

Применяется для обеззараживания и консервации питьевой воды и как высокоэффективное лечебное средство (Федченко и др., 2004).

4. *Программа дистанционного сбора данных (ПДС) и оперативного диспетчерского автоматизированного многоканального управления инженерным оборудованием по интерфейсу RS-232.* ПДС предназначена для обеспечения дистанционного управления и текущего контроля работы многоканальных дозаторов на рыбопроизводных предприятиях. Диспетчерский пункт, оборудованный ПК, может находиться на расстоянии до 100 м от исполнительного устройства, откуда можно изменить режим и время дозирования концентрированного препарата для каждой группы одновременно обрабатываемых объектов и оперативно получать текущие данные режима обработки. Позволяет полностью автоматизировать технологию профилактических и терапевтических обработок, до минимума сократить влияние “человеческого” фактора (Федченко и др., 2006).

Предлагаемые разработки имеют консультационное и научное обеспечение и могут быть внедрены в производство.

В сочетании с мониторингом эпизоотического состояния выращиваемой рыбы использование перечисленных разработок позволит значительно повысить эффективность профилактических мероприятий заболеваний. Их внедрение даст возможность получать дополнительно до 20 % рыбной продукции, улучшить ее качество и коммерческую ценность. Переход рыбных предприятий на новые технологии и оснащение, позволит резко повысить культуру производства в цехах, сделать профессию рыбвода и ихтиопатолога более привлекательной и значительно сократить потери при инкубации и выращивании рыб.

#### **Выделение возбудителей грибковых заболеваний осетровых рыб на рыбных заводах Краснодарского края и подбор лекарственных средств для борьбы с ними**

*М.А. Сазыкина, М.А. Коленко, В.А. Чистяков, А.В. Севрюков*

Объекты аквакультуры играют важную роль в питании человека. Отсутствие в них нежелательной микрофлоры приобретает первостепенное значение, так как рыба довольно часто является причиной заболеваний и пищевых отравлений за счет быстрого размножения в ней многочисленных групп микроорганизмов.

Наиболее опасными являются плесневые грибы, которые не только снижают питательную ценность, но и сами могут стать непосредственными

возбудителями заболеваний, т.к. способны выделять токсичные продукты своей жизнедеятельности. Содержание токсических веществ различного происхождения приводит к развитию патологических процессов и массовой гибели (Мюллер, Лёффлер, 1995).

Одно из ведущих мест, как по тяжести вызываемой патологии, так и по распространенности в природе, занимают микотоксины. В настоящее время известно свыше 250 видов микроскопических грибов, продуцирующих более 150 токсичных метаболитов. Наиболее распространены: афлатоксин, фузариотоксины (трихотецены), охратоксин (охр. А) и др. Продуцентами названных микотоксинов являются высокоадаптивные плесневые грибы (особенно грибы р. *Aspergillus* и *Penicillium*). Наиболее сильными продуцентами афлатоксинов являются грибы рода *Aspergillus*. Афлатоксины, продуцируемые плесневыми грибами *Aspergillus flavus* и *A. parasiticus*, являются одними из наиболее сильных гепатотоксинов и гепатоканцерогенов. Присутствие токсигенных грибов в моллюсках и рыбе представляет реальный риск отравлений при употреблении зараженных продуктов в пищу.

Использование современных методов диагностики заболеваний рыб может способствовать своевременному выявлению источника болезни и ее профилактике. Необходимым условием проведения исследований в вышеуказанном направлении является создание репрезентативной коллекции биологического материала, необходимого для проведения лабораторной диагностики, а также подбор противогрибковых препаратов для лечения и профилактики грибковых заболеваний.

*Материалы и методы.* В течение июля 2007 г. был произведен отбор рабочего материала для выделения грибов на следующих рыбноводных заводах Краснодарского края: Семикаракорский ДОЗ, ЮПОРЦ, Темрюкский ОРЗ, Гривенский ОРЗ. Были отобраны:

- русский осетр, гибрид русского осетра, севрюга, осетр ленский, белуга;

- вода из прудов и бассейнов для содержания рыбы;

- корма (продукционный корм для форели FM42/12 гранулированный (3 мм) «EMSLAND-ALLER AQUA» Gmbh; BRD, корм KRAFT («Марка Beeskow»); корм Aller Futura мм, Prod. №24400957 (Адлер форель корм для продуктивных рыб); корм Aller Trident XS, Prod. № 25001157 (Адлер форель корм для продуктивных рыб), пр-ль: Aller Aqua Allerve/Denmark).

Подготовку проб рыбы, воды и кормов, а также выделение и накопление чистых грибковых культур проводили согласно стандартным

микробиологическим методикам (Биргер, 1973; Лабинская, 1978; ГОСТ 10444.12-88; ГОСТ Р 51426-99 (ИСО 6887-83); ГОСТ Р 51446 – 99).

Для идентификации грибковых культур, помимо стандартных методов, используемых в микробиологии, использовалась ПЦР-диагностика (Методика... ПЦР, 2002).

Для определения чувствительности плесневых грибов к противогрибковым препаратам использовали метод диффузии в агар (метод дисков и луночный метод) и метод определения минимальной подавляющей концентрации на плотной среде (Методические указания, 1983; Борисов и др., 1984; Ланчини, Паренти, 1985).

*Результаты и обсуждение.* На первом этапе исследований было проведено выделение грибковых культур из воды и рыбы различных кубанских ОРЗ, а также из кормов, которые используют на этих заводах.

В исследованных кормах грибковые культуры не обнаружены, что свидетельствует об их высоком качестве.

Из грибов, выделенных из воды и рыбы, была сформирована коллекция, включающая 31 вид, из которых 22 вида относятся к плесневым грибам, а 9 видов – к дрожжам.

Шесть из них (номера штаммов в нашей коллекции 3, 7, 12, 13, 19, 24) были идентифицированы во Всероссийской Коллекции Промышленных микроорганизмов (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН, г. Москва) соответственно как:

- *Fusarium chlamydosporum* Wollenweber et Reinking 1952 var. *chlamydosporum*;
- *Mucor hiemalis* Wehmer 1903 var. *luteus* (Linnem.) Schipper 1973;
- *Aspergillus ochraceus* G. Wilhelm 1887;
- *Cladosporium cladosporioides* (Fresenius 1850) G.A. Vries 1952;
- *Paecilomyces variotii* Bainier 1907;
- *Penicillium phoeniceum* J.F.H. Веума 1933.

По морфологическим и физиологическим свойствам штамм дрожжей № 6 отнесен к *Rhodotorula* sp.

С помощью ПЦР все пробы тканей рыб были исследованы на присутствие ДНК *Candida albicans*. Визуализация ПЦР-продуктов показала присутствие в пробе № 9 (соответствует штамму № 16 в нашей коллекции) ДНК *Candida albicans* (рис. 1). Таким образом, по результатам ПЦР-диагностики штамм дрожжей № 16 отнесен к *Candida albicans*.

Четырнадцать наиболее часто встречающихся типичных представителей грибковой микрофлоры (4 вида дрожжей и 10 видов

плесеней) были отобраны для исследования чувствительности к противогрибковым препаратам.

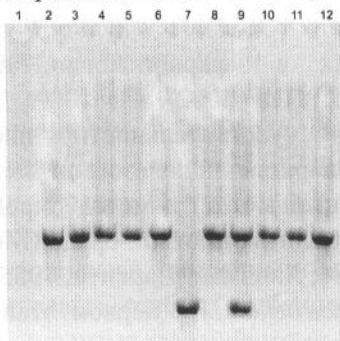


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов штаммов *Candida albicans*

1 - отрицательный контроль ПЦР; 2-6, 8-12 - пробы; 7 - положительный контроль ПЦР.

Чувствительность к трем антигрибковым препаратам была исследована методом диффузии в агар с использованием дисков. Результаты представлены в таблице 1. Чувствительными оказались к действию амфотерицина Ф только штамм № 7, а к действию нистатина - штаммы № 7 и 13.

Для определения минимальной фунгицидной концентрации нистатина был приготовлен ряд спиртовых растворов нистатина различных концентраций, действие которых было исследовано луночным методом. Результаты исследования представлены в таблице 2. Как видно из таблицы, минимальная фунгицидная активность нистатина составляет 400 ед./мл.

Также были исследованы вещества (табл. 3), которые применяются в прудовом рыбоводстве (Микитюк и др., 1984; Временная инструкция, 1998; Shao, 2001):

1. Малахитовый зеленый: 100 г/л (обработка ватным тампоном, смоченным раствором).

2.  $\text{CuSO}_4$ : маточный раствор: 1 г сульфата меди растворяют в 1 л воды. Затем 15 мл маточного раствора вносят на 10 л воды. Лечение можно проводить не более 10 дней.

3. Метиленовая синь: 1 г/м<sup>3</sup>, в течение 5 суток.

4.  $\text{KMnO}_4$ : 1 г/л, (обработка ватным тампоном, смоченным раствором).

5. NaCl: (2.5 %), ванны.

6.  $\text{KMnO}_4$ : 0,5 г на 10 л воды в лечебном сосуде. Лечение длится 10-20 минут через каждые 2 часа.

Диаметры зон ингибиции (мм) роста грибов дисками с антигрибковыми препаратами

№ штамма	Вид микроорганизма	Антигрибковые препараты, содержание в диске		
		амфотерицин В, 40 мкг	клотримазол, 10 мкг	нистатин, 80 ед.
1	Дрожжи	10	8,5	-
2	Плесневый гриб	6	-	10
3	<i>Fusarium chlamydosporium</i>	4	-	6
6	<i>Rhodotorula</i> sp.	6	-	8
7	<i>Mucor hiemalis</i>	11	-	20
9	Дрожжи	4	4,5	-
10	Плесневый гриб	-	-	10
12	<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	7,5	-
13	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6	-	15
16	<i>Candida albicans</i>	5	4,5	10
17	Дрожжи	5	-	3
19	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	10	-	10
26	Плесневый гриб	1,5	8	7
24	<i>Penicillium phoeniceum</i>	-	3	7,5

Примечание: при зоне задержки роста диаметром до 10 мм культуру расценивали как малочувствительную, а свыше 10 мм – как высокочувствительную (Борисов и др., 1984).

## Фунгицидная активность нистатина в отношении грибовых культур

№ штамма	Вид микроорганизма	Концентрация нистатина, ед/мл			80
		40 000	4 000	400	
1	Дрожжи	-	-	-	+
2	Плесневый гриб	-	-	-	+
3	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	-	-	-	+
6	<i>Rhodotorula sp.</i>	-	-	-	+
7	<i>Mucor hiemalis</i>	-	-	-	+
9	Дрожжи	-	-	-	+
10	Плесневый гриб	-	-	-	+
12	<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	-	-	+
13	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	-	-	+
16	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+
17	Дрожжи	-	-	-	+
19	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	-	-	+
26	Плесневый гриб	-	-	-	+
24	<i>Penicillium phoeniceum</i>	-	-	-	+

+ рост есть; - роста нет.

Диаметры зон ингибции (мм) роста грибов различными противогрибковыми веществами (лучочный метод)

№ шт.	Вид микроорганизма	Антигрибковые препараты, способ применения*					
		1	2	3	4	5	6
1	Дрожжи	17,5	12	-	-	-	-
2	Плесневый гриб	15	13	-	-	-	-
3	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	23	-	-	-	-	-
6	<i>Rhodotorula sp.</i>	15	15	-	-	-	-
7	<i>Mucor hiemalis</i>	-	13	-	-	-	-
9	Дрожжи	-	-	-	-	-	-
10	Плесневый гриб	-	14	-	15	-	-
12	<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	6,5	-	-	-	-
13	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	5,5	-	-	-	-
16	<i>Candida albicans</i>	-	17	-	-	-	-
17	Дрожжи	-	24	-	-	-	-
19	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	8	-	-	8	10	-
24	<i>Penicillium phoeniceum</i>	-	6	-	-	-	-
26	Плесневый гриб	-	-	-	-	-	-

Примечание: при зоне задержки роста диаметром до 10 мм культуру расценивали как малочувствительную, а свыше 10 мм – как высокочувствительную (Борисов и др., 1984).

\* Способ применения и концентрация противогрибковых препаратов указаны выше.

Как видно из данных, представленных в таблице 3, из всех исследованных веществ плесневые грибы и дрожжи чувствительны лишь к малахитовому зеленому в большой концентрации (предназначен для обработки тампоном) и к  $\text{CuSO}_4$  (ванны).

Данные вещества можно рекомендовать для профилактики и лечения грибковых заболеваний в рыбоводстве в случаях, когда патогенные грибы чувствительны к этим веществам.

В лечении различных микробных заболеваний в XX веке антимикробная терапия сыграла решающую роль, так как благодаря ей существенно уменьшилась смертность от инфекции. Но нерациональное применение, а порой и злоупотребление противомикробными препаратами, способствовало эволюции микроорганизмов с развитием у них различных механизмов устойчивости к их действию. Терапию отдельных форм инфекционных болезней с использованием противомикробных препаратов необходимо проводить на основании данных эпидемиологического мониторинга за уровнем резистентности к ним микроорганизмов, обитающих в конкретных регионах. Исследованию подлежат чистые культуры микроорганизмов, выделенные из объектов внешней среды. Необходимо проведение идентификации микробных культур.

Таким образом, в настоящее время можно констатировать, что широкое распространение штаммов патогенных грибов, устойчивых к фунгицидам в окружающей среде, снижает эффективность большинства ветеринарных противогрибковых препаратов. Поэтому необходимым элементом эффективной методики профилактики и лечения заболеваний является выделение и накопление чистых культур плесневых грибов и дрожжей и оценка чувствительности данных возбудителей заболеваний к препаратам, которые планируется применять.

Определение чувствительности плесневых грибов и дрожжей к противогрибковым препаратам с использованием метода диффузии в агар (метод дисков и луночный метод) и метода определения минимальной подавляющей концентрации на плотной среде (Методические указания, 1983; Ланчини, Паренти, 1985) позволяет использовать подобранные противогрибковые препараты в необходимых концентрациях для профилактики и лечения потенциальных грибковых заболеваний.