресноводных рыбах во взрослом состоянии встречаются представители 4 семейств: *Caryophyllidea*, *Pseudophyllidea*, *Proteocephalidea*, *Nippotaeniidea*. Представители четырех других: *Trypanorhyncha*, *Diphyllidea*, *Tetraphyllidea* и *Lecanicephalidea* встречаются половозрелыми в кишечнике акул и скатов, а плероцеркоиды – в морских и проходных рыбах. Девятое семейство *Cyclophyllidea* включает представителей, у которых личиночные формы встречаются во внутренних органах некоторых пресноводных рыб. Половозрелые цестоды локализуются в основном в кишечнике рыб, а на стадии плероцеркоида – в брюшной полости, в желчном пузыре, печени, мускулатуре и в других органах.

Тело зрелого червя состоит из головки (сколекса), шейки и собственно тела (стробилы). Стробила может быть нерасчлененной или состоящей из отдельных члеников (проглоттид). Число члеников у цестод различных таксонов колеблется от 2–3 до нескольких тысяч. Так же сильно варьируют и размеры тела червей – от долей миллиметра до 10 и более метров. В систематике цестод большое значение имеет строение сколекса и комплекса гермафродитной половой системы. Особенности строения женской половой системы цестод являются H-образный яичник, расположенный в нижней части проглоттиды, наличие вагинального протока, впадающего в оотип, и часто слепо замкнутой матки, которая, по мере заполнения ее яйцами, раздувается и занимает весь членик. Особенности мужской половой системы: множественность фолликулярных семенников, расположенных в паренхиме, наличие половой бурсы, окружающий конечный отдел семяпровода. Циррус цестод, паразитирующих у некоторых рыб, может быть вооружен хитиноидным крючком. Выводное отверстие мужской половой системы и вагинальное отверстие располагаются отдельно на половом сосочке или образуют общую половую клоаку. Развитие цестод проходит с участием одного-двух или более промежуточных хозяев.

Заболевание рыб вызывают как половозрелые черви, так и плероцеркоиды. Представители родов *Khawia*, *Caryophyllaeus*, *Bothriocephalus* и *Proteocephalus* наиболее распространены у карповых рыб, в том числе и среди объектов аквакультуры. У лососевых и сиговых рыб часто встречаются цестоды

родов *Cyathocephalus* и *Proteocephalus*. Паразиты вышеуказанных родов паразитируют у рыб в кишечнике, где достигают половозрелого состояния. На стадии плероцеркоида у карповых рыб паразитируют цестоды родов *Ligula*, *Digramma*, а также цистицерки *Dilepis*, *Gryporhynchus* и др. Половозрелые цестоды, паразитирующие у рыб Возбудитель кавиоза – *Khawia sinensis* – относится к отряду *Caryophyllidea*, семейства *Lytocestidae*. Паразитирует в кишечнике карпа, сазана и их гибридов. Паразиты имеют нечленистое тело. Головной конец паразита веерообразно расширен, с фестончатым передним краем. Шейки нет. Семенники и желточники расположены сразу за сколексом. Имеется один половой комплекс. Петли матки не заходят вперед сумки цирруса. Развитие кавии происходит с участием одного промежуточного хозяина – малощетинковых червей (олигохет). В яйцах гвоздичников формируются корацидии, которые выходят из них в кишечнике олигохет. Здесь же формируется процеркоид. После заглатывания зараженных олигохет рыбой в ее кишечнике образуется половозрелая форма цестоды. Возбудитель кариофиллеза – гвоздичник *Caryophyllaeus fimbriceps* из отряда *Caryophyllidea* семейства *Caryophyllaeidae*, паразитирует в кишечнике карпа, сазана, леща, язя, линя, голавля и плотвы. Тело гвоздичника нечленистое, белое. Сколекс расширен с многочисленными фестонами, шейка выражена нечетко. Цикл развития кариофиллеуса сходен с циклом развития кавии и происходит при участии промежуточных хозяев – олигохет. Ленточные гельминты рода *Bothriocephalus* из отряда *Pseudophyllidea* семейства *Bothriocephalidae* вызывают ботриоцефалез карпа и белого амура. Тело гельминтов белое, состоит из сколекса с ботридиальными щелями и длинной стробилы. Строение члеников характерно для таких цестод, то есть в каждом членике содержится половой комплекс. Важным определительным признаком является строение сколекса. У *B. acheilognathi* он сферический с неясно выраженным теменным диском, а у *B. opsarichthydis* сердцевидный, конический, с глубокими овальными ботридиями.

Цестода *Bothriocephalus scorpii* паразитирует в кишечнике морских рыб. Паразит имеет длинную белую стробилу с ясно выраженной членистостью. Передний край члеников короче заднего, поэтому боковые края стробилы пиловидны зазубрены. Сколекс прямоугольный, длина его намного превышает ширину, хорошо развит терминальный диск, желточники расположены в кортикальной наружной паренхиме. Яичник компактный. Развитие гельминтов рода *Bothriocephalus* проходит при участии одного промежуточного хозяина – рачка циклопа. Яйца гельминта вместе с экскрементами рыбы попадают на дно водоема, где в яйце завершается развитие корацидия. Корацидий округлой формы с тремя парами зародышевых крючьев, тело его покрыто ресничками. В циклопе корацидий прободает стенку кишечника и выходит в полость тела, где постепенно превращается в процеркоид. Заглатывая инвазированных циклопов, рыба заражается цестодой, которая в ее кишечнике достигает половой зрелости. В кишечнике как мирных, так и хищных пресноводных рыб встречаются лентецы из рода *Proteocephalus albulae* (отряд *Proteocephalidea*, семейства *Proteocephalidae*.) Черви белого или светло-серого цвета. Сколекс округлой

формы с четырьмя простыми присосками. На его вершине может находиться пятая теменная присоска или ее рудимент. Стробила с четким расчленением. Личиночные формы цестод, паразитирующие у рыб на стадии плероцеркоида ремнецы семейства *Ligulidae* родов *Ligula*, *Digramma*, *Schistocephalus* (отряд *Pseudophyllidea*) паразитируют в полости тела многих видов пресноводных рыб. Это крупные, сильно мускулистые ремневидные черви белого цвета с закругленным передним концом тела. Наружная членистость отсутствует, но внутренняя метамерия имеется. Половые комплексы расположены вдоль тела. На вентральной стороне ремнецов имеются в соответствии с половыми протоками продольные бороздки: одна у рода *Ligula* и две у рода *Digramma*.

Представители рода *Schistocephalus* с полностью расчлененной стробилой уже на стадии плероцеркоида

1. Сбор и выделение цестод.

Живую рыбу кладут в кювету, вскрывают брюшную полость. Осматривают внутренние органы на наличие плероцеркоидов. Затем органы выделяют, освобождают кишечник, пилорические придатки и вскрывают их. Содержимое кишечника рассматривают под лупой или биноклем. Делают соскоб со слизистой кишечника. Все это исследуют компрессионным способом на давящем стекле. В последнюю очередь исследуют мускулатуру рыб. С рыб снимают кожу и осматривают ее внутреннюю сторону. Мышцы исследуют полностью, разрезая их в косом направлении на пластинки толщиной не более 3–5 мм и просматривают, продавливая через давящие стекла под биноклем. Выделенных и освобожденных от слизи цестод помещают на предметное стекло в каплю чистой воды, накрывают покровным стеклом или предметным, если гельминт крупный, рассматривают под биноклем. Фиксируют цестод 70%-м спиртом. Для определения вида ленточных червей делают постоянные препараты. Их обязательно окрашивают, наиболее эффективна окраска квасцовым кармином.

2. Определение паразитов.

Изготовленные препараты изучают под биноклем и под малым и большим увеличением микроскопа. Изучают строение головки (наличие и количество присосок, ботридий, ботрий, крючьев), количество члеников в стробиле, строение половой системы (расположение и количество желточников и семенников, строение матки и яичников). С помощью Определителя выясняют видовую принадлежность гельминта.

Ход работы:

1. Ознакомиться с морфологическими признаками, являющимися определительными ключами цестод.

2. На постоянных препаратах рассмотреть особенности строения сколекса цестод, стробилы и половой системы.

3. Изготовить временные и постоянные препараты из цестод, выделенных из рыбы, представленной на анализ.

4. Пользуясь Определителями паразитов рыб, провести видовую идентификацию цестод, зарисовать их в тетради для лабораторных занятий.

5. Изучить жизненные циклы цестод.

Лабораторная работа 12. Трематоды рыб

Цели лабораторного занятия:

1. Изучение морфологических особенностей трематод, их систематическое положение
2. Освоение навыков определения трематод.
3. Ознакомление с методами приготовления временных и постоянных препаратов.

План проведения занятия:

1. Изучить морфологические и биологические особенности трематод.
2. Освоить навыки определения трематод, используя постоянные препараты.
3. Освоить метод выделения и приготовления временных и постоянных препаратов из трематод.
4. Зарисовать трематод в рабочей тетради, отмечая особенности их строения

Оборудование и материалы: рыба живая, чашки Петри, кюветы для вскрытия рыбы, вода дистиллированная, скальпели, пинцеты, ножницы, глазные пипетки, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, микроскопы, лабораторная коллекция препаратов трематод, Определители паразитов рыб.

Теоретическая часть

Трематоды – плоские черви из класса *Trematoda*, включающие только паразитические, освоившие в качестве окончательных или промежуточных хозяев всех позвоночных животных, в том числе и рыб. Они могут вызывать также заболевания людей, то есть некоторые из них являются эпидемиологически значимыми видами. Строение трематод характерно для плоских червей. В систематике трематод имеют значение размеры тела, ротовой и брюшной присосок, их соотношения, особенности строения кутикулы (наличие или отсутствие кутикулярных шипиков), пищеварительной системы. Половозрелые трематоды (мариты), паразитирующие у рыб. Трематоды из рода *Sanguinicola*, паразитирующие в кровеносной системе рыб. У карпа *Sanguinicola inermis* локализуется в сердце, вызывает заболевание. Это небольшой сосальщик вытянутой формы. Ротовая и брюшная присоски отсутствуют. Удлиненный пищевод переходит в кишечник, состоящий из двух передних и двух задних слепых отростков. Семенников 15 пар, двухлопастной яичник располагается за семенниками.

Вся поверхность тела покрыта мельчайшими труднозаметными шипиками. Развитие паразита проходит с участием одного промежуточного хозяина – моллюсков семейства *Limnaeidae*. Паразит, находясь в рыбе, продуцирует яйца треугольной формы, которые через отверстие матки

выводятся в кровь рыбы. Током крови яйца разносятся по всему телу, но задерживаются в капиллярах жабр и почек. В яйце развивается личинка – мирацидий, который выходит из яйца, разрывает ткани капилляров и выходит в воду. В воде мирацидий свободно плавает и внедряется в моллюска (первого промежуточного хозяина). В моллюске он превращается в спороцисту, в которой затем образуются редии. В редиях развивается следующая стадия – церкарий. Церкарии по своему строению напоминают взрослых паразитов и снабжены хвостом, раздвоенным на конце. Церкарии выходят из моллюска, с помощью хвоста плавают в воде и активно нападают на рыбу, проникая через покровы тела в кровеносные сосуды. При внедрении в кровеносные сосуды церкарий отбрасывает хвост и превращается во взрослого паразита. Трематоды паразитирующие у рыб на стадии метацеркария Метацеркарии трематод рода *Diplostomum* (семейство *Diplostomidae*, отряд *Strigeidida*) локализуются в глазах рыб, в основном в хрусталике, в стекловидном теле, а также между склерой и ретиной. В фауне России выявлено 17 видов этого рода. Тело метацеркария овальное, прозрачное. На переднем конце располагается ротовая присоска, от которой отходят два ствола кишечника. Рядом с ротовой присоской видны ушковидные выросты. Примерно в середине тела находится брюшная присоска, за которой располагается довольно крупный железистый орган Брандеса. В теле зрелых метацеркарий можно заметить известковые тельца, которые располагаются на концах разветвленных каналов выделительной системы. Число и расположение известковых телец служит систематическим признаком при определении видовой принадлежности метацеркария.

Жизненный цикл трематод рода *Diplostomum* сложный, протекает с участием трех хозяев: промежуточных – моллюски семейства прудовиков (*Limnaeidae*); дополнительных или вторых промежуточных хозяев – рыбы и круглоротые. Окончательные хозяева – рыбацкие птицы, в основном чайковые и утиные. Диплостомидами заражаются все виды пресноводных и проходных рыб. Наиболее восприимчивы к ним лососевые, сиговые, осетровые и большинство карповых рыб. Заражение рыб происходит в теплое время года, с возрастом зараженность рыб возрастает. Метацеркарии рода *Posthodiplostomum* – *P. cuticola*, довольно крупные трематоды, тело которых четко разделяется на два отдела. Длина заднего отдела в несколько раз меньше переднего. На переднем конце тела расположена ротовая, а в середине – брюшная присоски. В задней части переднего отдела помещается орган Брандеса. Развитие *P. cuticola* проходит с участием двух промежуточных хозяев. Первым промежуточным хозяином служат брюхоногие моллюски – катушки из рода *Planorbis*, вторым – рыбы (в основном представители семейства карповых). Окончательные хозяева паразита – цапли и квакши. Метацеркарии *P. cuticola* поселяются в коже или подкожной клетчатке рыб, паразит образует округлую цисту, вокруг которой отлагается в виде темного пятна пигмент меланин. Заражению подвержены различные виды пресноводных рыб. Наличие черных пятен на поверхности тела рыб дало название этому заболеванию рыб как черно-пятнистое. Однако черные пигментные пятна появляются на теле у рыб и при инцистировании других метацеркарий. В частности, метацеркарии

Aporhalls muehlingi образуют маленькие черные точки вокруг округлых цист с метацеркариями на плавниках, жабрах карповых, окуневых рыб и на щуке. Метацеркарии рода *Cryptocotyle* вызывали криптокотилез молоди кеты на Сахалине, когда молодь была покрыта вся черными пятнами, а метацеркарии *C. concave* образуют шаровидные или эллипсовидные цисты, пигментированные на коже и не пигментированные на жабрах и мускулатуре различных видов бычков и др. рыб

1. Сбор и выделение трематод.

Живую рыбу кладут в кювету, вскрывают. Осматривают покровы, исследуют жабры, внутренние органы, брыжейку, полость тела, глаза, где возможна локализация метацеркариев трематод. Обнаруженных паразитов переносят в отдельную солонку с чистой водой. Промывают и фиксируют 70°-м спиртом. Зафиксированных паразитов окрашивают квасцовым кармином, а метацеркариев диплостомид – уксусно-кислым кармином. Из них потом готовятся постоянные препараты.

2. Определение паразитов.

До вида трематод определяют на постоянных окрашенных препаратах, препараты изучают под малым и большим увеличением микроскопа. Изучают строение тела гельминта, затем – половой, пищеварительной и выделительной систем паразита. Для метацеркариев диплостомид проводят необходимые измерения с помощью окуляр-микрометра. С помощью Определителя выясняют видовую принадлежность гельминта.

Ход работы:

1. Ознакомиться с морфологическими признаками трематод, являющимися определительными ключами.

2. На постоянных препаратах рассмотреть особенности строения тела гельминта, половой, пищеварительной и выделительной систем. Ознакомиться с методикой приготовления постоянных препаратов из трематод.

3. Пользуясь определителями паразитов рыб, провести видовую идентификацию трематод из лабораторной коллекции, зарисовать их в тетради для лабораторных занятий.

4. Изучить жизненные циклы трематод.

Лабораторная работа 13. Скребни рыб

Цели проведения занятия:

1. Изучение морфологических особенностей скребней, их систематического положения.

2. Освоение навыков определения скребней.

3. Ознакомление с методами приготовления временных микропрепаратов.

План проведения занятия:

1. Изучить морфологические и биологические особенности скребней.

2. Знать систематику типа *Acanthocephales*.

3. Освоить навыки определения скребней, используя постоянные препараты.

4. Освоить метод выделения и приготовления временных микропрепаратов из скребней

Оборудование и материалы: рыба охлажденная, живая или фиксированные органы пищеварительной системы, чашки Петри, кюветы для вскрытия рыбы, вода дистиллированная, скальпели, пинцеты, ножницы, глазные пипетки, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, микроскопы, лабораторная коллекция микропрепаратов скребней, определители паразитов рыб.

Теоретическая часть

Скребни относятся к типу акантоцефалес или колючеголовых – *Acanthocephales*. Тело скребней белого или желтовато-оранжевого цвета, удлинненное, сужающееся к заднему концу. На переднем конце тела имеется вооруженный крючьями хоботок, который втягивается во влагалище. Здесь же располагаются два лемниска. Форма, размер хоботка и крючьев, а также взаимное расположение и количество последних на хоботке являются важными систематическими признаками. Пищеварительная система отсутствует, питание осуществляется осмотическим путем. Скребни раздельнополы. Половые системы у самца и самки хорошо развиты и сложно устроены. У самцов есть два семенника с выводящими протоками, цементные железы, половая бурса и совокупительный орган. Цементные железы выделяют клейкий секрет, заклеивающий половое отверстие самки после совокупления. Самка имеет парный яичник, который на ранней стадии развития представлен в виде группы яйцевых клеток. Выводящими аппаратами являются маточный колокол, яйцеводы, матка и влагалище. Структура цементных желез и форма яиц являются систематическими признаками двух классов скребней *Eoacanthocephala* и *Palacanthocephala*. Развитие скребней сложное, с участием промежуточного хозяина, в основном ракообразных (бокоплавов, водяных осликов, ракушечных рачков). В промежуточном хозяине вышедшая из яйца личинка (акантор) развивается в молодого скребня – акантеллу. Рыбы для скребней являются окончательным хозяином, в желудочно-кишечном тракте которого черви становятся половозрелыми. Локализуются скребни в кишечнике, желудке или пилорических придатках рыб, нередко вызывая в местах своего прикрепления сильное воспаление. Наибольшее эпизоотическое значение имеют: *Metechinorhynchus salmonis* и *M. truttae*, паразитирующие в лососевых и сиговых рыбах, и *Pomphorhynchus laevis* у карповых рыб. У многих морских рыб разных широт встречаются *Rhadinorhynchus pristis*. У морских рыб Северного полушария широко распространен *Echinorhynchus gadi*

1. Сбор и выделение скребней.

Живую рыбу обездвигивают и кладут в кювету. Можно использовать охлажденную рыбу или фиксированные органы пищеварительной системы. Вскрывают рыбу и выделяют органы пищеварительной системы, переносят их в чашку Петри. Ножницами осторожно производят разрез вдоль кишечника и просматривают его на наличие скребней, внедрившихся в стенку кишки.

Скальпелем с внутренней поверхности кишечника производят глубокий соскоб. Слизь с паразитами переносят в чашку Петри. Добавляют немного воды и препаровальными иглами освобождают червя, причем особенно тщательно его хоботок, от слизи и тканей хозяина. Если черви крупные или наблюдается истончение или прободение стенки кишечника, выделение гельминтов производят непосредственно из органа с помощью пинцета и препаровальных игл. Освобожденного от слизи скребня кладут на предметное стекло в каплю воды. Стекло помещают под микроскоп и рассматривают червя. Препаровальными иглами расправляют тело червя, его хоботок и накрывают покровным или другим предметным стеклом, слегка придавив передний конец, чтобы хоботок оставался вывернутым. Рассматривают и зарисовывают общий вид скребня, хоботок и расположение на нем крючьев. Зарисовывают форму и измеряют хоботок и крючья.

2. Определение паразитов. Просматривают коллекцию готовых препаратов из скребней рыб и ведут их определение до вида. Под микроскопом рассматривают строение червя. Производят необходимые измерения тела, хоботка, отдельного крючка, обратив внимание на строение его внутреннего отростка. Определяют схему расположения крючьев на хоботке. Отмечают морфологические особенности внутреннего строения червя, половой системы, наличие яиц у самки, их форму и размеры. С помощью Определителя выясняют видовую принадлежность скребня.

Ход работы:

1. Ознакомиться с ходом работы и морфологическими признаками скребней, являющимися определительными ключами.

2. Записать в тетрадь систематическое положение скребней и схему жизненного цикла этих гельминтов.

3. Изготовить временные препараты из скребней, выделенных из представленных на анализ рыб.

4. На постоянных препаратах рассмотреть, измерить и зарисовать основных представителей акантоцефалид.

5. Пользуясь определителями паразитов рыб, провести видовую идентификацию скребней из представленной коллекции микропрепаратов.

Лабораторная работа 14. Нематоды, паразитирующие у рыб

Цели лабораторного занятия:

1. Изучение морфологических особенностей нематод, их систематическое положение

2. Освоение навыков определения нематод

3. Ознакомление с методами приготовления временных и постоянных препаратов из нем.

План проведения занятий:

1. Изучить морфологические и биологические особенности нематод.

2. Освоить методы определения нематод.

3. Освоить метод выделения, приготовления временных и постоянных препаратов из нематод.

4. Зарисовать особенности строения нематод в рабочей тетради.

Оборудование и материалы: рыба охлажденная, живая, чашки Петри, кюветы для вскрытия рыбы, вода дистиллированная, скальпели, пинцеты, ножницы, глазные пипетки, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, микроскопы, лабораторная коллекция препаратов нематод, Определители паразитов рыб.

Теоретическая часть

Нематоды относятся к классу *Nematoda* типа *Nemathelminthes*. Начиная изучение нематод, паразитирующих в рыбах, следует вспомнить характерные черты строения червей этого класса. Тело их покрыто плотной эластичной кутикулой. Это многослойное образование, количество слоев которого зависит от систематического положения нематод и локализации их в организме хозяина. Кутикула может быть кольчатой. Она снабжена различными разрастаниями: шипиками, гребнями, сосочками, бляшками и др. На кутикуле располагаются и различные железистые образования (ренетты, фазмиды, амфиды). Характер вооружения кутикулы служит систематическим признаком. Важное систематическое значение у нематод имеет строение спикул и орнаментация заднего отдела тела самцов. Определение по самкам можно довести только до рода. Под кутикулой находится гиподерма, которая у половозрелых нематод имеет вид синцидия и образует внутрь тела выпячивания (валики), наиболее развитые по бокам, и в меньшей степени – дорсальной и вентральной сторонах тела. Соматическая мускулатура продольная, составляет часть кожно-мускульного мешка. Имеется специальная мускулатура отдельных органов. Внутренние органы нематод располагаются в первичной полости тела. Строение ротовой капсулы, стромы, пищевода (фаринкса), желудка и кишечника имеет важное систематическое значение. Цикл развития нематод рыб сложный, проходит с участием одного или нескольких промежуточных хозяев. В процессе развития нематод присутствуют четыре линьки, которые условно обозначают как личинки I, II, III и IV. Многие нематоды оказываются патогенными для рыб и способны вызывать серьезные заболевания. Нематоды встречаются у рыб как в половозрелом, так и в личиночном состоянии. Нематодозы рыб, вызываемые половозрелыми формами паразитов.

Филометроидоз – широко распространенное заболевание карпа в пудовых хозяйствах. Возбудитель – нематода *Philometroides lusiana*, отряд *Spirurida* из семейства *Philometridae*. Самки нематоды – довольно крупные гельминты яркорозового цвета длиной 90–160 мм, шириной до 1 мм, локализуются под чешуей в чешуйных кармашках. Тело нематоды покрыто многочисленными неравномерно разбросанными сосочками. Ротовое отверстие окружено 4 папиллами. Вся полость тела заполнена маткой, содержащей округлые яйца. Из яиц еще в теле нематоды вылупляются личинки, выходящие в воду. Самцы значительно меньше самок. На заднем конце тела самцов располагаются две

спикулы и небольшой рулек. Самцы локализируются в стенках плавательного пузыря

Рафидоскариоз – это заболевание леща и форели в естественных водоемах. Возбудитель рафидоскариоза – нематода *Raphidascaris acus* из отряда *Askaridida*, семейства *Anisakidae*. Гельминты с цилиндрической формой тела и загнутым на вентральную сторону передним концом. Самцы немного меньше самок. На переднем конце тела располагается ротовое отверстие, окруженное тремя губами и ведущее в пищевод. От пищевода отходит характерный для анизакид пищеводный вырост. Кишечный вырост отсутствует. У самцов и передний, и задний конец тела загнуты на вентральную сторону. На хвостовом конце имеются две спикулы равной длины

1. Сбор, выделение нематод и приготовление препаратов. Живую рыбу кладут в кювету, вскрывают. Осматривают покровы, исследуют жабры, внутренние органы, брыжейку, полость тела, глаза, где возможна локализация нематод. При наличии червей их выделяют на предметное стекло, очищают, и переносят в солонку с водой. Изучение живых паразитов осуществляют следующим образом. Освобожденного от слизи гельминта помещают в каплю воды на предметное стекло и изучают под биноклем или малым увеличением микроскопа. Для изготовления постоянных препаратов проводят фиксацию нематод горячей жидкостью Барбагалло. Из личинок и очень мелких нематод готовят глицерин-желатиновые препараты, как из моногеней. Крупных нематод после фиксации просветляют в молочной кислоте или в глицерине.

2. Определение паразитов.

После просветления в молочной кислоте их кутикула становится прозрачной и дает возможность рассмотреть внутреннее строение паразита.

С помощью Определителя выясняют видовую принадлежность гельминта.

Ход работы:

1. Ознакомиться с морфологическими признаками нематод.

2. На постоянных препаратах рассмотреть особенности строения тела гельминтов, обращая внимание на кутикулярную орнаментацию их тела, строение переднего и заднего концов, количество и размеры спикул.

3. Ознакомиться с методикой приготовления препаратов из нематод.

4. Пользуясь Определителями паразитов рыб, провести видовую идентификацию нематод из коллекции, зарисовать их в тетради для лабораторных занятий.

5. Изучить жизненные циклы нематод.

Лабораторная работа 15. Профилактика болезней рыб на рыбоводных предприятиях

Цели лабораторного занятия:

1. Ознакомление с нормативной базой по профилактике болезней рыб на рыбоводных предприятиях.

2. Изучение особенностей организации и проведения профилактических мероприятий в рыбоводных хозяйствах.

3. Приобретение навыков расчета профилактической обработки икры.

4. Приобретение навыков расчета доз дезинфектантов, используемых в рыбоводстве.

План проведения занятия:

Ознакомиться с нормативными документами и примерным планом проведения ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий для рыбоводных хозяйств

2. Составить план ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий для определенного типа рыбоводного хозяйства (прудовое, индустриальное, садковое, УЗВ и т. д.).

3. Рассчитать потребность в препаратах для проведения профилактической обработки инкубируемой икры.

4. Рассчитать потребность в дезинфектантах для проведения профилактических мероприятий в рыбоводном хозяйстве, исходя из п. 2 настоящего задания

Оборудование и материалы: нормативные документы – Ветеринарное законодательство, Сборники по борьбе с болезнями рыб (1998; 1999,) примерный план профилактических мероприятий в рыбоводных хозяйствах, обучающая компьютерная программа по ихтиопатологии.

Теоретическая часть

Профилактика или предохранение – это комплекс мероприятий, направленных на предупреждение возникновения заболеваний и сохранение здоровья рыб. Она является основным путем решения проблемы борьбы со многими опасными инфекциями и инвазиями. В соответствии с Законом РФ «О ветеринарии» от 14.05.1993 № 4979 (www.mcx.ru/navigation/page/show/334.htm) руководители рыбоводных предприятий обязаны своевременно обеспечить проведение мероприятий по профилактике болезней рыб. Делопроизводство по болезням рыб (лаб. работа № 2) предполагает составление и выполнение на рыбоводном хозяйстве годового плана проведения ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий и актов о проведении ветеринарно-санитарных и лечебно-профилактических мероприятий. Работа проводится в тесном контакте с районными ветеринарными специалистами. Одним из гарантов благополучия рыбоводного хозяйства по заразным болезням является регулярное проведение профилактических мероприятий. Они состоят из комплекса рыбоводномелиоративных и ветеринарно-санитарных работ. Рыбоводномелиоративная часть входит в общий технологический процесс и включает такую работу с рыбой, которая повышает ее общую резистентность, способствует повышению устойчивости ее к возбудителям заразных заболеваний и неблагоприятным факторам среды. К ним относятся:

1. Создание оптимальных условий для выращиваемых рыб, включая контроль за качеством воды.

2. Зарыбление качественным посадочным материалом.

3. Соблюдение оптимальной плотности посадки рыб, включая поликультуру, с учетом кормовой базы, условий кормления рыб, гидрохимического режима и эпизоотического состояния хозяйства.

4. Кормление качественными сбалансированными гранулированными кормами.

5. Создание оптимального гидрологического и гидрохимического режима, в том числе удобрение прудов.

6. Селекционно-племенная работа, направленная на выбраковку производителей и их подбор по принципу «лучший к лучшему».

7. Мелиоративные работы, включая устройство и восстановление водоподающей и водосбросной систем, борьбу с зарастаемостью прудов, водоподающих каналов, промораживание и просушивание ложа прудов.

Ветеринарно-санитарные мероприятия, согласно «Рекомендаций по планированию и проведению противозооотических мероприятий» (Сборник борьбы с болезнями рыб, 1998), составляются в виде годового плана, утверждаются директором предприятия и согласовываются с главным ветеринарным инспектором района. В благополучных по заразным болезням рыб хозяйствах в плане имеется только 1 раздел «Общие ветеринарно-санитарные и профилактические мероприятия», а в неблагополучных по какому-либо заболеванию – к этому плану добавляется 2-й раздел «Специальные мероприятия по борьбе с заразными заболеваниями», в который включают конкретные мероприятия по борьбе с имеющимися на хозяйстве заразными болезнями, согласно существующим инструкциям и наставлениям.

Ход работы:

1. Составить план ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий для виртуального рыбоводного хозяйства (по заданию преподавателя).

2. Ознакомиться с дезинфектантами, применяемыми в аквакультуре, и освоить методику расчета их потребности для рыбоводного хозяйства.

3. Используя обучающую компьютерную программу, провести расчет потребности в препаратах для профилактической обработки инкубируемой икры в виртуальном рыбоводном хозяйстве, исходя из п. 1.

Заключение

В ходе проведения лабораторных занятий студенты знакомятся с основами общей патологии, паразитологии, эпизоотологии. Изучают вирусные, бактериальные, инвазионные болезни, а также микозы, микотоксикозы и малоизученные заболевания, незаразные болезни рыб. Осваивают методы профилактики и терапии болезней рыб. Рассматривают рыб, как переносчиков возбудителей болезней человека и животных.

Список рекомендуемой литературы

1. Авдеева, Е. В., Буторина, Т. Е. Болезни морских рыб: учебное пособие / А. В., Авдеева, Т. Е. Буторина. – Нижний Новгород: Вектор Тис, 2011. – 112 с.
2. Бубинец, О. В. Методы культивирования, индикации и идентификации вирусов: учебно-методическое пособие / О. В. Бубинец. – Благовещенск, 2010. – 34 с.
3. Быховская-Павловская, И. Е. Паразиты рыб. Руководство по изучению / И. Е. Быховская-Павловская. – Ленинград: Наука, 1985. – 118 с.
4. Ветеринарное законодательство. Т. 1–4. – Москва: Агропромиздат, 1995. <http://www.mcx.ru/navigation/>
5. Воронин, В. Н., Кузнецова, Е. Н. и др. Практическое руководство. Болезни рыб в аквакультуре России / В. Н. Воронин, Е. Н. Кузнецова, Ю. А. Стрелков, Н. Б. Чернышева. – Санкт-Петербург, 2011. – 264 с.
6. Гаевская, А. В., Ковалева, А. А. Справочник основных болезней и паразитов промысловых рыб Атлантического океана / А. В. Гаевская, А. А. Ковалева. – Калининград: Кн. изд-во Атлант-НИРО, 1991. – 208 с.
7. Головина, Н. А. Охрана здоровья рыб при искусственном воспроизводстве : учебное пособие / Н. А. Головина. – Москва: Экономинформ, 2012. – 100 с.
8. Грищенко, Л. И. и др. Болезни рыб и основы рыбоводства / Л. И. Грищенко, М. Ш. Акбаев, Г. В. Васильков. – Москва: Колос, 1999. – 456 с.
9. Закон РФ «О ветеринарии» от 14.05.1993. – № 4979// <http://www.mcx.ru/navigation/page/show/334.htm>
10. Иванова, Н. Т. Атлас клеток крови рыб / Н. Т. Иванова. – Москва: Легкая и пищевая пром., 1983. – 183 с.
11. Изоргина, Е. Е. и др. Атлас клеток крови лососевых рыб материкового побережья северной части Охотского моря, Магадан / Е. Е. Изоргина, И. Л. Изоргин, Л. И. Изоргин; под ред. проф. Н. А. Головиной. – Кордис, 2014. – 127 с. 356
12. Ихтиопатология / Н. А. Головина, Ю. А. Стрелков, В. Н. Воронин, П. П. Головин, Е. Б. Евдокимова, Л. Н. Юхименко / под ред. Н. А. Головиной. – Москва: Колос, 2010. – 512 с.
13. Лабораторный практикум по болезням рыб / под ред. В. А. Мусселиус. – Москва: Легкая и пищевая пром-ть, 1983. – 295 с.
14. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР, т. 1, Паразитические простейшие. – Ленинград: Наука, 1984. – 428 с.
15. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР, т. 2, Паразитические многоклеточные (Первая часть). – Ленинград: Наука, 1985. – 425 с.
16. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР, т. 3, Паразитические многоклеточные (Вторая часть). – Ленинград: Наука, 1987. – 583 с.
17. Рахконен, Р., Веннерстрем, П. и др. Здоровая рыба. Профилактика, диагностика и лечение болезней / Р. Рахконен, П. Веннерстрем, П. Ринтамяки-

Киннунен, Р. Каннел. – Хельсинки: НИИ охотничьего и рыбного хозяйства, 2003. – 164 с.

18. Сборник инструкций по болезням рыб. – Ч. 1. – Москва: Отдел маркетинга МБА-агро, 1998. – 312 с.

19. Сборник инструкций по болезням рыб. – Ч. 2. – Москва: Отдел маркетинга МБА-агро, – 1999. – 234 с.

20. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / под ред. проф. Е. А. Кост. – Москва: Медицина, 1975. – 383 с.

Локальный электронный методический материал

Елена Витальевна Авдеева

Ихтиопатология

Редактор И. В. Голубева

Уч.-изд. л. 4,1. Печ. л. 3,8.

Издательство федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Калининградский государственный технический университет».
236022, Калининград, Советский проспект, 1