

Касянчук В.В. д.вет. н., професор, v.kasyanchuk@med.sumdu.edu.ua
Бергілевич О.М., д.вет. н., професор, o.bergylevych@med.sumdu.edu.ua
Сумський державний університет, м. Суми, Україна

Ротаєнко Ю.М., здобувач
Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна

КОНТРОЛЬ МІКРОБНОЇ КОНТАМІНАЦІЇ КИШЕЧНИКА ПРІСНОВОДНОЇ РИБИ

Анотація. Вивчали сезонні показники мікрофлори умісту кишечника прісноводних риб Київського водосховища. Виявлено, що мікрофлора кишечника риб змінюватися залежно від температури води. Було виявлено мікроорганізми десяти родів. Відмічено, що майже усі види виявлених мікроорганізмів превалювали у теплий період року, коли вода прогрівалася до 22 – 23°C. Такі мікроорганізми родів як *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.* та вид *L.monocytogenes* найчастіше виділялась ніж інші мікроорганізми за температури 6 – 8°C – у 57 % ,48 % та 64% випадках відповідно. Виявлено, що кишечник прісноводних риб містить найбільшу кількість різних видів мікроорганізмів за температури води 22 – 23°C, у меншій мірі серед усіх виявлених мікроорганізмів ми ідентифікували *L.monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* та *Bacillus spp.* Серед анаеробних спорових мікроорганізмів *Clostridium perfringens* більш часто виявляли порівняно до *Bacillus spp.*

Ключові слова: прісноводна риба, мікроорганізми, вміст кишечника, температура води, *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *L.monocytogenes*, *Clostridium perfringens*.

Касянчук В.В. д.вет. н., професор, v.kasyanchuk@med.sumdu.edu.ua
Бергілевич А.Н., д.вет. н., професор, o.bergylevych@med.sumdu.edu.ua
Сумской государственной университет, г. Сумы, Украина

Ротаєнко Ю.М., соискатель
Сумской национальной аграрный университет, г. Сумы, Украина

КОНТРОЛЬ МІКРОБНОЇ КОНТАМІНАЦІЇ КИШЕЧНИКА ПРЕСНОВОДНОЇ РИБИ.

Аннотация. Изучали сезонные показатели микрофлоры содержимого кишечника пресноводных рыб Киевского водохранилища. Выявлено, что микрофлора кишечника рыб изменяется в зависимости от температуры воды. Было выявлено микроорганизмы 10 родов. Отмечено, что почти все виды выявленных микроорганизмов преобладали в теплый период года, когда вода прогревалась до 22 – 23°C. Такие группы микроорганизмов как *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.* и *L.monocytogenes* чаще чем другие микроорганизмы выделялись при температуре 6–8°C – в 57 %, 48 % и 64% случаях соответственно. Выявлено, что кишечник пресноводных рыб содержит

наибольшее количество различных видов микроорганизмов при температуре воды 22 – 23° С, в меньшей степени среди всех выявленных микроорганизмов мы идентифицировали *L.monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus spp.* Среди анаэробных споровых микроорганизмов *Clostridium perfringens* более часто проявляли сравнению с *Bacillus spp.*

Ключевые слова: пресноводная рыба, микроорганизмы, содержимое кишечника, температура воды *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *L.monocytogenes*, *Clostridium perfringens*.

Kasianchuk V. V., v.kasyanchuk@med.sumdu.edu.ua

Berhilevych O. M., o.bergylevych@med.sumdu.edu.ua

Sumy State University, Sumy, Ukraine

Rotaenko U.M.,

Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

CONTROL OF INTESTINAL MICROBIAL CONTAMINATION OF FRESH-WATER FISH

Summary. The aim of the study was to establish the prevalence of microorganisms in the body of freshwater fish Kiev reservoir.

The intestinal of fish (carp) was selected for study. Research was conducted in the spring, summer and autumn periods when water temperature was 6 – 8°C; 22 – 23°C and 14 – 15°C respectively. Samples were collected in sterile plastic bags and stored for research on ice. Samples were examined in the laboratory for 2 hours: 10 g of each sample was transferred to 90 ml of sterile saline solution and were mixed. Nutrient media were plated with dilutions in an amount of 0.1 ml of each sample according to each type of microorganisms. Incubation were performed for intestinal bacteria group at 44.5o C for 24 hours, and for other groups of bacteria incubation was carried out at 37o C for 24 hours. After incubation characteristic colonies were determined. For isolate *Clostridium perfringens* and *Bacillus spp* each sample was moved into sterile saline in a ratio of 1: 8 and heated at 80°C for 15 minutes to kill the vegetative cells. Then, after accumulation in the broth were plated on agar medium.

According to the research, it was found that the intestinal microflora of fish vary depending on water temperature. It was found 10 groups and types of microorganisms in the gut fish. It was noted that almost all types of identified microorganisms prevalent in warmer seasons when water warmed to 22-23 ° C. Of all the microorganisms isolated us the lion's share accounted for *E.coli* and *Enterobacter spp.*In second place on frequency allocation were *Streptococcus faecalis* *Pseudomonas spp.* and *Micrococcus spp.* *Clostridium perfringens* with less frequency *Bacillus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas spp.* were isolated. The smallest number was found *L.monocytogenes*. Among anaerobic spore microorganisms *Clostridium perfringens* found more often compared to *Bacillus spp.* Groups such as *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.* and *L.monocytogenes* and more often than other microorganisms stand out at a temperature of 6 – 8°C – 57%, 48% and 64% of cases, respectively. *E.coli*, *Enterobacter spp.*, *Streptococcus faecalis* by water temperature 22 – 23°C were identified in 100% of cases.

Keywords: *freshwater fish, bacteria, intestinal contents, water temperature, Pseudomonas spp., Aeromonas spp., Bacillus spp., Staphylococcus aureus, L.monocytogenes, Clostridium perfringens.*

Вступ. Риба та рибні продукти вже давно використовується в якості важливого компонента їжі для людей. Сектор виробництва риби в Україні відіграє важливу роль в національній економіці та у рейтингу серед інших провідних виробництв продовольства знаходиться у першій п'ятірці після виробництва м'яса яловичини, свинини, птиці та молока. Виробництво національної риби включає морську рибу, та рибу прісноводну. Причому прісноводна риба займає вагоме місце у загальному об'ємі виробництва риби. Як в Україні, так і в усіх країнах світу риба та рибопродукти є важливим видом харчування людини[1,3,5,8]. Однією з найбільш серйозних труднощів для сталого та ефективного виробництва риби, є негативний вплив мікроорганізмів, які викликають як захворювання риб так і сприяють швидкому її псуванню після вилову. Крім того, серед мікроорганізмів, виявлених у рибі є багато таких, що негативно впливають на продовольчу безпеку рибопродукції. Отже мікробіологічна безпечність риби має важливий вплив на соціально-економічний розвиток, прибутковість і торгівлю рибопродукції[4,7].

За даними дослідників щорічно у світі вибракковується велика кількість риби після вилову через наявність у ній таких мікроорганізмів як: *Vibrio spp.*, *Shigella spp.*, сальмонели, стрептококи, стафілококи, колиформні бактерії, лістерії, клостридії [3,7,8]. У зв'язку з таким широким спектром мікробної контамінації риби, виникають ризики та також випадки харчових захворювань, таких як діарея, сальмонельоз тощо.

Мікрофлора риб може бути поділена на дві групи: мікроорганізми, що природно присутні на рибі та ті, що надходять до її організму із водного середовища. Мікроорганізми водного середовища присутні у ньому як результат антропогенного забруднення або надходять до нього з організму риб та водної флори та фауни [1,3,7,8]. Риба менш стійка в зберіганні порівняно з м'ясом яловичини та свинини. М'ясо риб легко окисляється. М'ясо здорових риб, які вилучені із сприятливого у мікробіологічному аспекті середовища є стерильним. В період засипання риб опір в'язевої тканини знижується, при цьому відбувається автоліз. Навіть в умовах зберігання риби при низькій температурі (0°C) кількість мікроорганізмів починає різко збільшуватись на 1 – 2 добу. Мікроорганізми до м'яса риб проникають з кишечника[1,7,8].

У зв'язку з актуальністю мікробного забрудненням яса риби, в країнах ЄС регламентовано постійне інформування споживачів щодо мікробіологічної безпечності риби та рибопродуктів [9].

В Україні, як і в більшості країн світу, контроль за якістю та безпечністю риби здійснює ветеринарна служба. Закон України «Про рибу, інші водні живі ресурси та харчову продукцію з них» визначає, що державний контроль та нагляд за безпечністю та якістю продуктів лову та харчової продукції з них здійснюються під час їх виробництва, зберігання, транспортування, реалізації, використання, утилізації чи знищення і надання послуг у сфері громадського

харчування спеціально уповноваженими органами виконавчої влади у галузі охорони здоров'я, захисту прав споживачів, стандартизації, метрології та сертифікації, ветеринарної медицини, карантину рослин [2].

Згідно сучасних національних та міжнародних вимог жива риба повинна бути отримана із водного середовища безпосередньо перед реалізацією, або реалізована після її отримання з водного середовища протягом терміну, меншого за термін, після якого закінчується її життєдіяльність. Оскільки, основним чинником псування живої риби є мікроорганізми, основними вимогами до її безпечності є мікробіологічні. У «Медико -біологічних вимогах до безпечності продовольчої сировини та харчових продуктах » визначені наступні мікробіологічні показники до риби сирця та риби живої: КМАФАнМ, КУО/г, не більше 5×10^4 БГКП (колі-форми) та *S. aureus* не допускаються у 0,01 г, а патогенні мікроорганізми, у тому числі сальмонели, *L. monocytogenes* – у 25 г.

Мікрофлора свіжо виловленої риби залежить від місця та способу лову, а також від мікробіологічного складу води, у якій вона вирощена. У рибі можуть зустрічатися такі мікроорганізми, які відносяться до родів *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Corinebacterium*, *Vibrio*, *Micrococcus*. Якщо риба виловлена у прибережних зонах, то у ній можуть виявлятися ґрунтові бактерії роду *Bacillus*, а також фекальні мікроорганізми [1,3].

Таким чином, враховуючи важливість прісноводної риби для харчування людини, важливо забезпечувати її мікробіологічну безпечність та якість. Тому, необхідно досліджувати особливості мікробіологічної контамінації риби, та у тому числі, прісноводної за дії різних чинників для того щоб встановити ефективні методи її ветеринарно-санітарного контролю та профілактики для забезпечення мікробіологічної безпечності.

Метою дослідження було встановлення поширеності мікроорганізмів у організмі прісноводних риб Київського водосховища.

Матеріал і методи. Для дослідження відбирали кишечника риб (коропів), дослідження проводили у весняний, літній та осінній періоди. Проводили посіви на поживні середовища: МПА (для визначення КМАФАнМ), на жовтково-сольовий агар (для виявлення патогенних стафілококів з наступним підтвердженням у реакції плазмо коагуляції). Представників родів *Escherichia spp*, *Enterobacter spp*, *Pseudomonas spp* визначали на комерційних середовищах відповідно до кожного виду мікроорганізмів. Дослідження проводили у три етапи: весною, літом та восени. Відібрані проби відбирали в стерильні поліетиленові пакети та зберігалися до дослідження на льодоагентах. Проби досліджували в лабораторії протягом 2-х годин. 10 г кожної проби переносили в 90 мл стерильного фізрозчину і гомогенізували. Висівали на поживні середовища десятикратні розведення у кількості 0,1 мл з кожної проби. Інкубування посівів проводили для бактерій кишкової групи при 44,5° С на протязі 24 годин, а для інших груп бактерій інкубування проводили при 37° С протягом 24 годин. Після інкубації протягом 24 годин, визначали характерні колонії

Для виділення *Clostridium perfringens* та *Bacillus spp* кожену пробу

перемішували стерильному фізіологічному розчині у співвідношенні 1:8 і нагрівали при 80°C протягом 15 хв, щоб убити вегетативні форми цих бактерій. Потім 1 см³ суспензії поміщали в 9 см³ накопичувального бульйону та інкубували при 37° С протягом 6 год. Після цього робили 10-кратні розведення та 0,1 см³ суспензії висівали на агарові середовища для *Clostridium perfringens* та *Bacillus spp.* та інкубували при 37° С в анаеробних умовах протягом 48 год.

Для виділення *L.monocytogenes*, 0,1 мл суспензії з 10⁴-10⁵ розведень висівали на спеціальне середовище для лістерій (PALCAM) та інкубували при 37°C протягом 48 год. Колонії оливково-зеленого кольору вважали віднесеними характерними щодо *L.monocytogenes*.

Результати дослідження. Ми вивчали сезонні показники мікробного умісту кишечника прісноводних риб Київського водосховища. При цьому було виявлено, що мікрофлора кишечника риб змінюватися залежно від температури води, що це може бути пов'язано терморезистентністю мікроорганізмів, а також з бактеріальним навантаженням фекального походження води з навколишнього середовища. Було виявлено представників 10 родів мікроорганізмів у кишечнику риб. Відмічено, що майже усі види виявлених мікроорганізмів превалювали у теплий період року, коли вода прогрівалася до 22 – 23°C. Виняток був по відношенню до *L.monocytogenes*, яка за температури води 6 – 8°C виявлялась частіше ніж коли вода мала температуру 22 – 23°C. Результати досліджень наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

**Результати досліджень умісту кишечника прісноводних риб,
n – 45 (15 кожного етапу досліджень)**

Вид мікроорганізму	Кількість виявлених штамів	Етапи досліджень		
		Березень - квітень	Червень- липень	Жовтень
		середня температура води водосховища		
		6 – 8°C	22 – 23°C	14 – 15°C
<i>Bacillus spp</i>	19	5	6	8
<i>Clostridium perfringens</i>	46	7	29	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	3	7	4
<i>Pseudomonas spp</i>	79	45	15	19
<i>Aeromonas spp.</i>	23	11	5	7
<i>E.coli</i>	113	33	45	35
<i>Enterobacter spp.</i>	106	29	45	32
<i>Streptococcus faecalis</i>	72	12	45	15
<i>Micrococcus spp</i>	65	5	45	15
<i>L.monocytogenes</i>	11	7	1	3

Дані таблиці 1 також вказують на те, що серед усіх виділених нами мікроорганізмів лівова частка припадала на *E.coli* *Enterobacter spp.* Це саме ті мікроорганізми, що є коменсалами вмістимого кишечника риб. На другому

місці по частоті виділення були *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas spp.*, *Micrococcus spp.*, *Clostridium perfringens*. З меншою частотою ми виділяли *Bacillus spp.*, *Aeromonas spp.*, *Staphylococcus aureus*, та *L.monocytogenes*.

Висновки.

1. Встановлено 10 видів та груп мікроорганізмів у вмістимому кишечника прісноводних риб Київського водосховища, частота виділення яких залежить від температури води. В усі досліджувані пори року найчастіше було виділено *E.coli*, *Enterobacter spp.*

2. Такі групи мікроорганізмів як *Pseudomonas spp.* та *Aeromonas spp.* та *L.monocytogenes* частіше ніж інші мікроорганізми виділялась за температури 6–8°C – у 57 % ,48 % та 64% випадках відповідно. *E.coli*, *Enterobacter spp.*, *Streptococcus faecalis* за температури води 22 – 23°C були виділені у 100% випадків.

3. Виявлено, що кишечник прісноводних риб містить найбільшу кількість різних видів мікроорганізмів за температури води 22 – 23°C, у меншій мірі серед усіх виявлених мікроорганізмів ми ідентифікували *L.monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* та *Bacillus spp.* Серед анаеробних спорових мікроорганізмів *Clostridium perfringens* більш часто виявляли порівняно до *Bacillus spp.*

Література

1.Борисочкина Л.И. Санитария и гигиена современного производства рыбной продукции / Л.И. Борисочкина //ВНИЭРХ. – Сер. «Обработка рыбы и морепродуктов». – вып.1(1). –Москва, 2000. –С.44.

2.Закон України «Про рибу, інші водні живі ресурси та харчову продукцію з них» із змінами і доповненнями, внесеними Законами України від 6 липня 2010 року – Київ, 2000. –32с.

3. Касянчук В.В., Ротаєнко Ю.М. Ветеринарно-санітарна оцінка стану водного середовища для вирощування прісноводної риби / В.В.Касянчук, Ю.М. Ротаєнко //Вісник СНАУ серія «Ветеринарна медицина». – Вип. 1(36). – Суми, 2015. – С.77 – 83.

4. Akinwale M.M.A. Bacterial microflora of African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles raised under fish cumpig intergrated farming system in fresh water earthen ponds during the dry season / M.M.A.Akinwale, R.I .Keke, C. Egenonu // Nig. J. Fisheries, 2007. – V.4 (2). – P. 91 – 104.

5. Barua P. Fishing industry and fisherfolk existence through microcredit services for India and Bangladesh / P.Barua, S.Chakraborty, J. Das and S. Sen //Bangladesh Research Publications Journal, 2012. – V.7(1). – P. 36 – 45.

6. Kawarazuka, N. The contribution of fish intake, agriculture, and small scale fisheries to improve nutrition: aliterature review / N.Kawarazuka // Report paper of World Fish Center. Penang, Malaysia, 2010– P. 16.

7. Oni T.A. Preliminary studies on associated bacterial and fungal load of artificially cultured *Clarias gariepinus* Burchell 1822 fingerlings / T.A. Oni, V.E. Olaley, B.O. Omafuvbe // Ife J. Sci., 2013– V. 15 (1). – P. 9 – 16.

8.Walker P.J. Disease Emergence and Food Security: Global Impact of Pathogens on Sustainable Aquaculture Production / P.J. Walker // In A.G.Brown edition: Fish, Aquaculture and Food security, Sustaining Fish as a Food Supply, 2004– P. 45 – 51.

9.Регламент Комиссии (ЕС) 2065/2001 (ОЖ L278, стр.6, 23/10/2001) от 22 октября 2001 г. устанавливает правила по применению Регламента Совета (ЕС) 104/2000 в отношении информирования потребителей о рыбных продуктах и продуктах аквакультуры, 2001. – P. 35.