

наблюдались признаки острого течения болезни, описанные выше, но они были менее выражены и развивались более медленно.

В это же время рыба, размещенная в контрольных аквариумах К₁, не получавшая ни бактериальной суспензии, ни содержащих серебро субстанций, была жива, здорова, активно потребляла корм. Каких-либо изменений в ее поведении и физиологическом состоянии не отмечено.

Заключение. Проведенными исследованиями установлено, что при определении толерантности рыб к соединениям нольвалентного серебра методом долгосрочных ванн (экспозиция 24 часа, концентрация – 0,05–0,5 мг/л) отрицательного влияния на рыб данные композиции не оказывают. При использовании метода краткосрочных ванн (60 мин., концентрация 2,0 и 5,0 мг/л) наблюдалась гибель рыбы, при этом наименее токсичными для рыб оказались образцы, содержащие в качестве стабилизатора аскорбиновую кислоту и глюкозу. При применении этих образцов в концентрациях 2,0 мг/л они вызывали гибель 30 (аскорбиновая кислота) и 20 (глюкоза) % рыбы. Следовательно, применять их нужно осторожно, в концентрациях, не превышающих 1,0 ppm.

При изучении антибактериальной активности образцов дисперсии нольвалентного серебра в опытах *in vitro* установлено, что зоны задержки роста бактерий (*Aeromonas hydrophyla*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*) достигали 25 мм; в опытах *in vivo* – заболеваемость рыб аэромонозом снижалась на 40–80%, болезнь протекала в легкой форме и не сопровождалась гибелью рыбы.

Литература. 1. Ветеринарные препараты на основе наночастиц серебра, модифицированных мирамистином: новые возможности в лечении кошек и собак / Ю. А. Крутяков [и др.] // *Международный вестник ветеринарии*. – 2015. – № 3. – С. 24–27. 2. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы / Ю. А. Крутяков [и др.] // *Успехи химии*. 2008. – № 77 (3). – С. 242–265. 3. Schmidt, Axel. *Gonorrhoeal ophthalmia neonatorum. Historic impact of Credé's eye prophylaxis* / Axel Schmidt, Horst Schroten, Stefan Wirth (Hrsg.) // *Pediatric Infectious Diseases Revisited*. – Birkhäuser, Basel, 2007. – S. 95–115.

Поступила в редакцию 07.08.2020 г.

УДК 619:615.3:639.3

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТИВНЫХ ФОРМ СЕРЕБРА НА ГРИБЫ P. SAPROLEGNIA ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ РЫБ

*Дегтярик С.М., **Карпинчик Е.В., *Полоз С.В.

*Республиканское научно-исследовательское дочернее унитарное предприятие «Институт рыбного хозяйства» Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», г. Минск, Республика Беларусь

**Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

*Применение серебросодержащих препаратов приводит к резкому снижению активности возбудителей болезней рыб: грибов и бактерий. Наибольшей активностью по отношению к грибам р. Saprolegnia обладали образцы коллоидного серебра с такими стабилизаторами, как аскорбиновая кислота, глюкоза, глицерин, полиэтиленгликоль, пектин. Перспективным вариантом обработки пораженной сапролегнией рыбы серебросодержащими субстанциями следует считать долгосрочные ванны с экспозицией 24 ч и концентрацией соединений, равной 0,1 мг/л. После добавления серебросодержащих соединений в пропорции 1:10 общее микробное число снизилось на 93,8–98,6%; в пропорции 1:100 общее микробное число воды снизилось на 44,7–80,0%. **Ключевые слова:** серебросодержащие препараты, грибы, бактерии, водная среда, рыбы.*

EFFECT OF DRUGFORMS OF SILVER ON FUNGI SAPROLEGNIA IN FISH FARM

*Degtyarik S.M., **Karpinchik E.V., *Polaz S.V.

*Republican Subsidiary Unitary Enterprise «The Institute for Fish Industry», Minsk, Republic of Belarus

**Institute of Chemistry of New Materials of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

The use of drugforms of silver leads to a sharp decrease in the activity of pathogens of fish diseases: fungi and bacteria. The greatest activity in relation to fungi of p. Saprolegnia possessed samples of colloidal silver with such stabilizers as ascorbic acid, glucose, glycerin, polyethylene glycol, pectin. Long-term baths with an exposure of 24 hours and a concentration of compounds equal to 0.1 mg/l should be considered a promising option for treating fish affected by saprolegnia with silver-containing substances. After adding silver-containing compounds in a ratio of 1:10, the total microbial count decreased by 93,8–98,6%; in a ratio of 1:100, the total microbial number

of water decreased by 44,7-80,0%. **Keywords:** silver-containing preparations, fungi, bacteria, aquatic environment, fish.

Введение. Болезни рыб способны наносить существенный экономический ущерб рыбной отрасли, вызывая гибель, снижение массы, ухудшение товарных и репродуктивных качеств рыбы. Разработка способов предотвращения заболеваний в условиях все возрастающей интенсификации имеет большое значение в общей проблеме повышения рыбопродуктивности.

Известно, что существует ряд бактерий и грибов, которые, являясь постоянными обитателями водной среды, обычно не причиняют рыбам вреда, но даже при небольшом снижении показателей иммунитета (который может быть вызван множеством причин) становятся патогенными и вызывают серьезные заболевания. Поэтому снижение бактериальной и грибковой обсемененности (дезинфекция) воды, рыбоводных емкостей и инвентаря имеет большое значение. Следует отметить, что биобезопасных препаратов, предназначенных для рыб, мало; они, как правило, дороги, а их применение трудоемко.

Многообразие дезинфицирующих средств, известных и применяемых в настоящее время, построено на использовании всего нескольких классов химических соединений, известных много десятков лет. Общая тенденция в развитии химических дезинфектантов в последние годы состоит не в создании новых препаратов, а в поиске способов активации уже известных дезинфицирующих средств – разработке режимов, при которых минимальная концентрация активных действующих веществ обеспечивает высокий бактерицидный эффект, а коррозионная или деструктивная активность по отношению к материалам изделия, а также токсикологическое действие на человека и животных становятся минимальными. В настоящее время одним из главных направлений повышения эффективности дезинфицирующих средств считается добавление в рецептуру активаторов, синергистов, использование дополнительных физических воздействий, т. е. создание условий, при которых действующее вещество в момент применения дезинфицирующих средств находилось бы в метастабильном состоянии, например, в стадии пролонгированной химической реакции с активаторами [1].

Высокая обеззараживающая эффективность и пролонгированная способность серебряных дезинфектантов, обеспечивающих более высокие экономические показатели по сравнению с синтетическими аналогами, их токсикологическая и экологическая безвредность чрезвычайно актуальны в отраслях, связанных с получением, переработкой и хранением продуктов питания, где к дезпрепаратам предъявляются очень высокие требования. Поэтому применение серебро-содержащих препаратов в рыбоводной отрасли весьма перспективно.

Материалы и методы исследований. Оценку противомикробной активности образцов нольвалентного серебра проводили в трех сериях опытов:

серия 1 – оценка противомикробной активности образцов дисперсии нольвалентного серебра при добавлении в воду и в отношении грибов, выращенных на субстрате *in vitro*;

серия 2 – оценка противомикробной активности экспериментальных образцов дисперсии нольвалентного серебра *in vivo*;

серия 3 – определение влияния серебросодержащих соединений в отношении гриба р. *Saprolegnia* и на показатели общего микробного числа (ОМЧ) в водной среде.

Серия 1. Изучение противомикробной активности образцов *in vitro* проводили с использованием гриба р. *Saprolegnia* (споры, фрагменты гиф), находящегося в воде, в которой содержалась больная сапролегниозом рыба. Воду с содержащимися в ней грибами разбавляли в чашках Петри образцами дисперсии серебра с концентрацией активного вещества 10 ppm (10 мг/л) в соотношении 1:1 и помещали в термостат на 60, 120 и 180 минут. В контрольные чашки серебросодержащие образцы не добавляли. По истечении времени экспозиции содержимое чашек в количестве 1 мл высевали на среду Сабуро, культивировали в термостате до появления мицелия (24–48 часов).

Для изучения противомикробной активности образцов дисперсии нольвалентного серебра также использовали грибы р. *Saprolegnia*, выращенные на прокаленных льняных семенах, помещенных в чашки Петри (рисунок 1). При проведении исследований на данном этапе применяли образцы дисперсии нольвалентного серебра без стабилизатора, а также со следующими стабилизирующими добавками: аскорбиновая кислота, трилон Б, пектин, глюкоза, глицерин и сахар. Возбудитель сапролегниоза был изъят с поверхности тела и жабр рыбы (каarp, пестрый толстолобик), больной сапролегниозом. В чашки Петри вносили образцы дисперсии нольвалентного серебра концентрацией 10 ppm в количестве 10 мл, затем туда же переносили семена льна, покрытые сапролегнией, помещали в термостат на 1 час или 1 сутки. По истечении экспозиции оценивали степень воздействия серебросодержащих образцов на мицелий гриба. В качестве контроля использовали чашки Петри, в которых культура гриба того же возраста росла и развивалась в аквариумной воде без добавления серебросодержащих субстанций.

Серия 2. Для изучения противомикробной активности образцов дисперсии нольвалентного серебра *in vivo* использована живая рыба (двухлеток карпа и карася серебряного, по 20 экз.

каждого вида), зараженная сапролегниевыми грибами естественным и экспериментальным путями. На них отмечались обильные разрастания сапролегниевых грибов в области головы, грудных плавников, на жаберных крышках и хвостовом стебле.

Рыбу на 24 часа помещали в аквариумы (по 10 экз. в каждый), в которые добавляли образцы дисперсии нольвалентного серебра с исходной концентрацией активного вещества 10 ppm (10 мг/л) и доводили в аквариумах до концентрации 0,1 ppm. Коллоиды серебра в данной концентрации соответствуют требованиям стандарта Европейского Комитета по стандартизации (CEN) EN 1040 в отношении оценки бактерицидной активности дезинфицирующих препаратов. Исходя из этого, данная концентрация признана исходной при применении препарата, содержащего коллоид серебра, методом длительных ванн. Кроме того, была испытана эффективность краткосрочных ванн с экспозицией 1 час и концентрацией образцов 1,0 мг/л. В контрольные аквариумы серебросодержащие образцы не добавляли, в остальных рыбу содержали при тех же условиях, что и в опытных аквариумах. По истечении экспозиции оценивали степень воздействия серебросодержащих образцов на мицелий гриба.

Серия 3. Проводили изучение активности препаратов нольвалентного серебра на показатели общего микробного числа (ОМЧ) и в отношении гриба р. *Saprolegnia* в водной среде. Для этого использовалась вода, содержащая споры и фрагменты гиф, в которой содержалась больная сапролегниозом рыба, а также вода с высоким содержанием сапрофитных микроорганизмов, в т. ч. аэромонад, в которой длительное время содержалась рыба, больная хронической формой аэромоназа. Перед добавлением серебросодержащих соединений в воду и спустя 60 минут после их добавления отбирали пробы воды для определения ОМЧ согласно методическим указаниям [2].

Воду с содержащимися в ней грибами разбавляли в чашках Петри образцами дисперсии серебра исходной концентрацией 10 ppm в соотношении 1:1 и помещали в термостат на 60 минут. В контрольные чашки серебросодержащие образцы не добавляли. По истечении времени экспозиции содержимое чашек в количестве 1 мл высевали на среду Сабуро, культивировали в термостате в течение 24–48 часов (до появления мицелия). Контролем во всех вариантах служила вода из аквариумов, в которые не добавляли серебросодержащие соединения.

Результаты исследований.

Серия 1.

Результаты наших исследований показали, что наибольшей противомикозной активностью обладали образцы с такими стабилизаторами, как трилон Б, аскорбиновая кислота, глюкоза, глицерин, пектин (таблица 1).

Таблица 1 – Антимикозная активность образцов дисперсии нольвалентного серебра в отношении гифов гриба р. *Saprolegnia*, находящихся в воде

Соединения нольвалентного серебра		Экспозиция, мин.		
		60	120	180
№ п/п	стабилизатор			
1	без стабилизатора	++	++	+++
2	трилон Б	+++	+++	+++
3	аскорбиновая кислота	++	+++	+++
4	сахар	+	++	++
5	глюкоза	+++	+++	+++
6	глицерин	+++	+++	+++
7	полиэтиленгликоль-200	++	++	++
8	водорастворимый крахмал	0	0	+
9	поливинилпирролидон	+	++	++
10	триэтаноламин	0	+	++
11	пектин	+++	+++	+++
12	контроль	0	0	0

Примечания:

0 – антимикозное действие не выражено, обильный рост гриба на среде Сабуро;

+ – слабо выраженное антимикозное действие: менее обильный рост грибного мицелия;

++ – средне выраженное антимикозное действие: фрагментарный рост грибного мицелия;

+++ – ярко выраженное антимикозное действие: роста гриба на среде не наблюдается.

При изучении антимикозной активности образцов дисперсии нольвалентного серебра в отношении гриба, выращенного на субстрате (льняное семя), установлено, что минимальное влияние на гифы сапролегниевых грибов при взаимодействии в течение часа оказывает только

образец без стабилизатора. Остальные образцы в этом варианте опыта не оказывали какого-либо воздействия на грибы, произрастающие на льняном семени (таблица 2).

Таблица 2 – Антимикозная активность образцов дисперсии нольвалентного серебра при воздействии на гифы гриба *Saprolegnia*, выращенного на субстрате

Образцы нольвалентного серебра		Экспозиция, ч.	
		1	24
№ п/п	стабилизирующие добавки		
1	без стабилизатора	+	+++
2	трилон Б	0	+++
3	аскорбиновая кислота	0	++
4	сахар	0	+
5	глюкоза	0	++
6	глицерин	0	++
7	пектин	0	++
8	контроль	0	0

Примечания:

0 – антимикозное действие не выражено, гифы гриба в том же состоянии, что и до начала эксперимента;

+ – слабо выраженное антимикозное действие: разрушение отдельных гиф грибного мицелия;

++ – средне выраженное антимикозное действие: фрагментация около 50% гиф мицелия;

+++ – ярко выраженное антимикозное действие: распад и фрагментация всего мицелия.

При экспозиции опыта 24 часа образцы без стабилизатора и с трилоном Б оказывали ярко выраженное антимикозное действие, вызывая «омыление» гриба (рисунок 2), фрагментацию его гифов. Образцы с аскорбиновой кислотой, глюкозой, глицерином и пектином оказывали среднее воздействие, т. е. наблюдался неполный распад гифов. Образец с сахаром в качестве стабилизатора имел слабое действие. Отмечалось разрушение отдельных фрагментов (как правило, кончиков) гифов гриба.

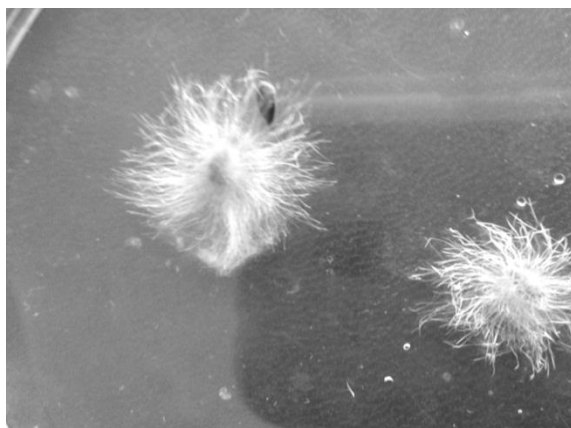


Рисунок 1 - Сапролегния, выращенная на субстрате (прокаленное льняное семя), до обработки дисперсией нольвалентного серебра



Рисунок 2 - Сапролегния, выращенная на субстрате, после обработки образцом дисперсии нольвалентного серебра без стабилизатора

Серия 2.

Данные, представленные в таблице 3, согласуются с результатами исследований, полученными при проведении экспериментов *in vivo*. Обработка образцами без стабилизатора и с аскорбиновой кислотой в течение часа в концентрации 1,0 мг/л оказывала выраженное влияние на разрастания сапролегниевых грибов: в воде отмечалось большое количество свободно плавающих фрагментов мицелия, а на рыбе наблюдались отдельные небольшие ослизненные участки.

Таблица 3 – Антимикозная активность образцов дисперсии нольвалентного серебра в отношении грибов р. *Saprolegnia in vivo*

Образцы дисперсии нольвалентного серебра		Экспозиция, ч, концентрация, мг/л	
№ п/п	стабилизатор	1 ч, 1,0 мг/л	24 ч, 0,1 мг/л
1	без стабилизатора	++	++
2	трилон Б	+	++
3	аскорбиновая кислота	++	++
4	сахар	0	0
5	глюкоза	0	++
6	глицерин	0	++
7	пектин	0	++
8	контроль	0	0

Примечания:

0 – антимикозное действие не выражено, гифы гриба в том же состоянии, что и до начала эксперимента;

+ – слабо выраженное действие: ослизнение мицелия гриба;

++ – выраженное антимикозное действие: распад мицелия гриба.

Слабое действие, выраженное в ослизнении сапролегниевых наростов, оказывал образец с трилоном Б. Остальные образцы в этом варианте опыта не оказывали какого-либо заметного воздействия на грибы, паразитирующие на рыбе. При экспозиции опыта 24 часа и концентрации 0,1 мг/л антимикозное действие не оказывал только образец с сахаром. При применении остальных образцов наблюдалась картина, характеризующаяся как «выраженное антимикозное действие». В контрольных аквариумах изменений структуры сапролегниевых грибов не наблюдалось.

Серия 3.

Для рыбы опасны не только представители патогенной, но и т. н. «сапрофитной» микрофлоры, которые сами не способны вызывать острый инфекционный процесс. Однако, проникая в организм рыбы и развиваясь во внутренних органах и крови в больших количествах, они способны наносить существенный вред за счет своей жизнедеятельности и выделения в ткани рыбы продуктов метаболизма. Согласно п. 2 «Рыбоводно-биологических норм для эксплуатации прудовых и садковых хозяйств Беларуси» [3], допустимое количество сапрофитов в воде, поступающей в рыбоводные пруды, составляет не более 5 000 КОЕ/мл.

Количество сапрофитных бактерий до начала опыта превышало норму для рыбоводных прудов в 1,6–2,3 раза. После добавления серебросодержащих соединений в пропорции 1:10 ОМЧ снизилось: образец № 1 – на 98,0%, образец № 2 – на 93,8%, образец № 3 – на 96,4%, образец № 4 – на 97,3%, образец № 5 – на 98,6%. После добавления серебросодержащих соединений в пропорции 1:100 эффект был менее выражен (таблица 4). Общее микробное число воды снизилось, но в гораздо меньшей степени: образец № 1 – на 44,7%, образец № 2 – на 61,4%, образец № 3 – на 48,2%, образец № 4 – на 66,4%, образец № 5 – на 80,0%.

Таблица 4 – Общее микробное число воды до и после применения образцов серебросодержащих соединений

Образец серебросодержащего соединения		ОМЧ, КОЕ/мл		
		До начала опыта	После опыта	
			1:10	1:100
№ п/п	стабилизатор			
1	без стабилизатора	11530	240	6450
2	пектин	8220	510	3180
3	поливинилпирролидон	8560	310	4440
4	аскорбиновая кислота	10310	280	3470
5	глюкоза	9240	130	1850
6	контроль	11500	11260	12130

Как показывают результаты опыта, все пять образцов серебросодержащих соединений обладали примерно одинаковой противомикробной активностью. В контрольном аквариуме общее микробное число не претерпело изменений в течение всего эксперимента.

Таблица 5 – Противомикозная активность образцов серебросодержащих соединений в отношении гифов гриба р. *Saprolegnia*, находящихся в воде

Образец серебросодержащего соединения		Разведение	
№	стабилизатор	1:10	1:100
1	без стабилизатора	+++	++
2	пектин	+++	++
3	поливинилпирролидон	++	+
4	аскорбиновая кислота	+++	++
5	глюкоза	+++	+++
6	контроль	0	0

Примечания:

0 – антимикозное действие не выражено, обильный рост гриба на среде Сабуро;

+ – слабо выраженное антимикозное действие: менее обильный рост грибного мицелия;

++ – средне выраженное антимикозное действие: фрагментарный рост грибного мицелия;

+++ – ярко выраженное антимикозное действие: роста гриба на среде не наблюдается.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют, что образцы серебросодержащих соединений обладают примерно одинаковой активностью против грибов р. *Saprolegnia*. Они оказывали как ярко-, так и средне выраженное действие на гифы гриба, находящиеся в воде.

Биологическая проба на рыбах показала, что активность оставшихся в воде возбудителей болезней рыб (бактерий и грибов) резко снизилась: при контакте с рыбой они не вызывали заражения, в то время как контакт рыбы из контрольной группы с возбудителями болезней вызвал вялотекущий инфекционный процесс.

Заключение. Проведенными исследованиями установлено, что наибольшей активностью по отношению к грибам р. *Saprolegnia* (споры, фрагменты гиф) обладали образцы коллоидного серебра с такими стабилизаторами, как аскорбиновая кислота, глюкоза, глицерин, полиэтиленгликоль, пектин. Они вызывали «омыление» гриба, фрагментацию его гифов, при сильном воздействии – неполный распад гифов.

На сапролегниевые грибы, паразитирующие на рыбе, выраженное влияние оказывали образцы коллоидного серебра без стабилизатора и с аскорбиновой кислотой при взаимодействии в течение часа в концентрации 1,0 мг/л. При экспозиции опыта 24 часа и концентрации 0,1 мг/л выраженное антимикозное действие оказывали эти же образцы, а также образцы с трилоном Б, глюкозой и пектином. Перспективным вариантом обработки пораженной сапролегнией рыбы серебросодержащими субстанциями следует считать долгосрочные ванны с экспозицией 24 ч и концентрацией соединений, равной 0,1 мг/л.

При определении общего микробного числа воды до и после применения серебросодержащих препаратов отмечено, что количество сапрофитных бактерий в экспериментальных аквариумах до начала опыта превышало норму для рыбоводных прудов в 1,6–2,3 раза. После добавления серебросодержащих соединений в пропорции 1:10 ОМЧ снизилось на 93,8–98,6%; в пропорции 1:100 ОМЧ воды снизилось на 44,7–80,0%. Отмечено также, что указанные соединения оказывали как ярко- так и средневыраженное действие на гифы гриба р. *Saprolegnia*, находящиеся в воде.

Применение серебросодержащих препаратов приводит к резкому снижению активности возбудителей болезней рыб (бактерий и грибов) в воде: при контакте с рыбой они не вызывают ее заражения.

Литература. 1. Рыбоводно-биологические нормы для эксплуатации прудовых и садковых хозяйств Беларуси. – Минск, 2008. – 119 с. 2. Федорова, Л. С. Основные направления повышения эффективности дезинфицирующих средств / Л. С. Федорова // Актуальные проблемы дезинфектологии в профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний : материалы Всероссийской научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения В.И. Вашкова. – Москва : ИТАР-ТАСС, 2002. – С. 26–30. 3. Методические указания по санитарно-бактериологической оценке рыбохозяйственных водоемов : утв. М-вом сельского хозяйства РФ, 27.09.1999.

Поступила в редакцию 07.08.2020 г.