

**САНЯ ОЛЬГА ВЛАДИМИРОВНА**

**НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПОВЫШЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И  
ИММУННОГО СТАТУСА ДИСКУСОВ (*SYMPHYSODON HARALDI*) В  
АКВАКУЛЬТУРЕ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИКА  
«СУБТИЛИС-С»**

**1.5.5. Физиология человека и животных**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» (г. Москва).

**Научный руководитель** доктор биологических наук, доцент Пронина Галина Иозеповна.

**Официальные оппоненты:**

Голованова Ирина Леонидовна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории экологии рыб Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук (пос. Борок).

Селюков Александр Германович, доктор биологических наук, профессор кафедры зоологии и эволюционной экологии животных, Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Тюменский государственный университет (г. Тюмень).

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 35.2.025.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный аграрный университет», 630039, г. Новосибирск, ул. Добролюбова, 160.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке университета и на сайте ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ <http://nsau.edu.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Князев Сергей Павлович

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Условия искусственного выращивания рыб значительно отличаются от естественных. Изменения температуры, гидрохимического режима и плотности посадки могут оказывать негативное влияние на иммунную резистентность (Uribe et al., 2011). Одним из эффективных методов профилактики болезней является использование пробиотиков, считающихся альтернативой антибиотикам, неорганическим красителям и вакцинации из-за их широкого спектра действия, экономической эффективности и экологической безопасности (Elkamel, Mosaad, 2012).

Для успешного разведения животных в искусственных условиях, необходимо учитывать физиологические принципы размножения и передачи иммунных свойств от родителей потомству. Дискусы в этом смысле являются прекрасным модельным объектом для изучения физиологии вскармливания и передачи иммунных свойств от родителей потомству через секрет собственного тела.

В данной работе представлены результаты изучения действия пробиотика «Субтилис-С» на иммунную резистентность половозрелых дискусов и жизнестойкость их потомства. Оценка физиологического состояния и иммунного статуса рыб проводилась по показателям крови, отражающим гомеостаз организма и его отношения с окружающей средой (Ahmed, Sheikh, 2020). Гематологические параметры часто используются в качестве важного показателя для оценки состояния здоровья рыб и позволяют его контролировать, что необходимо для успешного разведения дискусов.

Исследованиями крови рыб занимались многие авторы. Были выявлены изменения показателей крови при различных патологиях и компенсаторных адаптивных реакциях (Hrubec et al., 2000; Esteban, 2012; Grant, 2015). В частности, показано, что при экологическом стрессе у многих видов рыб отмечается относительная нейтрофилия, связанная с фагоцитозом (Savari et al., 2011).

Известны питательные и иммунные компоненты эпидермального секрета кормящих дискусов: альдолаза, нуклеозиддифосфат киназа, белки теплового шока, тиоредоксин пероксидаза, гемопексин, лектин С-типа. (Chong et al., 2006; Buckley, 2012). Однако в доступной литературе о наличии в эпидермальном секрете кормящих дискусов лактоферрина, свойственного лактирующим млекопитающим и ответственным за колостральный иммунитет, информации не найдено. В связи с этим одной из задач стало исследование иммунных свойств эпидермального секрета по содержанию лактоферрина. Лактоферрин относится к кислороднезависимым факторам неспецифической иммунной защиты и обладает противовирусным, антибактериальным и фунгицидным действием (Бухарин и др., 2011). В связи с вышеизложенным, тема диссертации является актуальной.

**Цель исследования:** определить и научно обосновать повышение резистентности и иммунного статуса дискусов при использовании пробиотика «Субтилис-С» в преднерестовый и нерестовый периоды.

### **Задачи исследования:**

1. Определить абсолютную и относительную скорость роста дискусов при скармливании пробиотика «Субтилис-С».
2. Установить влияние добавки «Субтилис-С» на морфологические, биохимические, иммунологические параметры крови половозрелых дискусов (родительских пар и ремонтного стада).
3. Провести качественную и количественную оценку содержания лактоферрина в эпидермальном секрете дискусов при кормлении добавкой «Субтилис-С».
4. Оценить выживаемость потомства дискусов на ранних стадиях онтогенеза при скармливании пробиотика родителям.
5. Дать предложения по использованию пробиотика для повышения иммунного статуса дискусов в аквакультуре.

**Научная новизна исследований.** Впервые проведены физиолого-иммунологические исследования крови и эпидермального секрета половозрелых дискусов (*Symphysodon haraldi*) при применении пробиотической добавки «Субтилис-С».

Показано повышение иммунного статуса (по морфологическим показателям крови и гуморальным показателям эпидермального секрета) родительских пар и выживаемость потомства (более чем на 25%) под влиянием пробиотика.

Доказано наличие лактоферрина в эпидермальном секрете кормящих дискусов и увеличение его содержания (на 41,5 нг/мл) при скармливании добавки «Субтилис-С».

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Определено влияние пробиотика на эритропоэз и лейкограмму половозрелых дискусов, клеточный и гуморальный иммунитет крови и эпидермального секрета, а также на выживаемость потомства.

Для увеличения выживаемости потомства дискусов рекомендовано скармливать родительским формам пробиотик «Субтилис-С» в дозе 1 г на кг корма в течение двух месяцев.

Результаты исследований используются в учебном процессе для подготовки студентов по дисциплинам «Болезни рыб», «Индустриальное и декоративное рыбоводство» и др.

Результаты работы внедрены в научно-исследовательские работы ВНИИП. Используются элементы методики проведения физиологической оценки и иммунного статуса, определения лактоферрина.

**Методология и методы исследований.** Морфометрический, гематологический, биохимический, цитохимический, иммунно-ферментный. Для обработки данных применялся метод вариационной статистики.

### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Применение кормовой добавки «Субтилис-С» активизирует появление незрелых форм клеток эритроидного ряда, увеличивает долю моноцитов (макрофагов) в лейкограмме.
2. Скармливание пробиотика «Субтилис-С» увеличивает содержание

катионного лизосомального белка в нейтрофилах крови, как отражение фагоцитарной активности нейтрофилов.

3. При кормлении пробиотиком увеличивается содержание лактоферрина в эпидермальном секрете кормящих дискуссов.

4. Применение кормовой добавки «Субтилис-С» увеличивает выживаемость потомства на ранних стадиях онтогенеза.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов обеспечена применением адекватного набора методов исследований, оригинальными продуманными схемами постановки экспериментов, достаточными объемами контрольных и экспериментальных выборок, использованием необходимых методов и статистической обработкой данных.

**Апробация результатов работы.** Результаты работы докладывались на отечественных и международных научных конференциях: International Conference «Process Management and Scientific Developments» (Birmingham, UK, March 31, 2020); Всероссийская научно-практическая конференция: «Инновационные решения для повышения эффективности аквакультуры» (Москва, 5 февраля 2019); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Новейшие генетические технологии для аквакультуры» (Москва, 29-31 января 2020); Международная научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённой 160-летию В.А. Михельсона (Москва, 9-11 июня 2020); Международная научная конференция профессорско-преподавательского состава, посвящённая 155-летию РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, 2-4 декабря 2020); Всероссийская с международным участием научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 155-летию со дня рождения Н.Н. Худякова (Москва, 7-9 июня 2021); IX Научно-практическая конференция молодых учёных с международным участием, посвящённая 140-летию ВНИРО (Москва, 11-12 ноября 2021).

**Личный вклад автора.** Автором осуществлен анализ имеющейся информации по проблематике представленной диссертации и подготовлен обзор литературы. Им выполнены все виды экспериментальных работ, проведена статистическая обработка и графическое представление полученных результатов. Он принял непосредственное участие в анализе полученной информации, в подготовке рукописи диссертации и статей соответствующей тематики.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 15 научных трудов, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 2 статьи в изданиях, индексируемых в Международной базе данных Scopus.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 123 страницах, состоит из введения, основной части, содержащей 20 рисунков, 8 таблиц, заключения, списка сокращений, списка литературы (включает 211 наименований, в том числе 143 – на иностранном языке), 1 приложения.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследования являлись рыбы вида голубой дискус согласно систематике *Symphysodon haraldi* (Н. Bleher, 2007). В соответствии с современной систематикой *Symphysodon haraldi* является синонимом *Symphysodon aequifasciatus* Pellegrin, 1904. (Geerts, 2011).

Ремонтное стадо дискусов содержалось в 400 литровых аквариумах с принудительной аэрацией и водоочисткой по 20 особей в каждом. Кормом для рыб служили: мясорыбный фарш, сухой корм TetraMin flakes, замороженные личинки хирономид *Chironomus plumosus*.

Родительские пары отсаживались в отдельные нерестовые 100 литровые аквариумы, где рыбы нерестились и выкармливали потомство. Аквариумы снабжались глиняным субстратом для нереста. Родительские пары получали корм 1 раз в день: замороженный мотыль длиной 28-35 мм.

Ремонтное стадо и родительские пары были разделены на 2 группы каждая по принципу аналогов. Рыбам опытной группы давали кормовую добавку пробиотик «Субтилис-С» в количестве 1 г/кг корма, производства ООО «НИИ Пробиотиков» содержащий штаммы бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*. Продолжительность эксперимента составляла 2 месяца.

Общая схема эксперимента приведена на рисунке 1.

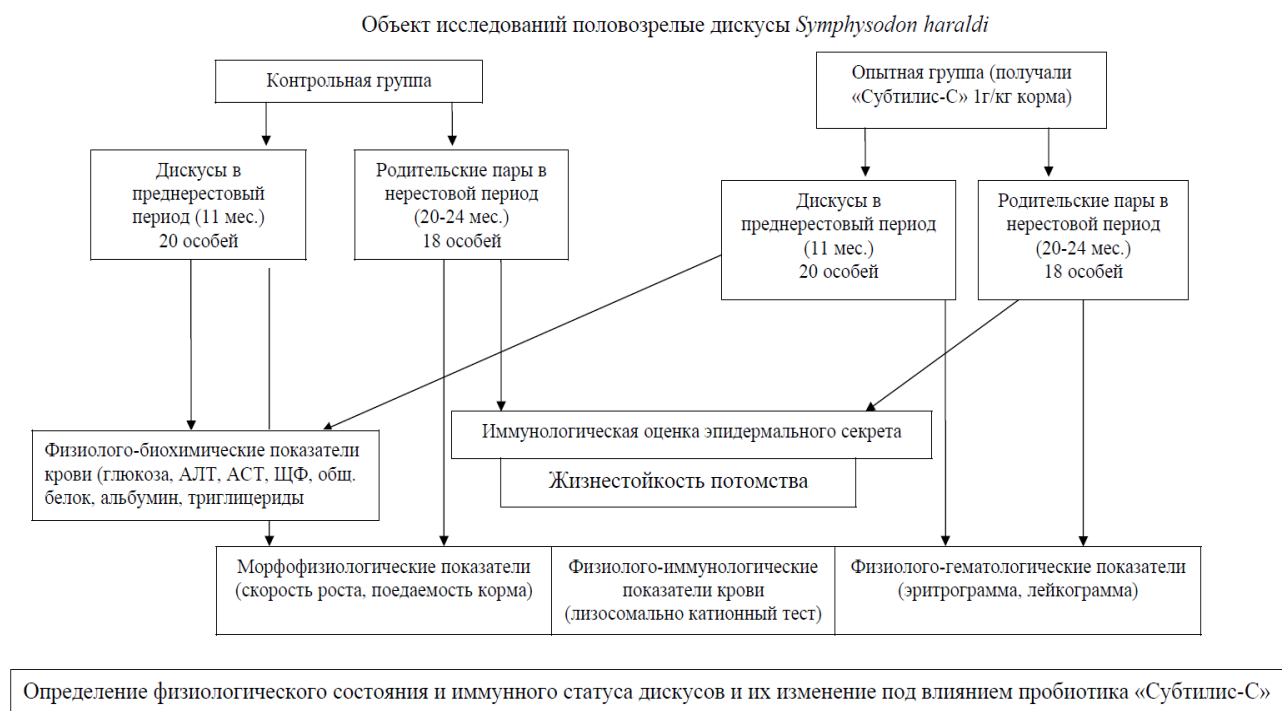


Рисунок 1 – Схема эксперимента

Для определения морфометрических показателей проводили бонитировку рыб до и после опыта.

Для физиолого-иммунологической оценки отбиралась кровь у дискусов прижизненным методом одноразовыми шприцами из хвостовой вены (рис. 2).



Рисунок 2 – Прижизненный отбор крови у дискусов из хвостовой вены

Физиолого-иммунологическую оценку рыб проводили в соответствии с методологией, позволяющей прижизненно и информативно определить их состояние здоровья и иммунный статус.

Исследовались морфологические, биохимические и цитохимические показатели.

*Морфологический анализ* проводился на окрашенных по Паппенгейму мазках периферической крови. Определение эритрограммы и лейкограммы осуществлялось методом дифференциального подсчета клеток на цифровом микроскопе Биолэб ЛЮМ 11.

Фагоцитоз оценивался цитохимическим методом с бромфеноловым синим. Определялось содержание неферментного катионного белка в лизосомах нейтрофилов крови рыб (Пронина Корягина, 2017).

*Биохимические показатели* сыворотки крови определялись на анализаторе Chem Well Awareness Technology. В сыворотке крови дискусов определяли активность ферментов: аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ) и содержание субстратов: глюкоза, лактат, мочевины, общий белок, альбуминовая фракция, холестерин, триглицериды.

У родительских пар дискусов определяли *лактоферрин* в плазме крови и эпидермальном секрете. На рисунке 3 показана техника отбора слизи с тела (Chong, 2006).



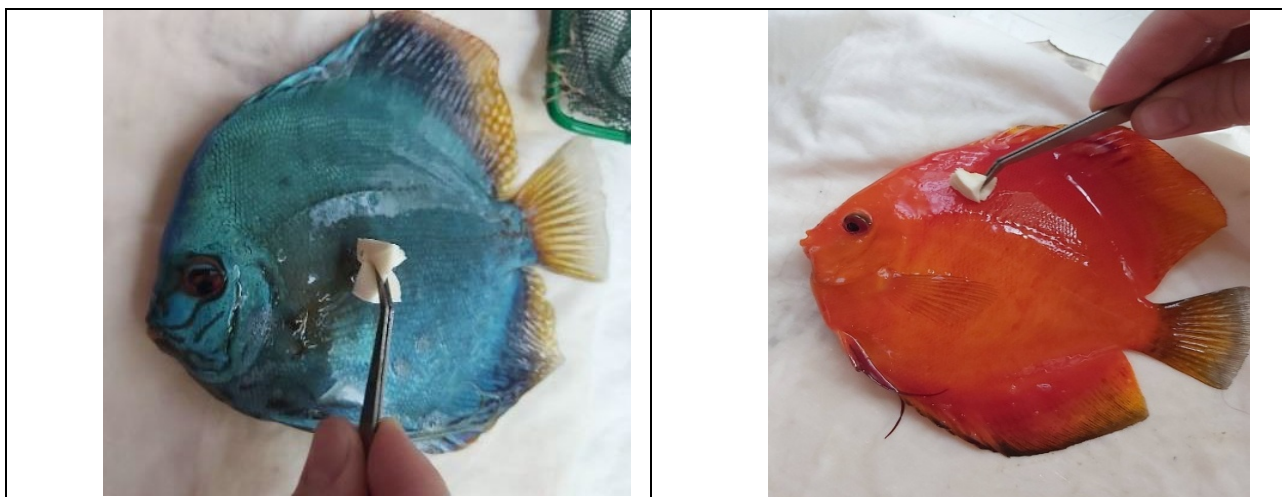


Рисунок 3 – Получение эпидермального секрета

Лактоферрин определялся «сэндвич» методом твердофазного иммуноферментного анализа (Тараканова и др., 2019).

*Выживаемость потомства* оценивали визуальным методом подсчета на ранних стадиях онтогенеза: от нереста до перехода малька на самостоятельное существование.

За время проведения 2 этапа опыта нерестовые аквариумы с родительскими парами ежедневно проверяли на наличие кладок икры и предличинки, а также наблюдали за ростом личинки и малька.

Проводили фотофиксацию и штучный подсчет на 3-х стадиях развития: эмбриональной, стадии выклева предличинки и при пересадке в отдельный аквариум (в возрасте 21 день).

*Статистическая обработка* полученных результатов проводилась методом вариационной статистики по Стьюденту с использованием программы Excel. Достоверными считались различия показателей при  $p < 0,05$ .

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1. Влияние пробиотика «Субтилис-С» на размерно-весовые показатели дискусов

За время проведения эксперимента случаев гибели дискусов участвующих в эксперименте не отмечено.

Результаты исследования показали, что пробиотик «Субтилис-С» не оказал влияния на размерно-весовые показатели взрослых дискусов: как ремонтного стада, так и родительских пар. За время проведения опыта у дискусов ремонтного стада обеих групп отмечено увеличение массы тела.

В опытной группе привес составил 6,7 г, в контрольной – 5,8 г. Достоверных различий по данному показателю зафиксировано не было.

Относительная скорость роста составила, в опытной группе 0,40%, в контрольной группе 0,37%, что соответствует оптимальному значению для дискусов. В этот период (возраст 11-12 месяцев) еще наблюдается активный рост рыб.

Применение пробиотика также не оказало влияния на увеличение массы и



длины тела у нерестящихся пар.

Родительские пары дискусов в контрольной группе показали абсолютную скорость роста 0,105г/сут, а в опытной группе 0,113г/сут.

Относительная скорость роста взрослых дискусов в нерестовый период в 3 раза ниже, чем у ремонтного стада, что связано с затратами энергии на размножение и возрастными изменениями.

Таким образом, результаты нашего исследования показали, что кормление половозрелых дискусов пробиотиком «Субтилис-С» в течение 2 месяцев не повлияло на их рост по сравнению с контролем. Это согласуется со многими исследованиями пробиотика рода *Bacillus* на семействе цихловые (например, *O. niloticus*) и других видах пресноводных рыб.

### 3.2. Изменения гематологических показателей и клеточного иммунитета дискусов при скармливании добавки «Субтилис-С»

Эритроцитроидный ряд в крови дискусов представлен эритробластами, нормобластами, базофильными эритроцитами и зрелыми эритроцитами (рис. 4).

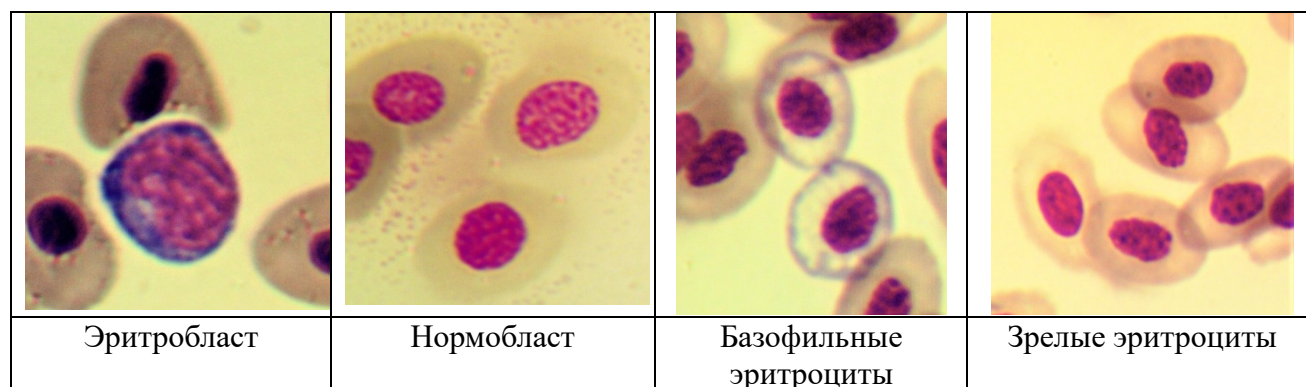


Рисунок 4 – Клетки эритроидного ряда дискусов

При подсчете лейкоцитарной формулы дискусов были обнаружены лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, а также незрелые клетки миелоидного и моноцитарного ряда (рис. 5).

В крови опытной группы дискусов ремонтного стада, получавших пробиотик, достоверно увеличилось количество бластных форм эритроцитов: в два раза по сравнению с контролем.

Доля более зрелых базофильных эритроцитов в общем количестве клеток эритроидного ряда уменьшилась за счет других форм эритроцитов.


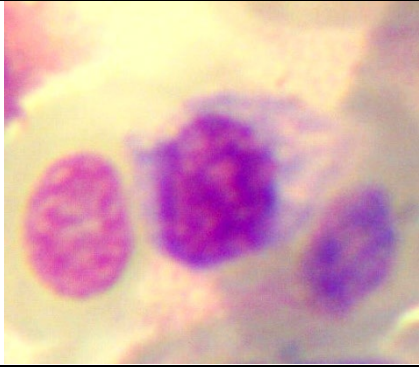
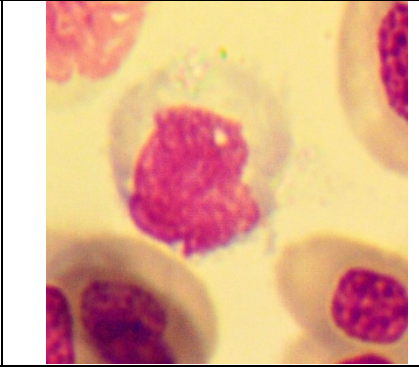


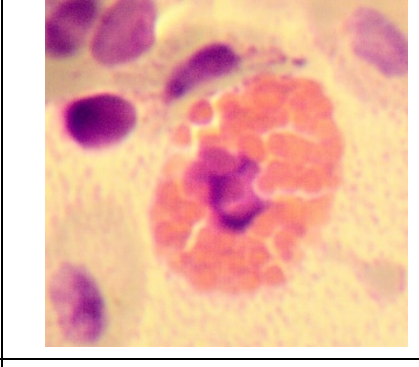
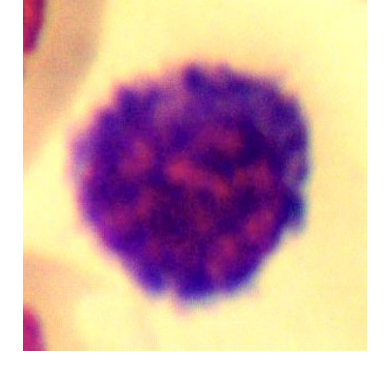
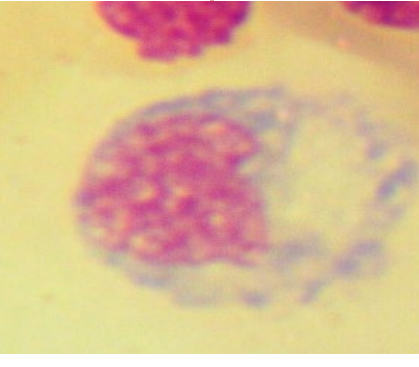
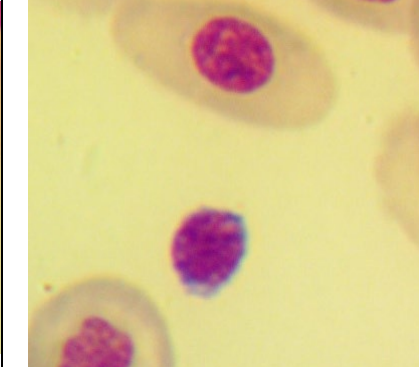
		
Миелобласт	Промиелоцит	Миелоцит
		
Метамиелоцит	Сегментоядерный нейтрофил	Эозинофил
		
Базофил	Моноцит	Лимфоцит

Рисунок 5 – Лейкоциты крови дискусов

Активация эритропоэза свидетельствует об усилении респираторной функций эритроцитов. А также об оптимизации изотонического и кислотно-щелочного баланса. Нормальный эритропоэз приводит к образованию достаточного количества эритроцитов для замены стареющих.

Пробиотик вызвал достоверное увеличение моноцитов в лейкограмме. Это свидетельствует о активации неспецифического звена клеточного иммунитета рыб – фагоцитоза. Процент палочкоядерных нейтрофилов через 2 месяца эксперимента снизился у рыб обеих групп. Вероятно, это связано с совершенствованием иммунной защиты в онтогенезе, так как палочкоядерные нейтрофилы являются незрелыми формами. Появление базофилов в лейкограмме дискусов опытной группы подтверждает усиление неспецифической клеточной защиты.

Результаты лизосомально-катионного теста показали, что кормление

пробиотиком увеличило содержание цитотоксичного катионного белка в лизосомах нейтрофилов, что свидетельствует об усилении активности макрофагов и, соответственно, клеточной защиты (табл. 1).

**Таблица 1** – Морфологические и цитохимические показатели дискусов старшего ремонтного стада

Показатели	Контроль		Опыт	
	До эксперимента	Через 2 месяца	До эксперимента	Через 2 месяца
	а	б	в	г
<b>Эритрограмма, %</b>				
<b>Гемоцитобласты, эритробласты</b>	<b>0,9±0,1</b>	<b>1,0±0,1</b>	<b>1,0±0,1</b>	<b>2,0±0,2аб</b>
Нормобласты	3,5±0,7	4,0±0,4	3,4±1,0	5,7±1,0
<b>Базофильные эритроциты</b>	<b>17,2±1,5</b>	<b>12,0±2,0</b>	<b>16,0±1,8</b>	<b>6,1±0,3аб</b>
Зрелые эритроциты	78,4±2,8	83,2±1,9	79,6±2,9	86,2±2,2
<b>Лейкоцитарная формула, %</b>				
Миелобласты	1,1±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1
Промиелоциты	0,9±0,1	1,2±0,3	1,0±0,1	1,2±0,1
Миелоциты	1,0±0,1	1,3±0,3	1,0±0,1	1,0±0,1
Метамиелоциты	2,1±0,1	2,0±0,4	2,0±0,1	2,0±0,1
Палочкоядерные нейтрофилы	5,1±0,7	1,5±0,5а	5,0±0,7	1,8±0,1а
Сегментоядерные	2,5±0,6	1,4±0,3	2,7±0,6	1,8±0,1
Эозинофилы	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1
<b>Базофилы</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1,0±0,1</b>
<b>Моноциты</b>	<b>1,9±0,5</b>	<b>2,2±0,2</b>	<b>2,0±0,5</b>	<b>3,8±0,3аб</b>
Лимфоциты	84,4±2,4	88,4±1,4	84,8±2,4	86,4±1,4
<b>Лизосомально-катионный тест</b>				
СЦК, ед.	1,16±0,04	1,18±0,05	1,20±0,05	1,31±0,01б

Примечание: здесь и далее а, б, в, г – различия достоверны  $p < 0,05$

По эритрограмме у нерестящихся и кормящих дискусов достоверных различий между группами не отмечено (табл. 2).

Изменения в лейкоцитарной формуле под влиянием пробиотика у нерестящихся и кормящих дискусов аналогичны таковым у ремонтного стада рыб. Доля моноцитов (макрофагов крови) опытных дискусов более чем в два раза выше контроля. В лейкограмме дискусов опытной группы, в отличие от контрольных рыб, отсутствуют эозинофилы, что является физиологической нормой и очевидно связано с нерестом и кормлением. Под действием пробиотика в крови нерестящихся и кормящих дискусов выявлены аналогичные старшему ремонту изменения: увеличение доли моноцитов – отмечена активация моноцитопоеза. Моноциты проявляют высокую фагоцитарную

активность к продуктам распада клеток и тканей и способны нейтрализовать действие токсинов.

**Таблица 2 – Морфологические и цитохимические показатели родительских пар дискусов**

Показатели	Контроль		Опыт	
	До эксперимента	Через 2 месяца	До эксперимента	Через 2 месяца
	а	б	в	г
Эритрограмма, %				
Гемоцитобласты, эритробласты	-	0,5±0,3	0,3±0,3	0,5±0,3
Нормобласты	9,1±2,9	7,1±0,9	6,3±0,7	8,8±1,2
Базофильные эритроциты	14,7±3,1	13,5±1,4	15,3±2,7	17,0±1,6
Зрелые эритроциты	76,2±4,4	78,9±2,3	78,1±2,9	73,7±4,2
Лейкоцитарная формула, %				
Миелобласты	0,3±0,3	0,3±0,3	0,8±0,3	0,3±0,2
Промиелоциты	1,3±0,8	1,0±0,7	-	0,7±0,3
Миелоциты	1,0±0,7	-	0,5±0,3	1,2±0,5
Метамиелоциты	-	0,7±0,5	0,3±0,3	0,7±0,5
Палочкоядерные нейтрофилы	3,0±1,1	2,9±0,8	2,8±0,4	4,8±0,9
Сегментоядерные	2,3±0,8	1,3±0,7	0,6±0,3	0,7±0,3
<b>Эозинофилы</b>	<b>0,9±0,7</b>	<b>0,7±0,3</b>	<b>0,3±0,2</b>	-
Базофилы	0,2±0,1	-	-	-
<b>Моноциты</b>	<b>5,4±1,4</b>	<b>3,8±0,7</b>	<b>5,7±0,4</b>	<b>12,8±1,2абв</b>
<b>Лимфоциты</b>	<b>85,6±2,2</b>	<b>89,3±2,3</b>	<b>89,0±0,5</b>	<b>78,8±1,4абв</b>
Лизосомально-катионный тест				
<b>СЦК, ед.</b>	<b>1,21±0,03</b>	<b>1,18±0,03</b>	<b>1,12±0,06</b>	<b>1,43±0,07абв</b>

Выявлено, что особенностью дискусов является наличие в лейкограмме бластных форм миелоидного ряда. У тилипии отмечена большая доля эозинофилов и базофилов, что вероятно связано с участием этих клеток в воспалительной реакции и защите от инвазий (Саная и др., 2021а).

К основным фагоцитирующим клеткам относятся макрофаги (моноцитарный ряд) и микрофаги (нейтрофилы) рыб. Моноциты и нейтрофилы, основные участники фагоцитоза у рыб, удаляют бактерии главным образом путем производства активных форм кислорода во время респираторного взрыва. Кроме того, нейтрофилы обладают миелопероксидазой в своих цитоплазматических гранулах, которые в присутствии галогенида и перекиси водорода убивает бактерии путем галогенирования бактериальной клеточной стенки. Кроме того, эти клетки содержат лизоцимы и другие гидролитические ферменты в своих лизосомах (Uribe и др., 2011).

Выявлено что пробиотик, содержащий *B. subtilis* (109 КОЕ г-1) при добавлении к рациону в дозах 5 г/кг и 10 г/кг корма в течение 2-3 месяцев улучшают неспецифический иммунитет у *Brycon amazonicus*. При этом отмечается повышение уровня и фагоцитарной активности без увеличения

фагоцитарного индекса (Dias et al., 2020).

Кормление пробиотиком «Субтилис-С» родительских пар дискусов, так же как ремонтного стада, вызывает повышение количества лизосомального катионного белка нейтрофилов крови – как резерв потенциальной клеточной защиты макрофагов.

Иммуностимулирующие свойства пробиотика «Субтилис-С» усиливают ферментативную мобилизацию нейтрофилов, которые содержат большое количество пероксидазы, лизосомального фермента, присутствующего в фагоцитирующих клетках, который способствует окислению перекиси водорода во время фагоцитоза.

Важным маркером иммунной устойчивости является цитохимический показатель кислороднезависимого фактора клеточного иммунитета. Неферментные катионные белки лизосом обладают прямым киллерным действием на патогены (Pronina, 2017; Chowdhury, 2020).

Как известно, одной из систем, обеспечивающих биоцидность нейтрофилов, представляет собой кислород независимые механизмы. К ним в первую очередь относятся специфические катионные белки – дефенсины (от англ. defence – защита). По своему биологическому действию они весьма разнообразны: они могут повреждать мембраны микробов (катепсин G), расщеплять мукопептиды клеточной стенки бактерий (лизозим), лишать бактерии железа, необходимого для их пролиферации (лактоферрин), переваривать убитые микробы (Маянский, Маянская, 1995).

Показано, что катионные белки обладают универсальной антимикробной активностью, свойствами медиаторов воспаления, фактора проницаемости, стимулятора фагоцитоза, модификатора дыхательных и ферментативных процессов в клетке. Высказано предположение о трех взаимосвязанных механизмах внеклеточного антимикробного действия лизосомных катионных белков нейтрофильных гранулоцитов в очагах воспаления: прямое антимикробное действие, подготовка бактерий к фагоцитозу, стимуляция фагоцитарной и антимикробной активности макрофагов при их контакте с катионными белками (Пронина, Корягина, 2017).

### **3.3. Биохимические показатели крови дискусов под действием пробиотика**

Результаты биохимических исследований сыворотки крови рыб в эксперименте показали ряд достоверных различий у дискусов, получавших пробиотик, по сравнению с контрольными рыбами.

Через 2 месяца эксперимента в группе получавшей пробиотик «Субтилис-С» отмечен более низкий показатель активности АЛТ на 26,2 ед/л, что в 1,7 раза ниже чем в контроле. Увеличение уровня фермента наблюдается при разрушении клеток сердечной мышцы и печени, вероятно пробиотик усилил клеточную резистентность миоцитов и гепатоцитов дискусов. В норме у рыб активность АЛТ в крови очень низкая, поэтому в данном случае снижение активности фермента является благоприятным признаком (табл. 3).

**Таблица 3 – Биохимические показатели крови дискусов**

Показатели	Контроль n=12	Опыт n=12
	а	б
<b>АЛТ, ед/л</b>	<b>63,7±16,4</b>	<b>37,5±7,3а</b>
<b>АСТ, ед/л</b>	<b>60,3±13,8</b>	<b>153,9±32,3а</b>
<b>Глюкоза, ммоль/л</b>	<b>4,6±0,4</b>	<b>3,4±0,2а</b>
<b>Лактат, мг/дл</b>	<b>16,6±1,2</b>	<b>7,9±1,0а</b>
ЩФ, ед/л	153,5±37,6	103,3±41,1
Мочевина, мг/дл	9,4±5,3	13,0±2,8
<b>Мочевая к-та, мг/дл</b>	<b>5,6±1,1</b>	<b>2,9±0,3а</b>
Общ белок, г/л	60,8±12,6	52,2±3,2
Альбумин, г/л	21,6±5,1	21,8±0,8
Триглицериды, мг/дл	502,8±28,1	472,2±7,3
Холестерин, мг/дл	439,2±121,5	456,7±44,1

Усиление активности АСТ в опытной группе выше на 93,6 ед/л, чем в группе не получавшей пробиотик. По нашим наблюдениям иммунноустойчивые рыбы имеют достаточно высокий уровень АСТ т.к. АСТ участвует в переаминировании аминокислот, то можно предположить, что усиление действия фермента связано с усилением белкового обмена. Также увеличение активности АСТ свидетельствуют о большей стрессоустойчивости рыб.

Уровень глюкозы в крови дискусов опытной группы был 3,4 ммоль/л, по сравнению с 4,6 ммоль/л в контроле, что достоверно меньше. Более низкое значение глюкозы говорит о сбалансированном углеводном обмене, характеризующим оптимальный баланс глюкозы рыб, получавших пробиотик.

Рядом исследователей напротив, отмечено повышение уровня глюкозы при добавлении пробиотика, содержащего *B. subtilis* в дозе 5 и 10 мг/кг (Dias et al., 2020).

Авторы связывают это со стрессовой реакцией рыб. В нашем случае пробиотик снижает уровень стресса у дискусов, что проявляется снижением содержания глюкозы в крови. При этом меньше пар рыб уничтожают свои кладки икры. Вероятно, оптимальной дозой пробиотика можно считать менее 1-1,5 мг/кг корма, как прописано в инструкции по применению «Субтилис-С».

У дискусов в опытной группе уровень лактата ниже на 8,7 мг/дл, что подтверждает нормализацию метаболизма глюкозы (гликолиза), так как повышение этого показателя может свидетельствовать о метаболическом ацидозе и нарушении кислотно-щелочного баланса организма. Содержание мочевой кислоты в крови дискусов опытной группы достоверно ниже на 2,7 мг/дл, что связано с хорошей работой их выделительной системы, выводящей этот конечный продукт обмена пуринов. Все показатели находились в пределах референтных значений, определенных для рыб.

В исследованиях воздействия спорообразующих бактерий рода *Bacillus*, показано значительное снижение в сыворотке крови уровней АЛТ, АСТ и

глюкозы в группах, получавших пробиотики, по сравнению с контролем (Dowidar et al., 2018).

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить, что применение пробиотика «Субтилис-С» достоверно способствует усилению белкового обмена, нормализации баланса глюкозы и повышению стрессоустойчивости у опытной группы.

Уровень аланинаминотрансферазы снизился на 70% в опыте по сравнению с контролем, это связано, вероятно, с тем, что с повышением резистентности мембран гепатоцитов и миокардиоцитов. Известно, что увеличение уровня АЛТ в сыворотке крови связано с разрушением клеток печени и сердечной мышцы (Galvin et al., 2015; Claus et al., 2021). Липидный обмен достаточно высок судя по содержанию триглицеридов и холестерина.

Повышенные белковый и липидный обмены связаны с тем, что питание рыб осуществлялось концентрированными и высокоэнергетическими кормами, большую долю которых представляют корма животного происхождения.

#### **3.4. Влияние пробиотика «Субтилис-С» на содержание лактоферрина в крови и эпидермальном секрете кормящих дискусов и выживаемость потомства**

В крови и эпидермальном секрете кормящих дискусов обеих групп был обнаружен лактоферрин. В группе кормящих дискусов, получавших пробиотик, отмечено увеличение содержания лактоферрина в эпидермальном секрете и снижение его в крови (табл. 4).

**Таблица 4 – Содержание лактоферрина в крови и эпидермальном секрете кормящих дискусов, нг/мл**

Показатели	Контроль	Опыт
	а	б
Кровь	165,8±25,9	91,0±4,8а
Эпидермальный секрет	71,5±13,7	113,0±8,8а

Количество лактоферрина в крови дискусов опытной группы на 74,8 нг/мл меньше, чем у дискусов контрольной группы. В эпидермальном секрете родительских пар опытной группы содержание лактоферрина напротив выше на 41,5 нг/мл по сравнению с контрольной группой.

Выявлена обратная корреляция содержания лактоферрина в крови и эпидермальном секрете с коэффициентом равном -0,79. Можно предположить, что по аналогии с млекопитающими пробиотик усиливает выработку лактоферрина в эпидермальном секрете. Эпидермальный секрет кормящих дискусов помимо питательной ценности обладает адаптогенными свойствами и повышает защитные механизмы иммунитета у личинок, что может быть связано с входящим в его состав лактоферрином.

Выявлено, что у дискусов с высоким уровнем лактоферрина в эпидермальном секрете (опытная группа) меньше уничтоженных кладок и больше выращенных и высаженных пометов, чем у родительских пар с более



низким уровнем лактоферрина в кожном секрете (Саная и др., 2023).

Доказано благоприятное влияние пробиотиков на свойства грудного молока. В настоящее время сформулировано представление о том, что кишечная микробиота является, в сущности «виртуальным эндокринным органом». Целый ряд бактерий вырабатывает гормоны и гормоноподобные вещества, например, глюкагонподобный пептид-1, пептид YY, грелин, лептин. А также биологически активные вещества со свойствами нейромедиаторов. Пробиотики участвуют в синтезе и всасывании витаминов К, группы В, фолиевой и никотиновой кислот (Попова и др., 2019).

Увеличение лактоферрина в эпидермальном секрете кормящих дискусов очевидно способствует повышению резистентности и выживаемости потомства. Свойства лактоферрина позволяют организму противостоять различным негативным воздействиям. Выявлено, что экзогенный лактоферрин способен ингибировать перекисное окисление липидов путем блокирования образования свободных гидроокисильных радикалов и активировать ферменты антиоксидантной системы (Постникова и др., 2020).

Обнаружение лактоферрина в крови и эпидермальном секрете дискусов подтверждает эволюционное приспособление этих рыб к сохранению потомства. Добавление пробиотика «Субтилис-С» в рацион кормящих дискусов увеличивает выработку лактоферрина в эпидермальном секрете родителей, что ведет к усилению иммунитета потомства. Это проявляется в лучшей оплодотворяемости икры, выживаемости личинок и мальков рыб.

Эмбриональная стадия начинается у дискусов сразу после оплодотворения икры самцом. Длится 56-60 часов при температуре 29-30°C (Mattos et al., 2016). Оплодотворяемость икры оценивалась через 30-40 часов после нереста, когда видны неоплодотворенные икринки, с характерным помутнением или побелением (рис. 8а). Через 56-64 часа происходит вылупление предличинки из икры (рис. 8б). Стадия личинки определяется с началом свободного плавания. Спустя 5-6 дней после нереста молодь перебирается на родителей, чтобы питаться их кожными выделениями (рис. 8в) (Onal et al., 2010).

Личиночная стадия является наиболее критичной в онтогенезе дискусов, потому что выживаемость личинки напрямую зависит от количества и качества эпидермального секрета родителей.

Мальковая стадия характеризуется исчезновением личиночных органов, появлением чешуи, развитием плавников, обретением дисковидной формы. Выживаемость малька считали во время пересадки в отдельный аквариум (рис.8г).

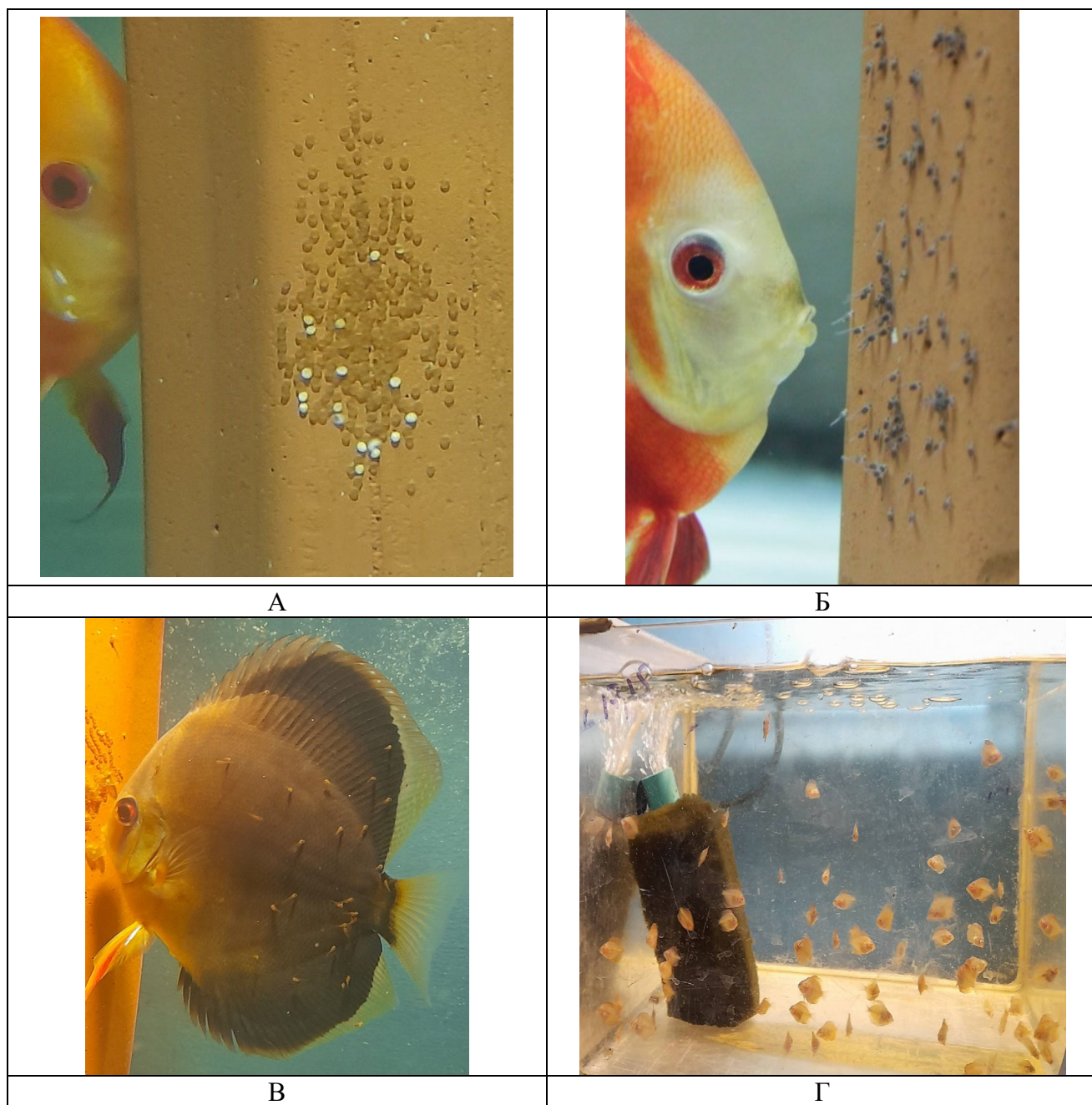


Рисунок 8 – Стадии развития дискусов в раннем онтогенезе

За время проведения эксперимента гибели дискусов среди родительских пар не отмечено.

Результаты исследований показали, что родительские пары дискусов, получавшие пробиотик «Субтилис-С», реже уничтожали кладки икры и вырастили на 12 помётов больше, чем рыбы контрольной группы (табл. 5).

Вероятно, это происходило в связи со снижением стресса дискусов опытной группы за счёт нормализации микрофлоры кишечника и углеводного обмена, что подтверждено результатами биохимических показателей у ремонтного стада.

**Таблица 5** – Показатели жизнестойкости потомства дискусов за 2 месяца

Показатели	Контроль 9 пар	Опыт 9 пар
	а	б
Количество уничтоженных кладок, шт	30	14
Гибель пометов, шт	7	8
Выращено и высажено пометов, шт.	10	22
Количество выращенных личинок с одного помета, шт	52,3±2,9	65,1±3,4а
Выживаемость икры, %	80,1±2,9	89,2±2,4а
Выход предличинки, %	61,8±7,2	51,4±6,8
Выход малька, %	40,3±3,3	51,0±2,3а

Гибель пометов наблюдалась в одинаковом количестве, как в опытной, так и в контрольной группах, чаще всего погибала личинка в возрасте 7 дней, в период перехода с эндогенного на экзогенное питание.

Выход живой икры у опытной группы дискусов был выше, чем в контроле примерно на 10%.

По выживаемости предличинки достоверных различий в опыте и контроле не отмечено. Что закономерно, так как предличинка питается за счёт желточного мешка и на этой стадии не зависит от родителей.

Добавление к корму дискусов пробиотика «Субтилис-С» повышает выживаемость личинок и мальков. Чему способствует иммунные свойства эпидермального секрета родителей.

Выживаемость малька у дискусов, получающих «Субтилис-С» была на 27% выше, чем в группе рыб без кормления пробиотиком.

Полученные результаты позволяют ближе подойти к пониманию фундаментальных основ эволюционного развития, так как цихлиды, находясь на более низкой ступени, предположительно раньше млекопитающих перешли на вскармливание потомства, тем самым повысив их выживаемость.

При применении пробиотиков уменьшается процент пар дискусов, уничтожающих кладки. Это, по-видимому, связано со снижением стрессовой реакции и оптимизацией микрофлоры кишечника рыб.

## ВЫВОДЫ

1. Скармливание пробиотика «Субтилис-С» в течение двух месяцев не влияет на абсолютную и относительную скорость роста половозрелых дискусов.

2. Под влиянием пробиотика интенсивнее идет эритропоэз: у ремонтного стада дискусов: содержание бластных форм эритроцитов на 100% (в два раза) выше, чем в контроле, за счет базофильных эритроцитов.

3. Применение пробиотика способствует активации фагоцитоза: увеличивается доля моноцитов в лейкограмме как у старшего ремонта, так и у родительских пар дискусов на 73% и 125% соответственно.

4. «Субтилис-С» увеличивает содержание катионного лизосомального белка в нейтрофилах крови дискусов, что свидетельствует о высокой

потенциальной фагоцитарной активности. СЦК у ремонтной группы выше на 0,13, у кормящих пар на 0,25 единицы.

5. Под действием добавки снижается активность аланинаминотрансферазы дискусов на 26,2 ед/л (практически в 2 раза), вероятно, в результате усиления клеточной резистентности миоцитов и гепатоцитов. Активность аспартатаминотрансферазы при этом увеличивается на 93,6 ед/л и снижается уровень мочевой кислоты на 2,5 мг/дл, что связано с усилением белкового обмена. Пробиотик «Субтилис-С» нормализует углеводный обмен, снижая содержание глюкозы на 1,2 ммоль/л и лактата на 8,5 мг/дл.

6. Кормление пробиотиком увеличивает на 41,5 нг/мл (на 58%) содержание лактоферрина в эпидермальном секрете кормящих дискусов и снижает в крови на 74,8 нг/мл (на 45%).

7. Скармливание добавки «Субтилис-С» в дозе 1г/кг корма в течение двух месяцев повышает иммунный статус старшего ремонта, родительских форм дискусов и увеличивает выживаемость потомства: выход икры дискусов на 10%, малька – на 27%.

### **Практические предложения:**

1. Добавлять в рацион родительских пар дискусов пробиотик «Субтилис-С» в дозе 1 г на кг корма в течение 2-х месяцев для увеличения выживаемости потомства дискусов.

2. Методы прижизненного отбора, исследования крови (эритрограмма, лейкоцитарная формула, биохимические параметры, лизосомально-катионный тест), а также эпидермального секрета дискусов (содержание лактоферрина) могут использоваться для оценки физиолого-иммунологического состояния рыб в декоративной аквакультуре.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы:**

1. Дальнейшее изучение защитных свойств эпидермального секрета дискусов: наличие лизоцима, иммуноглобулинов А, М, G под влиянием пробиотиков, и передача иммунных свойств потомству.

2. Для изучения физиологии колострального иммунитета требуется исследование влияния пробиотиков на других видах рыб, в том числе семейства Цихловые, отличающиеся заботой о потомстве.

3. Разработка методик оценки иммунитета рыб на разных стадиях онтогенеза по наиболее информативным показателям.

4. Определение референтных значений и физиологических норм гематологических, цитохимических и биохимических показателей дискусов в эпидермальном секрете и крови.

5. Разработка неинвазивных методов оценки состояния здоровья и иммунного статуса рыб по показателям эпидермального секрета.

6. Разработка подкормки для личинки дискусов с использованием лактоферрина.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Саная, О.В. Изучение содержания лактоферрина в эпидермальном секрете кормящих дискусов на выживаемость выкармливаемого потомства / О.В. Саная, Г.И. Пронина, А.О. Ревякин // Вестник Тверского государственного университета. Серия Биология и экология. – 2021. – № 4 (64). – С. 62-69.

2. Саная, О.В. Влияние пробиотика на физиологическое состояние и иммунный статус рыб семейства Цихловые / О.В. Саная, Г.И. Пронина, А.И. Черкалин // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2022. – № 1. – С. 33-37.

### Публикации в изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных:

3. Sanaya, O.V. Probiotics as means of discus fish (*Symphysodon haraldi*) prevention disease in aquaculture / O.V. Sanaya // AACL BIOFLUX. – 2022. – С. 737-743.

4. Саная, О.В. Влияние пробиотика «Субтилис-С» на содержание лактоферрина в крови и эпидермальном секрете кормящих дискусов / О.В. Саная, Г.И. Пронина, А.О. Ревякин // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2023. – № 1. – С. 52-57.

### Публикации в рецензируемых научных изданиях:

5. Пронина, Г.И. Физиологические особенности дискуса рода *Symphysodon* / Г.И. Пронина, О.В. Петрушина // Доклады ТСХА: Сборник статей. - Вып. 291. - Ч.V. – М.: Издательство РГАУ-МСХА, 2019. – С. 281-284.

6. Петрушина, О.В. Гематологические, цитохимические и биохимические исследования дискуса рода *Symphysodon* / О.В. Петрушина, А.О. Ревякин // Сборник статей: Материалы Всероссийской научно-практической конференции: «Инновационные решения для повышения эффективности аквакультуры» (Москва, ВВЦ, 5 февраля 2019 г.). – Т.1. – М.: Издательство «Перо», 2019. – С. 291-298.

7. Саная, О.В. Сравнительная физиолого-иммунологическая характеристика рыб семейства цихловые и карповые / О.В. Саная, Г.И. Пронина // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2020. – № 6. – С. 26-33.

8. Саная, О.В. Влияние пробиотика-иммуномодулятора «Субтилис-С» на физиологическое состояние дискусов *Symphysodon haraldi* по биохимическим показателям / О.В. Саная // Сборник статей: Мат. Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием «Новейшие генетические технологии для аквакультуры» (Москва, МВЦ «Крокус Экспо», 29-31 января 2020 г.). – М.: Издательство «Перо», 2020. – С. 346-349.

9. Pronina, G.I. Influence of the immunomodulator «Subtilis-C» on the physiological state of *Symphysodon haraldi* discus by hemotological and cytochemical parameters / G.I. Pronina, O.V. Sanaya // Сборник статей: International Conference «Process Management and Scientific Developments» (Birmingham, United Kingdom Novotel Birmingham Centre, March 31, 2020). – С. 106-111.

10. **Саная, О.В.** Сравнительная характеристика рыб семейства Цихловые по гематологическим и биохимическим показателям / О.В. Саная // Сборник статей: Материалы международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 160-летию В.А. Михельсона. (Москва, 09–11 июня 2020 года). – С. 165-168.
11. Пронина, Г.И. Иммуитет пойкилотермных гидробионтов / Г.И. Пронина, А.А. Иванов, А.Г. Маннапов, **О.В. Саная** // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – №2. – 2021. – С. 71-91.
12. **Саная, О.В.** Биохимическая характеристика крови дискусов *Symphysodon haraldi* при использовании кормовой добавки «Субтилис-С» / **О.В. Саная** // Доклады ТСХА: Сборник статей Международной научной конференции профессорско-преподавательского состава, посвященной 155-летию РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, 2-4 декабря 2021 года). – Вып. 293. – Ч. I. – С. 657-660.
13. **Саная, О.В.** Влияние пробиотика на физиологическое состояние и иммунный статус дискусов *Symphysodon haraldi* в аквакультуре / **О.В. Саная** // В сборнике: Всероссийская с международным участием научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 155-летию со дня рождения Н.Н. Худякова (Москва, 7-9 июня 2021). – Т.1. – С. 72-76.
14. **Саная, О.В.** Влияние пробиотика «Субтилис-С» на зоотехнические и гематологические показатели нильской тилляпии в аквакультуре / **О.В. Саная**, В.В. Дернаков, А.И. Черкалин, Е.Ю. Уварова, В.М. Хрупкин // Сборник статей: Современные проблемы и перспективы развития рыбохозяйственного комплекса. Сборник трудов IX Научно-практической конференции молодых учёных с международным участием, посвященная 140-летию ВНИРО (Москва, 11-12 ноября 2021). – С. 152-154.
15. Пронина Г.И. Применение пробиотика «Субтилис-С» при разведении нильской тилляпии (*Oreochromis niloticus*) / Г.И. Пронина, **О.В. Саная**, В.В. Дернаков, А.И. Черкалин, Е.Ю. Уварова, В.М. Хрупкин // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2022. – №3. – С. 201-211.