

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ
ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-КОНТРОЛЬНИЙ ІНСТИТУТ
БІОТЕХНОЛОГІЇ І ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ**

ГРИНЕВИЧ НАТАЛІЯ ЄВГЕНІЇВНА

УДК 619:614.31:639.331.5:628.1

**ОБҐРУНТУВАННЯ СИСТЕМИ САНІТАРНО-ГІГІЄНІЧНИХ ЗАХОДІВ
ЗА ЗАМКНУТОГО ВОДОПОСТАЧАННЯ В ІНДУСТРІАЛЬНИХ
РИБНИЦЬКИХ ГОСПОДАРСТВАХ**

16.00.06 – гігієна тварин та ветеринарна санітарія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора ветеринарних наук

Суми – 2018

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Білоцерківському національному аграрному університеті
Міністерства освіти і науки України

Науковий консультант: доктор ветеринарних наук, професор

Кухтин Микола Дмитрович

Тернопільський національний технічний
університет імені Івана Пулюя, професор кафедри
харчової біотехнології і хімії

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник

Коваленко Вячеслав Леонідович, Державний науково-
контрольний інститут біотехнології і штамів
мікроорганізмів, завідувач сектору з розробки
нормативно-правової бази з питань біобезпеки

доктор ветеринарних наук, доцент **Тарасенко Людмила
Олексіївна**, Одеський державний аграрний університет,
завідувач кафедри ветеринарної гігієни, санітарії і
експертизи

доктор ветеринарних наук, старший науковий
співробітник **Величко Володимир Олександрович**,
Державний науково-дослідний контрольний інститут
ветеринарних препаратів та кормових добавок
Держпродспоживслужби України, головний науковий
співробітник

Захист відбудеться « 6 » липня 2018 р. о _____ год. на засіданні спеціалізованої
вченої ради Д 55.859.04 при Сумському національному аграрному університеті
та Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів
мікроорганізмів за адресою: 03151, м. Київ., вул. Донецька, 30, 1-ий поверх,
конференц-зал.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеках Сумського національного
аграрного університету за адресою: 40021, м. Суми, вул. Г. Кондратьєва, 160 та
Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів
мікроорганізмів за адресою: 03151, м. Київ., вул. Донецька, 30.

Автореферат розісланий «___» червня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Г.І. Ребенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Останніми роками у світі значного поширення набула індустріальна аквакультура з використанням інтенсивних методів, що передбачають високу щільність посадки риби і великий вихід продукції з одиниці об'єму або площі. Одна із перспективних форм розвитку індустріальної аквакультури – вирощування риби та інших гідробіонтів в установках замкнутого водопостачання (УЗВ). У разі вирощування різних об'єктів в УЗВ можна максимально скоротити використання чистої води, отримати чисту продукцію у максимально короткі терміни (Алимов С.І., 2010, Димань Т.М., 2011, Вдовенко Н.М., 2013, Божик В.Й., 2014, Шарило Ю.Є., 2015).

В Україні через зміну клімату, зменшення опадів, посушливі весну і літо власники рибницьких господарств також змушені до переходу на водоекономні програми вирощування риби (Грициняк І.І., 2010). З огляду на це, якості і безпечності води, яка живить індустріальне господарство, надають надзвичайно великого значення (Назаренко В.І., 2002, Гребенюк Т.В., 2015). За невідповідності води санітарно-гігієнічним нормам у риби виникають різні захворювання, знижуються її прирости, а також безпечність і екологічність продукції. Відтак, питання забезпечення якісною водою УЗВ і водовідведення води з підприємств аквакультури, яка б не впливала негативно на навколишнє природне середовище, є актуальним (Молчанова К.А., 2015). В Україні в умовах УЗВ вирощують в основному осетрових риб, водночас у південних і центральних регіонах країни набуває поширення розведення райдужної форелі (Кольман Р., 2013, Кононенко Р.В., 2013). Досвід вирощування райдужної форелі в УЗВ у вітчизняних господарствах незначний, внаслідок чого виникає низка невирішених проблем, пов'язаних передусім з санітарно-гігієнічними заходами під час запуску і функціонування УЗВ. Основною відмінністю вирощування райдужної форелі в УЗВ порівняно з вирощуванням на відкритій водоймі є обмежена територія, на якій повинні одночасно забезпечуватися сприятливі умови для росту риби і роботи системи очищення води (Гребенюк Т.В., 2015). Важливу роль у цих процесах відіграє механічна фільтрація, під час якої видаляються завислі у воді речовини, та біологічна фільтрація, яка очищає воду від токсичних для риб сполук за рахунок активного корисного мікробіоценозу. Вивчення особливостей використання біофільтрів в УЗВ в аквакультурі доводить, що наповнювачі біофільтрів відіграють одну з ключових ролей для підтримання оптимальних умов роботи цих установок (Аси А.А., 1985, Grudniewska J., 2012, Кухтин М.Д., 2017). Разом з тим досліджень щодо зміни санітарно-показових мікроорганізмів, а також кількості бактерій, що беруть участь у процесах нітрогенного циклу, формування біоплівки, концентрації нітритів у воді реактора біофільтра УЗВ за використання різних наповнювачів обмаль, а окремі повідомлення не висвітлюють зазначеної проблеми в повному обсязі.

Ефективне ведення форелівництва можливе лише за підтримання на належному рівні санітарного стану і регулярного проведення профілактичних

заходів, зокрема дезінфекції (Вовк Н.І., 2002, Борбат М.О., 2008, Коцюмбас І.Я., 2010). Однак у форелевих господарствах за використання УЗВ проведення дезінфекції є проблематичним через можливість нанесення шкоди корисним мікроорганізмам, які населяють біонаповнювач реактора біофільтра. Вивчення впливу способів дезінфекції води за замкнутого водопостачання в індустріальних форелевих господарствах на стан мікробіоценозу наповнювача біофільтра та розроблення методів безпечної санації води є актуальними і практично значущими завданнями. Крім того, важливе значення має оцінювання ефективності роботи біофільтра, особливо під час запуску УЗВ або після проведення лікувально-профілактичних заходів з лікування риби та розроблення швидких способів корекції порушень мікробіоценозу біофільтра. Важливим є також з'ясування впливу субтоксичних доз нітритів під час запуску УЗВ на гематологічні і функціональні показники райдужної форелі. Проведені в такому напрямі дослідження уможливають обґрунтування і розроблення комплексної системи коригувальних дій під час вирощування райдужної форелі в умовах УЗВ. У цьому полягала проблемна ситуація, яка і зумовила вибір теми дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в Білоцерківському національному аграрному університеті на кафедрі іхтіології та зоології за ініціативною тематикою «Обґрунтування та розроблення системи санітарно-гігієнічних заходів в індустріальних форелевих господарствах України за замкнутого водопостачання» (Державний реєстраційний номер 0116U005809).

Мета і завдання досліджень. Метою роботи було науково-експериментальне обґрунтування системи санітарно-гігієнічних заходів в індустріальному форелевому господарстві в умовах замкнутого водопостачання.

Для реалізації мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- провести санітарно-гігієнічне оцінювання води за органолептичними, гідрохімічними та мікробіологічними показниками в установках замкнутого водопостачання за вирощування райдужної форелі упродовж року;
- провести гігієнічне оцінювання води в УЗВ під час вирощування райдужної форелі за мікробіологічними показниками;
- дослідити кількісний та якісний склад психротрофної мікрофлори води в УЗВ за вирощування райдужної форелі;
- розробити спосіб безпечної дезінфекції води в УЗВ за вирощування райдужної форелі без порушення мікробіоценозу біофільтра;
- дослідити вплив різних типів наповнювачів реактора біофільтра на процес формування нітрифікуючої і денітрифікуючої мікрофлори під час запуску УЗВ за вирощування райдужної форелі;
- дослідити процес формування мікробних біоплівочок на різних типах наповнювачів реактора біофільтра в УЗВ за вирощування райдужної форелі;
- розробити спосіб оцінювання нітрифікуючої здатності мікрофлори біофільтра УЗВ (за показником щільності мікробних біоплівочок);

– розробити мікробіологічний стартер наповнювача реактора біофільтра для швидкого формування нітрифікуючого мікробіоценозу в біофільтрі за вирощування райдужної форелі;

– провести токсикологічне оцінювання мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра для вирощування райдужної форелі за показниками виживаності риб гуппі та інфузорій;

– дослідити вплив мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра на інтенсивність нітрифікуючих процесів під час запуску УЗВ для вирощування райдужної форелі;

– дослідити ефективність санітарного стану УЗВ за фізіологічними, гематологічними показниками та гістологічними змінами органів і тканин малька райдужної форелі під час формування мікробіоценозу біофільтра УЗВ;

– дослідити вплив вітамінно-кормової добавки «Ганаміновіт» на виживаність райдужної форелі та на виживання заплідненої ікри і передличинок;

– розробити діагностичну тест-систему для ідентифікації *Flavobacterium psychrophilum* у райдужної форелі;

– розробити систему НАССР для умовного повносистемного індустріального форелевого господарства України.

Об'єкт досліджень. Санітарно-гігієнічний стан індустріальних господарств з вирощування райдужної форелі за використання систем замкнутого водопостачання.

Предмет досліджень. Санітарно-гігієнічні показники води УЗВ, морфометричні та біохімічні показники, які характеризують біологічний статус риб, біорізноманіття мікрофлори водойм і біофільтрів УЗВ, матрикс біоплівки, хвороби форелі, санітарно-гігієнічні заходи.

Методи досліджень. Гігієнічні, мікробіологічні, органолептичні, гематологічні, гістологічні, токсикологічні, фізико-хімічні та статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше системно проведено санітарно-гігієнічне оцінювання води за технології вирощування райдужної форелі в УЗВ в Україні за використання різних типів наповнювачів реактора біофільтра. Встановлено сезонні коливання значень гідрохімічних і токсикологічних показників води в УЗВ та стічної води упродовж року та виявлено зміни мікробіоценозу води в модулях під час запуску і функціонування УЗВ. Зміни характеризувалися зростанням психротрофної мікрофлори в басейні для риб та нітрифікуючих і денітрифікуючих мікроорганізмів у реакторі біофільтра. Уперше встановлено, що кількість психротрофної мікрофлори у воді модулів УЗВ, у середньому в 1,3 рази більша, порівняно з вмістом МАФАНМ, а серед психротрофів домінують роди *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes* і *Flavobacterium*, які становлять до 90%, що дає підставу вважати їх автохтонною мікрофлорою УЗВ.

Отримано нові дані про закономірності колонізації мікрофлорою різних типів наповнювачів біофільтра під час запуску та функціонування УЗВ для вирощування райдужної форелі. Експериментально з'ясовано динаміку нітрифікуючого процесу в реакторі біофільтра за використання різних типів

наповнювачів та виявлено залежність цього процесу від типу наповнювача, кількісного вмісту нітрифікуючих і денітрифікуючих мікроорганізмів, щільності сформованих мікробних біоплівки на наповнювачі.

Вперше встановлено, що під час запуску УЗВ мікроорганізми найшвидше колонізують поліпропіленовий наповнювач RK PLAST, дещо повільніше поліпропіленовий наповнювач AQ-25 і KALDNER K1П і найповільніше статичний керамзитовий наповнювач. При цьому концентрація нітритів у воді для риб зростала за використання поліпропіленових наповнювачів, в середньому до 20-ї доби запуску УЗВ, а за керамзитового – до 25-ї доби.

Розширено уявлення про розвиток нітритного отруєння райдужної форелі під час запуску УЗВ і встановлено динаміку змін гематологічних показників, гістологічної будови зябрового епітелію, печінки і нирок, а також кількості пошкоджених хромосом у клітинах зябер.

Теоретично обґрунтовано та експериментально встановлено доцільність застосування розробленого мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д» під час запуску УЗВ або після проведення лікувально-профілактичних заходів щодо інфекційних хвороб для швидкого формування активного нітрифікуючого і денітрифікуючого мікробіоценозу біофільтра. Теоретично та практично доведено необхідність застосування способу знезараження води в УЗВ ультрафіолетовою бактерицидною лампою, що уможливорює безпечну дезінфекцію без порушення мікробіоценозу біофільтра. Встановлено позитивний вплив вітамінно-кормової добавки «Ганаміновіт» під час годівлі молоді райдужної форелі за рахунок підвищення імунітету і збільшення приросту, а також вплив «Ганаміновіту» на продуктивний ефект личинки за умови згодовування плідникам райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*).

Наукову новизну досліджень підтверджено деклараційними патентами України на корисну модель № 117950 «Спосіб дезінфекції води за вирощування райдужної форелі в умовах замкнутого водопостачання»; № 118019 «Спосіб підвищення імунітету райдужної форелі»; № 119573 «Спосіб біоіндикації водойм»; №121437 «Спосіб створення мікробіоценозу біофільтра форелевого інкубатора»; № заявки у 2018 02069 «Спосіб оцінки функціонування реактора біофільтра установки замкнутого водопостачання».

Практичне значення одержаних результатів. Запропоновано систему санітарно-гігієнічного забезпечення технології вирощування райдужної форелі в УЗВ «від малька до товарної риби».

Виявлені порушення мікробіоценозу води в різних модулях УЗВ вказують на необхідність застосування безпечних коригувальних профілактичних заходів. З цією метою запропоновано «Спосіб дезінфекції води за вирощування райдужної форелі в умовах замкнутого водопостачання», який дає змогу значно безпечніше проводити дезінфекцію порівняно з застосуванням антимікробних препаратів.

Для швидкого формування активного нітрифікуючого мікробіоценозу реактора біофільтра під час запуску УЗВ, або після проведення лікувально-профілактичних заходів запропоновано мікробіологічний стартер наповнювача

біофільтра форелевого інкубатора в установках замкнутого водопостачання «Фільтронорм Д» (ТУ України 10.9-00493712-001:2017).

Результати, отримані під час вивчення складу мікрофлори наповнювача реактора біофільтра УЗВ, інтенсивності колонізації мікроорганізмами різних типів наповнювача, а також здатності бактерій до формування біоплівки різної щільності стали підґрунтям для розроблення «Способу оцінки функціонування реактора біофільтра установки замкнутого водопостачання» та методичних рекомендацій «Використання різних типів наповнювача біофільтра для забезпечення санітарно-гігієнічних умов відтворення та вирощування райдужної форелі в системі замкнутого водопостачання», які затверджено Вченою Радою екологічного факультету Білоцерківського національного аграрного університету (протокол № 4 від 16.11.2017 р.), «Методичні рекомендації щодо використання полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі для ідентифікації патогенної мікрофлори у продовольчій сировині і харчових продуктах», які затверджено Вченою Радою екологічного факультету Білоцерківського національного аграрного університету (протокол № 4 від 23.01.2018 р.)

Вивчення найбільш небезпечних періодів під час вирощування райдужної форелі в умовах УЗВ дало змогу запропонувати вітамінно-кормову добавку «Ганаміновіт» для підгодівлі молоді райдужної форелі з метою підвищення імунітету та виживаності, а для годівлі плідників райдужної форелі з метою підвищення продуктивного ефекту личинки під час переходу на активне живлення.

Матеріали дисертаційної роботи використовуються у навчальному процесі для підготовки фахівців спеціальності «Ветеринарна медицина», «Водні біоресурси та аквакультура» у вищих навчальних закладах України: Білоцерківському національному аграрному університеті, Сумському національному аграрному університеті, Подільському державному аграрно-технічному університеті, Житомирському державному аграрному університеті, Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького, Рівненському державному гуманітарному університеті, Дослідній станції епізоотології Інституту ветеринарної медицини НААН України. Наукові розробки впроваджено в рибних господарствах Чернівецької, Чернігівської та Харківської областей.

Особистий внесок здобувача. Авторкою самостійно проведено патентний пошук, огляд літератури з обраної теми, розроблено програму та етапи наукових досліджень, сформульовано мету і завдання та відпрацьовано методики експериментальних досліджень. Проведено виробничі та лабораторні дослідження. Проаналізовано та узагальнено отримані наукові результати, написано статті, оформлено патенти, проведено статистичну обробку цифрового матеріалу і написання дисертації. За участю наукового консультанта доктора ветеринарних наук, професора Кухтина М.Д. обґрунтовано основні положення, висновки і пропозиції. Молекулярно-генетичні дослідження виконано за консультативної допомоги доктора сільськогосподарських наук, професора Т.М. Димань.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень за темою виконаної дисертаційної роботи доповідалися на: науково-практичній конференції «Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті» (Біла Церква, 2008); міжнародній науково-практичній конференції «Стан та перспективи використання водного басейну Поділля: промислові, екологічні, туристичні аспекти» (Кам'янець-Подільський, 2010); міжнародній науково-практичній конференції молодих учених, аспірантів, докторантів (Біла Церква, 2011); державній науково-практичній конференції «Екологічні проблеми України та шляхи їх вирішення» (Біла Церква, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016); міжнародній науково-практичній конференції «Інноваційність розвитку сучасного аграрного виробництва», присвяченій Всесвітньому рокові ветеринарної медицини та 130-річчю заснування цісарсько-королівської ветеринарної школи у Львові (Львів, 2011, 2016); міжнародній науково-практичній конференції молодих учених, аспірантів, докторантів «Екологічні проблеми сучасного світу та шляхи їх вирішення» (Біла Церква, 2015, 2016); міжнародної практичної конференції «Биотехнология производства рыболовочного материала ценных видов рыб в Азербайджане» (Баку, 2015); міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів і молодих учених «Знання молодих для розвитку ветеринарної медицини і АПК країни» (Санкт-Петербург, 2016); 8th international sturgeon conference (Warsaw, 2016); міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми та шляхи інтенсифікації виробництва продукції тваринництва» (Дніпро, 2017); міжнародній науково-практичній конференції молодих учених, аспірантів і докторантів «Сучасні проблеми ветеринарної медицини» (Біла Церква, 2017); XIII-міжнародній науково-практичній конференції морфологів України «Актуальні проблеми сучасної морфології» (Житомир, 2017); міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної ветеринарної медицини та тваринництва» (Одеса, 2017); VII міжнародній науково-практичній конференції «Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування» (Львів, 2017); міжнародній науково-практичній конференції «Іхтіологія та морфологія – наукова та практична основа рибництва» присвячена 85-річчю заснування кафедри іхтіології та зоології і 60-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Клименка Олега Миколайовича (Біла Церква, 2017); державній науково-практичній конференції «Проблеми екологічної безпеки та охорони навколишнього природного середовища у ландшафтній сфері» (Біла Церква, 2017); міжнародній науково-практичній конференції «Кліматичні зміни та сільське господарство. Виклики для аграрної науки та освіти», (Київ, 2018); міжнародній науково-практичній конференції «Аграрна наука та освіта в умовах євроінтеграції» (Кам'янець-Подільський, 2018).

Публікація матеріалів дослідження. За темою дисертаційної роботи опубліковано 53 наукові праці, із них 18 у фахових виданнях затверджених МОН України (10 із них написані одноосібно), 1 стаття у міжнародному виданні, 1 стаття у виданні індексованому у Web of Science, 5 деклараційних

патентів України на корисну модель, 25 тез конференцій, 2 методичні рекомендації, 1 Технічні умови України.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 370 сторінках комп'ютерного набору тексту. Вона складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, власних досліджень, аналізу та узагальнення власних досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку літератури, додатків. Робота ілюстрована 31 таблицею та 63 рисунками. Список використаної літератури налічує 549 джерел, з яких 303 кирилицею та 246 латинським шрифтом. До додатків увійшли акти виробничих випробувань та впроваджень.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експериментальні дослідження проведено упродовж 2008–2017 рр. на кафедрі іхтіології та зоології Білоцерківського національного аграрного університету МОН України, в фермерських господарствах України СТОВ «Східноукраїнський центр розведення цінних видів риби «МЖА»; ПрАТ «Чернігіврибгосп»; ФГ «Ішхан».

Досліджено 27 проб води, яка живить УЗВ за органолептичними та гідрохімічними показниками; 60 проб води, відібраної із різних модулів УЗВ за мікробіологічними показниками; 10 проб води з УЗВ, яка піддавалася різним способам дезінфекції; 140 проб води і 140 змивів з чотирьох типів наповнювача біофільтра під час запуску УЗВ за мікробіологічними показниками і вмістом нітритів у воді. Ідентифіковано 273 культури психротрофних мікроорганізмів та у 5 культурах *Pseudomonas spp.* визначено процес формування біоплівки на наповнювачах. Для визначення токсичності мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д» використано 60 риб гуппі (*Poecilia reticulata Peters*). Використано 1000 особин дорослої форелі для визначення клінічних ознак під час застосування мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д». Використано 20 000 молоді райдужної форелі та 5000 личинок під час оцінювання вітамінно-кормової добавки «Ганаміновіт». Поведінку малька райдужної форелі за нітритного отруєння під час запуску біофільтра оцінено на 1000 особинах риби. Досліджено 40 особин райдужної форелі за гематологічними, гістологічними показниками та кількістю мікроядер.

Комплексна робота включала дослідження, які були розділено на чотири етапи (рис. 1).

Дослідження першого етапу полягали у санітарно-гігієнічному оцінюванні індустріального фермерського господарства за замкнутого водопостачання, зокрема визначення органолептичних, токсикологічних, фізико-хімічних та мікробіологічних показників води, що живить форелеве господарство.



Рис. 1. Схема досліджень дисертаційної роботи

Дослідження другого етапу полягали в обґрунтуванні санітарно-гігієнічних заходів з удосконалення функціонування УЗВ, зокрема, вивчали вплив знезараження води в УЗВ за допомогою бактерицидних ламп, визначали склад мікрофлори наповнювача реактора біофільтра УЗВ, інтенсивність колонізації мікроорганізмами різних типів наповнювача, розробляли способи швидкого формування активного нітрифікуючого мікробіоценозу реактора біофільтра та способи підвищення виживаності молоді риби і продуктивного ефекту личинки.

На третьому етапі дослідження було направлено на оцінювання санітарного стану УЗВ за формування мікробіоценозу біофільтра, зокрема за гематологічними показниками, гістологічними змінами органів і тканин та за кількістю мікроядер у клітинах зябер малька райдужної форелі.

На четвертому етапі виконували дослідження з розроблення системи НАССР для індустріальних форелевих господарств, зокрема ідентифікували небезпечні чинники, які можуть виникати під час вирощування райдужної форелі на всіх етапах виробничого циклу в умовах замкнутого водопостачання.

Відбирання проб води зі свердловини, модулів УЗВ та стічної води, яка впадає в поверхневе водне джерело, наповнювачів реактора біофільтра, доставляння їх у лабораторію, підготовку та мікробіологічні дослідження виконували відповідно до ДСТУ 4808:2007; ДСТУ 7525:2014; ДСТУ ISO 6887 – 1:2003; і відповідних методичних рекомендацій (Антипчук А.Ф. та ін., 2003, Gendel Y. 2013, Stickney R.R. 2000).

Визначення кількості мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів (МАФАНМ) проводили на МПА за температури $30 \pm 1^\circ\text{C}$ та інкубації впродовж 72 год. Психротрофні мікроорганізми (ПсхМ) визначали за температури $6,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ упродовж 10 діб. Кількість бактерій родини *Enterobacteriaceae* у пробах визначали на середовищі *Endo Agar*, гриби – на середовищі Сабуро, виділення псевдомонад проводили на середовищі з 0,2% вмістом N-цетилпіридинію хлориду, нітрифікуючі і денітрифікуючі мікроорганізми згідно Антипчук А.Ф. та ін., 2003). Для визначення родового складу та популяційного рівня мікроорганізмів наповнювачів біофільтра, відбирали тампоном змив, який висівали на відповідні селективні для кожної групи мікроорганізмів середовища.

Визначення родового складу психротрофної мікрофлори проводили за морфологічними, тинкторіальними, культуральними, біохімічними властивостями та ознаками патогенності. Крім того використовували пластини для біохімічної ідентифікації «Неферм тест-24» (Pliva-lachema, Чехія).

Щільності утворених біоплівок на різних типах наповнювача біофільтра визначали за методом (Hall-Stoodley L., Costerton J.W. et al., 2004). Електронно-мікроскопічні дослідження біоплівок, сформованих мікроорганізмами на різних типах наповнювача реактора біофільтра, проводили за допомогою електронного растрового мікроскопу з системою енергодисперсного мікроаналізу (РЕМ 106 И, Україна). Молекулярно-генетичні дослідження мікрофлори реактора біофільтра проводили в Інституті прісноводного рибного господарства ім. Станіслава Саковича, Польща.

Токсичність розробленого мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д» визначали на рибах гуппі (*Poecilia reticulata* Peters) та інфузоріях (*Tetrachymena pyriformis*) лабораторний штам WH-14 відповідно до методичних рекомендацій (Шаблій В.Я. та ін., 1983).

Визначення органолептичних показників води проводили згідно з ГОСТ 3351-74, фізико-хімічні: вміст сульфатів – згідно з ГОСТ 7389-72, хлоридів – згідно з ДСТУ ISO 9297:2007, сухий залишок – згідно з ГОСТ 18154-72, ферум – згідно з ДСТУ ISO 6332:2003, загальну жорсткість – згідно з ГОСТ 4151-72, рН – згідно з ДСТУ 4077-2001, амоній – згідно з ДСТУ ISO 5664:2007. Також у пробах води визначали методом атомної абсорбції уміст кадмію, кобальту, купруму, плюмбуму, цинку – згідно ДСТУ ISO 11885:2005. Нітрати у воді визначали за допомогою нітратоміра Н-401, а вміст нітритів – за допомогою GBL-тесту.

У крові риби визначали кількість еритроцитів, рівень гемоглобіну, метгемоглобіну, середній об'єм одного еритроцита і середню концентрацію гемоглобіну за загальноприйнятими методиками.

Для гістологічних досліджень використовували зразки зябер, печінки та нирок розміром 0,5–1,0 см³. Їх фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну впродовж 24 годин за кімнатної температури. Зрізи товщиною 10 мкм виготовляли на санному мікротомі МС-2. Фарбування гістологічних зрізів дослідних зразків тканин форелі проводили гематоксиліном і еозином (Горальський, 2005). Мікроскопічні дослідження здійснювали за допомогою мікроскопів Біолам та KONUS із вмонтованою відеокамерою.

Для мікроядерного тесту зразки зябер малька райдужної форелі фіксували в двох змінах свіжовиготовленої та охолодженої суміші етилового спирту і оцтової кислоти (3:1) упродовж 30 хв кожна в об'ємі, який в 50 раз перевищує об'єм фіксованого матеріалу. Зразки поміщали в холодильник, через дві доби промивали 70% етиловим спиртом та зберігали до проведення досліджень. Механічну мацерацію проводили впродовж 5–10 хв, хімічну – в 45% розчині оцтової кислоти впродовж 40–50 хв. Повітряно-сухі препарати фарбували 50% розчином нітрату срібла в термостаті за 58–60°C упродовж 5–6 хв до отримання коричневого кольору, дофарбовували 2% розчином Гімза в фосфатному буфері (рН = 6,8) упродовж 1 хв. Число ядерець підраховували у кожного зразка у 500–700 клітин з використанням окулярів х16, об'єктивів х100 мікроскопа Біолам та вимірювали діаметр ядерець окуляр-мікрометром у 100 клітин при тому ж збільшенні об'єктиву.

Ідентифікація мікрофлори біофільтра на різні філогенетичні групи проведено на основі методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) (Michaud et al., 2009). Діагностичну тест-систему для ідентифікації у райдужної форелі захворювання на флавобактеріоз розроблено на основі методу ПЛР у реальному часі (Van Vliet D. et al., 2016).

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали за загальновизнаними методами варіаційної статистики з використанням програми Statistic 7. Використовували непараметричні методи досліджень

(критерій Уїлкоксона, Манна-Уїтні). Визначали середнє арифметичне – \bar{x} , стандартну похибку середньої величини m . Різницю між порівнюваними величинами вважали достовірною за $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Санітарно-гігієнічне оцінювання води за гідрохімічними показниками в установках замкнутого водопостачання. Під час дослідження органолептичних показників води з свердловини, що живить УЗВ виявили, що вони істотно змінювались, залежно від пори року, проте не перевищували допустимі норми ДСТУ. Вміст феруму, це єдиний показник, значення якого перевищувало нормативне. У березні і грудні перевищення становило відповідно в 1,27 та 1,18 рази, однак у жовтні кількість феруму була менше норми в 2,7 рази ($p < 0,05$). Також встановлено, що вміст основних токсикантів, таких як нітрати, нітрити, солі амонію та важкі метали (кадмій, плумбум, цинк), у воді впродовж року не перевищували гранично допустимих значень, відтак, ці сполуки не чинили негативного впливу на рибу.

Важливий показник благополучності господарства – якість відпрацьованої води, яка скидається. Результати досліджень стічних вод форелевого господарства виявили, що вода, яка скидається, за вмістом завислих речовин, сполук амонію, нітратів і фосфатів, хоч і різнилася упродовж року, однак не порушувала біологічної рівноваги місцевої екосистеми.

Отже, перед плануванням вирощування райдужної форелі в УЗВ необхідно обов'язково перевірити якість води, яка має жити установку, оскільки рибу, вирощену в УЗВ, відносять до екологічно чистої і безпечної продукції.

Гігієнічне оцінювання води УЗВ за мікробіологічними показниками. Встановлено, поступове збільшення мікробного забруднення води по ходу технологічного процесу в біологічному фільтрі. Однак кількість психротрофної мікрофлори у модулях УЗВ була в середньому в 1,3 рази ($p < 0,05$) більшою порівняно з кількістю МАФАНМ. Найбільше *E. coli* виділяли з механічного фільтра – 2,79 lg КУО/см³. Саме від його функціонування залежить наявність мікроорганізмів коліформної групи у воді УЗВ, а також на поверхні риби. Псевдомонади в значно більшій кількості порівняно з *E. coli*. виділяли з води УЗВ. Виявлено їх збільшення не тільки у воді до механічного фільтра, а й у воді біологічного фільтра. Зростання кількості бактерій роду *Pseudomonas* у басейні для вирощування риб може бути причиною виникнення псевдомонозу.

Визначення складу психротрофної групи мікрофлори води УЗВ за вирощування райдужної форелі. Дослідження родової ідентифікації мікроорганізмів у воді в процесі вирощування форелі показали, що до їх складу входили найбільш поширені психротрофні роди *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* та родина *Enterobacteriaceae*. Псевдомонад з біологічного фільтра виділяли в 3,2 рази ($p < 0,05$) більше, ніж із води на вході в інкубатор.

Секвенування сДНК мікрофлори води біофільтра та порівняння 16S рДНК і 16S РНК-клонів, наявних у бібліотечній базі, виявило 11 бактеріальних

філотипів (рис. 2). Більша частина секвенованих клонів належала до філотипу *Gammaproteobacteria* – 56,7%, 12,2% припадало на клас *Alphaproteobacteria*.

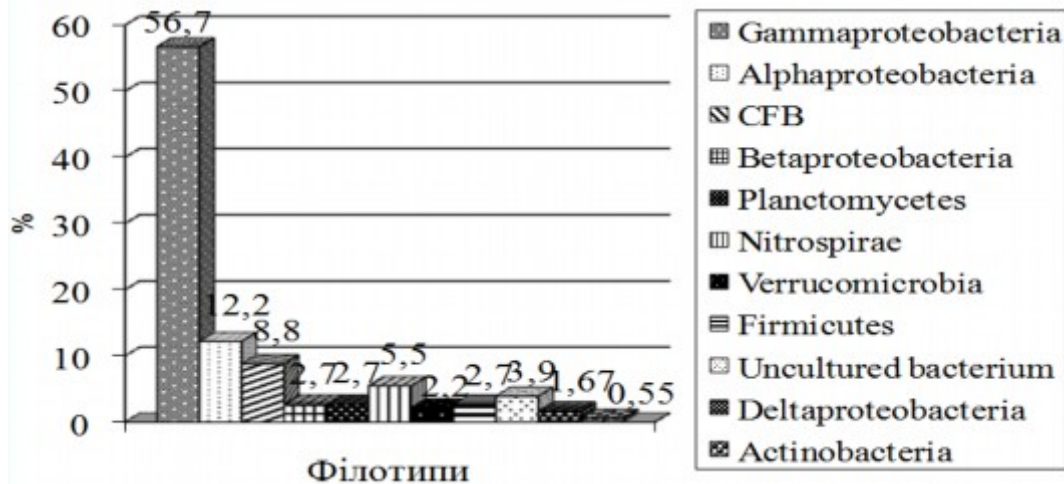


Рис. 2. Поширення секвенованих сДНК бактеріальних філотипів у воді реактора біофільтра за вирощування райдужної форелі

Частка філотипу *CFB* становила 8,88%, що в 6,4 разів ($p < 0,05$) менше, ніж *Gammaproteobacteria* і в 1,5 рази ($p < 0,05$) – ніж *Alphaproteobacteria*. Частка решти філотипів, таких як *Nitrospirae*, *Betaproteobacteria*, *Planctomycetes*, *Deltaproteobacteria*, *Uncultured bacterium*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes* не перевищувала 6%, і найменш чисельним був філотип *Actinobacteria* – 0,5%. Значне переважання представників філотипу *Gammaproteobacteria* пов'язано з тим, що до нього входять декілька великих родин (*Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae* та ін.), які широко розповсюджені в навколишньому природному середовищі – в ґрунті, на рослинах, деревах, у воді, і закономірно формують мікрофлору води реактора біофільтра. Також встановлено, що частка основних родів і видів бактерій, які беруть участь у процесах нітрифікації і денітрифікації, зокрема *Nitrosomonas sp.*, *Nitrospira sp.*, *Pseudomonas stutzeri*, становила 13,7%. Інші ідентифіковані види бактерій були поділені рівномірно між виявленими родами. Отже, для забезпечення ефективної роботи біофільтра, яка залежить від здатності мікроорганізмів розкладати органічні та неорганічні речовини, що накопичуються у воді під час вирощування риби, важливо сприяти формуванню активної щільної біоплівки з автохтонних психротрофних бактерій джерельної води.

Вплив наповнювачів реактора біофільтра на перебіг нітрифікуючого і денітрифікуючого процесів у воді. У процесі життєдіяльності риби у воді УЗВ накопичується нітроген, який є токсичним для риби і має бути перетворений у біологічному фільтрі в нешкідливий нітрат. Перетворення нітритів у нітрати відбувається за участі нітрифікуючих мікроорганізмів, які заселяють наповнювач реактора біофільтра. Від наповнювача біофільтра залежить також швидкість денітрифікуючих процесів у реакторі УЗВ.

Встановлено, що нітрифікатори найшвидше колонізували біофільтр з наповнювачем RK PLAST, дещо повільніше – з наповнювачами AQ-25 і

KALDNER K1П і найповільніше – де наповнювачем був керамзит. Кількість нітрифікуючих мікроорганізмів у воді реактора біофільтра з наповнювачем RK PLAST була в 2,2 рази ($p < 0,05$) більшою порівняно з керамзитовим наповнювачем та в 1,2 рази і 1,7 рази ($p < 0,05$) за використання наповнювачів AQ-25 і KALDNER K1П відповідно. На 25-у добу формувався стабільний нітрифікуючий мікробіоценоз з кількістю бактерій від 6,7 до 7,7 Іг КУО/см³.

Дослідження кількості нітритів у воді басейну для риб під час запуску біофільтра за використання різних наповнювачів (табл. 1) показали, що за використання керамзитового наповнювача концентрація нітритів у воді зростала до 20-ї доби досліду і становила 1,9 мг/дм³, з 20 до 25-ї доби – знаходилася на одному рівні і з 25-ї доби почала поступово знижуватися. Тим часом за використання поліпропіленових наповнювачів RK PLAST, AQ-25 і KALDNER K1П концентрація нітритів наростала до 20-ї доби і їх кількість становила 1,5, 1,6 і 1,7 мг/дм³ води відповідно, з 20-ї доби їх вміст почав знижуватися.

Таблиця 1

Динаміка кількості нітритів у воді реактора біофільтра з різними видами наповнювача, $X \pm x_m$, $n=140$, мг/дм³

Час дослідження, доби	Види наповнювача			
	керамзит	RK PLAST	AQ-25	KALDNER K1П
5	0,4±0,01	0,4±0,01	0,3±0,01	0,4±0,01
10	0,8±0,01	0,7±0,01	0,7±0,01	0,7±0,01
15	1,4±0,02*	1,3±0,01	1,3±0,02*	1,4±0,02*
20	1,9±0,02*	1,5±0,02*	1,6±0,02*	1,7±0,02*
25	1,9±0,01*	1,3±0,01*	1,4±0,01*	1,5±0,02*
30	1,4±0,01*	1,0±0,01*	1,2±0,01*	1,3±0,01*
35	1,2±0,01*	0,8±0,01*	1,0±0,01*	1,1±0,01*

Примітка: * – $p < 0,05$ – порівняно з 5-ю добою дослідження

З метою оцінювання різних типів наповнювачів реактора біофільтра, зокрема їх здатності до біологічного очищення (нітрифікації, денітрифікації), було досліджено процес формування біоплівки на наповнювачах під час запуску УЗВ. Встановлено, що біоплівки найнижчої щільності формувалися на керамзитових наповнювачах. Біоплівки високої щільності (більш як 2,0 од) формувалися на наповнювачі RK PLAST починаючи з 20-ї доби запуску УЗВ, на наповнювачах AQ-25 і KALDNER K1П – приблизно на 25-у добу, а на керамзитовому наповнювачі – з 30-ї доби. Отже, за показником щільності мікробних біоплівок можна судити про інтенсивність перебігу нітрифікуючих процесів у біофільтрі. Нами запропоновано шкалу для оцінювання стану біоплівки наповнювача (табл. 2). За величини щільності біоплівки до 2,00 од (низька) у воді басейну для риб вміст нітритів буде високий і проявляється токсичний вплив їх на організм. За такої щільності біоплівки необхідно контролювати рівень нітритів і застосовувати заходи з відновлення або

стимулювання розвитку мікробіоценозу біофільтра. За величини щільності біоплівки від 2,01–2,50 од в реакторі біофільтра розпочинається інтенсивний нітрифікуючий процес внаслідок чого кількість нітритів у воді басейну буде стрімко знижуватися. За величини щільності біоплівки від 2,50 од і вище у воді реактора проявляється максимальна активність нітрифікуючих мікроорганізмів.

Таблиця 2

Оцінювання нітрифікуючої здатності мікрофлори наповнювача реактора біофільтра за показником щільності мікробних біоплівок

Щільність мікробних біоплівок	Оптична густина спиртового промивного розчину з біоплівкою, од
Низька	до 2,00
Середня	2,01 – 2,50
Висока	2,51 і вище

Отже, від інтенсивності колонізації наповнювача біофільтра нітрифікуючими і денітрифікуючими бактеріями залежить динаміка зниження нітритів у воді; процес включення мікрофлори реактора біофільтра в нітрифікуючий процес за використання поліпропіленових наповнювачів відбувається на п'ять діб швидше, ніж за використання керамзитового наповнювача.

Розроблення і застосування мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д» для швидкого формування мікробіоценозу реактора біофільтра. З метою швидкого заселення мікрофлорою наповнювача біофільтра, зокрема формування щільної біоплівки із нітрифікуючих і денітрифікуючих мікроорганізмів під час запуску УЗВ або після проведення дезінфекції води, нами розроблено мікробіологічний стартер наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д». Він містить у своєму складі живі культури нітрифікуючих і денітрифікуючих мікроорганізмів (*Nitrosomonas spp.*, *Nitrospira spp.*, *Pseudomonas spp.*) у кількості не менш як 10^7 КУО/г.

Дослідженнями параметрів гострої і хронічної токсичності мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д» на рибах гуппі (*Poecilia reticulata Peters*) та інфузоріях (*Tetrachymena pyriformis*) встановлено відсутність гострої і хронічної токсичної дії у концентрації від 10^3 до 10^7 нітрифікуючих бактерій в см^3 води для рибок гуппі, оскільки загибелі тест-об'єктів упродовж 4-х і 60-ти діб не виявили. Також у заданих концентраціях нітрифікаторів не відмічали гострої і хронічної дії на інфузорії. У всіх варіантах досліду впродовж 30 і 60 хв жодних морфологічних змін у інфузорій не відзначали. Вони були активні, мали характерний прямолінійний рух, який не відрізнявся від руху інфузорій у контролі. Запропонований нами «Фільтронорм Д» впливає на швидкість колонізації біоценозів УЗВ МАФАНМ, психротрофними мікроорганізмами і бактеріями родини *Enterobacteriaceae* (табл. 3). Наростання їх кількості в УЗВ нагадувало заселення зазначеними мікроорганізмами біоценозів установки, під час запуску якої не використовувався «Фільтронорм Д». Основні зміни у воді відбулися з кількістю нітрифікуючих і денітрифікуючих бактерій. Динаміка росту цих бактерій після

внесення «Фільтронорму Д» виявила стрімке наростання їх кількості. Так, на 6-у добу їх кількість зросла у 20–30 разів, на 11-у добу – приблизно в 1000 разів, на 16–20-25-у добу – у 3000 разів порівняно з початком досліду. Це вказує на створення добрих умов для їх розвитку і виконання функції відновлювати нітрати.

Таблиця 3

Мікробіологічні показники води з реактора біофільтра під час запуску УЗВ для вирощування райдужної форелі за використання мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д», КУО/см³, $X \pm x_m$, n = 5

Доба дослідження	Мікроорганізми				
	МАФАНМ	ПсхМ	<i>Enterobacteriaceae</i>	нітрифікуючі	денітрифікуючі
5	4,1±0,22 ×10 ³	2,4±0,21 ×10 ³	1,5±0,1 ×10 ²	2,7±0,18 ×10 ⁴	1,9±0,15 ×10 ³
10	1,3±0,12 ×10 ⁴	1,5±0,31 ×10 ⁴	5,2±0,24 ×10 ²	5,6±0,32 ×10 ⁵	5,1±0,33 ×10 ⁴
15	5,7±0,34 ×10 ⁴	7,1±0,51 ×10 ⁴	1,1±0,1 ×10 ³	2,8±0,21 ×10 ⁷	5,6±0,27 ×10 ⁵
20	9,3±0,57 ×10 ⁴	1,0±0,09 ×10 ⁵	3,5±0,26 ×10 ³	7,9±0,42 ×10 ^{7*}	9,8±0,75 ×10 ^{5*}
25	1,3±0,14 ×10 ⁵	1,5±0,33 ×10 ⁵	9,8±0,53 ×10 ³	9,1±0,55 ×10 ^{7*}	1,3±0,12 ×10 ^{7*}
30	1,3±0,11 ×10 ⁶	3,1±0,23 ×10 ⁶	3,5±0,24 ×10 ⁴	9,4±0,56 ×10 ^{7*}	5,7±0,42 ×10 ^{7*}
35	3,1±0,24 ×10 ⁶	5,3±0,35 ×10 ⁶	5,7±0,32 ×10 ⁴	9,9±0,71 ×10 ^{7*}	6,2±0,48 ×10 ^{7*}

Примітка: * – $p < 0,05$ – порівняно з 5-ю добою досліджень

Формування біоценозу в УЗВ для вирощування райдужної форелі за використання «Фільтронорм Д» (рис. 3) вплинуло на динаміку кількості нітритів у воді з реактора біофільтра. На 15-у добу виявлено зростання концентрації нітритів в 2,75 рази ($p < 0,05$) порівняно з початком досліду, що пов'язано з заселенням мікроорганізмами біоценозу. З формуванням сталого складу мікроорганізмів в УЗВ, починаючи з 15-ї доби, концентрація нітритів у воді з реактора біофільтра стабілізувалася і утримувалася на такому рівні до 20-ї доби.

З 20-ї доби запуску УЗВ виявлено інтенсивний нітрифікуючий процес і на 25-у добу досліду кількість нітритів знизилася в 1,8 рази ($p < 0,05$) та становила 0,6 мг/дм³. Практично на 25-у добу кількість нітритів знизилася до максимально можливого рівня (0,6±0,1 мг/дм³) за вирощування райдужної форелі в УЗВ, оскільки упродовж наступних десяти діб дослідження їх вміст знаходився на одному рівні. Це вказує на те, що починаючи з 15-ї доби, за використання «Фільтронорм Д» в УЗВ формується сталий біоценоз зі значною кількістю нітрифікуючих і денітрифікуючих бактерій, які утилізують сполуки

амоніаку. Установка працює безпечно без токсичного впливу нітритів на організм риби.

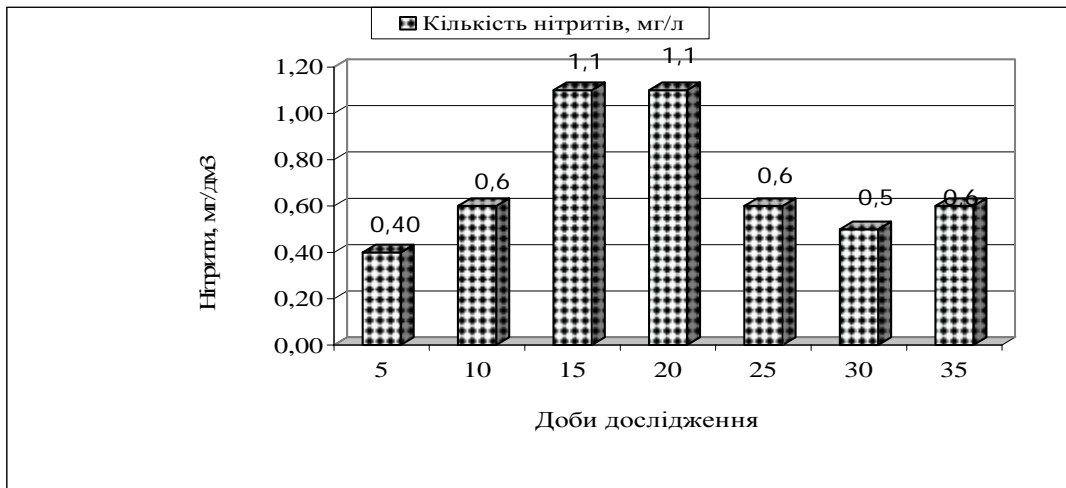


Рис. 3. Динаміка кількості нітритів у воді з реактора біофільтра під час запуску УЗВ для вирощування райдужної форелі за використання мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д»

Отже, розроблений мікробіологічний стартер наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д» істотно впливає на інтенсивність перебігу нітрифікуючих процесів в реакторі біофільтра і дає можливість на 10 діб швидше сформувати дієвий мікробіоценоз та запустити систему замкнутого водопостачання для безпечного вирощування райдужної форелі.

Оцінювання санітарного стану УЗВ під час формування мікробіоценозу біофільтра. Оцінювання санітарного стану УЗВ під час формування мікробіоценозу біофільтра проводили за фізіологічними характеристиками малька райдужної форелі, за гематологічними показниками і гістологічними змінами органів і тканин риби, а також використовували мікроядерний тест.

Оцінювання санітарного стану води УЗВ за фізіологічними характеристиками малька райдужної форелі. Під час запуску біофільтра в УЗВ процес нітрифікації залишається незавершеним, що тимчасово створює надмірний фон нітриту (табл. 1). Ознаки нітритного отруєння малька райдужної форелі під час запуску біофільтра за використання у ньому поліпропіленового наповнювача RK PLAST показали, що першими у риби змінюються поведінкові реакції, які клінічно проявляються, починаючи з 6-ї доби запуску біофільтра. Характерним є зниження у всієї риби рухливості, а приблизно 25% риби тривалий час нерухомо «стоїть» у кутах басейну. Починаючи з 15-ї доби досліду приблизно 50% риби піднімається до поверхні води, у поодиноких представників відмічається незначно виражене нервово тремтіння. Вона у великих кількостях підпливає до місця подавання чистої води. З 16 до 20-ї доби досліду, коли концентрація нітритів у воді була найвищою, відмічено, що вся риба плавала у верхніх шарах, у приблизно 50% риби відмічали нервово тремтіння тіла та плавників, і вона продовжувала масово підпливати до місця подавання насиченої киснем води. У період з 21 до 25-ї доби, який збігається з

початком переважання у біофільтрі діяльності денітрифікаторів, що підтверджується зниженням кількості нітритів у воді УЗВ, приблизно 50% риби плаває у верхніх шарах води, а решта занурена у товщу води, рухливість слабка, і лише майже у 10% риби спостерігається нервово тремтіння. На зниження концентрації нітритів у воді на 26–30-у добу вказує наростаюча рухливість риби, лише окремі особини залишалися на місці подавання води чи у кутах басейну, однак приблизно 25% риби продовжувало знаходитись у верхніх шарах води. Про запуск біофільтра і зниження нітритного отруєння малька райдужної форелі свідчило те, що у період від 30 до 35-ї доби вся риба занурилася у товщу води і була рухливою.

Крім змін поведінки риби, під час запуску біофільтра було встановлено й інші ознаки нітритного токсикозу, серед яких найбільш помітними були пігментація шкіри і кольору зябер. У перші дні запуску біофільтра, коли концентрація нітритів у воді УЗВ була удвічі вищою верхньої межі допустимої концентрації, змін кольору зябер і пігментації шкіри малька райдужної форелі не виявлялося. З 6 до 10-ї доби запуску біофільтра у загальній масі риби приблизно 10% мали потемніння тіла і плавників, а у окремих особин колір зябер змінився з червоного на коричневий, що вважають однією з характерних ознак нітритного отруєння форелі. На 11–15-у добу досліду, коли у малька форелі спостерігали нервово тремтіння, у приблизно 30% риби відбувалося потемніння тіла і плавників, плавники ущільнювалися, колір зябер був коричневий. З 16 до 20-ї доби від початку запуску біофільтра і максимальної концентрації у воді нітритів у 90% риби спостерігали потемніння тіла і плавників, плавники були ущільнені, колір зябер був коричневим. У риби, яка вижила після 20-ї доби досліду, у наступні дні досліду і після зниження у воді УЗВ нітритів до $1,3 \text{ мг/дм}^3$, почав відновлюватися до природного колір тіла і плавників, які і далі залишалися ущільненими, у 50% риби колір зябер був коричневий або блідо-рожевий. На 26–30-у добу запуску біофільтра пігментація шкіри риби набула природного кольору і лише у приблизно 10% риби спостерігали потемніння тіла і плавників, у окремих особин плавники були ущільнені. Колір зябер у майже 20% риби залишався коричневим, а у всіх інших ставав блідо-рожевим. Починаючи з 31-ї доби у всієї риби колір шкіри ставав природним, плавники були розправлені і про нітритне отруєння нагадувало лише блідо-рожеве забарвлення зябер.

У процесі запуску біофільтра і використання у ньому поліпропіленового наповнювача RK PLAST, було встановлено і загибель риби, що видно з рис. 4.

Найбільшу загибель встановлено з 16 до 20-ї доби досліду – 149 риб. У риби спостерігали розвиток сильних клонічно-тонічних судом (штовхоподібні рухи) та тремтіння плавників. Молодь форелі втрачала рівновагу, опускалася на дно басейнів і лежала з широко розкритим ротом, розставленими плавниками і зябровими кришками. Форель снула миттєво. Трупне залякання було добре вираженим. Вся поверхня тіла і зябра були вкриті слизом з чітко вираженими крапковими вогнищевими крововиливами. Однією з основних клінічних ознак нітритного отруєння була наявність крововиливів у ротовій порожнині. Зі зниженням кількості нітритів у воді загибель риби знижувалася і становила у

період з 21 по 25-ї доби – 7,6% від загальної кількості риби, взятої для досліджу. За тривалого перебування райдужної форелі у воді з умістом нітритів, що перевищувала ГДК, отруєння нітритами перейшло в хронічну форму, загибель різко знизилася і становила у періоди з 26 до 30-ї доби і з 31 до 35-ї відповідно 0,6 і 0,2%, від загальної кількості риби, взятої для досліджу. У снулої риби трупне залякання не було добре виражене, поверхня тіла і зябра були вкриті слизом, у ротовій порожнині виявлялися крововиливи.

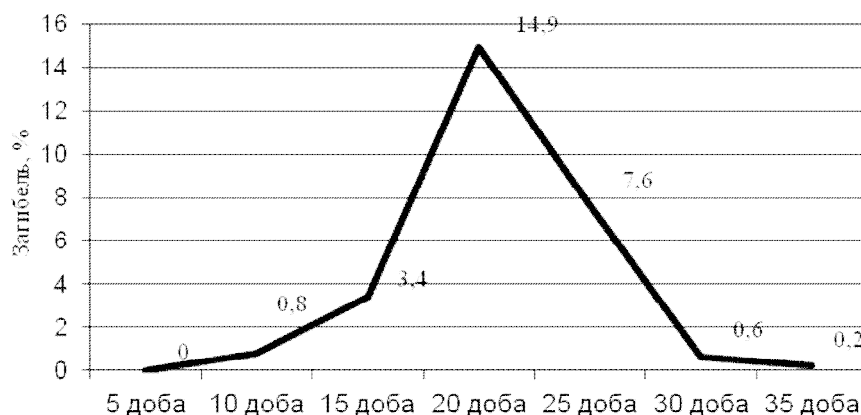


Рис. 4. Динаміка загибелі малька райдужної форелі під час запуску біофільтра УЗВ за використання поліпропіленового наповнювача RK PLAST

Отже, під час запуску біофільтра УЗВ найбільша загибель малька райдужної форелі виникає з 16 до 20-ї доби досліджу і становить 14,9% від усієї риби. Отруєння нітритами малька райдужної форелі перебігало у гострій і хронічній формах, а смертність становила 27,5% від загальної кількості риби, взятої для досліджу.

Оцінювання санітарного стану води УЗВ за гематологічними показниками малька райдужної форелі під час формування мікробіоценозу біофільтра. Тривалий контакт риби з токсичною речовиною – нітритами, під час запуску біофільтра УЗВ, позначився і на гематологічних показниках, які визначають функціональну і адаптивну здатність організму малька райдужної форелі. Встановлено, що з моменту запуску біофільтра і до 25-ї доби досліджу в крові райдужної форелі знизилася кількість еритроцитів – з $1,32 \pm 0,12$ Т/дм³ до $0,94 \pm 0,08$ Т/дм³. При цьому зниження досліджуваного показника у крові риби виявилось вірогідним у період з 16 до 20-ї доби ($p < 0,05$) і з 21 до 25-ї доби ($p < 0,05$). Зі зниженням нітритного навантаження на рибу, через 26 діб від запуску біофільтра, внаслідок активізації мікробів нітрифікаторів і зниження рівня нітритів у воді, кількість еритроцитів у крові риби зросла порівняно з попереднім періодом, однак не повернулася до початкових величин навіть на кінець досліджу.

Дослідження рівня гемоглобіну у крові малька райдужної форелі під час запуску біофільтра з наповнювачем RK PLAST показали, що його концентрація впродовж всього досліджу знаходилася в межах від $60,3 \pm 2,12$ до $68,1 \pm 1,65$ г/ дм³. Найвищий рівень гемоглобіну спостерігали у крові риб на початку досліджу, далі, за наростання у воді нітритів на 6–10-у добу дослідження, він став нижчим

на 3,7%, 11–15-у добу – на 8,5%, 16–20-у добу – на 11,5% ($p < 0,05$), 21–25-у добу – на 10,7% ($p < 0,05$), 26–30-у добу – на 5,9% і 31–35-у добу – на 1,3%.

Дослідження динаміки гематокриту у райдужної форелі під час запуску біофільтра УЗВ за використання у ньому поліпропіленового наповнювача RK PLAST (рис. 5) показало, що гематокритна величина у малька райдужної форелі впродовж запуску біофільтра знаходилася в межах 29,0–31,4%. Найвищим показник гематокриту у риби був за найнижчої концентрації нітритів у воді на початку досліду, з якого починається запуск біофільтра УЗВ. На 10-у добу досліду, показник гематокриту у молоді райдужної форелі знизився на 0,6%, порівняно із початком запуску біофільтра. Починаючи з 10-ї доби досліду показник гематокриту у риби продовжував знижуватися і виявився найнижчим на 25-у добу функціонування біофільтра. При цьому зниження становило 2,4% на 25-у добу порівняно з початком досліду. З 25-ї доби встановлено зростання вмісту гематокриту у молоді форелі, однак його значення виявилось нижчим, ніж на початку досліду, і ця різниця становила на 30-у добу 2,3% і на 35-у добу – 1,5%.

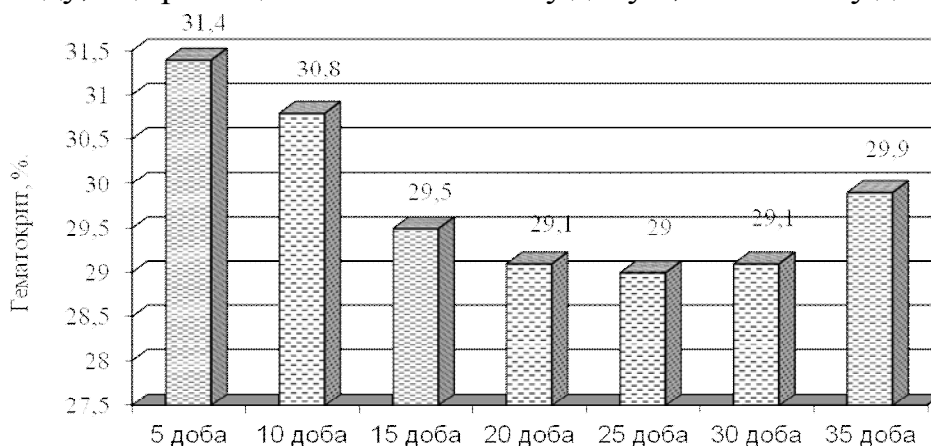


Рис. 5. Динаміка гематокриту у райдужної форелі під час запуску біофільтра УЗВ за використання поліпропіленового наповнювача RK PLAST

Під час запуску біофільтра УЗВ виявлено зміни середнього об'єму одного еритроцита і середньої концентрації гемоглобіну в еритроциті малька райдужної форелі. У результаті досліджень середнього об'єму одного еритроцита встановлено, що він становив від $236,9 \pm 19,2$ до $308,5 \pm 25,8$ $\mu\text{м}^3$. При цьому впродовж перших п'ятнадцяти діб середній об'єм одного еритроцита не перевищував $237,9$ $\mu\text{м}^3$, однак збільшився на 13,8% на 20-у добу порівняно з початком запуску біофільтра, і це збільшення виявилось статистично значущим ($p < 0,05$). Найвищим упродовж всього періоду досліду виявився середній об'єм одного еритроцита райдужної форелі на 25-у добу, його величина становила $308,5 \pm 25,8$ $\mu\text{м}^3$ ($p < 0,01$). Починаючи з 30-ї доби запуску біофільтра, середній об'єм одного еритроцита почав знижуватися і на 35-у добу становив $237,3 \pm 17,4$ $\mu\text{м}^3$.

Під час запуску біофільтра середня концентрація гемоглобіну в еритроциті риби становила від $20,7 \pm 1,62$ до $22,5 \pm 1,92$ $\text{ммоль}/\text{дм}^3$. При цьому на 5-у добу досліду величина досліджуваного показника у крові риби знаходилася в межах $21,69 \pm 1,64$ $\text{ммоль}/\text{дм}^3$. Починаючи з 10-ї доби від запуску біофільтра,

середня концентрація гемоглобіну в еритроциті малька райдужної форелі мала тенденцію до зниження, найнижчою виявилася на 20-у добу експерименту і становила $20,7 \pm 1,62$ ммоль/ дм³, що нижче на 4,6% порівняно з початком досліджень. На 25-у добу досліду і до повного запуску біофільтра нами відмічено поступове збільшення середньої концентрації гемоглобіну в еритроциті малька райдужної форелі, яке на 30-у добу становило 6,3%, а на завершення досліджень – 8,7%.

До основних процесів токсичного ураження риби нітритами належить метгемоглобіноутворення, що проявляється високим рівнем метгемоглобіну у крові риби. Аналіз динаміки кількості метгемоглобіну у крові райдужної форелі під час запуску біофільтра УЗВ за використання у ньому поліпропіленового наповнювача RK PLAST показав, що на початку запуску біофільтра рівень метгемоглобіну у крові риб був найнижчим. Це свідчить про те, що навіть низькі кількості нітритів у воді зумовлюють перехід гемоглобіну в метформу у крові малька форелі внаслідок окиснення ферума гему ($\text{Fe}^{+2} \rightarrow \text{Fe}^{+3}$). На 6–10-у добу дослідження його концентрація у крові зросла на 8,8%, 11–15-у добу – на 15,0%, 16–20-у добу – на 26,4%, 21–25-у добу – на 16,8%, 26–30-у добу – на 12,8% і 31–35-у добу – на 2,1% порівняно із початком запуску біофільтра.

Оцінювання санітарного стану води УЗВ за гістологічними змінами органів і тканин малька райдужної форелі під час формування мікробіоценозу біофільтра. У зв'язку з постійним контактом із оточуючим водним середовищем головною мішенню токсикантів є зябра. Досліджуючи гістологічні препарати, пофарбовані гематоксиліном та еозином, спостерігали розростання дихального епітелію на кінцях ламел у вигляді барабаних паличок, проліферацію багат шарового незроговілого епітелію. На деяких ділянках філамента багат шаровий епітелій утворював нероздільну епітеліальну пластину з атрофованими ламелями. Мікроскопічний аналіз дав змогу виявити некрози респіраторних клітин за довжиною ламел, а також нерівномірне збільшення самої довжини структури. Подекуди відбувався процес відшарування дихального епітелію з поверхні ламел. Відмічали певну різницю і за товщиною окремих відрізків хрящової пластинки.

Збільшення тривалості часу впливу токсиканту і його висока концентрація у воді призводили до появи у вторинному зябровому епітелії слизових клітин. Виявлено гіпертрофію та гіперплазію бокалоподібних клітин. Судини зяберних дуг були гіперемійованими і кровонаповненими. За тривалого впливу нітритів найбільш виражені зміни спостерігаються зі сторони кровоносних судин зябрових дуг: вони були кровонаповненими, значна частина судин була розширеною, в окремих випадках візуалізувалися поодинокі крововиливи. Відмічали дезінтеграцію клітин респіраторного епітелію на верхівках ламел та їх некроз.

Під час запуску біофільтра було виявлено гістологічні зміни у будові печінки. Встановлено, що на початковому етапі нітритного отруєння молоді райдужної форелі, яке виникає під час запуску біофільтра, судини печінки були наповнені кров'ю і розташовувались між печінковими пластинками (балками). Печінкові пластинки зазвичай були утворені двома рядами гепатоцитів.

Збільшення часу перебування риби у токсичному середовищі і високий уміст у воді нітритів приводять до значного кровонаповнення підчасточкових вен, які давали початок печінковим венам. Паренхіма печінки малька райдужної форелі складалася з гепатоцитів, які мали невеликий розмір і містила невеликі, округлої або овальної форми ядра. Надалі спостерігали точкові та вогнищеві крововиливи в паренхімі печінки, що були локалізовані в різних ділянках. Зокрема, характерними є крововиливи в підкапсулярній зоні печінки.

Гістологічні зміни у печінці малька райдужної форелі були пропорційні часу дії на рибу та дозі нітритів у воді УЗВ. Довготривале перебування молоді риби в несприятливих умовах (перевищення гранично допустимої концентрації нітритів), що виникали під час запуску біофільтра установки замкнутого водовикористання, наростали явища деструкційного характеру – некроз гепатоцитів, який проявлявся змінами клітинного ядра (рис. 6 А), а також білкова зерниста дистрофія гепатоцитів (рис. 6 Б).

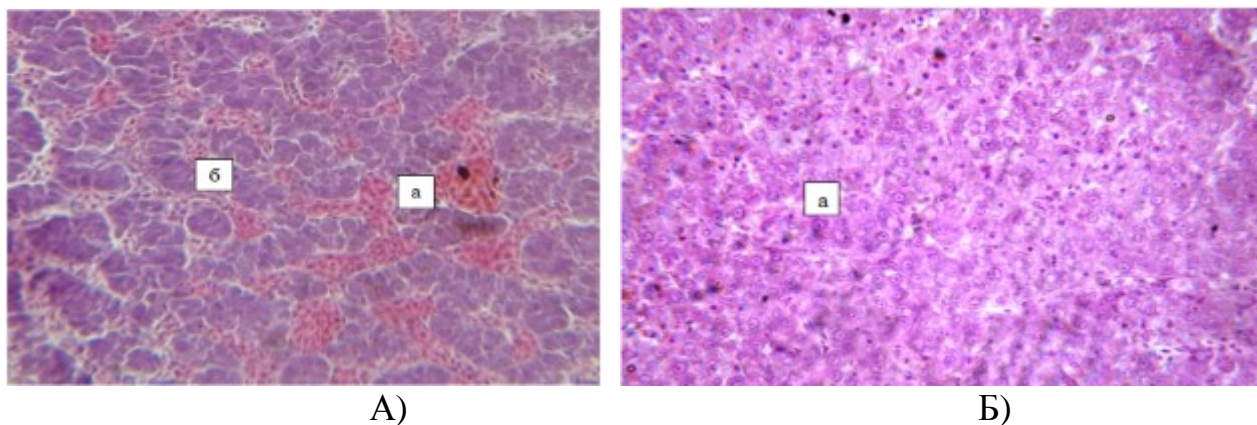


Рис. 6 (А, Б). Фрагменти мікроструктури печінки форелі: А) а – кровонаповнені судини; б – некроз гепатоцитів; Б) а – білкова зерниста дистрофія гепатоцитів (Гематоксилін та еозин $\times 120$)

Некроз призводить до погіршення кровопостачання печінки, відтак до погіршення роботи органу. В результаті кров одразу ж потрапляє в загальний кровообіг, накопичуючи продукти обміну і отруюючи організм.

За впливу токсичних речовин змін зазнає і видільна система риб. У нирках міжканальцева тканина мала високий ступінь набряку. В паренхімі нирок зустрічались крововиливи з появою гемосидерину. Ниркові клубочки мали пухку консистенцію, відмічалось нерівномірне звуження порожнини за рахунок гіперплазії мезонефросу і повнокрів'я клубочків. У ниркових каналцях молоді райдужної форелі також виявили білкову дистрофію, що свідчить про порушення фільтрації і реабсорбції в нирках риби.

Оцінювання санітарного стану УЗВ за кількістю мікроядер в клітинах зябер малька райдужної форелі під час формування мікробіоценозу біофільтра. Вивчення впливу несприятливих чинників на малька райдужної форелі, що виникають під час запуску біофільтра, проводили у чотири періоди, кожен з яких тривав 10 діб і лише останній – 5 діб (рис. 7). Останній період виявився найкоротшим через зниження, майже до норми, у воді нітритів, утворення

біоплівки на поверхні наповнювача біофільтра, що підтверджувалося інтенсивною діяльністю мікроорганізмів-денітрифікаторів. Встановлено, що впродовж всього періоду запуску біофільтра УЗВ у клітинах зябер малька райдужної форелі з'являються мікроядра, що вказує на погіршення фізіологічного стану риби і мутагенність ендогенно утворених у воді нітритів. На 10-у добу від запуску в дію нового біофільтра, що збігалось з початком формування біоплівки на поліпропіленовому наповнювачі RK PLAST для УЗВ, кількість мікроядер у клітинах зябер малька райдужної форелі становила 1,04 мікроядерцець. На 20-у добу досліду, коли у воді УЗВ був найвищий рівень нітритів, кількість мікроядер у клітинах зябер риби зросла на 79,8% порівняно із 10-ю добою досліджень і становила 1,87 мікроядерцець.

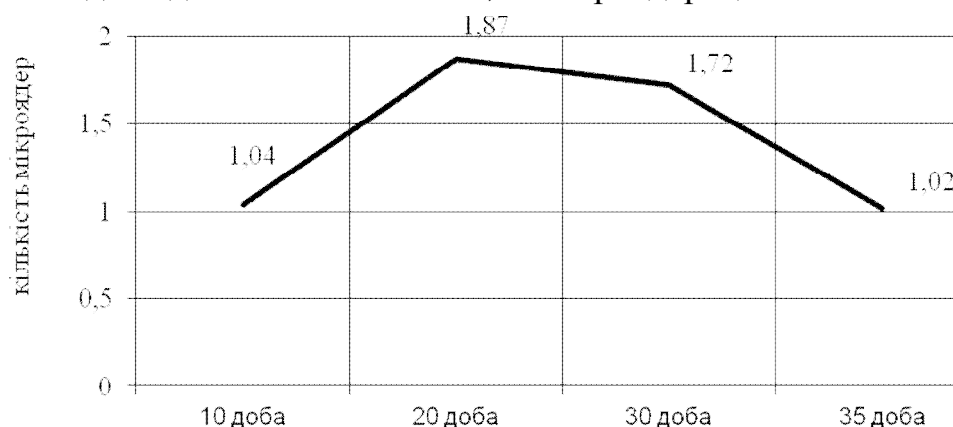


Рис. 7. Зміна кількості мікроядер у клітинах зябер малька райдужної форелі під час запуску біофільтра УЗВ за використання поліпропіленового наповнювача RK PLAST

На 30-у добу від запуску біофільтра нами відмічено зниження кількості мікроядер у клітинах зябер малька райдужної форелі до 1,72 мікроядерцець порівняно з 20-ю добою досліджень, що свідчить про завершення формування мікробної біоплівки на поверхні наповнювача RK PLAST і зниження рівня у воді УЗВ нітритів. Найменшу кількість мікроядер у клітинах зябер малька райдужної форелі було виявлено на 35-у добу від початку запуску біофільтра – 1,02 мікроядерця, не зважаючи навіть на те, що у воді УЗВ був найнижчий рівень нітритів.

У результаті проведеного гістологічного оцінювання клітин зябер райдужної форелі було виявлено три типи мікроядер. До 1-го типу було віднесено клітини зябер малька райдужної форелі, що містили 1 мікроядро, яке знаходилося на великій відстані від основного ядра, до 2-го типу – клітини зябер, що містили 2 мікроядра, які знаходилися ближче до периферії клітин, і до 3-го типу – клітини зябер, що містили 3 і більше мікроядер. Переважна більшість клітин зябер райдужної форелі містила по 1–2 (80%), а також зустрічалися клітини з 3 мікроядрами.

Отже, формування корисної мікрофлори в біофільтрі для УЗВ має важливе значення для нормального функціонування організму райдужної форелі в умовах системи замкнутого водопостачання, про що свідчить зміна кількості ядерцець у клітинах зябер. Максимальна кількість пошкоджених

хромосом спостерігається упродовж перших двадцяти діб утримання, коли біоплівка знаходиться на перших етапах формування. Мінімум мікроядер зафіксовано на 35-у добу від запуску біофільтра, коли біоплівка повністю сформувалася на поверхні поліпропіленового наповнювача RK PLAST.

Спосіб підвищення виживаності райдужної форелі вітамінно-кормовою добавкою «Ганаміновіт».

У попередніх дослідженнях встановлено, що райдужна форель під час запуску УЗВ зазнає впливу токсичної дії нітритів. Внаслідок цього в риби знижується імунний статус, приріст та виживаність. Тому для покращення вище зазначених характеристик нами було апробовано згодовування молоді райдужної форелі вітамінно-кормової добавки «Ганаміновіт» після запуску УЗВ. На рис. 8 наведено дані щодо впливу препарату на приріст маси тіла у риби впродовж 30-ти добового періоду тривалості дослідю.

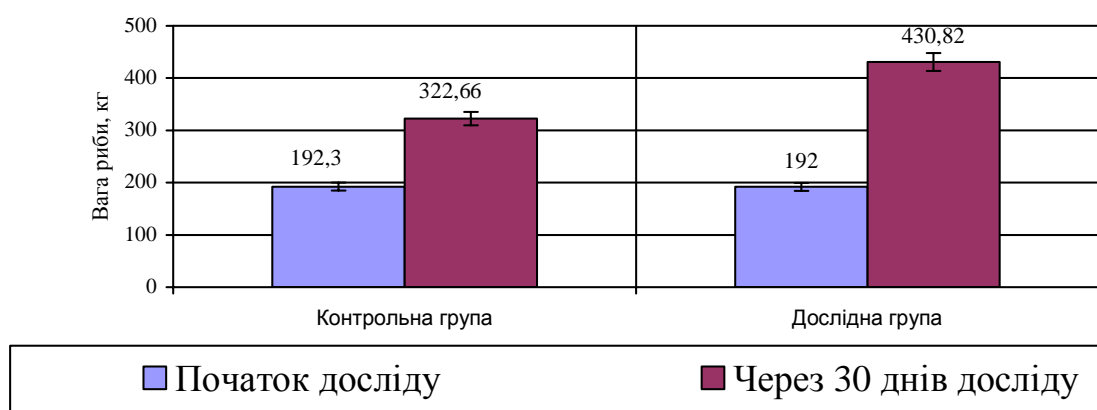


Рис. 8. Вплив вітамінно-кормової добавки «Ганаміновіт» на приріст маси тіла молоді райдужної форелі, n = 20 000

Встановлено, що у контрольній групі упродовж дослідного періоду маса тіла риби збільшилася в середньому 1,7 рази ($p < 0,05$). У дослідній групі, в якій риба додатково отримувала «Ганаміновіт», збільшення маси тіла відбулося в 2,2 рази ($p < 0,05$). Тобто за згодовування «Ганаміновіту» 10 000 шт. молоді райдужної форелі з початковою масою 19 ± 1 г ми отримали на 108,12 кг більше приросту порівняно з контролем.

Отже, можна стверджувати, що вітамінно-кормова добавка «Ганаміновіт» посилює метаболічні процеси в організмі райдужної форелі і сприяє збільшенню живої маси.

Вплив згодовування плідникам райдужної форелі «Ганаміновіту» на виживання заплідненої ікри та передличинок. Встановлено (табл. 4), що в досліді кількість загиблих личинок від першого дня інкубації ікри до виходу личинки масою 3 г зменшується порівняно з контрольною групою і залежить від часу використання плідниками добавки. Так, у 2015 році від плідників, яким згодовували «Ганаміновіт» впродовж 2 місяців виживання ікри було вищим, загибель становила 37%, у контролі – 61,7%. Тимчасом у 2016 році загибель зменшилася до 28,3%, тобто кількість загиблих ікринок у 2016 році виявили в 1,6 рази менше ($p < 0,05$), ніж у 2015 році. Таке високе виживання ікри і вихід личинок форелі у 2016 році вважаємо пов'язано з повторним використанням

плідникам вітамінно-кормової добавки, адже 85,0% плідників залишилися з попереднього року.

Отже, результати досліджень вказують на те, що вітамінно-кормову добавку «Ганаміновіт» можна ефективно використовувати у форелівництві в УЗВ для підвищення виживаності, збільшення приросту молоді райдужної форелі. Також згодовування плідникам форелі з метою покращення виживання заплідненої ікри.

Таблиця 4

Вплив згодовування плідникам райдужної форелі «Ганаміновіту» на виживаність заплідненої ікри на стадії вічка і передличинки, $X \pm x_m$, $n = 5000$

Місяці досліджень	Групи	Роки дослідження			
		2015		2016	
		Кількість загиблих ікринок		Кількість загиблих ікринок	
		n	%	n	%
Листопад	К	275,7±0,5	5,5±0,1	205,4±0,2	4,1±0,1
	Д	284,3±0,4	5,7±0,2	217,6±0,2	4,3±0,2
Грудень	К	1138,1±0,6	22,7±0,2	1206,7±0,4	24,1±0,2
	Д	893,5±0,5	17,8±0,2	656,5±0,3	13,1±0,3
Січень	К	694,7±0,4	13,9±0,1	1004,3±0,5	20,0±0,2
	Д	386,2±0,3	7,4±0,3	361,7±0,2	7,2±0,1
Лютий	К	504,1±0,4	10,1±0,2	266,3±0,2	5,3±0,1
	Д	209,7±0,2	4,2±0,1	114,9±0,1	2,3±0,2
Березень	К	473,6±0,4	9,5±0,1	291,6±0,2	5,8±0,2
	Д	94,5±0,2	1,9±0,1	72,4±0,1	1,4±0,1
Всього	К	3084,1±0,5	61,7±0,3	2972,9±0,5	79,4±0,3
	Д	1866,4±0,6	37,0±0,2*	1420,5±0,4	28,3±0,2*

Примітка: К – контроль; Д – дослід; * – $p < 0,05$ – порівняно з контролем.

Розроблення способу знезараження води в УЗВ за вирощування райдужної форелі. Попередні дослідження виявили, що під час вирощування риби в УЗВ відбувається поступове зростання мікробного обсіменіння води. Велика кількість мікроорганізмів у воді негативно впливає на життєдіяльність форелі, оскільки виникають різні захворювання бактеріального походження (псевдомоноз, аеромоноз та ін.). Для запобігання таким явищам необхідно проводити профілактичну дезінфекцію води в басейнах УЗВ. Однак в УЗВ проведення дезінфекції є проблематичним через можливість нанести шкоду корисним мікроорганізмам, які населяють реактор біофільтра. Нами розроблено спосіб дезінфекції води в інкубаторах та підросувальних системах для райдужної форелі, шляхом встановлення ультрафіолетових бактерицидних ламп потужністю 30 Вт і випромінюванням з довжиною хвилі 254 Нм на висоті не більш як 50 см над поверхнею води. Встановлено (табл. 5), що УФ промені за біофільтром незначною мірою впливають на нітрифікуючі бактерії води. Їх

кількість зменшувалася всього на один порядок як у поверхневому шарі, так і на глибині 7–10 см. У пробах, відібраних з глибини 17–20 см, кількість нітрифікуючих бактерій виявилася навіть вищою порівняно з водою, що не піддавалася дезінфекції. Отже, ультрафіолетові промені бактерицидної лампи не впливають на нітрифікуючі бактерії, які розвиваються на глибині 17–20 см, ймовірно у біоплівці, яка захищає їх від згубної дії факторів навколишнього середовища. Разом з тим, відмічено згубну дію 0,5% хлораміну на мікроорганізми, що досліджували, адже їх кількість знижувалася на 3–4 порядки.

Таблиця 5

Кількість нітрифікуючих бактерій у воді за різних способів дезінфекції установок замкнутого водопостачання, $\bar{X} \pm x_m$, $n = 10$

Об'єкт дослідження	Кількість нітрифікуючих бактерій, КУО/см ³ води			
	до дезінфекції	після дезінфекції бактерицидною лампою	до дезінфекції	після дезінфекції хлораміном
Вода за біофільтром:				
поверхневий шар	$4,7 \pm 0,25 \times 10^6$	$2,6 \pm 0,15 \times 10^5$	$3,3 \pm 0,28 \times 10^6$	$1,8 \pm 0,16 \times 10^{2*}$
на глибині 7–10 см	$2,5 \pm 0,21 \times 10^6$	$1,1 \pm 0,18 \times 10^5$	$2,8 \pm 0,25 \times 10^6$	$2,1 \pm 0,20 \times 10^{2*}$
на глибині 17–20 см	$2,1 \pm 0,11 \times 10^6$	$2,7 \pm 0,67 \times 10^6$	$1,9 \pm 0,18 \times 10^6$	$2,2 \pm 0,15 \times 10^{3*}$
Вода з біофільтра:				
поверхневий шар	$6,4 \pm 0,27 \times 10^7$	$4,1 \pm 0,33 \times 10^7$	$4,5 \pm 0,41 \times 10^7$	$3,4 \pm 0,26 \times 10^{4*}$
на глибині 7–10 см	$4,1 \pm 0,36 \times 10^7$	$4,5 \pm 0,37 \times 10^7$	$2,4 \pm 0,24 \times 10^7$	$5,7 \pm 0,43 \times 10^{3*}$
на глибині 17–20 см	$2,9 \pm 0,21 \times 10^7$	$3,2 \pm 0,25 \times 10^7$	$2,0 \pm 0,17 \times 10^7$	$8,6 \pm 0,54 \times 10^{3*}$

Примітка: * – $p < 0,05$ – порівняно з водою до дезінфекції

Подібні зміни кількості нітрифікуючих бактерій також виявлено у воді, відібраній з біофільтра, де їх кількість знаходилася в межах від $2,9 \pm 0,21 \times 10^7$ до $6,4 \pm 0,27 \times 10^7$ КУО/см³ води. Згубна дія хлораміну поширювалася на мікроорганізми біофільтра, адже у цій точці їх кількість була нижчою на 3–4 порядки порівняно з водою, що не піддавалася дезінфекції.

Отже, розроблений спосіб знезараження води в УЗВ за допомогою ультрафіолетової бактерицидної лампи дає змогу значно безпечніше проводити дезінфекцію води, порівняно з антимікробними препаратами.

Розроблення діагностичної тест-системи для виявлення *Flavobacterium psychrophilum* у райдужної форелі. Флавобактеріоз («хвороба холодної води») визначено одним із найнебезпечніших для сучасної аквакультури, і виявлення його збудника у популяціях об'єктів рибництва є важливим санітарно-гігієнічним заходом. На основі методу ПЛР-РЧ (технологія *TaqMan*) було розроблено діагностикум для виявлення та ідентифікації *Flavobacterium psychrophilum* у риби. Пару праймерів з зондом FPGyxB для ідентифікації ДНК збудника було підібрано за допомогою комп'ютерної програми Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). Для цього було використано послідовність гена *GyrB*

(ДНК-гіраза, субодиниця В; GenBank: KT809647.1). Обраний зонд було мічено флуоресційним барвником HEX та гасником флуоресценції ВHQ1.

Перевірку специфічності роботи праймерів, підібраних для ідентифікації *F. psychrophilum*, здійснювали шляхом тестування зразків ДНК, ізольованих із таких культур як *F. columnare*, *F. branchiophilum*, *F. oncorynchi*, *P. fluorescens*, *Aeromonas salmonicida*, *Shewanella putrefaciens*. Пробу розглядали як позитивну на присутність бактерій *F. psychrophilum* у тому випадку, якщо сигнал флуоресценції детектувався за каналом HEX, а значення Ct варіювало з 10 по 40 цикл, залежно від кількості бактеріальної ДНК. Відповідно, пробу розглядали як негативну, якщо сигнал за каналом HEX був відсутній. Перехресних реакцій при цьому виявлено не було та встановлено 100% специфічність підібраних праймерів. Розраховане значення ефективності ПЛР для праймерів FPGyrV становило 95,8%, що свідчить про високу ефективність розробленої тест-системи. Аналітична чутливість розробленої ПЛР-системи становить приблизно 1×10^{-6} нг або $3,33 \times 10^{-1}$ копій/мкл.

Розроблення системи НАССР для повносистемного індустріального форелевого господарства. Враховуючи результати аналізу і опис ризиків за вирощування форелі в УЗВ нами встановлено 5 критичних точок контролю.

1 точка – на виході води із свердловини: визначення мікробного числа, колі-титру, вмісту нітритів, нітратів і мінерального складу;

2 точка – вода у градирні: визначення температури;

3 точка – вода на вході у басейн: визначення мікробного числа, колі-титру і бактерій роду *Pseudomonas*, температури;

4 точка – механічний і біологічний фільтри: визначення у воді мікробного числа, колі-титру, активності нітрит- і нітратредуктази, вмісту нітритів, нітратів, рівня величини рН і визначення коефіцієнта мутності;

5 точка – риба на всіх етапах вирощування: визначення збудників, що можуть викликати захворювання, протоколи лікування і розробка превентивних заходів, залишкові кількості ветеринарних препаратів (антибіотики) та інше.

Економічна ефективність. Застосування, під час запуску біофільтра мікробіологічного стартера «Фільтронорм Д» сприяє зменшенню у 5 разів загину молоді райдужної форелі та економічна ефективність при вирощуванні 1000 шт. райдужної форелі становить 1694,68 грн. Економічний ефект від застосування вітамінно-кормової добавки «Ганаміновіт» для годівлі 10 000 шт. молоді райдужної форелі після запуску біофільтра становить 17292,6 грн., внаслідок підвищення виживаності і продуктивності.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі обґрунтовано та розроблено комплекс санітарно-гігієнічних показників з оцінки ефективності роботи біофільтра УЗВ за вирощування райдужної форелі. Встановлено динаміку нітрифікуючого процесу в реакторі біофільтра за використання різних типів наповнювачів та виявлено залежність цього процесу від типу наповнювача, кількісного вмісту нітрифікуючих і денітрифікуючих мікроорганізмів, щільності сформованих мікробних біоплівки. Розроблено мікробіологічний стартер наповнювача

біофільтра «Фільтронорм Д» для швидкого формування активного нітрифікуючого мікробіоценозу біофільтра. Доведена доцільність застосування способу знезараження води в УЗВ ультрафіолетовою бактерицидною лампою. Встановлено позитивний вплив вітамінно-кормової добавки «Ганаміновіт» на організм райдужної форелі за рахунок збільшення приросту.

1. У результаті дослідження гідрохімічних та токсикологічних показників води в установках замкнутого водопостачання для вирощування райдужної форелі виявлено незначні сезонні коливання значень показників якості використовуваної та стічної води. Незначне збільшення в 1,2–1,3 рази, ($p < 0,05$) вмісту феруму спостерігали у воді УЗВ у березні і грудні. Уміст основних токсикантів – нітратів, нітритів, солей амонію та важких металів (Кадмій, Плюмбум, Цинк) – у воді УЗВ та стічних водах впродовж року не перевищував ГДК, відтак, ці сполуки не чинили негативного впливу на рибу і навколишнє природне середовище.

2. Під час вирощування форелі в модулях УЗВ змінюється мікробіоценоз і наростає мікробне «навантаження» на організм риби. Найбільшу кількість МАФАНМ містить вода, відібрана в біотопі механічного фільтра – $5,04 \text{ Ig КУО/см}^3$. Домінуючою у воді модулів УЗВ є психротрофна мікрофлора, її кількість у 1,2–1,3 рази ($p < 0,05$) перевищує кількість МАФАНМ. Серед психрофільних мікроорганізмів найбільша частка припадає на бактерії роду *Pseudomonas* – від 18,2 до 75% залежно від технологічного етапу (біотопу).

3. Істотний вплив на колонізацію біофільтра нітрифікуючою мікрофлорою, щільність утвореної біоплівки, відтак активне включення біофільтра у процес нітрифікації залежить від типу наповнювача. З-поміж досліджених керамзитового та поліпропіленових наповнювачів RK PLAST, AQ-25 і KALDNER K1П найшвидшому розмноженню нітрифікуючих мікроорганізмів і формуванню найщільнішої (понад 2,5 од оптичної густини) біоплівки у воді реактора біофільтра сприяв наповнювач RK PLAST. Кількість нітрифікуючої мікрофлори за його використання була в середньому у 1,2–2,2 рази ($p < 0,05$) більшою, а щільна мікробна плівка формувалась на 5–10 діб раніше, ніж за використання інших наповнювачів. Активне включення біофільтра у процес нітрифікації за використання поліпропіленових наповнювачів відбувається з 20-ї доби запуску УЗВ, тимчасом за використання керамзитового – з 25-ї доби.

4. Встановлено, що за використання поліпропіленових наповнювачів біофільтра RK PLAST, AQ-25 і KALDNER K1П концентрація нітритів у воді наростала до 20-ї доби від початку запуску УЗВ і становила $1,5 \pm 0,1$, $1,6 \pm 0,1$ і $1,7 \pm 0,1 \text{ мг/дм}^3$ відповідно, а за керамзитового наповнювача – до 25-ї доби і становила $1,9 \pm 0,1 \text{ мг/дм}^3$. З 20 до 30-ї доби запуску УЗВ за використання наповнювачів RK PLAST, AQ-25 і KALDNER K1П кількість нітритів знизилася в 1,5 і 1,3 рази ($p < 0,05$), а за керамзитового – в 1,3 рази. Це вказує на активне включення біофільтра у нітрифікуючий процес саме за поліпропіленових наповнювачів.

5. Знезараження води в УЗВ ультрафіолетовою бактерицидною лампою потужністю 30 Вт і довжиною хвилі 254 Нм, розміщеною на висоті не більше

50 см над поверхнею води, дає змогу значно безпечніше проводити дезінфекцію в інкубаторах та підрощувальних системах для райдужної форелі порівняно з антимікробними препаратами, не порушуючи мікробіоценозу наповнювача реактора біофільтра. Кількість основних нітрифікуючих бактерій у біофільтрі після дезінфекції бактерицидною лампою становила $3,9 \pm 0,16 \times 10^7$ КУО/см³ води, що на чотири порядки більше, ніж при дезінфекції хлораміном.

6. Застосування мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д» під час запуску УЗВ для вирощування райдужної форелі забезпечує позитивний вплив на мікробіоценоз біофільтра, сприяє швидшому (на 2–3 порядки) збільшенню кількості нітрифікуючих і денітрифікуючих мікроорганізмів, повільнішому (у середньому в 1,5 рази) зростанню концентрації нітритів у воді, відтак, дає можливість на 10 діб швидше сформувати активний мікробіоценоз біофільтра і запустити систему замкнутого водопостачання для безпечного вирощування форелі. Відсутність гострої і хронічної токсичної дії «Фільтронорму Д» доведено на тест-об'єктах – рибках гуппі (*Poecilia reticulata* Peters) та інфузоріях (*Tetrachymena pyriformis*).

7. Активізацію метаболічних процесів в організмі риб, підвищення виживаності молоді райдужної форелі уможливорює використання для її підгодівлі вітамінно-кормової добавки «Ганаміновіт». Так, упродовж 30-ти добового періоду згодовування добавки відхід риби зменшився в 1,5 рази, приріст живої маси збільшився в 1,3 рази ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою. Крім того, зазначена добавка сприяє підвищенню виходу личинки від моменту запліднення ікри в середньому в 1,7 рази ($p < 0,05$). Повторне використання плідників, яким у попередньому році впродовж двох місяців, до та після нересту та у наступному році до нересту, разом з екструдованими комбікормами давали «Ганаміновіт», підвищує в 2,8 рази ($p < 0,05$) збереження життєздатності ікри від першого дня її інкубації і до виходу личинки масою 3 г. За рахунок зростання маси в 1,3 рази ($p < 0,05$) під час переходу на активне живлення підвищується також продуктивний ефект личинки.

8. Найбільш критичним для виживаності райдужної форелі в УЗВ є період з 16 до 20-ї доби з моменту запуску біофільтра, про що свідчать гематологічні показники. У цей період у крові знижується на 18,1% кількість еритроцитів та середня концентрація гемоглобіну на 11,5%. Разом з тим, на 13,8% збільшується середній об'єм одного еритроцита малька райдужної форелі та на 26,4% вміст метгемоглобіну порівняно з початком запуску біофільтра.

9. На початковому етапі запуску біофільтра і початку нітритного отруєння риби виявлено значні патологічні зміни у зябровому епітелії, печінці та нирках малька райдужної форелі (гіпертрофію та гіперплазію бакалоподібних клітин, некроз гепатоцитів, білкову дистрофію ниркових каналців та ін.). Довготривале перебування молоді риби в несприятливих умовах призводило до поглиблення деструктивних процесів в досліджених органах і тканинах суціль до їх атрофії і некрозу.

10. Максимальна кількість хромосомних аберацій у клітинах зябер райдужної форелі спостерігалась упродовж перших двадцяти діб вирощування і

становила 1,87 мікроядер, що на 79,8% ($p < 0,05$) більше, порівняно з 10-ю добою досліджень. Мінімум мікроядер зафіксовано на 35-у добу запуску біофільтра – 1,02 мікроядер, тобто у час, коли біоплівка повністю сформувалася на поверхні поліпропіленового наповнювача RK PLAST.

11. Розроблена діагностична тест-система для визначення бактерій *Flavobacterium psychrophilum* за використання технології *TaqMan* методу полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі дає змогу на ранніх стадіях розвитку діагностувати у райдужної форелі флавобактеріоз. Для конструювання діагностикуму було використано праймери і зонд до гена *GyrB* ДНК-гірази бактерії *Flavobacterium psychrophilum*, специфічність праймерів становить 100%.

12. Для забезпечення належного керування небезпечними чинниками за повноциклового вирощування форелі в УЗВ встановлено п'ять критичних точок контролю: 1 точка – на виході води із свердловини: визначення мікробного числа, колі-титру, вмісту нітритів, нітратів і мінерального складу; 2 точка – вода у градирні: визначення температури; 3 точка – вода на вході у басейн: визначення мікробного числа, колі-титру і бактерій роду *Pseudomonas*, температури; 4 точка – механічний і біологічний фільтри: визначення у воді мікробного числа, колі-титру, активності нітрит- і нітратредуктази, вмісту нітритів, нітратів, рівня величини рН і визначення коефіцієнта мутності; 5 точка – риба на всіх етапах вирощування: визначення збудників, що можуть викликати захворювання, залишкові кількості ветеринарних препаратів.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для забезпечення сталого ветеринарного благополуччя, здоров'я і високої продуктивності райдужної форелі під час вирощування в УЗВ необхідно використовувати комплекс санітарно-гігієнічних розробок.

1. Для безпечної дезінфекції води в модулях УЗВ без порушення мікробіоценозу використовувати запропонований «Спосіб дезінфекції води за вирощування райдужної форелі в умовах замкнутого водопостачання».

2. З метою оцінки інтенсивності колонізації і формування мікробних біоплівок на наповнювачі реактора біофільтра використовувати розроблений «Спосіб оцінки функціонування реактора біофільтра установки замкнутого водопостачання» та методичні рекомендації «Використання різних типів наповнювача біофільтра для забезпечення санітарно-гігієнічних умов відтворення та вирощування райдужної форелі в системі замкнутого водопостачання».

3. З метою профілактики нітритного отруєння райдужної форелі під час запуску УЗВ або після проведення лікувально-профілактичних заходів щодо інфекційних хвороб застосовувати розроблений мікробіологічний стартер наповнювача біофільтра форелевого інкубатора в установках замкнутого водопостачання «Фільтронорм Д» ТУ України 10.9-00493712-001:2017.

4. Для підвищення імунітету, виживаності та приросту молоді райдужної форелі, а також для годівлі плідників райдужної форелі з метою підвищення

продуктивного ефекту личинки пропонується використовувати вітамінно-кормову добавку «Ганаміновіт».

5. Результати досліджень рекомендовано до використання у науковій роботі та навчальному процесі при підготовці фахівців спеціальності «Ветеринарна медицина», «Водні біоресурси та аквакультура» у вищих навчальних закладах III-IV рівня акредитації України.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ **Наукові праці, у яких опубліковані основні наукові результати дисертації**

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. **Гриневич, Н. Є.** (2008). Застосування стередиалу W – 5 та формаліну для профілактики і лікування молоді райдужної форелі за іхтіофтіріозу. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини і біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 10, 2 (37), (1), 49–53. (Дисертанткою проведено дослідження щодо дезінфекції води за вирощування молоді райдужної форелі та підготовлено матеріали до друку).

2. **Гриневич, Н. Є.,** Клименко, О. М. та Слюсаренко, А. О. (2009). Особливості гістоструктури м'язової тканини латеральних м'язів сома звичайного. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 11, 2 (41), (2), 145–150. (Дисертанткою досліджено гістологію м'язових волокон сома звичайного за його вирощування в індустріальних умовах та підготовлено матеріали до друку).

3. **Гриневич, Н. Є.** (2010). Ергазильоз райдужної форелі. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 12, 3 (45), (1), 28–30. (Дисертанткою проведено моніторингові дослідження із вивчення паразитофауни райдужної форелі в індустріальних господарствах та підготовлено матеріали до друку).

4. **Гриневич, Н. Є.** та Слюсаренко, А. О. (2011). Структура м'язової тканини латеральних м'язів форелі райдужної. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 13, 4 (50), (2), 218–221. (Дисертанткою досліджено гістологію м'язових волокон райдужної форелі за її вирощування в індустріальних умовах та підготовлено матеріали до друку).

5. **Гриневич, Н. Є.** (2012). Йерсеніоз лососевих риб. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 14, 2 (52), (1), 56–58. (Дисертанткою проведено моніторингові дослідження із вивчення інфекційних хвороб райдужної форелі в індустріальних господарствах та підготовлено матеріали до друку).

6. **Гриневич, Н. Є.** (2014). Динаміка інвазії *Mухobolus displar* у цьоголітки коропа. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 16, 3 (60), (1), 91–95. (Дисертанткою проведено дослідження гідрохімічних, гідробіологічних показників води, запропоновано комплексну систему профілактики вирощування коропа в аквакультурі, підготовлено матеріали до друку).

7. Барило, Є. О. та **Гриневич, Н. Є.** (2015). Морфометричні та біохімічні показники лососевих риб. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 17, 1 (61), (3), 12–17. (Дисертанткою проведено дослідження морфологічних та гематологічних показників райдужної форелі за індустріального вирощування та підготовлено матеріали до друку).

8. **Гриневич, Н. Є.** (2016). Особливості використання біофільтрів з різними типами наповнювача в установках замкнутого водопостачання в аквакультурі. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 18, 3 (70), 57–61. (Дисертанткою проведено огляд літературних джерел, які відображають особливості функціонування установок замкнутого водопостачання та підготовлено матеріали до друку).

9. **Гриневич, Н. Є.** та Димань, Т. М. (2016). Сезонні зміни гідрохімічних показників води за використання установок замкнутого водопостачання для вирощування райдужної форелі. *Науковий вісник ветеринарної медицини: зб. наук. праць*, 2 (130), 33–39. (Дисертанткою проведено дослідження гідрохімічних показників води, в індустріальних рибних господарствах та підготовлено матеріали до друку).

10. **Гриневич, Н. Є.** та Дунаєвська, О. Ф. (2017). Перспективи морфологічних досліджень в аквакультурі. *Вісник Житомирського національного агроекологічного університету*, 3, 1 (60), 42–46. (Дисертанткою проведено аналіз даних літератури щодо морфологічних досліджень – складової біомоніторингу в аквакультурі та підготовлено матеріали до друку).

11. **Гриневич, Н. Є.** (2017). Вплив мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д» на інтенсивність нітрифікуючих процесів мікрофлори реактора біофільтра під час запуску УЗВ для вирощування райдужної форелі. *Аграрний вісник Причорномор'я: зб. наук. праць*, 83, 33–38. (Дисертанткою проведено дослідження на інтенсивність нітрифікуючих процесів в індустріальних форелевих господарствах та підготовлено матеріали до друку).

12. **Гриневич, Н. Є.**, Димань, Т. М., Кухтин, М. Д., Семанюк, В. І. та Слюсаренко, А. О. (2017). Ідентифікація небезпечних чинників під час вирощування райдужної форелі в умовах замкнутого водопостачання. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 19, (78), 48–52. (Дисертанткою проведено моніторинг небезпечних чинників та ступеню вірогідності потенційних небезпек в індустріальних форелевих господарствах та підготовлено матеріали до друку).

13. **Гриневич, Н. Є.** (2017). Вміст нітрифікуючих мікроорганізмів у воді реактора біофільтра установки замкнутого водопостачання за використання різних типів наповнювача. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 19, (82), 184–187. (Дисертанткою проведено моніторинг вмісту

нітрифікуючих організмів на різних типах наповнювача в індустріальних форелевих господарствах та підготовлено матеріали до друку).

14. **Гриневич, Н. Є.** (2017). Вплив згодовування плідникам райдужної форелі ганаміновіту на виживання заплідненої ікри та передличинок. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 19, (73), 33–37. (Дисертанткою проведено моніторинг результату під час згодовування плідникам райдужної форелі мінерально-вітамінної добавки ганаміновіт та підготовлено матеріали до друку).

15. **Гриневич, Н. Є.** (2017). Мікроорганізми процесів нітрогенного циклу у воді реактора біофільтра в установках замкнутого водопостачання за використання різних наповнювачів. *Науковий вісник ветеринарної медицини: зб. наук. праць*, 1 (133). 131–136. (Дисертантка брала участь у експериментальних дослідженнях під час ідентифікації мікроорганізмів процесів нітрогенного циклу в індустріальних форелевих господарствах та підготовлено матеріали до друку).

16. **Гриневич, Н. Є.** (2017). Оцінка токсичності мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д» для вирощування райдужної форелі за показниками виживаності риб гуппі та інфузорій. *НТБ ДНДКІ вет. преп. та корм. доб.*, 18, (2), 219–224. (Дисертантка брала участь у експериментальних дослідженнях під час визначення токсичності мікробіологічного стартера «Фільтронорм Д» та підготовлено матеріали до друку).

17. **Гриневич, Н. Є.**, Кухтин, М. Д. та Семанюк, В. І. (2017). Формування мікробіоценозу біофільтра в індустріальних форелевих господарствах за використання різних наповнювачів. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. м. Біла Церква, 2. 36–41. (Дисертантка брала участь у експериментальних дослідженнях під час запуску біофільтра в індустріальних форелевих господарствах та підготовлено матеріали до друку).

18. Присяжнюк, Н. М., **Гриневич, Н. Є.**, Хом'як, О. А., Куновський, Ю. В. та Михальський, О. Р. (2017). Хижі риби як тест-об'єкт біоіндикації природних водойм за антропогенного навантаження. *Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК*, 5, (4), 31–36. (Дисертанткою проведено аналіз даних літератури щодо біоіндикації водойм за антропогенного навантаження та підготовлено матеріали до друку).

Статті у фахових наукових виданнях інших держав:

19. **Гриневич, Н. Е.**, Головаха, В. И. и Слюсаренко, А. А. (2018). Изменение микрофлоры воды при дезинфекции в индустриальных форелевых хозяйствах Украины с замкнутым водоснабжением. *Ученые записки УО ВГАВМ*, 54, (1), 137–139. (Дисертантка брала участь у експериментальних дослідженнях під час розробки способу дезінфекції в індустріальних форелевих господарствах та підготовлено матеріали до друку).

Статті індексовані у Web of Science (WOS)

20. **Grynevych, N., Dyman, T., Kukhtyn, M. and Semanyuk, N.** (2017), "Composition of psychrotrophic microflora of water and biofilter filler in recirculation aquaculture system on trout farm", Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 8(3), 900–905. *(Дисертація брала участь у дослідженнях динаміки змін психротрофної мікрофлори під час запуску біофільтра в промислових форелевих господарствах та підготовлено матеріали до друку).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

Патенти України на корисну модель:

1 **Гриневич, Н. Є.**, заявник і власник Білоцерківський національний аграрний університет (2017). Пат. № 118019, Україна МПК А01К 61/00 А23К 50/00. *Спосіб підвищення імунітету райдужної форелі. № а 2016 12546; заявл. 09.12.2016; опубл. 25.07.2017, Бюл. № 14. (ідея способу, проведення досліджень, аналіз одержаних даних, оформлення заявки на корисну модель).*

2. **Гриневич, Н. Є.**, Кухтин, М. Д. та Димань, Т. М., заявник і власник Білоцерківський національний аграрний університет (2017). Пат. № 117950 Україна МПК А01К 61/00 Е02В 15/00 С02F 1/32. *Спосіб дезінфекції води за вирощування райдужної форелі в умовах замкнутого водопостачання. № у 2017 01722; заявл. 23.02.2017; опубл. 10.07.2017, Бюл. № 13. (ідея способу, проведення досліджень, аналіз одержаних даних, оформлення заявки на корисну модель).*

3. Присяжнюк, Н. М., **Гриневич, Н. Є.**, Куновський, Ю. В. та Михальський, О. Р., заявник і власник Білоцерківський національний аграрний університет (2017). Пат. № 119573 Україна МПК G01N 33/12 С12Q 1/12. *Спосіб біоіндикації водойм. № у 2017 04189; заявл. 27.04.2017; опубл. 25.09.2017, Бюл. № 18. (ідея способу, проведення досліджень, аналіз одержаних даних, оформлення заявки на корисну модель).*

4. **Гриневич, Н. Є.** та Кухтин, М. Д., заявник і власник Білоцерківський національний аграрний університет (2017). Пат. № 121437 Україна МПК А01К 61/17. *Спосіб створення мікробіоценозу біофільтра форелевого інкубатора. № у 2017 04747; заявл. 17.05.2017; опубл. 11.12.2017, Бюл. № 23. (ідея способу, проведення досліджень, аналіз одержаних даних, оформлення заявки на корисну модель).*

5. **Гриневич, Н. Є.**, Кухтин, М. Д. та Димань, Т. М., заявник і власник Білоцерківський національний аграрний університет (2018). Заявка на патент *Спосіб оцінки функціонування реактора біофільтра установки замкнутого водопостачання. № у 2018 02069 (28.02.2018). (ідея способу, проведення досліджень, аналіз одержаних даних, оформлення заявки на корисну модель).*

Методичні рекомендації:

1. **Гриневич, Н. Є.**, Димань, Т. М. та Кухтин, М. Д. (2018). *Використання різних типів наповнювача біофільтра для забезпечення санітарно-гігієнічних умов відтворення та вирощування райдужної форелі в системі замкнутого водопостачання. Методичні рекомендації. Біла Церква, 14 с. (підготовка та узагальнення матеріалів, написання рекомендацій).*

2. Облап, Р. В., **Гриневич, Н. Є.**, Новак, Н.Б. та Димань, Т. М. (2018). *Використання полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі для ідентифікації патогенної мікрофлори у продовольчій сировині і харчових продуктах. Методичні рекомендації. Біла Церква, 36 с. (узагальнення матеріалів, написання рекомендацій).*

Технічні умови

1. **Гриневич, Н.Є.** та Кухтин, М.Д. (2017). Технічні умови України 10.9 – 00493712 – 001: 2017. Затверджені ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок від 27.03.2017.

Тези наукових доповідей:

1. **Гриневич, Н. Є.** (2008). Форелівництво в Україні. *Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті: матеріали науково-практичної конференції. м Біла Церква, 68–69.*

2. **Гриневич, Н. Є.** та Соколов, О.І. (2010). Загальні санітарно-профілактичні заходи в ставкових господарствах. *Матеріали науково-практичної конференції. м Кам'янець-Подільський, 65–67.*

3. **Гриневич, Н. Є.** (2011). Значення сортування при вирощуванні товарної продукції форелі. *Міжнародна науково-практична конференція молодих учених, аспірантів, докторантів. м. Біла Церква. 46–47.*

4. **Гриневич, Н. Є.** (2011). Особливості годівлі личинки осетрових риб натуральними кормами. *Аграрна наука – виробництву: тези доповідей Державної науково-практичної конференції “Екологічні проблеми України та шляхи їх вирішення”. м Біла Церква, 4–5.*

5. Слюсаренко, А. О. та **Гриневич, Н. Є.** (2011). Структура м'язової тканини латеральних м'язів форелі райдужної. *Міжнародна науково-практична конференція “Інноваційність розвитку сучасного аграрного виробництва”, присв. Всесвітньому рокові ветеринарної медицини та 130-річчю заснування цісарсько-королівської ветеринарної школи у Львові. м. Львів, 218–221.*

6. **Гриневич, Н. Є.** (2012). Гіродактильоз форелі. *Матеріали науково-практичної конференції. м. Тернопіль, 3–4.*

7. **Гриневич, Н. Є.** (2012). Біологічний, гідробіологічний і біотехнологічний потенціал в рибницькій галузі. *Матеріали науково-практичної конференції. м. Тернопіль, 21–22.*

8. **Гриневич, Н. Є.** (2012). Ефективне використання природної кормової бази в полікультурі. *Аграрна наука – виробництву: тези доповідей Державної науково-практичної конференції “Екологічні проблеми України та шляхи їх вирішення”. м. Біла Церква, 10–11.*

9. **Гриневич, Н. Є.** (2013). Ультразвукографія в аквакультурі. *Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті: тези доповідей Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених, аспірантів та докторантів “Екологічні проблеми України та шляхи їх вирішення”. м. Біла Церква, 12–13.*

10. **Гриневич, Н. Є.** (2014). Формування та утримання ремонтно-маточного стада райдужної форелі. *Тези доповідей Державної науково-практичної конференції “Екологічні проблеми України та шляхи їх вирішення”. м. Біла Церква, 12–13.*

11. **Гриневич, Н. Є.** (2015). Відтворення водних живих ресурсів в об'єктах, які знаходяться на територіях природно-заповідного фонду. *Міжнародна науково-практична конференція молодих учених, аспірантів, докторантів. “Екологічні проблеми сучасного світу та шляхи їх вирішення”*. м. Біла Церква, 12–13.

12. **Гриневич, Н. Є.** (2015). Основи біологічного способу боротьби з *Bothriosephalus achilugnati*. *Тези доповідей Державної науково-практичної конференції молодих учених, аспірантів, докторантів “Екологічні проблеми України та шляхи їх вирішення”*. м. Біла Церква, 4–5.

13. **Гриневич, Н. Є.** (2016). Особливості використання біофільтрів з різними типами наповнювача в установках замкнутого водопостачання в аквакультурі. *Міжнародна науково-практична конференція “Інновації у ветеринарній медицині та аграрному виробництві”*. м. Львів, 57–61.

14. **Гриневич, Н. Є.** (2016). Значення фільтруючих елементів у технологічному процесі рибницьких господарств за замкнутого водопостачання. *Тези доповідей Державної науково-практичної конференції молодих учених, аспірантів, докторантів. “Екологічні проблеми України та шляхи їх вирішення”*. м. Біла Церква, 30–31.

15. **Гриневич, Н. Е.** и Слюсаренко, А. А. (2016). Влияние нитритной интоксикации на форель в промышленных хозяйствах при замкнутом водоснабжении. *Матер. междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых “Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны”*. г. Санкт-Петербург, 56–57.

16. **Гриневич, Н. Є.** (2017). Санітарно-профілактичні заходи в аквакультурі за системи замкнутого водопостачання. *Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції “Проблеми та шляхи інтенсифікації виробництва продукції тваринництва”*. м. Дніпро, 218–219

17. **Гриневич, Н. Є.** (2017). Токсичний вплив аміаку та солей амонію на райдужну форель за вирощування в системі замкнутого водопостачання. *Тези доповідей Міжнародної науково-практичної конференції молодих учених, аспірантів і докторантів “Сучасні проблеми ветеринарної медицини”*, м. Біла Церква, 58–59.

18. **Гриневич, Н. Є.** та Дунаєвська, О. Ф. (2017). Перспективи морфологічних досліджень в аквакультурі. *XIII Міжнародна науково-практична конференція морфологів України “Актуальні проблеми сучасної морфології”*. м. Житомир, 42–47.

19. **Гриневич, Н. Є.** (2017). Вплив мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д» на інтенсивність нітрифікуючих процесів мікрофлори реактора біофільтра під час запуску УЗВ для вирощування райдужної форелі. *Міжнародна науково-практична конференція “Актуальні проблеми сучасної ветеринарної медицини та тваринництва”*. м. Одеса, 33–38.

20. **Гриневич, Н. Є.** (2017). Оцінка токсичності мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д» для вирощування райдужної форелі за показниками виживаності риб гуппі та інфузорій. *VII*

Міжнародна науково-практична конференція “Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування”. м. Львів, 219–224.

21. **Гриневич, Н. Є.** (2017). Методи видалення нітратів у системах замкнутого водопостачання форелевих господарств. *Міжнародна науково-практична конференція “Іхтіологія та морфологія – наукова та практична основа рибництва” присвячена 85-річчю заснування кафедри іхтіології та зоології і 60-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Клименка Олега Миколайовича. м. Біла Церква, 7–8.*

22. Dubin, O.V., Dyman, T.M., **Grynevych, N.Ye.** & Szczepkowski, M. (2017). Polymorphism of sturgeon species on microsatellite markers. *Міжнародна науково-практична конференція “Іхтіологія та морфологія – наукова та практична основа рибництва” присвячена 85-річчю заснування кафедри іхтіології та зоології і 60-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Клименка Олега Миколайовича. м. Біла Церква, 2–3.*

23. Кухтин, М. Д., Семанюк, В. І., Семанюк, Н. В. та **Гриневич, Н. Є.** (2017). Динаміка кількості денітрифікуючих організмів у воді реактора біофільтра УЗВ за використання різних наповнювачів. *Міжнародна науково-практична конференція “Іхтіологія та морфологія – наукова та практична основа рибництва” присвячена 85-річчю заснування кафедри іхтіології та зоології і 60-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Клименка Олега Миколайовича. м. Біла Церква, 5.*

24. **Гриневич, Н. Є.** (2018). Динаміка кількості нітрифікуючих мікроорганізмів у воді реактора біофільтра в індустріальних форелевих господарствах. *Міжнародна науково-практична конференція “Кліматичні зміни та сільське господарство. Виклики для аграрної науки та освіти”. м. Київ, 206–209.*

25. **Гриневич, Н. Є.,** Присяжнюк, Н. М. та Куновський, Ю. В. (2018). Вплив вітамінної добавки «Ганаміновіт» на підвищення імунітету райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*). *Міжнародна науково-практична конференція “Аграрна наука та освіта в умовах євроінтеграції”. м. Кам'янець-Подільський, 38–40.*

АНОТАЦІЯ

Гриневич Н.Є. Обґрунтування системи санітарно-гігієнічних заходів за замкнутого водопостачання в індустріальних рибницьких господарствах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.06 – гігієна тварин та ветеринарна санітарія. – Сумський національний аграрний університет і Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Суми, 2018.

Встановлено сезонні коливання значень гідрохімічних і токсикологічних показників води в УЗВ і стічної води упродовж року та виявлено зміни мікробіоценозу води в модулях під час запуску і функціонування УЗВ. Уперше встановлено, що кількість психротрофної мікрофлори у воді модулів УЗВ, у середньому в 1,3 рази більша, порівняно з вмістом МАФАНМ, а серед

психротрофів домінують роди *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes* і *Flavobacterium*, які становлять до 90%.

Отримано нові дані про закономірності колонізації мікрофлорою різних типів наповнювачів біофільтра під час запуску та функціонування УЗВ для вирощування райдужної форелі. Експериментально з'ясовано динаміку нітрифікуючого процесу в реакторі біофільтра за використання різних типів наповнювачів та виявлено залежність цього процесу від типу наповнювача, кількісного вмісту нітрифікуючих і денітрифікуючих мікроорганізмів, щільності сформованих мікробних біоплівки на наповнювачі. Під час запуску УЗВ мікроорганізми найшвидше колонізують наповнювач РК PLAST.

Розширено уявлення про розвиток нітритного отруєння райдужної форелі під час запуску УЗВ і встановлено динаміку змін гематологічних показників, гістологічної будови зябрового епітелію, печінки і нирок, а також кількості пошкоджених хромосом у клітинах зябер.

Встановлена доцільність застосування розробленого мікробіологічного стартера наповнювача біофільтра «Фільтронорм Д» під час запуску УЗВ або після проведення лікувально-профілактичних заходів для швидкого формування активного нітрифікуючого і денітрифікуючого мікробіоценозу біофільтра. Доведено необхідність застосування способу знезараження води в УЗВ ультрафіолетовою бактерицидною лампою, що уможливило безпечну дезінфекцію без порушення мікробіоценозу біофільтра. Показано позитивний вплив вітамінно-кормової добавки «Ганаміновіт» під час годівлі молоді райдужної форелі за рахунок підвищення імунітету і збільшення приросту, а також вплив «Ганаміновіту» на продуктивний ефект личинки за умови згодовування плідникам райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*).

Ключові слова: установка замкнутого водопостачання, райдужна форель, біофільтр, наповнювач, нітритне отруєння, колонієутворюючі одиниці, мезофільні аеробні і факультативно анаеробні мікроорганізми, психротрофні мікроорганізми, нітрифікуючі і денітрифікуючі мікроорганізми, НАССР.

АННОТАЦИЯ

Гриневиц Н.Е. Обоснование системы санитарно-гигиенических мероприятий при замкнутом водоснабжении в промышленных рыбных хозяйствах. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на получение научной степени доктора ветеринарных наук по специальности 16.00.06 – гигиена животных и ветеринарная санитария. - Сумский национальный аграрный университет и Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов, Сумы, 2018.

Установлены сезонные колебания значений гидрохимических и токсикологических показателей воды у УЗВ и сточной воды на протяжении года и обнаружены изменения микробиоценоза воды в модулях во время запуска и функционирования УЗВ. Впервые установлено, что количество психротрофной микрофлоры в воде модулей УЗВ, в среднем в 1,3 раза больше, сравнительно с содержимым МАФАНМ, а среди психротрофов доминируют

роды *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes* и *Flavobacterium*, которые составляют до 90%.

Получены новые данные о закономерностях колонизации микрофлорой разных типов наполнителей биофильтра во время запуска и функционирования УЗВ для выращивания радужной форели. Экспериментально выяснена динамика нитрифицирующего процесса в реакторе биофильтра при использовании разных типов наполнителей и обнаружена зависимость этого процесса от типа наполнителя, количественного содержания нитрифицирующих и денитрифицирующих микроорганизмов, плотности сформированных микробных биопленок на наполнителе.

Расширено представление о развитии нитритного отравления радужной форели во время запуска УЗВ и установлена динамика изменений гематологических показателей, гистологического строения жаберного эпителия, печени и почек, а также количества поврежденных хромосом в клетках жабр.

Установлена целесообразность применения разработанного микробиологического стартера наполнителя биофильтра «Фильтронорм Д» во время запуска УЗВ или для быстрого формирования активного нитрифицирующего и денитрифицирующего микробиоценоза биофильтра. Доказана необходимость применения способа обеззараживания воды в УЗВ ультрафиолетовой бактерицидной лампой. Показано позитивное влияние витаминно-кормовой добавки «Ганаминовит» во время кормления молоди радужной форели за счет повышения иммунитета и увеличения прироста, также влияние «Ганаминовиту» на продукционный эффект личинки при условиях скармливания производителям радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*)

Ключевые слова: установка замкнутого водоснабжения, радужная форель, биофильтр, наполнитель, нитритное отравление, колониеобзасующие единицы, мезофильные аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы, психротрофные микроорганизмы, нитрифицирующие и денитрифицирующие микроорганизмы, НАССР.

ANNOTATION

Grynevych N.E. The system of sanitary-hygienic measures in recirculating aquatic systems of industrial trout farms. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Dissertation for a Doctor of Veterinary Sciences degree, specialty 16.00.06 Animal Hygiene and Veterinary Sanitation, Sumy State Research and Control Institute of Biotechnology and Microorganisms Strains, Sumy, 2018.

The dissertation is aimed at developing a system of sanitary and hygienic measures necessary for the effective reproduction and growing of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in industrial farms in conditions of recirculating aquatic systems (RAS).

Organoleptic and hydrochemical properties of water samples from RAS were investigated. Water samples from different RAS modules were investigated on microbiological characteristics. Water samples after different types of disinfection

and also washing water from four types of biofilter filler during the start of RAS were examined on microbiological parameters and the content of nitrites. 273 cultures of psychrotrophic microorganisms were identified. It was revealed that 5 cultures of *Pseudomonas* spp. participate in process of formation of biofilm on fillers. To determine the toxicity of the microbiological starter of the biofilter filler “Filtronorm D”, the guppy fish (*Poecilia reticulata* Peters) were used. 1000 individuals of adult trout were used to determine the clinical signs when using the microbiological starter filler “Filtronorm D”. 20 000 individuals of young rainbow trout and 5000 larvae were used when evaluating the vitamin supplement “Gamaninovit”. The behavior of a rainbow trout fry in condition of nitrite poisoning at the start of a biofilter was estimated using 1000 fish individuals.

The sanitary-hygienic assessment of water for the technology of rainbow trout growing in RAS when using different types of biofilter reactor fillers was completed for the first time in Ukraine. Seasonal fluctuations of hydrochemical and toxicological parameters of water in RAS and waste water have been established. Changes were characterized by the growth of the psychrotrophic microflora in fish pool and the nitrifying and denitrifying microorganisms in biofilter reactor. It was first established that the amount of psychrotrophic microflora in water of RAS modules is on average 1,3 times higher than that of MAFAnM. Species *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes* and *Flavobacterium* are the dominant among the psychrotrophs (90%), which gives rise to consider them an autochthonous microflora of RAS.

On the patterns of microflora colonization of different types of biofilter fillers during start and operation of the RAS for rainbow trout growing were obtained. The dynamics of the nitrification process in the biofilter reactor using different types of fillers was experimentally determined. The dependence of this process on the type of filler, the quantitative content of nitrifying and denitrifying microorganisms, and the density of the formed microbial biofilms on the filler was found.

For the first time it was established that during the RAS start microorganisms colonize polypropylene filler RK PLAST fastest, AQ-25 and KALDNER K1P – a little bit slower and claydite – slowest. The active inclusion of biofilter in the process of nitrification when using polypropylene fillers occurs from the 20th day of RAS start, while by using claydite filler – from 25th day.

The idea of nitrite poisoning development in rainbow trout during the RAS start was expanded. The dynamics of changes in the hematological parameters, the histological structure of gill epithelium, liver and kidneys as well as the number of damaged chromosomes in gill cells were established.

The expediency of using the developed biofilter microbiological starter “Filtronorm D” during RAS start or after implementation of treatment and prophylactic measures on infectious diseases for the rapid formation of active nitrifying and denitrifying microbiocenosis of biofilter has been theoretically substantiated and experimentally established. The theoretically and practically proved the necessity of using a method of water disinfecting in RAS by means of ultraviolet bactericidal lamp, which enables safe disinfection without disturbing the biofilter microbiocenosis. Positive influence of vitamin supplement “Hanaminovit” in young

rainbow trout feeding thanks to immunity and growth rate increasing was revealed. The positive effect of this supplement on the larvae productivity when using it in feeding of the adult rainbow trout was also observed.

Key words: recirculation aquaculture systems, rainbow trout, biological filter, biofilter filler, nitrite poisoning, colony-forming unit, mesophilic aerobic and optional anaerobic microorganisms, psychrotrophic microorganisms, nitrification and denitrifying microorganisms, HACCP.

Підп. до друку 24.05.2018 р. Формат 60X84/16. Папір офсетний.
Гарнітура Times New Roman. Друк офсетний.
Ум. друк. арк. 1,9. Тираж 130 пр. Вид. № 14.

Віддруковано у ВВП “Мрія-1”.
40000, м. Суми, вул. Кузнечна, 2.
Тел. 22-13-23, 22-15-05, 67-92-15.

Свідоцтво суб’єкта видавничої справи:
Серія ДК, № 36 від 19.04.2000.