

ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ

УДК 639.3.091:615.32

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ АЭРОМОНОЗОВ И ПСЕВДОМОНОЗОВ РЫБ

*С.М. Дегтярик, Е.И. Гребнева, Г.В. Слободницкая, Н.А. Бенецкая,
Е.В. Максимьюк, А.В. Беспалый*

*РУП «Институт рыбного хозяйства»,
220024, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Стебенева, 22,
e-mail: belniirh@tut.by*

THE INFLUENCE OF PLANT EXTRACTS ON THE ORIGINATORS AEROMONOSSES AND PSEUDOMONOSSES OF FISHES

*S.M. Degtjarik, E.I. Grebneva, H.V. Slobodnitskaja, N.A. Benetskaja,
E.V. Maksimyyuk, A.V. Biaspaly*

*RUE "Fish industry institute",
220024, Stebeneva str., 22, Minsk, Republic of Belarus,
e-mail: belniirh@tut.by*

Резюме. Приведены экспериментальные данные о влиянии экстрактов ряда высших растений на жизнеспособность возбудителей бактериальных болезней рыб (бактерий pp. *Aeromonas* и *Pseudomonas*), изученном *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: аэромонады, псевдомонады, бактериальные инфекции рыб, фитопрепараты, фитонциды.

Abstract. There is available the experimental data on the impact produced by the extracts of some higher plants on livability of the excitants of fish bacterial diseases (bacteria pp. *Aeromonas* and *Pseudomonas*), studied *in vitro* and *in vivo*.

Key words: Aeromonads, pseudomonads, fish bacterial infections, plant-based preparations.

Введение. Одной из проблем современного рыбоводства, базирующегося на интенсификации производства и расширении ассортимента выращиваемых рыб, является постоянная угроза возникновения бактериальных инфекций.

В рыбоводных организациях Беларуси достаточно широкое распространение получили возбудители аэромоноза, одного из наиболее опасных бактериальных заболеваний рыб. Аэромоноз причиняет рыбоводной отрасли значительный экономический ущерб, связанный со снижением у пораженной рыбы темпа роста, упитанности, плодовитости, ухудшением

товарных качеств, гибелью рыбы. При остром течении инфекционного процесса может погибнуть около 70%, а в отдельных случаях – до 100 % заболевшей (фактически содержащейся в пруду, бассейне, хозяйстве) рыбы. Довольно часто встречаются, либо в виде самостоятельных заболеваний, либо (что еще более опасно) в виде бактериальной ассоциации, возбудители псевдомонозов, вибриоза, иерсиниоза и др.

Основная сложность разработки мер борьбы против таких полиэтиологических заболеваний состоит в различной чувствительности изолятов к антибактериальным препаратам. Губительно действуя на одного возбудителя, используемый препарат способствует размножению другого и приводит к новой вспышке заболевания, но уже с другим этиологическим агентом. Особенно это актуально для таких ассоциаций, как псевдомонады – аэромонады – энтеробактерии и вибрионы – аэромонады – псевдомонады. Традиционные способы профилактики и лечения бактериальных инфекций, направленные на длительное применение лечебных кормов с антибиотиками, приводят к изменению микробиоценоза рыбы и водоема и накоплению в водоемах резистентных форм патогенных микроорганизмов. Это влечет за собой снижение эффективности антибиотикотерапии.

В настоящее время в странах, занимающихся интенсивным рыбоводством, актуальной задачей науки становится разработка биопрепаратов для лечения и профилактики бактериальных инфекций. Их применение позволяет повысить качество товарной рыбы и исключить формирование антибиотико-резистентных штаммов, патогенных как для выращиваемой рыбы, так и для человека. В этой связи открывается перспектива использования в ихтиопатологической практике препаратов из растительного сырья, которые в большинстве своем не токсичны, редко вызывают побочные явления, обладают антибактериальным действием в отношении широкого спектра возбудителей бактериальных болезней человека и животных [1-3].

Материалы и методы исследований. Материалом для исследований служило сухое измельченное растительное сырье, изготовленное из различных частей (корни, стебли, листья, цветки, плоды, кора) растений.

На первом этапе проведен анализ литературных данных, результатом которого стал список из 62 наименований растений, которые должны отвечать двум критериям: обладать выраженными антимикробными свойствами и произрастать на территории Республики Беларусь. На следующем этапе указанный список был существенно сокращен путем удаления из него растений, действие которых распространяется только на грамположительные бактерии (например, дуб черешчатый, липа, клевер луговой, горцы и др.), поскольку объект исследований – бактерии рр. *Aeromonas* и *Pseudomonas* – являются грамотрицательными. Далее из списка были удалены растения, которые не могут в дальнейшем служить сырьем для массовых заготовок и изготовления фитопрепарата в силу своей малочисленности или запрета на их заготовку (черемша, кубышка желтая и др.), а также растения, токсичные для рыб даже в сверхмалых дозах (аир обыкновенный).

Остался перечень, включающий 32 вида растений, представителей 21 семейства. Спиртовые настойки этих растений были испытаны в лабораторных условиях на наличие антагонистической активности к возбудителям *in vitro*.

Для определения оптимального способа экстракции активных веществ из каждого вида растений готовили три жидкие лекарственные формы: настои, настойки и отвары [4].

Объектом исследований служили:

– бактерии р. *Aeromonas* (9 штаммов) и *Pseudomonas* (4 штамма) из коллекции лаборатории болезней рыб;

– годовики карпа (720 экз.) – для постановки биопробы и усиления вирулентности бактериальных штаммов, а также для изучения зависимости антагонистической активности растительных экстрактов по отношению к аэромонадам от концентрации;

– сеголетки карпа (240 экз.) – для изучения влияния фитонцидов растений на вирулентность бактерий р. *Aeromonas in vivo*.

Наиболее патогенные для рыб штаммы аэромонад и псевдомонад из имеющихся в лаборатории болезней рыб 13 штаммов отобраны методом постановки биопробы. Отобранные штаммы (№ 64 – *Aeromonas hydrophila, gr.1* и №3 – *Pseudomonas aeruginosa*) послужили в дальнейшем тест-объектами при постановке опытов. Бактериологические исследования проводили согласно существующим методикам [5-9]. Идентификацию бактерий производили при помощи тест-системы Api 20 E.

Результаты и их обсуждение. С целью подбора бактериальных штаммов для дальнейших исследований было проведено определение патогенности аэромонад и псевдомонад из коллекции лаборатории, для чего была поставлена биопроба на годовиках карпа. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Патогенность для рыб бактериальных штаммов

Вид микроорганизма, № штамма	Гибель рыбы, %			
	1 сутки	3 сутки	8 сутки	30 сутки
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 3	–	100	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 4	–	66	–	–
<i>Aeromonas salmonicida</i> , 34	–	–	–	–
<i>Aeromonas hydrophila, gr.1</i> , 43	–	–	–	–
<i>Aeromonas hydrophila, gr.1</i> , 53	–	–	–	–
<i>Aeromonas hydrophila, gr.2</i> , 55	–	–	–	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 58	–	–	–	–
<i>Aeromonas hydrophila, gr.1</i> , 61	–	–	–	–
<i>Aeromonas hydrophila, gr.1</i> , 63	–	–	–	30
<i>Aeromonas hydrophila, gr.1</i> , 64	–	–	66	–
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , 67	–	–	–	–
<i>Aeromonas hydrophila, gr.1</i> , 68	–	–	–	–
<i>Aeromonas hydrophila</i> , 69	–	–	–	–

Таким образом, наибольшей вирулентностью отличались 3 штамма бактерий: №№ 3, 4, идентифицированные как *Ps. aeruginosa*, и №64, идентифицированный как *A. hydrophyla*, gr.1. Псевдомонады вызывали гибель рыбы через трое суток, LD (100% - штамм №3 и 66% - штамм №4) составила $0,2 \times 10^9$ кл./мл или 2×10^8 кл./мл. Через 8 суток с начала эксперимента начался отход рыбы, зараженной 64 штаммом аэромонад. Причем, если штаммы № 3 и 4 (*Ps. aeruginosa*) вызывали гибель рыбы бессимптомно, то штамм № 64 *Aeromonas* вызывал 66 % гибель рыбы с характерными для аэромонадоза признаками: экзофтальмия, наличие экссудата в брюшной полости, ерошение чешуи. Для усиления вирулентности указанный штамм прошел 1 пассаж через организм рыбы.

Больную рыбу подвергли патологоанатомическому анализу, сопровождающемуся бактериологическими посевами, в результате которых были реизолированы исходные культуры.

Определенной патогенностью обладали также штаммы аэромонад под №№ 63 (*A. hydrophyla*, gr.1), и 55 (*A. hydrophyla*, gr.2). Каждый из них вызывал гибель 30 % подопытных рыб в течение месяца.

В аквариумах, где содержалась рыба, зараженная другими бактериальными штаммами, также как и в контрольных аквариумах, где рыба заражению не подвергалась, гибели или признаков инфекционных заболеваний отмечено не было в течение всего времени наблюдения.

Проведена первичная проверка наличия антагонистической активности у 32 видов растений к возбудителям болезней рыб. В качестве тест-объекта выбраны бактерии р. *Aeromonas*, штамм № 64; проверку проводили диско-диффузионным методом (методом диффузии в агар). В результате экспериментов для дальнейших исследований было отобрано 14 видов растений, обладающих бактерицидными и бактериостатическими свойствами (табл. 2).

Таблица 2. – Антагонистическая активность растений в отношении бактерий р. *Aeromonas*

№ п/п	Виды растений, используемые для приготовления настоек	Зоны задержки роста бактерий р. <i>Aeromonas</i> , мм
1	Сфагнум болотный (<i>Sphagnum palustre L.</i>)	19-33
2	Береза повислая (<i>Betula pendula Roth.</i>)	12-17
3	Чистотел большой (<i>Chelidonium majus L.</i>)	16-28
4	Зверобой продырявленный (<i>Hypericum perforatum L.</i>)	15-24
5	Полынь горькая (<i>Artemisia absinthium L.</i>)	10-19
6	Пижма обыкновенная (<i>Tanacetum vulgare L.</i>)	15-30
7	Багульник болотный (<i>Ledum palustre L.</i>)	17-22
8	Сосна обыкновенная (<i>Pinus sylvestris L.</i>)	21-24
9	Лук обыкновенный (<i>Allium cepa L.</i>)	22-30
10	Чеснок обыкновенный (<i>Allium cepa L.</i>)	19-25
11	Барбарис обыкновенный (<i>Berberis vulgaris L.</i>)	24-25
12	Смородина черная (<i>Ribens nigrum L.</i>)	12-17
13	Календула или ноготки лекарственные (<i>Calendula officinalis L.</i>)	15-23
14	Осина (<i>Populus tremula L.</i>)	8-10

Как видно из таблицы 2, наиболее сильными бактерицидными и бактериостатическими свойствами обладали сфагнум болотный (зоны задержки роста бактерий составили 19-33 мм), лук обыкновенный (22-30 мм), пижма обыкновенная (15-30 мм), чистотел большой (16-28 мм), барбарис обыкновенный (24-25 мм), чеснок обыкновенный (19-25 мм).

Для изучения оптимального способа экстракции активных веществ из различных видов растений в качестве тест-объекта использовали *A. hydrophyla*, штамм № 64, зарекомендовавший себя наиболее патогенным. Из каждого вида сухого сырья были изготовлены три жидкие лекарственные формы: настой,

настойка и отвар. Изучение их влияния на бактерии проводилось диско-диффузионным методом (табл. 3).

Таблица 3. – Влияние растительных экстрактов на агаровую культуру аэромонад

№ п/п	Виды растений, используемые для приготовления лекарственных форм	Зоны задержки роста бактерий р. <i>Aeromonas</i> , мм		
		настойка	настой	отвар
1	Сфагнум болотный (<i>Sphagnum palustre</i> L.)	17-32	16-30	17-30
2	Береза повислая (<i>Betula pendula</i> Roth.)	15 - 16	8-10	10-12
3	Чистотел большой (<i>Chelidonium majus</i> L.)	14 - 26	–	8-9
4	Зверобой продырявленный (<i>Hypericum perforatum</i> L.)	16-23	–	12-17
5	Полынь горькая (<i>Artemisia absinthium</i> L.)	12-20	–	–
6	Пижма обыкновенная (<i>Tanacetum vulgare</i> L.)	16-28	–	12-16
7	Багульник болотный (<i>Ledum palustre</i> L.)	14-25	11-12	14-20
8	Сосна обыкновенная (<i>Pinus sylvestris</i> L.)	22-26	–	8-9
9	Лук обыкновенный (<i>Allium cepa</i> L.)	22-31	–	–
10	Чеснок обыкновенный (<i>Allium sativum</i> L.)	17-22	–	–
11	Барбарис обыкновенный (<i>Berberis vulgaris</i> L.)	20-25	18-24	18-25
12	Смородина черная (<i>Ribens nigrum</i> L.)	13-18	–	–
13	Календула или ноготки лекарственные (<i>Calendula officinalis</i> L.)	13-25	12-16	13-23
14	Осина (<i>Populus tremula</i> L.)	10-11	–	–

Как видно из таблицы 3, для различных видов растений эффективны различные способы экстракции активных веществ, однако общая тенденция такова: спиртовые настойки позволяют извлечь больше фитонцидов, чем водные, отвары – больше, чем настои. Водные экстракты таких растений, как полынь горькая, лук обыкновенный, чеснок обыкновенный, смородина черная (листья) и осина (кора) не оказывали ингибирующего действия на аэромонады. Пижма обыкновенная и чистотел большой оказывали слабое воздействие на бактериальную культуру в форме отваров, в то время как настои

бактерицидного действия не оказывали. Практически не отличалось действие спиртовых и водных экстрактов сфагнома болотного, барбариса обыкновенного и календулы.

Наиболее сильными бактерицидными и бактериостатическими свойствами из исследованных растений обладали сфагнум болотный, лук обыкновенный (в виде спиртовой настойки), пижма обыкновенная (в виде спиртовой настойки и отвара), чистотел большой (спиртовая настойка), барбарис обыкновенный, чеснок обыкновенный (в виде спиртовой настойки).

В контроле (наложенные на агаровую бактериальную культуру диски, пропитанные спиртом либо водой без фитосырья) задержки роста микроорганизмов не наблюдалось, что позволяет исключить влияние экстрагента на рост тест-микробов.

Влияние растительных экстрактов на жизнеспособность аэромонад и псевдомонад изучали следующими методами: диско-диффузионный метод; метод совместного инкубирования тест-микробов с растительными экстрактами в жидкой питательной среде с последующим высевом на твердую питательную среду; метод серийных разведений в жидкой питательной среде. При проведении исследований из травы сфагнома и цветков пижмы готовили спиртовые настойки, из плодов барбариса – отвар.

Таблица 4. – Влияние растительных экстрактов на бактерии р. *Aeromonas* и *Pseudomonas* (диско-диффузионный метод)

Растительное сырье	Диаметр зон задержки роста бактерий, мм			
	<i>A. hydrophyla</i> , gr.1, шт. № 64		<i>Ps. aeruginosa</i> , шт. №3	
	lim	среднее	lim	среднее
Трава сфагнома болотного (настойка)	26-33	29,7	16-19	17,6
Трава пижмы обыкновенной (настойка)	17-25	21,3	---	---
Плоды барбариса обыкновенного (отвар)	20-24	22,0	12-13	12,3
Контроль	0	0	0	0

Данные, представленные в таблице 4, свидетельствуют, что псевдомонады менее чувствительны к воздействию экстрагированных из растений фитонцидов: если чувствительность *A. hydrophyla* можно охарактеризовать, как высокую (сфагнум, барбарис) или среднюю (пижма), то чувствительность псевдомонад – как низкую (сфагнум, барбарис) или она вообще отсутствует (пижма). В целом тенденция такова: наиболее сильным влиянием на условно-патогенные для рыб бактерии обладает настойка сфагнума болотного (зоны задержки роста в среднем составили для аэромонад 29,7 мм, для псевдомонад – 17,6 мм), средним действием обладали плоды барбариса (22,0 мм – аэромонады и 12,3 – псевдомонады), наиболее слабо выраженным – трава пижмы.

С целью изучения влияния времени воздействия растительных экстрактов на жизнеспособность возбудителей бактериальных болезней рыб проведено их совместное инкубирование в жидкой питательной среде, табл. 5.

Таблица 5. – Влияние времени воздействия растительных экстрактов на жизнеспособность бактерий р. *Aeromonas Pseudomonas* (совместное инкубирование в жидкой питательной среде)

Растительное сырье	Время инкубации, мин.							
	30		60		120		180	
	Aer	Ps	Aer	Ps	Aer	Ps	Aer	Ps
Трава сфагнума болотного (настойка)	++	–	+++	+	+++	++	+++	++
Трава пижмы обыкновенной (настойка)	+	–	+	–	++	+	+++	+
Плоды барбариса обыкновенного (отвар)	+	–	++	+	+++	+	+++	++
Контроль	–	–	–	–	–	–	–	–

– сплошной рост тест-микроба

+ незначительное угнетение роста (различимы отдельные колонии)

++ значительное угнетение роста (немногочисленные обособленные колонии)

+++ отсутствие роста

На секторах чашек, засеянных содержимым контрольных пробирок (бактериальная культура без растительного экстракта), наблюдался сплошной рост бактерий, а на секторах, засеянных из пробирок с питательной средой, содержащей бактерии и растительные экстракты, наблюдались отдельные

колонии либо полное их отсутствие в зависимости от вида растения и длительности инкубации. После получасового совместного инкубирования тест-микроорганизмов с растительными экстрактами аэромонады в значительной степени были подавлены сфагнумом, в незначительной – пижмой и барбарисом; рост псевдомонад во всех вариантах наблюдался наравне с контролем, т.е. в виде сплошного покрова. При часовом инкубировании наблюдалось незначительное угнетение роста псевдомонад настойкой сфагнума и отваром барбариса, аэромонад – всеми тремя растениями (по нисходящей: сфагнум, барбарис, пижма). По мере увеличения продолжительности совместного культивирования возрастало влияние растительных экстрактов на условно-патогенные бактерии. По прошествии 3 часов барбарис и сфагнум подавляли рост псевдомонад в значительной степени, пижма – в незначительной; что касается аэромонад, то во всех трех вариантах роста колоний после посева на твердые среды не наблюдалось.

Влияние концентрации экстрактов растений на рост бактерий рр. *Aeromonas* и *Pseudomonas* изучали также с помощью метода серийных разведений в жидкой питательной среде (табл. 6).

Подавление экстрактами растений бактериальной культуры (как аэромонад, так и псевдомонад) уменьшается пропорционально уменьшению их концентрации. При концентрации экстракта 20% происходит угнетение роста бактерий в той или иной степени во всех вариантах: сильное (сфагнум и барбарис - аэромонады), значительное (пижма - аэромонады, сфагнум и барбарис - псевдомонады) и незначительное (пижма - псевдомонады). При концентрации 1,25% незначительное угнетение роста бактерий наблюдается только в одном случае (сфагнум - аэромонады).

Данные экспериментов по изучению влияния растительных экстрактов на жизнеспособность аэромонад и псевдомонад, представленные в таблицах 3-6, однозначно свидетельствуют о более низкой чувствительности бактерий р. *Pseudomonas* к фитонцидам.

Таблица 6. – Влияние концентрации растительных экстрактов на возбудителей инфекционных болезней рыб (серийные разведения в жидкой питательной среде)

Растительное сырье	Концентрация экстракта, %					Контроль	
	20	10	5	2,5	1,25		
<i>Aeromonas hydrophyla, gr.1</i> , штамм № 64							
Трава сфагнома болотного (настойка)	+++	+++	+++	++	+	-	0
Трава пижмы (настойка)	++	++	+	-	-	-	0
Плоды барбариса (отвар)	+++	+++	++	+	-	-	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , штамм № 3							
Трава сфагнома болотного (настойка)	++	++	+	-	-	-	0
Трава пижмы (настойка)	+	+	-	-	-	-	0
Плоды барбариса (отвар)	++	+	-	-	-	-	0

- угнетение роста тест-культуры не наблюдается;

+ незначительное угнетение роста (сильное помутнение бульона);

++ значительное угнетение роста (слабое помутнение бульона);

+++ отсутствие роста в результате взаимодействия с растительным экстрактом (полностью прозрачный бульон);

0 отсутствие роста в контроле с чистой средой

В ходе эксперимента изучено влияние фитонцидов растений на аэромонады *in vivo*, т.е. на вирулентность аэромонад, введенных в организм рыб, а также влияние концентрации растительных экстрактов на подавление активности аэромонад, развивающихся в организме рыбы. Отмечено, что даже при однократном введении растительных настоек признаки инфекционного заболевания развивались медленней, чем в контроле, гибель рыб отмечена в 10-30 % случаев. У рыб, которые не погибли в начале эксперимента, признаки заболевания исчезали в течение 7-11 суток. В то же время 3-х и 5- кратное введение в организм зараженной рыбы экстрактов растений, показавших ярко выраженные фитонцидные свойства в серии предыдущих опытов *in vitro*, подавляет развитие инфекционного процесса. Антагонистическая активность растительных экстрактов по отношению к аэромонадам, развивающимся в организме карпа, уменьшается пропорционально уменьшению их концентрации. При введении рыбе экстрактов 20%-ой и 10%-ой концентрации отмечалось либо полное исчезновение клинических признаков аэромонадоза, поведение подопытной рыбы нормализовалось (сфагнум), либо выраженность

признаков резко ослабевала (пижма, барбарис). В более низких концентрациях (5-1,25%) настой пижмы не оказывал заметного воздействия на состояние подопытной рыбы и, следовательно, на бактерии р. *Aeromonas*. При введении рыбе отвара плодов барбариса в концентрации 5% наблюдалось некоторое снижение выраженности клинических признаков аэромоноза, однако рыба была вялая, корм не брала. В более низких концентрациях (2,5 – 1,25%) отвар плодов барбариса не оказывал заметного воздействия на состояние подопытной рыбы. Наиболее ярко выраженным антибактериальным действием обладал настой сфагнома: при его введении в концентрациях 5 и 2,5% отмечена слабая выраженность клинических признаков, рыба хоть и неохотно, но брала корм.

Заключение.

Наиболее выраженными бактерицидными и бактериостатическими свойствами по отношению к возбудителям бактериальных инфекций рыб обладают сфагнум болотный (зоны задержки роста бактериальной культуры составили 19-33 мм), лук обыкновенный (22-30 мм), пижма обыкновенная (15-30 мм), чистотел большой (16-28 мм), барбарис обыкновенный (24-25 мм), чеснок обыкновенный (19-25 мм).

Для различных видов растений эффективны различные способы экстракции активных веществ, однако общая тенденция такова: спиртовые настойки позволяют извлечь больше фитонцидов, чем водные, отвары – больше, чем настои. Степень влияния экстрактов растений на тест-микробы зависит от времени взаимодействия и концентрации экстракта.

Псевдомонады менее чувствительны к воздействию экстрагированных из растений фитонцидов, чем аэромонады.

Растительные экстракты влияют на вирулентность бактерий р. *Aeromonas*, введенных в организм рыб. При однократном введении per os рыбам, зараженным бактериями р. *Aeromonas*, растительных настоек признаки инфекционного заболевания развивались у рыб медленней, чем в контроле, гибель составила 10-30 %. При трехкратном введении указанные признаки либо не развивались, либо были слабо выражены, гибели рыбы при этом не

наблюдалось. При пятикратном введении клинические признаки инфекции исчезли спустя 2-6 суток, гибели рыбы отмечено не было.

Список использованных источников.

1. Токин, Б.П. Целебные яды растений: Повесть о фитонцидах.-Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1980. – С. 42-57.

2. Токин, Б.П. Фитонциды как экологическая и эволюционная проблема // Материалы VIII совещ. по проблеме фитонцидов: Тез. докл., Киев, 16-18 окт. 1979 г. - Киев: Наукова думка, 1979. – С. 3-5.

3. Айзенман, Б.Е. Антибиотики из высших растений // Фитонциды, их биологическая роль и значение для медицины и народного хозяйства. – Киев: Наукова думка, 1967. – С. 23–28

4. Гесь, Д.К. Лекарственные растения и их применение / Д.К. Гесь, Н.В. Горбач, Г.Н. Кадаев.– Мн.: Наука и техника, 1974. – 592 с.

5. Мусселиус, В.А. Лабораторный практикум по болезням рыб / В.А. Мусселиус, В.Ф. Ванятинский, А.А. Вихман и др.; под ред. В.А. Мусселиус. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. – С.124-125.

6. Методические указания по определению чувствительности к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных (Утв. Главным управлением ветеринарии Минсельхозпрода СССР 30 октября 1971 г) // Лабораторные исследования в ветеринарии. Бактериальные инфекции: Справочник / Сост. Б.И. Антонов, В.В. Борисова, П.М. Волкова и др.; под ред. Б.И. Антонова. – М.: Агропромиздат, 1986. – с. 270-278.

7. Юхименко, Л.Н. Временные рекомендации по выделению и идентификации аэромонад / Л.Н. Юхименко, В.Ф. Викторова, И. Фаркаш. – М.: ВНИИПРХ, 1987. – 14 с.

8. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive document // Clin Microbiol Infect.- 1998. – V.4. – P.291-296.

9. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement M100-S9. – 1999. – V.19. – N.1.