

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«АСТРАХАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

ЖАНДАЛГАРОВА АДЕЛЯ ДЖУМАНИЯШЕВНА

**НАУЧНО ОБОСНОВАННЫЕ ПРИЕМЫ ПОВЫШЕНИЯ
ФИЗИОЛОГО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ОСЕТРОВЫХ РЫБ
В АКВАКУЛЬТУРЕ**

4.2.4. Частная зоотехния, кормление, технологии приготовления кормов и
производства продукции животноводства

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор сельскохозяйственных наук,
доцент Бахарева А.А.

АСТРАХАНЬ – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1 Пробиотические препараты: определение, характеристика, классификация, опыт применения в аквакультуре.....	17
1.2 Показатели крови, как индикаторы физиолого-иммунологического состояния рыб.....	42
1.3 Структурно-функциональная организация иммунной системы рыб.....	49
1.4 Опыт применения бактериофагов в аквакультуре и механизм их взаимодействия с организмом рыбы.....	63
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	68
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	87
3.1 Использование пробиотического препарата на основе штаммов <i>Bacillus subtilis</i> и <i>Bacillus licheniformis</i> , иммобилизованных на фитосорбенте, при выращивании осетровых рыб	87
3.1.1 Оценка влияния пробиотика на интенсивность роста и физиологическое состояние молоди русского осетра.....	90
3.1.2 Научно-производственная оценка эффективности применения пробиотика при выращивании молоди русского осетра.....	98
3.1.3 Оценка эффективности применения пробиотического препарата при выращивании русского осетра в садковых условиях.....	103
3.2 Применение синбиотического препарата, содержащего иммобилизованные штаммы <i>Bacillus subtilis</i> и <i>Bacillus licheniformis</i> , при выращивании осетровых рыб.....	106
3.2.1 Влияние синбиотического препарата на рыбоводно-биологические и физиолого-биохимические показатели молоди осетровых рыб	108
3.2.2 Научно-производственная оценка эффективности применения синбиотика при выращивании молоди русского осетра	112
3.2.3 Влияние пробиотического препарата на динамику роста и показатели	

крови русского осетра при садковом выращивании.....	117
3.3 Микробиологическая оценка эффективности пробиотического и синбиотического препаратов при выращивании осетровых рыб	119
3.3.1 Клинико-микробиологическая оценка эффективности применения пробиотика и синбиотика с целью коррекции нарушений микробиоты осетровых рыб.....	121
3.3.1.1 Исследование численности молочнокислых микроорганизмов в жабрах молоди осетровых рыб на различных питательных средах	122
3.3.1.2 Анализ численности молочнокислых микроорганизмов в кишечнике молоди осетровых рыб на различных питательных средах	130
3.3.2 Влияние пробиотического и синбиотического препаратов нового поколения на обсемененность комбикормов молочнокислыми микроорганизмами	136
3.3.3 Анализ санитарно-микробиологических показателей комбикормов с добавлением пробиотического и синбиотического препаратов	145
3.3.4 Оценка микрoэкологического состояния водной среды при использовании пробиотика и синбиотика.....	149
3.4 Оценка влияния пробиотика на основе штаммов бактерий р. <i>Bifidobacterium</i> и <i>Lactobacillus</i> , сорбированных на энтеросорбенте СУМС-1, на физиолого-иммунологический статус осетровых рыб.....	152
3.4.1 Анализ интенсивности роста и физиолого-биохимической картины крови бестера при использовании пробиотика на энтеросорбенте СУМС-1...	153
3.4.2 Анализ влияния пробиотика на энтеросорбенте СУМС-1 на рыбоводно-биологические и физиолого-иммунологические показатели стерляди.....	159
3.4.3 Оценка влияния пробиотика, иммобилизованного на энтеросорбенте СУМС-1, на иммунологическое состояние русско-ленского осетра	166
3.4.3.1 Влияние пробиотика-энтеросорбента на показатели гуморального иммунитета русско-ленского осетра.....	168
3.4.3.2 Влияние пробиотического препарата на показатели клеточного иммунитета русско-ленского осетра.....	173

3.4.3.3 Анализ бактериальной обсемененности внутренних тканей и органов русско-ленского осетра при использовании пробиотика-энтеросорбента.....	177
3.4.3.4 Оценка перекисного окисления липидов тканей и органов русско-ленского осетра при применении пробиотика на энтеросорбенте.....	181
3.4.4 Оценка влияния пробиотического препарата, иммобилизованного на энтеросорбенте СУМС-1, на иммунный статус сибирского осетра	185
3.4.4.1 Влияние пробиотика-энтеросорбента на факторы гуморальной неспецифической иммунной защиты сибирского осетра.....	185
3.4.4.2 Исследование влияния сорбированного пробиотика на клеточные факторы врожденного иммунитета сибирского осетра.....	188
3.4.4.3 Анализ антибактериальных свойств сибирского осетра при использовании пробиотика на энтеросорбенте.....	193
3.4.4.4 Влияние пробиотического препарата на биохимические показатели иммунокомпетентных органов сибирского осетра.....	194
3.5 Влияние пробиотика на основе штаммов бактерий р. <i>Bifidobacterium</i> и <i>Lactobacillus</i> , сорбированных на активированном угле, на функциональное состояние и иммунный статус осетровых рыб.....	199
3.5.1 Оценка влияния сорбированного на активированном угле пробиотического препарата на рост и физиологическое состояние бестера.....	199
3.5.2 Исследование влияния пробиотика, сорбированного на активированном угле, на рыбоводно-биологические и иммунно-физиологические показатели стерляди	207
3.5.3 Влияние сорбированного на активированном угле пробиотика на функционирование иммунной системы русско-ленского осетра	215
3.5.3.1 Исследование влияния иммуностропных свойств сорбированного пробиотического препарата на показатели неспецифического гуморального иммунитета русско-ленского осетра.....	216
3.5.3.2 Влияние сорбированного пробиотического препарата на показатели клеточного иммунитета русско-ленского осетра.....	220
3.5.3.3 Влияние пробиотика-энтеросорбента на антибактериальные свойства	

русско-ленского осетра.....	225
3.5.3.4 Оценка влияния пробиотического препарата на перекисное окисление липидов тканей и органов русско-ленского осетра.....	226
3.5.4 Влияние пробиотика, сорбированного на активированном угле, на иммунный статус сибирского осетра	230
3.5.4.1 Влияние пробиотика-энтеросорбента на факторы гуморальной неспецифической иммунной защиты сибирского осетра.....	230
3.5.4.2 Оценка влияния сорбированного пробиотического препарата на показатели клеточного иммунитета сибирского осетра.....	233
3.5.4.3 Влияние сорбированного пробиотика на антибактериальные свойства сибирского осетра.....	237
3.5.4.4 Исследование биохимических показателей иммунокомпетентных органов сибирского осетра при применении пробиотика.....	238
3.6 Оценка эффективности новых рецептур комбикормов с сорбированными пробиотическими препаратами на основе штаммов бактерий <i>p. Bifidobacterium</i> и <i>Lactobacillus</i> при выращивании осетровых рыб	242
3.6.1 Исследование питательной ценности и качества разработанных комбикормов с добавлением сорбированных пробиотических препаратов.....	244
3.6.2 Оценка влияния разработанного комбикорма с пробиотиком на энтеросорбенте СУМС-1 на интенсивности роста бестера.....	248
3.6.3 Оценка влияния разработанного комбикорма с сорбированным на активированном угле пробиотическим препаратом на продуктивность бестера.....	249
3.7 Применение бактериофагов для повышения эффективности выращивания и улучшения физиологического состояния осетровых рыб.....	250
3.7.1 Оценка влияния пиобактериофага на интенсивность роста стерляди.....	253
3.7.2 Анализ влияния пиобактериофага на физиолого-биохимические и иммунологические показатели стерляди.....	256
3.7.3 Оценка влияния интести-бактериофага на интенсивность роста стерляди.....	261

3.7.4 Анализ влияния интести-бактериофага на физиолого-биохимические и иммунологические показатели стерляди.....	263
3.8 Экономическая эффективность использования иммунобиологических препаратов микробного происхождения в составе комбикормов для осетровых рыб	266
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	272
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	285
ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ.....	289
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	290
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	291
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	292
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	338

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В настоящее время аквакультура характеризуется новыми подходами к содержанию рыб в условиях плотных посадок, связанными с поддержанием естественного физиологического состояния организма и основанными на использовании биологически активных веществ. Одним из аспектов такого подхода является нормализация измененного микробиоценоза рыб в условиях водной среды установок замкнутого водоснабжения при помощи иммунобиологических препаратов микробного происхождения, предназначенных для формирования и коррекции кишечной микрофлоры, повышения иммунологически обусловленной естественной резистентности рыб, регуляции их иммунного гомеостаза, профилактики и лечения различных заболеваний, связанных с нарушением постоянства внутренней среды организма (Л.Н. Юхименко, В.Ф. Викторова, 1979; И.В. Бурлаченко, 2008; А.А. Михайлов и др., 2024; W. Li et al., 2024).

Использование биопрепаратов может позволить решить ряд проблем, связанных с физиолого-иммунологическим состоянием рыб, повысив эффективность пищеварения, стимулируя рост и развитие (Е.А. Шульга, 2006; И.В. Бурлаченко и др., 2007; К.А. Маленкина, А.Е. Аринжанов, 2024; Н.И. Кочетков и др., 2024). Бактерийные и антимикробные биологические препараты оказывают положительное влияние на функционирование желудочно-кишечного тракта, способствуют повышению адаптационных способностей организма и стимулируют его неспецифический иммунитет. Кроме того, они обладают высокой избирательной антагонистической активностью по отношению к патогенным микроорганизмам и способностью продуцировать разнообразные биологически активные вещества, повышающие иммунитет (Г.В. Кулаков, 2003; Ю.Н. Грозеску и др., 2009; К.А. Маленкина, А.Е. Аринжанов, 2024; B.C. Meskhi et al., 2025).

В современной аквакультуре иммунобиологические препараты микробного происхождения применяются с целью увеличения прироста массы, усиления

естественной резистентности, профилактики стресса, профилактики заболеваний и формирования нормальной микрофлоры кишечника рыб на всех стадиях развития. Вследствие этого, изучение эффективности использования данных препаратов в аквакультуре является весьма актуальным.

Степень разработанности темы исследования. Современная аквакультура базируется на интенсивных технологиях, особенностью которых является большая концентрация рыбы на ограниченных площадях. Однако при этом возрастает риск заражения рыб возбудителями опасных инфекций. Традиционно меры борьбы с инфекционными заболеваниями сводятся к применению различных антимикробных препаратов. Постоянное и широкое применение антибиотиков, в свою очередь, вызывает появление антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, в результате чего катастрофически снижается иммунный статус рыб и их выживаемость. Одним из перспективных методов борьбы с различными инфекционными заболеваниями и повышения естественной резистентности рыб в аквакультуре является применение иммунобиологических препаратов микробного происхождения, в частности пробиотиков, синбиотиков и бактериофагов.

Исследования по использованию пробиотических и синбиотических препаратов в аквакультуре проводились такими учеными, как И.В. Бурлаченко (2006-2008), Г.В. Кулаков (2001-2004), В.В. Панасенко (2001), Л.И. Бычкова (2008), Л.Н. Юхименко (2002, 2008, 2021), Г.И. Пронина (2019, 2022, 2023), И.В. Ткачева (2016, 2018, 2022), Е.П. Мирошникова (2022-2023), Д.С. Павлов (2014, 2021), Н.А. Ушакова (2014, 2021-2023), Е.А. Шульга (2006-2009), Х.Б. Аламдари (2013-2016) и другие. Вопросам изучения иммунологического состояния рыб при использовании пробиотических препаратов уделяли большое внимание Д.В. Микряков (2011, 2013, 2023, 2025), Т.А. Суворова (2013, 2019, 2023, 2025), К.В. Гаврилин (2013), Н.А. Силкина (2019, 2025), Г.И. Пронина (2022, 2023), С.В. Кузьмичева (2023, 2025) и другие.

Исследования в области применения бактериофагов являются одним из ведущих направлений современной аквакультуры, что связано с возрастающим

интересом к их практическому применению с целью диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Данные иммунобиологические препараты микробного происхождения применяются для увеличения линейно-весового прироста, стабилизации физиологического состояния выращиваемых рыб, уничтожения патогенных микроорганизмов, нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта с целью формирования и поддержания в нем колонизационной резистентности. Бактериофаги свободно проникают в ткани организма, оказывают иммуностимулирующее действие, не обладая иммуносупрессивным эффектом.

Исследования в данном направлении проводились такими учеными, как Д.А. Васильев (2013), Н.А. Парамонова (2013), Д.А. Викторov (2013, 2014), Т.А. Гринева (2013, 2014), И.Г. Горшков (2014), А.А. Зимин (2018), С.И. Кононенко (2018).

В настоящее время большинство вопросов, затронутых учеными в данном направлении, остаются открытыми и требуют дальнейших исследований. В связи с этим, возникла необходимость в разработке комплексного научно обоснованного подхода к изучению влияния иммунобиологических препаратов микробного происхождения на эффективность выращивания осетровых рыб, улучшению их физиолого-иммунологического и микробиологического статуса.

Цель и задачи исследования. Цель – повышение физиолого-иммунологического статуса и продуктивности осетровых рыб в аквакультуре за счет использования иммунобиологических препаратов микробного происхождения.

Поставленная цель определила следующие задачи:

– определить оптимальную дозу ввода пробиотика на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* в комбикорма и оценить ее влияние на интенсивность роста и физиолого-биохимические показатели крови осетровых рыб;

- установить норму ввода синбиотика на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* в комбикорма и выявить ее влияние на показатели роста и физиологическое состояние осетровых рыб;
- оценить влияние пробиотического и синбиотического препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* на динамику обсемененности осетровых рыб молочнокислыми микроорганизмами;
- исследовать микробную контаминацию комбикормов и оборотной воды при использовании пробиотического и синбиотического препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*;
- оценить влияние пробиотического препарата на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, сорбированных на энтеросорбенте СУМС-1, на темп роста и физиолого-иммунологический статус осетровых рыб и определить его оптимальную дозу;
- выявить оптимальность дозы пробиотического препарата на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, сорбированных на активированном угле, и установить ее влияние на рост, функциональное состояние и иммунный статус осетровых рыб;
- разработать рецептуры комбикормов с использованием пробиотических препаратов на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, сорбированных на энтеросорбентах, и установить их влияние на продуктивность осетровых рыб;
- провести биологическую оценку эффективности применения препаратов на основе бактериофагов с целью повышения темпов роста и физиолого-биохимических показателей крови осетровых рыб;
- оценить экономическую эффективность применения иммунобиологических препаратов микробного происхождения при выращивании осетровых рыб.

Научная новизна. Впервые теоретически обоснована и экспериментально доказана высокая биологическая эффективность применения иммунобиологических препаратов микробного происхождения, в частности

иммобилизованных пробиотиков и синбиотиков, а также бактериофагов, при выращивании осетровых рыб на основании комплексных рыбоводно-биологических, физиолого-биохимических, иммунологических и микробиологических исследований.

Выявлено, что пробиотические и синбиотические препараты на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте, способствуют повышению интенсивности роста осетровых рыб и улучшению физиолого-биохимических показателей крови. Доказано положительное влияние сорбированных пробиотических препаратов на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* на функциональное состояние и иммунный статус осетровых рыб. Установлено, что их применение способствует усилению активности местных и системных факторов иммунной защиты. Разработаны рецептуры комбикормов с включением сорбированных пробиотических препаратов на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, эффективность которых экспериментально подтверждена повышением продуктивности осетровых рыб. Впервые в аквакультуре проведена оценка эффективности применения бактериофагов при выращивании осетровых рыб в установках замкнутого водоснабжения.

Приоритет и новизна исследований подтверждены патентами на изобретения: №2656386 «Продукционный комбикорм для производителей осетровых рыб с добавлением пробиотика и биологически активных веществ», №2812045 «Продукционный комбикорм для осетровых рыб», №2827392 «Способ повышения резистентности осетровых рыб к бактериальным инфекциям», №2024138690 «Способ повышения иммунного статуса осетровых рыб», №2024138692 «Способ коррекции иммунитета осетровых рыб», №2851496 «Продукционный комбикорм для осетровых рыб», №2851508 «Продукционный комбикорм для осетровых рыб», базами данных №2025622462 «Динамика накопления микроэлементов в органах осетровых рыб при введении в рацион продукционных комбикормов с пробиотическими препаратами в различных дозировках», №2025622612 «Лейкоцитарная формула периферической крови

сибирского осетра при использовании сорбированного пробиотического препарата».

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость работы заключается в установлении научных подходов к организации выращивания осетровых рыб с применением иммунобиологических препаратов микробного происхождения, включая сорбированные пробиотические и синбиотические препараты на основе штаммов *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, представителей р. *Bifidobacterium*, р. *Lactobacillus* и бактериофаги. Полученные результаты способствуют расширению современных представлений о возможностях их комплексного использования, механизмах влияния на интенсивность роста, физиолого-иммунологический и микробиологический статус осетровых рыб.

Практическая значимость работы заключается в разработке рекомендаций по применению иммунобиологических препаратов микробного происхождения при выращивании осетровых рыб, направленных на повышение продуктивности, естественной резистентности и экономической эффективности. Установлено, что использование пробиотиков, синбиотиков и бактериофагов способствует увеличению интенсивности роста и выживаемости, улучшению физиолого-биохимических показателей крови осетровых рыб. Применение сорбированных пробиотиков обеспечивает активацию факторов неспецифического иммунитета рыб, характеризующуюся повышением концентрации лизоцима до 19,06 мкг/мл и снижением уровня иммунных комплексов до 2,46 усл. ед. Использование иммобилизованных пробиотиков и синбиотиков способствует оптимизации микробиоценоза осетровых рыб за счет увеличения количества молочнокислых микроорганизмов в кишечнике до $8,57 \times 10^7$ КОЕ/г и жабрах до $5,25 \times 10^7$ КОЕ/г, а также снижения микробной контаминации комбикормов до $3,2 \times 10^5$ КОЕ/г и воды до $8,5 \times 10^4$ КОЕ/мл. Экономическая эффективность применения препаратов подтверждается повышением уровня рентабельности до 16,13%.

Исследования выполнены за счет гранта РНФ №23-76-01019 «Разработка и исследование научно обоснованных методов повышения иммунологически

обусловленной естественной резистентности организма рыб и регуляции их иммунного гомеостаза при использовании иммобилизованных форм биопрепаратов микробного происхождения в интенсивной аквакультуре» (<https://rscf.ru/project/23-76-01019/>), государственного задания ФАР №223013100039-6 «Научное обоснование применения различных форм иммунобиологических препаратов микробного происхождения в современной аквакультуре», государственного задания ФАР №224020100846-7 «Изучение влияния пробиотических препаратов на формирование микробиоценоза ценных объектов индустриальной аквакультуры», государственного задания ФАР №124041100140-2 «Оценка рыбоводно-биологических и физиолого-иммунологических показателей объектов аквакультуры в зависимости от условий содержания».

Полученные результаты используются в ФГБОУ ВО «АГТУ» при чтении лекций и проведении практических занятий по дисциплинам «Корма и кормление рыб в аквакультуре», «Современные методы кормления рыб в индустриальных условиях», «Методы борьбы с болезнями рыб» для студентов направлений 35.03.08, 35.04.07 «Водные биоресурсы и аквакультура».

Методология и методы исследований. Для проведения научных исследований были использованы классические и современные методы рыбоводно-биологических, физиолого-биохимических, микробиологических, иммунологических и экономических исследований с применением современного сертифицированного оборудования. В процессе выполнения работы были оценены рыбоводно-биологические и физиолого-биохимические показатели, исследована иммунологически обусловленная естественная резистентность рыб, проведен микробиологический анализ симбионтной микрофлоры жабр и кишечника рыб в условиях интенсивной аквакультуры.

Результаты проведенных исследований обработаны методами вариационной статистики. Для оценки достоверности различий между группами использовались t-критерий Стьюдента при трех уровнях значимости, а также однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Положения, выносимые на защиту:

- пробиотический и синбиотический препараты на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованные на фитосорбенте, способствуют увеличению выживаемости, повышению интенсивности роста и улучшению физиолого-биохимических показателей крови осетровых рыб;
- использование иммобилизованных форм пробиотического и синбиотического препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* повышает обсемененность жабр и кишечника осетровых рыб молочнокислыми микроорганизмами;
- применение пробиотического и синбиотического препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, способствует снижению уровня зараженности кормов патогенными микроорганизмами, снижению общего микробного числа в оборотной воде;
- применение пробиотических препаратов на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, иммобилизованных на энтеросорбентах, повышает эффективность выращивания осетровых рыб, улучшает их физиологический и иммунный статус;
- разработанные рецептуры комбикормов с использованием пробиотических препаратов на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, сорбированных на энтеросорбентах, повышают продуктивность осетровых рыб;
- применение бактериофагов способствует увеличению интенсивности роста и улучшению физиолого-биохимических показателей крови осетровых рыб;
- использование иммунобиологических препаратов микробного происхождения при выращивании осетровых рыб экономически эффективно и способствует повышению рентабельности и снижению себестоимости продукции.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты исследований, изложенные в диссертационной работе, докладывались на научных и научно-практических конференциях: Международной научной конференции «Рациональное использование и сохранение водных биоресурсов» (Ростов-на-

Дону, 2014); Международной научной конференции «Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей России» (Ростов-на-Дону, 2014); Молодежной научно-практической конференции «Исследования молодых ученых – вклад в инновационное развитие России» (Астрахань, 2015); Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня рождения Заслуженного деятеля науки, д.с.-х.н, профессора В.М. Куликова (Волгоград, 2015); «World aquaculture – 2015» (Jeju, Korea, 2015); Международной научной конференции «Состояние водных биологических ресурсов и аквакультуры Казахстана и сопредельных стран» (Алматы, Казахстан, 2019); VIII International Scientific Practical Conference «Innovative Technologies in Engineering» (ITSE 2020) (Rostov-on-Don, Russian Federation, 2020); Национальной научно-практической конференции «Каспий 2021: пути устойчивого развития» (Астрахань, 2021); International scientific and practical conference «Ensuring sustainable development in the context of agriculture, green energy, ecology and earth science» (ESDCA 2021) (Smolensk, Russian Federation, 2021); International scientific conference «Sustainable Fisheries and Aquaculture as a basis for the development of the Blue Bioeconomy» (Kaliningrad, Russian Federation, 2022); Всероссийской междисциплинарной научной конференции «Наука и практика – 2022» (Астрахань, 2022); Всероссийской междисциплинарной научной конференции «Наука и практика – 2023» (Астрахань, 2023); II International conference «Ensuring sustainable development: Ecology, Energy, Earth Science and Agriculture» (AEES 2023) (Shenzhen, Guangdong, China, 2023); IV International scientific and practical conference «Ensuring sustainable development in the context of Agriculture, Green Energy, Ecology and Earth Science» (ESDCA 2024) (Smolensk, Russian Federation, 2024); III Национальной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биоразнообразия и природопользования», посвященной 25-летию кафедры экологии моря ФГБОУ ВО «КГМТУ» (Керчь, 2024); Всероссийской междисциплинарной научной конференции «Наука и практика – 2024» (Астрахань, 2024); Международной научно-практической конференции «Стратегия развития инновационных систем в кормлении животных»,

посвященной 100-летию со дня рождения д.с.-х.н., профессора Петуховой Е.А. (Москва, 2025); Международной научной конференции научно-педагогических работников Астраханского государственного технического университета (Астрахань, 2017-2025).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 52 работы, из них 13 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ, 7 в зарубежных журналах, включенных в систему цитирования Web of Science и Scopus, 7 патентов на изобретения, 2 свидетельства на базы данных.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 353 страницах печатного текста, иллюстрирована 56 рисунками и 87 таблицами. Состоит из введения, литературного обзора, материала и методов исследований, результатов собственных исследований, обсуждения результатов исследований, заключения, предложений производству, перспективы дальнейшей разработки темы и приложений. Библиографический список включает 367 источников, из них 168 на иностранных языках.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Пробиотические препараты: определение, характеристика, классификация, опыт применение в аквакультуре

Термин «пробиотик» был впервые введен Lilly и Stillwell в 1965 г., как средство, обладающее функцией противоположной функции антибиотиков. Позже R.B. Parker (1974) использовал данный термин для описания живых микроорганизмов и веществ, обеспечивающих микробиологическое равновесие кишечной микрофлоры. R. Fuller (1989) расширил определение до «живой микробной пищевой добавки, приносящей пользу хозяину, улучшая микробный баланс организма». Впоследствии было высказано предположение, что пробиотики – это «монокультуры или смешанные культуры микроорганизмов, применяемые для животных или людей, приносящие пользу хозяину, улучшая свойства местной микрофлоры» (Havenaar, Huis, 1992). Согласно мнению F. Guarner и G.J. Schaafsma (1998), пробиотики можно рассматривать как живые микроорганизмы, которые при поступлении в организм в достаточном количестве способны оказывать благоприятное влияние на состояние здоровья хозяина. В свою очередь, F.J. Gatesoupe (1999) характеризовал пробиотики как «микробные клетки, вводимые определенным способом, которые достигают желудочно-кишечного тракта и сохраняют жизнеспособность, обеспечивая улучшение общего состояния организма». В том же году были проведены исследования по ингибированию патогенных микроорганизмов с использованием пробиотиков, что расширило определение до «...живая микробная добавка, приносящая пользу хозяину, и улучшающая его микробный баланс» (Gram et al., 1999).

Таким образом, пробиотическими препаратами называют комплекс различных микроорганизмов, способных оказывать положительное влияние на физиологические и биохимические параметры, а также на иммунную реакцию организма-хозяина за счет улучшения кишечной микрофлоры и стимуляции обменных и иммунных процессов (Федорова и др., 2016).

Положительное влияние пробиотических препаратов на микрофлору отмечалось с начала XX века. Основоположником данной концепции является И.И. Мечников, который за свои исследования в 1908 г. был удостоен Нобелевской премии в области медицины. В 1907 г. в своей работе «Этюды оптимизма» И.И. Мечников впервые обозначил роль микрофлоры в жизни человека, утверждая, что «зависимость кишечных микробов от пищи позволяет изменять нашу флору и заменять вредные микробы полезными». Он также отметил, что с возрастом в кишечнике возрастает концентрация микроорганизмов, которые производят азотсодержащие вещества с токсическим действием. Мечников предложил бороться с этими микроорганизмами, используя живые молочнокислые бактерии, такие как *Lactobacillus bulgaricus* (Федорова и др., 2016).

Современное понятие пробиотиков дано в 2002 г. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ): «Пробиотические препараты – это живые микроорганизмы, оказывающие положительное влияние на здоровье организма-хозяина при применении их в предписанных количествах». Продовольственной и сельскохозяйственной организацией при ООН (Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO) совместно с ВОЗ определен ряд критериев, которым должны соответствовать микроорганизмы, используемые при создании пробиотических препаратов (FAO, 2016):

1. Штаммы, включаемые в состав пробиотиков, должны быть безопасны для человека и животных;
2. Микроорганизмы обязаны проявлять выраженную антагонистическую активность в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры;
3. Необходима устойчивость к действию ферментов слюны, пищеварительных энзимов и желчи;
4. Штаммы должны выдерживать кислую среду желудочного сока;
5. Микроорганизмы должны сохранять жизнеспособность при воздействии антибиотиков;

6. Для пробиотических культур важна высокая скорость роста, позволяющая эффективно осваивать питательную среду и обеспечивать достаточный выход биомассы;

7. Штаммы должны быть технологичными – удобными в производстве, стабильными при культивировании и хранении.

Микроорганизмы, применяемые при создании пробиотических препаратов, оказывают многогранное и многоуровневое влияние на организм хозяина. Результативность пробиотиков во многом определяется способностью входящих в их состав бактерий прочно закрепляться на слизистой оболочке, противостоять нежелательной микрофлоре и формировать устойчивые колонии, обеспечивая их длительное присутствие в организме.

Адгезивные свойства пробиотических штаммов позволяют им закрепляться в определенных участках кишечной среды, что способствует успешному заселению слизистой и поддержанию стабильной микробной популяции. За счет этого один из механизмов защиты организма от роста патогенной микрофлоры заключается во введении таких культур, которые способны занимать места возможной фиксации патогенных микроорганизмов и вытеснять их.

Антагонистический потенциал пробиотиков проявляется в их способности угнетать развитие патогенов, что достигается за счет стимуляции активности ферментов слюны и поджелудочной железы, а также усиления секреции желудочно-кишечных желез, что в итоге улучшает защитные возможности организма (Жандалгарова, 2017).

Антибактериальное действие пробиотиков основано на подавлении жизнедеятельности патогенных микроорганизмов путем проникновения ионов гидроокиси, образующихся из недиссоциированных кислот, в клеточную цитоплазму. Это воздействие приводит также к ингибированию роста условно-патогенных бактерий и снижению синтеза токсинов у плесневых грибов (Corlett, Brown, 1980; Бурлаченко, 2007).

Таким образом, эффективным способом восстановления и поддержания здоровья организма, является использование в рационе функциональных

продуктов, оказывающих регулирующее и нормализующее воздействие на организм, на постоянной основе (Шендеров, 2008)

На протяжении долгих лет в разных странах разрабатывается множество разнообразных биологических добавок и фармакологических препаратов, состав которых основывается на типичных для микрофлоры кишечника микроорганизмах. Как правило, используются различные штаммы бифидо- и лактобактерий, а также непатогенные штаммы кишечной палочки и стрептококки.

Бифидобактерии – это важная группа микроорганизмов, характерных для нормальной микрофлоры здорового организма и широко применяемых при создании пробиотических средств. При разработке таких препаратов обычно используют различные штаммы, включая *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. thermophilum* (Крысенко и др., 2010).

Лактобактерии наряду с бифидобактериями являются важнейшими представителями нормальной микрофлоры кишечника, появляющимися и начинающими доминировать уже в ранние периоды развития организма. Эти бактерии способны эффективно колонизировать эпителиальные ткани желудочно-кишечного тракта, формируя защитную микробную пленку, которая препятствует внедрению патогенных микроорганизмов и способствует поддержанию стабильного микробиоценоза кишечника. В составе пробиотических препаратов наиболее распространены штаммы *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum* (Tanaka, 1997).

Применение штаммов кишечной палочки в качестве основы для пробиотических средств берет свое начало в 1918 г., когда появился препарат «Мутафлор». В его составе использовали штамм *E. coli* М-17, выращенный на молочной среде. Несмотря на перспективность, данная форма не получила широкого распространения из-за ограниченного срока годности. Впоследствии, в 1961 г., была создана вакуумно-высушенная форма – «Колибактерин», по эффективности сопоставимая с исходным жидким вариантом. В настоящее время продолжается работа над улучшением и созданием новых модификаций данного препарата. Штаммы кишечной палочки также лежат в основе ряда других

пробиотических средств, таких как «Актофлор», «Бификол», «Нормофлорин», «Колифлоран», «Нормафлор» и др. (Барановский, Кондрашина, 2000).

Для разработки пробиотиков могут также применяться микроорганизмы, принадлежащие родам *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Streptococcus* (Осипова и др., 2016). Имеются сведения об использовании дрожжей при разработке пробиотиков (Саубенова и др., 2023). Препарат, в состав которого входит *Saccharomyces boulardii*, оказался эффективным при лечении кишечных инфекций, вызванных *Clostridium difficile*. Положительный клинический эффект также отмечался при использовании *Saccharomyces cerevisiae* (Хорошилова, 2003).

Спорообразующие бактерии р. *Bacillus* являются наиболее яркими представителями экзогенной микрофлоры и привлекают все больше внимания исследователей. Достаточно много представителей данного рода испытываются и применяются в качестве терапевтических средств при лечении острых и хронических инфекций: *Bacillus cereus*, *B. polymyxa*, *B. coagulans*, *B. brevis*, *B. subtilis*, *B. ucheniformis*, *B. pantothenicus* (Смирнов и др., 1982; Бакулина и др., 2001; Крысенко и др., 2010; Андреева и др., 2012). Наиболее распространенным является вид *Bacillus subtilis*, с помощью которого создаются анаэробные условия роста (Wostmann, 1996). Другим широко распространенным видом является *Bacillus clausii* – грамположительная аэробная бактерия в форме палочки, способная образовывать эндоспоры и выдерживать щелочную среду. Она синтезирует каталазу и оксидазу, гидролизует крахмал и желатин, а также восстанавливает нитраты. Оптимальный температурный диапазон для ее роста составляет 30-50°C, при этом она способна развиваться в средах с содержанием NaCl до 10%.

Действие всех пробиотических препаратов на основе бактерий р. *Bacillus* начинается с момента их попадания в пищеварительный тракт. Такие пробиотики представляют собой лиофилизированные бактериальные массы в форме спор, находящихся в состоянии анабиоза. Однако после попадания в желудочно-кишечный тракт споры разбавляются секретами слизистых оболочек и желудка,

после чего активно прорастают, независимо от физико-химических характеристик желудочного содержимого.

Исследования показывают, что споровые формы *Bacillus clausii* обладают выраженной устойчивостью к кислой среде желудка: они могут сохранять жизнеспособность при pH=2-7 на протяжении примерно двух часов. Вегетативные клетки значительно более чувствительны – при pH=2 они гибнут уже через 10 минут, а при pH=3 – сохраняются не более часа. Хлористоводородная кислота способствует активации спор, поскольку в кислой среде их прорастание происходит быстрее и более синхронно. Рост же вегетативных форм возможен лишь при pH выше 4,5, тогда как оптимальные условия для размножения пробиотических штаммов *B. clausii* достигаются при pH=8.

Через два часа после поступления пробиотика в организм до 90% спор *B. clausii* переходят в активное вегетативное состояние, сопровождаемое выделением биологически значимых соединений – протеаз, антибиотиков и различных внеклеточных метаболитов. Известно, что *B. clausii* демонстрирует способность сохранять рост при сниженной доступности кислорода, а также активно размножаться в бескислородной среде, если в ней присутствует нитрат натрия. Такие особенности указывают на ее высокую адаптированность к условиям кишечника. Подобная устойчивость обусловлена тем, что алкалофильные клетки данного вида содержат повышенное количество цитохромов, участвующих в процессах клеточного дыхания (Тимошко, 1990; Бекина и др., 2021).

Таким образом, физиологические характеристики *B. clausii* указывают на способность спор к размножению, а вегетативных форм – к выживанию при прохождении через пищеварительный тракт.

Микроорганизмы р. *Bacillus* обладают широким спектром биологической активности и проявляют антагонистическое действие по отношению к патогенной микрофлоре, однако в тоже время они способны синтезировать пектины, целлюлозу, ферменты, лизирующие крахмал, различные аминокислоты и

антибиотики. Представители р. *Bacillus* выступают в виде транзиторной микрофлоры и в норме не колонизируют пищеварительный канал (Антипов, 1991; Тараканов, Николичева, 2000; Скрыпник, Маслова, 2009).

Бактерии р. *Bacillus* обладают ферментативной активностью, которая у некоторых штаммов достигает максимума в первые сутки. Вырабатываемые ими амилаза и липаза, попадая в желудок, способствуют нормализации пищеварительных процессов, особенно при дисбактериозе (Бондаренко, Грачева, 2003; Кудрявцев и др., 2004). Штаммы *Bacillus subtilis* способны синтезировать значительное количество аминокислот, включая незаменимые, такие как треонин, аланин, валин, тирозин, гистидин, орнитин и другие.

Представители р. *Bacillus* способны синтезировать около двухсот антибиотиков, что свидетельствует об их широкой антимикробной активности. Исследования показали, что на третьи сутки после введения спорообразующего пробиотика количество золотистого стафилококка и кишечной палочки значительно уменьшается, а в последующие дни эти микроорганизмы полностью выводятся из организма. Подавление патогенной и условно-патогенной микрофлоры имеет особую значимость, так как доказано, что бактерии, присутствующие в пищеварительном тракте, могут вызывать бактериемию с последующим распространением в органы и ткани (Бовкун, Нигманов, 1998).

Установлено, что спорообразующие бактерии способны вырабатывать несколько типов пептидов, имеющих схожее основное строение, но различающихся по конечным группам. Это обуславливает их широкий антибактериальный эффект и снижает вероятность быстрого формирования устойчивых штаммов. Попадая в пищеварительный тракт, бактерии р. *Bacillus* способствуют нормализации соотношения белковых фракций крови, что, вероятно, связано с активацией синтеза специфических иммуноглобулинов. Благодаря своим протеолитическим, пектинолитическим, липолитическим и целлюлолитическим свойствам бациллы могут разрушать токсичные соединения и аллергены, а также снижать образование мицелл холестерина.

Пробиотическое действие бактерий р. *Bacillus* обусловлено их высокой ферментативной активностью. Протеазы *Bacillus* улучшают процессы пищеварения, способствуя увеличению выработки витамина В₂, субтилизина и каталазы, а также стимулируют рост *Lactobacillus*. В отличие от пробиотиков на основе лакто- и бифидобактерий, споры *Bacillus subtilis* обладают выраженной антагонистической активностью против стафилококков и дрожжевых грибов.

Исследования *in vitro* подтвердили, что дипиколиновая кислота, вырабатываемая спорами *Bacillus spp.*, подавляет рост большинства лактобацилл и энтеробактерий, при этом, не оказывая влияния на энтерококки (Jungersen et al., 2014).

Пробиотическое действие бацилл начинается уже при первом взаимодействии с эпителиальными клетками пищеварительного тракта. В этот момент протеолитические ферменты, каталаза и дипиколиновая кислота диффундируют в слизистую оболочку кишечника, способствуя активизации обменных процессов и улучшению пищеварения. Ингибирующий эффект дипиколиновой кислоты в сочетании с усилением локального метаболизма является ключевым механизмом действия пробиотических спор. В течение последующих двух часов 90% спор бацилл трансформируются в вегетативные формы, которые активно подавляют рост патогенной микрофлоры и выделяют физиологически активные соединения. В нижнем отделе кишечника, как споры, так и вегетативные формы пробиотических бактерий, стимулируют иммунокомпетентные клетки и макрофаги, что приводит к усиленной продукции интерферонов и цитокинов (Тимошко, 1990; Шевелева, 1999).

Эффективность пробиотического действия в кишечнике определяется характером патологического процесса. При сниженной секреторной активности желудка и усиленной перистальтике пищеварительного тракта вегетативные формы бацилл появляются в кишечнике уже через несколько минут после приема препарата.

Механизм пробиотического воздействия спорообразующих бактерий при острых и хронических заболеваниях кишечника обусловлен несколькими

факторами. Во-первых, антагонистическая активность против патогенной микрофлоры обеспечивается за счет действия дипиколиновой кислоты, а также антибиотических соединений и ферментов, вырабатываемых вегетативными формами. Во-вторых, стимулируется работа иммунокомпетентных клеток и активизируется продукция интерферонов, способствующих укреплению защитных функций организма. В-третьих, совокупность этих процессов, включая проникновение биологически активных веществ в кровь, лимфу и внутренние органы, способствует общему повышению иммунного ответа и сопротивляемости организма инфекциям.

Согласно данным С.А. Шевелевой (1999), бактерии р. *Bacillus* оказывают стимулирующее влияние на лимфоциты крови, способствуя усилению защитных реакций организма. Уже в первые минуты после попадания пробиотика в организм наблюдается повышение выработки эндогенного интерферона. Также установлено, что вегетативные клетки способны активировать митоген-индуцированную пролиферацию мононуклеарных клеток, при этом споровые и вегетативные формы не оказывают влияния на продукцию интерлейкина или γ -интерферона (Cirrandi et al., 1986).

Доказана способность пробиотиков на основе спорообразующих бактерий поглощать и прочно связывать радиоактивный цезий и стронций, что означает, что бактерии р. *Bacillus* способствуют выведению солей тяжелых металлов (Покровский и др., 1987).

Пробиотические препараты на основе бактерий р. *Bacillus* благодаря синтезу биологически активных веществ оказывают не только прямое воздействие на патогенную и условно-патогенную микрофлору, но и опосредованное, активируя иммунный ответ организма. Они производят различные ферменты и аминокислоты, способствующие нормализации пищеварения, а также выделяют антибиотикоподобные вещества, такие как дипиколиновая кислота, которые непосредственно воздействуют на патогенные микроорганизмы (Куваева, 1976).

Таким образом, штаммы спорообразующих бактерий демонстрируют высокую эффективность как биологические средства для нормализации микробиоценоза кишечника и стимуляции иммунной системы организма.

Классификация пробиотических препаратов с момента начала их применения подвергалась сильным изменениям. В настоящий момент используется новая рабочая классификация, согласно которой препараты подразделяются на три основных поколения:

1. Препараты первого поколения включают симбиотические или эндогенные микроорганизмы. Они состоят из видов, которые являются характерными для нормальной микрофлоры кишечника или их близких аналогов. Эти препараты могут успешно приживаться в кишечнике, благодаря чему они относительно устойчивы к воздействию внешних факторов, ферментов и других условий, характерных для желудочно-кишечного тракта.

2. Препараты второго поколения базируются на сапрофитных или экзогенных микроорганизмах, чаще всего непатогенных бациллах. Эти микроорганизмы не приживаются в кишечнике и выводятся из организма через несколько дней. Основным их преимуществом является высокая устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды.

3. Препараты третьего поколения используют штаммы экзогенных и эндогенных микроорганизмов, полученных с применением методов генной инженерии на основе непатогенных бацилл. Возможно создание генномодифицированных штаммов на основе лактобацилл. В настоящее время такие препараты активно применяются в ветеринарной практике (Федорова и др., 2016).

Существует и другая классификация пробиотических препаратов, основывающаяся на видах и количестве используемых при их разработке штаммов. Согласно этой классификации пробиотики разделяются на четыре поколения:

1. Монокомпонентные препараты;
2. Самоэлиминирующиеся антагонисты (представители р. *Bacillus*);

3. Комбинированные препараты (несколько штаммов бактерий или добавки, усиливающие их действие);

4. Живые бактерии, иммобилизованные на сорбенте (Жандалгарова, 2017).

А.В. Чижая и Г.Н. Дудикова (2017) выделяют пятое поколение пробиотических препаратов – в виде биопленки на твердом носителе.

Препараты первого поколения представляют собой классические монокомпонентные средства, содержащие один штамм бактерий, таких как бифидобактерии и лактобактерии (Слабоспицкая и др., 1990). Ко второму поколению можно отнести самоисключающиеся антагонисты, представители р. *Bacillus*, в основном такие препараты как «Биоспорин» и «Бактисубтил», содержащие *B. subtilis* и *B. licheniformis*. В третье поколение входят комбинированные препараты, в составе которых содержится комплекс из нескольких видов штаммов бактерий (поликомпонентные) или включающие добавки, усиливающие их действие. Препараты четвертого поколения включают живые бактерии нормальной микрофлоры, иммобилизованные на сорбенте, например, бифидосодержащие пробиотики, такие как «Бифидумбактерин форте» (Ушакова и др., 2010; Ушакова и др., 2012). Пятое поколение пробиотических препаратов отличается образованием микроорганизмами биопленок на твердом носителе, что повышает их биологическую эффективность.

Целесообразность применения пробиотических препаратов в аквакультуре обусловлена необходимостью повышения качества продукции за счет улучшения физиологического и иммунологического состояния рыб. Кроме того, пробиотики применяют с целью коррекции дисбактериозов, регулирования микробиологических процессов пищеварительного тракта, лечения и профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта алиментарного и инфекционного характера (Лебедева, 2007).

Различные пробиотические препараты, как монокомпонентные, так и комбинированные, способствуют повышению фагоцитарной активности лейкоцитов, лизоцима, комплемента, а также экспрессии различных цитокинов у

рыб. Кроме того, пробиотики стимулируют иммунную систему кишечника рыб с заметным увеличением количества иммуноглобулинов и эозинофилов.

Среди многочисленных полезных действий пробиотиков иммунокоррекция играет наиболее важную роль. Изучение иммуномодулирующего действия полезных микроорганизмов на организм рыб показало, что пробиотические препараты, как по отдельности, так и в комбинации могут усиливать не только системный, но и местный иммунитет у рыб.

Известно, что пробиотики взаимодействуют с иммунными клетками, такими как моноклеарные фагоцитарные клетки (моноциты, макрофаги), полиморфноядерные лейкоциты (нейтрофилы) и NK-клетки, усиливая врожденные иммунные реакции. Кроме того, некоторые пробиотические препараты способствуют увеличению количества эритроцитов, гранулоцитов, макрофагов и лимфоцитов у различных видов рыб (Irianto, Austin, 2002; Kumar et al., 2008). При введении в рацион рыб пробиотиков также наблюдается повышение уровня иммуноглобулинов (Panigrahi et al., 2004; Nayak et al., 2007; Al-Dohail et al., 2009). Song et al. (2007) было зарегистрировано повышение уровня иммуноглобулинов в слизистой оболочке кожи *Miichthys miiuy*, вызванное *Clostridium butyricum*. Также обнаружено, что использование пробиотического штамма *Lactobacillus rhamnosus* в составе кормов значительно повышает уровень иммуноглобулинов у радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) (Nikoskelainen et al., 2003). Однако Balcazar et al. (2007) обнаружили, что повышение уровня иммуноглобулинов характерно только для ручьевой форели (*Salmo trutta*), при использовании пробиотиков, содержащих молочнокислые бактерии, в частности, *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactobacillus sakei* и *Leuconostoc mesenteroides* в дозировке 10^6 КОЕ/г в течение 2 недель.

Известно, что кишечник представляет собой орган, в котором пробиотики не только создают, но и выполняют свои функции, включая иммуностимулирующую активность. Иммунная система кишечника рыб называется лимфоидной тканью, ассоциированной с кишечником (GALT) и сильно отличается от иммунной системы млекопитающих. В отличие от

млекопитающих, у рыб в кишечнике отсутствуют пейеровы бляшки, секреторный Ig A и М-клетки, транспортирующие антиген (Buddington et al., 1997). Однако многие диффузно-организованные лимфоидные клетки, макрофаги, гранулоциты и слизь IgM, обнаруженные в кишечнике рыб, обеспечивают функционирование иммунной системы (Rombout et al., 1993; Joosten et al., 1996; Picchietti et al., 1997; Bakke-McKeller et al., 2007; Uran et al., 2008; Inami et al., 2009).

В настоящее время обнаружено, что пробиотические препараты оказывают положительное влияние на стимуляцию системных иммунных реакций у рыб. Однако из-за отсутствия подходящих инструментов предпринимаются ограниченные попытки получить доступ к иммунному ответу кишечника рыб после лечения пробиотиками. Исследования, проведенные в последнее время, показывают, что пробиотики могут стимулировать иммунную систему кишечника рыб с заметным увеличением количества Ig⁺ клеток и ацидофильных гранулоцитов (АГ) (Salinas et al., 2008; Picchietti et al., 2007; 2009). Применение пробиотиков на ранних стадиях развития оказывает положительное влияние на увеличение конкретных субпопуляций АГ (Picchietti et al., 2007).

Пробиотики начали применять в аквакультуре за рубежом в 80-е гг. XX века, однако на тот момент использовались препараты, разработанные для наземных животных. В 1990-е гг. количество успешных экспериментов и положительных результатов значительно увеличилось, а также было разработано больше препаратов, основанных на штаммах автохтонной микрофлоры различных видов рыб.

Положительные результаты применения пробиотиков на основе бактерий р. *Bacillus* были получены в экспериментах на рыбах и ракообразных. В частности, использование препарата на основе *Bacillus toyoi*, разработанного для крупного рогатого скота, оказалось эффективным при выращивании японского угря. Помимо заметного улучшения рыбоводных показателей, применение этого препарата способствовало снижению загрязненности среды культивирования и кормовых организмов патогенными бактериями р. *Vibrio* (Vaseeharan, Ramasamy, 2003). Porubcan (1991) доказал эффективность использования *Bacillus spp.* при

выращивании тигровой креветки (*Penaeus monodon*), что также способствовало улучшению качества воды за счет снижения концентрации аммиака и нитритов. Доказана способность пробиотиков стимулировать аппетит, улучшать усвоение питательных веществ и укреплять иммунную систему рыб (Irianto, Austin, 2002; Wang et al., 2008).

Кроме препаратов на основе бацилл, успешно применялись и пробиотики, содержащие другие виды бактерий. Например, добавление лактобактерий в рацион способствовало увеличению выживаемости и ускоренному росту тюрбо и японского ромба (Guo et al., 2020). Работы, посвященные поиску собственных для гидробионтов микробных штаммов, пригодных для создания пробиотиков, адаптированных к конкретным видам, показали, что некоторые бактерии из родов *Vibrio*, *Aeromonas* и *Pseudomonas* обладают выраженной способностью подавлять развитие нежелательной микрофлоры. Благодаря этой особенности такие штаммы нашли применение в аквакультуре – их использование способствует ускорению роста молоди рыб и различных беспозвоночных при интенсивных технологиях выращивания (Бурлаченко, 2007; Бурлаченко, 2008).

Широкое применение антибиотиков и химиопрепаратов для профилактики и лечения бактериальных заболеваний в рыбоводных хозяйствах привело к возникновению таких проблем, как развитие лекарственной устойчивости, накопление препаратов в тканях рыб и подавление иммунной системы. Стоит отметить, что при использовании антибиотиков в минимально возможных дозах, как по экономическим соображениям, так и для снижения побочных эффектов и воздействия на окружающую среду, вероятность формирования устойчивости патогенов к ним значительно возрастает. В последние годы ряд стран запретил использование некоторых антибиотиков из-за их серьезной экологической опасности и потенциального канцерогенного воздействия на костистых рыб. Антибиотики также могут угнетать полезную микрофлору пищеварительного тракта рыб, а их использование в аквакультуре ограничено, так как они не являются универсальным средством борьбы с заболеваниями и могут быть

эффективны лишь при конкретных бактериальных или вирусных инфекциях (Ушакова и др., 2009, 2010).

В настоящее время в аквакультуре некоторых стран, включая Россию, пробиотики не получили широкого применения, несмотря на то, что переход от полуинтенсивных к высокоинтенсивным технологиям рыбоводства неизбежно приводит к возникновению различных бактериальных заболеваний.

В настоящее время в аквакультуре практикуется использование препаратов на основе спорообразующих культур, таких как «Субтилис», «Субалин» («СУБ-ПРО»), «Ферм-КМ», «Простор», «Пролам», «Бацелл-М», «Моноспорин» и др.

Наиболее распространенным является препарат «Субтилис» – поликомпонентный пробиотик, основанный на сочетании двух форм бактерий: аэробной *Bacillus subtilis* и анаэробной *Bacillus licheniformis*. В 1 г препарата содержится не менее 2×10^9 КОЕ. *B. subtilis* функционирует как источник ферментов, участвующих в пищеварении, тогда как *B. licheniformis* характеризуется выраженной антагонистической активностью по отношению к широкому спектру грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Благодаря такому сочетанию обеспечивается эффективность пробиотика при использовании в различных технологических условиях (Кулаков, 2003).

Препарат оказывает влияние на иммунную систему и стимулирует рост организма, способствуя выработке пищеварительных ферментов, что позволяет сократить время выращивания и снизить расход кормов. Он также повышает устойчивость к инфекционным, микозным, инвазионным и алиментарным заболеваниям.

Научная обоснованность использования пробиотика «Субтилис» была впервые подтверждена специалистами Инновационного центра «Биоаквапарк – научно-технический центр аквакультуры» ФГБОУ ВО АГТУ, которые провели исследования, ориентированные на анализ физиолого-биохимических характеристик осетровых рыб. В результате было показано, что включение сухой формы препарата в рацион положительно влияло на физиологическое состояние молоди стерляди. В частности, у рыб опытной группы отмечалось повышение

концентрации гемоглобина до 81,1 г/л, уровня гематокрита до 33%, при этом среднее содержание гемоглобина в эритроците достигало 7,3 мкмкг/эритроцит. Дополнительно установлено, что применение пробиотика ускоряло восстановление кожных повреждений у осетровых и способствовало увеличению выживаемости особей, получивших травмы (Шульга, 2006; Шульга и др., 2011).

Р.А. Руденко (2020) исследовал влияние препарата пробиотического действия «Субтилис» на рост и развитие прудового карпа в условиях Ростовской области. При проведении эксперимента были взяты 3 группы двухгодовиков ставропольского карпа, одна из которых являлась контрольной (Н-19). В рацион двух оставшихся групп – Н-20 и Н-21 включили пробиотик «Субтилис» в дозировке 0,2% и 0,5% от общей массы корма, соответственно. По результатам проведенных исследований установлено, что применение пробиотика «Субтилис», оказало положительный эффект на прирост массы. Если на начало эксперимента масса карпа в контрольной группе составляла 374 г, превышая контрольные группы на 29,1% и 33,4%, соответственно, то к концу эксперимента карпы из опытных групп Н-20 и Н-21 превосходили рыб из контрольного варианта на 73,0 и 53,0 г, соответственно. Кроме того, введение в рацион рыб пробиотика «Субтилис» способствовало увеличению уровня протеина в теле рыбы. Результаты исследования показали, что при введении в рацион двухгодовика карпа 0,2% и 0,5% «Субтилиса» эффективность использования протеина и валовой энергии кормов на рост повысилась на 3,1 и 2,2%, соответственно. Выживаемость двухгодовиков за время проведения эксперимента составила 79,7% в контрольной группе, в опытной Н-20 – 94,3%, в группе Н-21 – 93,2%.

Другим эффективным пробиотическим препаратом является «Субалин» («СУБ-ПРО») – лечебно-профилактический пробиотик нового поколения, входящий в число монокомпонентных препаратов, применяемых в аквакультуре (Борисова и др., 2000). В основе пробиотика лиофилизированная культура штамма *Bacillus subtilis* 2335 ВКПМ 84759 в споровой форме. Суммарное количество спор в 1 г препарата составляет не менее 50×10^9 КОЕ. В 1 дозе

препарата содержится 10^{10} КОЕ, в 1 г препарата содержится 5 доз. Препарат обладает высокой устойчивостью к пищеварительным сокам и ферментам желудочно-кишечного тракта, активизирует процессы пищеварения, способствует усвоению кальция, синтезу витаминов группы В и оказывает антитоксическое и иммуномодулирующее действие, обусловленное выработкой пептидогликанов, тейхоевых и липотейхоевых кислот, при этом рост нормальной микрофлоры кишечника не подавляется. «СУБ-ПРО» эффективен при различных стрессовых ситуациях: высокой плотности посадки, повышенной температуре, микотоксикозах, бактериальных заболеваниях, перегруппировках, нарушении технологии содержания и кормления. Препарат стимулирует фагоцитарную активность лейкоцитов крови, является эффективным иммуностимулятором.

С 1997 г. препарат успешно применяется в хозяйствах, занимающихся разведением осетровых, лососевых, форелевых и карповых рыб, для профилактики и лечения бактериальных инфекций (Борисова и др., 2000; Юхименко и др., 2002). Опыт его использования в разных по типу рыбоводных хозяйствах показал, что даже при неблагоприятной эпизоотической обстановке «Субалин» обеспечивает выраженный положительный эффект. У рыб ускоряется заживление язвенных поражений, восстанавливается формирование слизистого покрова, улучшается состояние жабр, нормализуется работа желудочно-кишечного тракта и активность пищеварительных ферментов. Также восстанавливается баланс между полезной и патогенной микрофлорой, а из внутренних органов постепенно устраняются контаминантные микроорганизмы.

После поступления пробиотика в организм начинается выделение комплекса биологически активных веществ, активируется метаболическая деятельность микробных клеток, что обеспечивает как прямое подавление патогенной и условно-патогенной микрофлоры, так и косвенное влияние – через стимуляцию специфических и неспецифических защитных механизмов организма хозяина. На этом этапе клетки пробиотических бактерий выполняют роль биокатализаторов, участвующих в работе пищеварительного тракта и

продуцирующих ферменты, аминокислоты, антибиотические соединения и другие метаболиты, усиливающие терапевтический эффект.

Благодаря этому при использовании «Субалина» отмечается выраженное иммуностимулирующее действие. В результате применения препарата у рыб возрастает бактерицидная активность сыворотки крови и увеличивается уровень агглютинирующих антител к аэромонадам (Гаврилин и др., 2002; Юхименко и др., 2002).

Оценка влияния пробиотического препарата на состояние естественной резистентности организма рыб проводилась на основе анализа показателей специфического и неспецифического иммунитета. Исследования иммунного статуса годовиков карпа показали, что у рыб, получавших пробиотик, показатели гуморальных факторов защиты были значительно выше, чем у рыб контрольной группы. Так, на начальном этапе эксперимента бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК) карпов составляла 10,4-12,5%. Максимальных значений БАСК достигала на 7-е сутки после кормления и составила 18,4 % в опытной группе, в то время как в контроле данный показатель находился на прежнем уровне (Суворова, Силкина, 2019). Таким образом, было выявлено, что использование пробиотиков в кормлении годовиков карпа положительно влияет на естественную резистентность организма, что выражено индуцированием специфической защитной реакции иммунной системы.

В аквакультуре комплексные пробиотические препараты применяют для улучшения физиологического состояния рыб, стимуляции неспецифического иммунитета, повышения приростов и снижения затрат на корм. Особое внимание уделяется препаратам, иммобилизованным на твердых фитосубстратах, которые обеспечивают более высокую жизнеспособность бактерий и устойчивость к неблагоприятным условиям (Ушакова и др., 2010).

Примером такого препарата является пробиотик «Ферм-КМ», включающий живые клетки штаммов *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* и комплекс молочнокислых бактерий. Наиболее эффективным считается сочетание депонированных в ВКПМ штаммов: *Bacillus subtilis* 188, *B. subtilis* B-8130,

B. licheniformis МС-12, *B. subtilis* 44-р, которые проявляют выраженный пробиотический эффект в комплексе с эндоглюканазной, протеолитической и амилазной активностью. Благодаря фиксации клеток на фитоносителе в виде биопленки препарат отличается высокой устойчивостью к внешним стрессовым факторам. «Ферм-КМ» содержит ключевые ферменты – эндоглюканазу, целлюлазу, амилазу, комплекс протеаз, липазу, а также органические кислоты, биологически активные вещества, витамины, аминокислоты и иммуноактивные пептиды, являющиеся продуктами метаболизма пробиотических микроорганизмов (Ушакова и др., 2009).

Для решения проблемы качественной и эффективной подготовки производителей осетровых рыб к нересту и их постнерестовой адаптации специалистами кафедры «Аквакультура и водные биоресурсы» ФГБОУ ВПО АГТУ была разработана специализированная рецептура комбикорма, включающая комплекс биологически активных веществ и пробиотический препарат нового поколения «Ферм-КМ». Состав корма обеспечивает его применение на протяжении всего периода преднерестового выдерживания рыб (Жандалгарова, 2017). Проведенные исследования показали, что разработанный комбикорм удовлетворяет физиологические потребности осетровых в ключевых биологически активных компонентах в период формирования и созревания гонад. Использование корма с пробиотической добавкой приводило к увеличению рабочей плодовитости производителей до 237,6 тыс. шт., а также повышало процент оплодотворения икры до 89,5%. Кроме того, анализ качества эякулятов самцов стерляди выявил увеличение процента созревания до 89,8% (Пат. 2656386).

Также установлено, что применение пробиотического препарата «Ферм-КМ» способствует улучшению рыбоводно-биологических показателей молоди белуги. За период экспериментальных исследований линейно-весовые показатели имели наиболее высокие показатели в опытном варианте и составили 16,7 см и 28,2 г, соответственно. Выживаемость рыб при использовании «Ферм-КМ» составила 80% (Жандалгарова и др., 2017).

Помимо пробиотиков в аквакультуре используют различные синбиотические препараты. Синбиотики – это физиологически функциональные пищевые ингредиенты, включающие в себя комбинацию пробиотиков и пребиотиков, обладающую свойством взаимного усиливающего воздействия на физиологические функции и метаболические процессы в организме животных и рыб (Тараканов, Николичева, 2000). Основной особенностью синбиотических препаратов является проявление синергетического эффекта, достигаемого за счет увеличения скорости размножения полезных микроорганизмов, способности фиксировать пробиотики в кишечнике с помощью пребиотиков, увеличения скорости доставки пробиотиков к месту назначения за счет переноса на пребиотиках, активной разработки пробиотиков с продуцированием их метаболитов в процессе производства синбиотиков (Лебедева, 2007).

Одной из новейших биологически активных добавок является синбиотик «Простор», представляющий собой иммобилизованные на фитосорбенте штаммы *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, комплекс молочнокислых бактерий, а также продукты их метаболизма. Технология получения синбиотического препарата частично имитирует условия жизнедеятельности кишечных микросимбионтов и включает неполное твердофазное сбраживание пробиотической ассоциацией свекловичного жома (Ушакова и др., 2009, 2013). В результате образуется биопленка на поверхности фитоносителя, позволяющая сохранять жизнеспособные бактерии, их метаболиты и биологически активные вещества. Конечный продукт включает биомассу пробиотиков, продукты их метаболизма, продукты биотрансформации фитосубстрата и фитокомпоненты (Ушакова и др., 2019). Получение биопленки пробиотика позволяет не только обеспечить жизнеспособность клеток в неблагоприятных условиях высушивания, грануляции, но и адаптировать популяцию пробиотических микроорганизмов к условиям жизнедеятельности в кишечнике. Иммобилизованная форма пробиотических культур позволяет существенно повысить защиту микроорганизмов при прохождении через кислые условия желудка, где обычные

препараты, содержащие лиофильно высушенные клетки пробиотиков, теряют до 90% жизнеспособности (Кравцова и др., 2004).

Исследования показывают, что бактерии, находящиеся в составе биопленки, функционируют иначе, чем изолированные клеточные культуры. Это различие проявляется как в характере метаболических процессов, так и в спектре синтезируемых ими биологически активных соединений. Существенную роль в таких сообществах играют сигнальные молекулы, обеспечивающие координацию и обмен информацией между клетками. Предполагается, что некоторые из этих веществ могут выполнять функции, сходные с регуляторными молекулами организмов животных. В частности, обнаруженный у ряда штаммов *Bacillus subtilis* соматостатинподобный пептид рассматривается как возможный компонент системы межклеточной коммуникации. Известно, что грамположительные бактерии передают сигналы с помощью олигопептидов, обеспечивая тем самым согласованность поведения клеток внутри сообщества (Гинцбург и др., 2003). Согласно симбиогенетическим представлениям о возникновении эукариотической клетки, многие универсальные сигнальные системы, характерные как для бактерий, так и для эукариот, первоначально обеспечивали взаимодействие между прокариотами, а позднее стали выполнять роль регуляторов функционирования клеток в многоклеточных организмах (Ушакова и др., 2010). В этой связи пробиотические препараты, полученные методом твердофазного культивирования и формирующие биопленки, отличаются наличием специфических сигнальных веществ бактериального происхождения, которые могут оказывать влияние на поддержание гомеостаза у организмов-хозяев (Жандалгарова, 2017).

Сегодня, учитывая высокую стоимость сырья, необходимо обеспечить его максимально эффективное использование, наиболее полное извлечение питательных веществ и энергии для получения продукции. Для этого необходим многофункциональный препарат, сочетающий несколько механизмов воздействия на биоценозы пищеварительной системы. Препарат должен оказывать многостороннее действие: вытеснять условно-патогенную микрофлору,

подкислять химус, расщеплять некрахмалистые полисахариды, белок, содействовать развитию кишечного эпителия – и таким образом, наряду с выполнением функции пробиотика, дублировать действие других кормовых добавок, с которыми он хорошо совместим. Такое дублирование ферментативных и иных функций пищеварительной системы – важное условие ее стабильной работы в условиях колебаний кормового и ветеринарного фона.

Н.А. Ушаковой и соавторами (2013) на базе ФГБОУ ВПО АГТУ были проведены исследования по оценке эффективности введения в рацион осетровых рыб пробиотического препарата «Простор». Примененный синбиотический препарат повысил продуктивность двухлеток гибрида русско-ленского осетра, что отразилось на интенсивном накоплении массы у опытных рыб. Повышение рыбоводно-биологических показателей выращиваемых рыб было связано с активацией энергетического обмена, что проявилось в повышении уровня гемоглобина и общих липидов в сыворотке крови.

Исследования показали, что применение препарата «Простор» обеспечивает выраженный защитный эффект: помимо противомикробного и иммунокорригирующего действия, он снижает вероятность проникновения в организм патогенных микроорганизмов, вирусов и токсинов, а также способствует повышению устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды (Жандалгарова и др., 2018).

Известно, что кормовая синбиотическая добавка нового поколения «Простор» оказывает положительное влияние на рыбоводно-биологические показатели молоди русского осетра. В период выращивания наблюдалось увеличение абсолютного прироста массы, среднесуточной скорости роста и коэффициента упитанности рыб. Особое влияние препарат оказал на выживаемость молоди русского осетра (Жандалгарова и др., 2017).

Для изучения влияния препарата «Простор» на физиологические и микробиологические показатели рыб в условиях садкового хозяйства «Лагуна» Орловской области проведен опыт на стерляди и карпе. Установлено, что применение пробиотика «Простор» оказало положительное влияние на

численность и родовой состав химуса микробиоценоза кишечника рыб. Так, доля представителей различных родов в составе микрофлоры кишечника исследуемых рыб снижалась: *Proteus* – на 6-14%, *Acinetobacter* – на 5-9%, бацилл – на 7-8%. Также наблюдалось достоверное повышение активности ряда пищеварительных ферментов: протеаз, амилазы, а у карпа – эндоглюканазы, в несколько меньшей степени – липазы. За период выращивания месячный прирост массы карпа и стерляди превысил контрольные значения на 13,6 и 36%, среднесуточный – на 25 и 35%, соответственно (Зуенко, 2019).

Установлено, что пробиотическая составляющая препарата «Простор» обеспечивает биозащиту организма, профилактику развития дисбактериозов, стимуляцию обменных и иммунных процессов, обеспечивает увеличение переваримости кормов. Пребиотические компоненты способствуют росту нормальной микробиоты, нормализуют моторику кишечника, адсорбируют токсины. Специальный комплекс ферментов обеспечивает повышение усвоения питательных веществ, биотрансформацию микотоксинов за счет превращения их в неактивные формы. Комплекс лекарственных трав обладает иммуномодуляторными свойствами за счет повышения естественных защитных сил организма.

Таким образом, пробиотические препараты, сформированные в виде биопленок на твердом фитоносителе, характеризуются высокой метаболической активностью и представляют значительный интерес для использования в аквакультуре. Их применение оправдывает экономические затраты за счет увеличения темпов роста и выживаемости рыб, улучшения коэффициента конверсии корма, а также получения продукции аквакультуры с более высокими экологическими характеристиками.

К перспективным формам пробиотических препаратов нового поколения также относятся сорбированные формы, содержащие бактерии родов *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, иммобилизованные на частицах твердого сорбента, способствующие выведению в полость кишечника эндотоксинов из внутренних

сред организма, что приводит к подавлению и ослаблению токсических реакций, воспалительных процессов и профилактике соматогенного экзотоксикоза.

В настоящее время наиболее перспективными и эффективными сорбентами являются активированный уголь и оксид алюминия, обладающие высокой ионообменной и сорбционной способностями. Для них характерен хорошо развитый поверхностный каркас с порами различного диаметра, взаимодействующий с разными веществами и клетками препаратов микробиосинтеза. Данные сорбенты имеют высокую бактерицидную активность, обладают способностью сохранения в кишечнике гормонов, ферментов, транспортных белков, поддерживающих гомеостаз в организме рыб. Также не оказывают влияния на водно-солевой баланс организма, не вызывают атонию кишечника, снижают нагрузку на печень, имеют детоксикационный эффект и выводит из организма токсины, патогенные микробы и продукты незавершенного метаболизма. Повышенная биологическая активность пробиотиков, фиксированных на энтеросорбентах, обусловлена тем, что закрепленные на носителе клетки быстрее колонизируют кишечник. Имобилизованная форма обеспечивает более эффективную защиту лакто- и бифидобактерий при прохождении кислой среды желудка, проявляет выраженные иммуномодулирующие свойства, способствует восстановлению нормального микробиоценоза кишечника и усиливает неспецифические защитные механизмы организма. Такие препараты характеризуются высокой селективной антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также способностью синтезировать широкий спектр биологически активных соединений, включая липополисахариды, участвующие в иммунной регуляции. Использование сорбированных пробиотиков положительно отражается на работе пищеварительного тракта, способствует повышению общей адаптационной устойчивости рыб и стимулирует функции неспецифического иммунитета.

В настоящее время в отечественной аквакультуре научные исследования работы по данному направлению ведутся сотрудниками кафедры «Аквакультура и водные биоресурсы» ФГБОУ ВО АГТУ.

Данные, полученные Sergina Yu.A. et al (2021), позволили установить, что применение пробиотического препарата на энтеросорбенте «Экофлор» (4 г/кг) способствовало увеличению количества молочнокислых микроорганизмов в жабрах и кишечнике русского осетра. В результате проведенного микробиологического анализа были выявлены: грамположительные палочки и кокки, относящиеся к родам *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*.

Известно, что при использовании пробиотика-энтеросорбента «Экофлор» при выращивании осетровых рыб наблюдается увеличение рыбоводно-биологических и гематологических показателей рыб. Установлено, что применение пробиотического препарата-консорциума, иммобилизованного на углеродминеральном сорбенте СУМС-1, способствовало повышению концентрации гемоглобина до 73,1 г/л, снижению холестерина до 1,7 ммоль/л, а также снижению СОЭ до 2,4 мм/ч в крови русского осетра (Жандалгарова и др., 2021).

Установлено, что применение данного пробиотического препарата при выращивании цихловых рыб способствовало активации защитных функций организма, нормализации уровня обменных процессов, оптимизации процессов пищеварения красной тиляпии (Сергина и др. 2023).

Таким образом, анализ отечественных биологически активных кормовых добавок, в частности пробиотиков, позволяет расширить область исследований и разработать оптимальные методы их применения в аквакультуре, что в свою очередь поспособствует росту рыбопродуктивности водоемов.

Несмотря на положительные результаты применения пробиотиков в аквакультуре, многие вопросы остаются нерешенными. По данным И.В. Бурлаченко (2007, 2008), вопрос о том, какие пробиотические средства – выделенные из наземных организмов или полученные от гидробионтов – обладают наибольшей эффективностью в аквакультуре, остается открытым. С

одной стороны, видоспецифичные пробиотики традиционно демонстрируют более выраженный положительный эффект. С другой стороны, штаммы, выделенные из водных животных, должны полностью соответствовать требованиям биологической безопасности и исключать риск патогенности. Также еще недостаточно исследованы такие аспекты, как адгезия микроорганизмов к кишечной слизи рыб, влияние на иммунную систему, оптимальные дозировки и продолжительность применения препаратов. Кроме того, не существует единого мнения о преимуществах однокомпонентных и многокомпонентных пробиотиков.

1.2 Показатели крови, как индикаторы физиолого-иммунологического состояния рыб

Кровеносная система включает в себя кровь, органы, отвечающие за кроветворение, и механизмы, регулирующие состав и свойства крови. Особенности этой системы определяются составом и характеристиками крови. Кровь, тканевая жидкость и лимфа вместе составляют внутреннюю среду организма (Лысов, Максимов, 2004). Кровью называется жидкая подвижная ткань, циркулирующая в кровеносных сосудах. Ее межклеточная жидкость – плазма – сообщается с другими межклеточными и межтканевыми жидкостями в организме, но отделена от них стенками кровеносных сосудов, и представляет собой только часть жидкости организма. Стенки сосудов хорошо проницаемы для воды и низкомолекулярных соединений, таких как глюкоза, аммиак, аминокислоты, кислород, углекислота, но гораздо хуже проницаемы для крупных молекул, например, белков. Объем циркулирующей крови различен у разных видов рыб: у костистых рыб он колеблется в пределах от 0,9 до 3,7%, у активных пелагических рыб – от 1,4 до 2,4%, у малоподвижных донных рыб – от 0,9 до 1,9% от массы тела.

Кровь в организме рыб выполняет несколько ключевых функций. Она обеспечивает трофику, перенося питательные вещества от органов пищеварения к

тканям. Также кровь участвует в дыхательной функции, транспортируя кислород к тканям и углекислоту к органам дыхания. В процессе выделительной функции кровь выводит из тканей конечные продукты метаболизма и доставляет их к органам выделения. Кровь выполняет регуляторную функцию, транспортируя гормоны и биологически активные вещества от желез внутренней секреции к органам и тканям. Наконец, защитная функция заключается в содержании в крови противомикробных и антитоксических веществ, таких как лизоцим, пропердин, комплемент и интерферон (Аминева, Яржомбек, 1984; Луговская и др., 2006).

Кровь включает в себя форменные элементы и жидкую часть, называемую плазмой. Форменные элементы крови делятся на три категории: эритроциты, лейкоциты и тромбоциты. Эритроциты представляют собой красные кровяные тельца, имеющие своеобразную форму двояковогнутого диска и напоминающие в поперечном разрезе гантели. Они состоят из стромы и полупроницаемой оболочки, содержат ядра округлой формы, располагающиеся в центре клетки. Происходя из гемоцитобластов, эритроциты при созревании проходят следующие стадии: эритробласт – пронормобласт – нормобласт базофильный – нормобласт полихроматофильный – нормобласт оксифильный – зрелый эритроцит.

У взрослых костистых рыб кровь обычно содержит определенный процент незрелых эритроцитов или стареющих клеток (растущих клеток), называемых проэритроцитами или ретикулоцитами. Количество эритроцитов в периферической крови рыб определяется множеством факторов, включая уровень их активности, температуру воды, содержание растворенного в воде кислорода, а также другие параметры окружающей среды. Данный показатель значительно варьирует в зависимости от сезона. Кроме того, он варьирует под воздействием ряда биологических факторов: возраста и пола рыб, характера их питания, стадии репродуктивного цикла, а также может иметь популяционные различия даже внутри одного вида.

Основной составной частью эритроцитов является гемоглобин – внутриклеточная молекула, переносящая кислород в крови от органов дыхания к остальным частям тела (Коржуев, 1964). Известно, что оболочка эритроцита,

являясь динамическим образованием, избирательно проницаема для различных газов и других веществ, тогда как строма эритроцита, в состав которой входит гемоглобин, играет большую роль в антигенных свойствах крови.

К основным свойствам эритроцитов можно отнести их осмотические характеристики, пластичность, способность к оседанию и функции по адсорбции и транспортировке различных веществ. Осмотические свойства эритроцитов обусловлены наличием в них белков и низкомолекулярных веществ, создающих осмотическое давление. Мембрана эритроцитов проницаема для низкомолекулярных соединений. В условиях гипертонической среды клетки теряют воду и сморщиваются, тогда, как в гипотонической среде вода поступает внутрь эритроцита, что приводит к разрушению его мембраны и выходу гемоглобина в плазму крови, вызывая осмотический гемолиз. Эритроциты обладают высокой пластичностью, что позволяет им легко изменять форму под воздействием внешних факторов и беспрепятственно проходить через капилляры. Благодаря тому, что их удельный вес (1,096) превышает удельный вес плазмы крови (1,027), они склонны к оседанию и образованию агрегатов. Помимо этого, эритроциты способны адсорбировать и транспортировать различные вещества, включая питательные элементы, воду, гормоны и другие биологически активные соединения (Лысов, Максимов, 2004).

Лейкоциты – белые кровяные тельца, основная функция которых фагоцитарная. Количество лейкоцитов у рыб колеблется в широких пределах от десятков до сотен тысяч в 1 мкл и зависит от возраста, пола, стадии зрелости, а также факторов внешней среды. Лейкоциты различаются по величине, форме и строению ядер, по количеству цитоплазмы и наличию зернистости в ней, по способности окрашиваться кислыми и основными красителями (Аминева, Яржомбек, 1984).

Согласно классификации Н.Т. Ивановой (1983), лейкоциты делятся на агранулоциты (лимфоциты и моноциты) и гранулоциты (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы). Лимфоциты являются преобладающими клетками белой крови рыб, составляя до 95% всех лейкоцитов (Zhandalgarova et al., 2024). У рыб лимфоциты

функционально можно отнести к двум группам: В-лимфоциты, имеющие рецепторы к γ -глобулинам (аналог В-лимфоцитов высших позвоночных), и Т-лимфоциты, включающие, как минимум, два вида клеток – киллеры и хелперы. Основная функция лимфоцитов рыб заключается в обеспечении иммунного механизма путем выработки антител.

Моноциты составляют небольшое количество лейкоцитов (0,1% от общего количества крови). По достижении стадии зрелости через 48 часов данные клетки покидают циркуляционное русло и превращаются в макрофаги тканей. По этой причине ряд исследователей отказываются признавать моноциты самостоятельной группой и считают их «гематогенными» макрофагами у костистых рыб (Иванов, 2003). Однако экспериментально установлена выраженная способность этих клеток к хемотаксису по отношению ко многим веществам и корпускулярным структурам. Основная функция моноцитов – уничтожение болезнетворных микроорганизмов в процессе фагоцитоза.

Гранулоциты рыб по морфологии и качественному составу имеют существенные различия. Наиболее часто встречающимися среди них являются нейтрофилы. Биохимическими исследованиями установлено наличие в составе нейтрофильных гранулоцитов белков с бактерицидными свойствами. Многие авторы считают нейтрофилы основными фагоцитными клетками, защищающими ткани от воспалений и повреждений (Шполянская, 1964; Садовская, 1967; Терентьева, Шишканова, 1972).

Эозинофилы в циркуляторном русле обнаруживаются редко, но в кроветворных органах присутствуют постоянно. Клетки данного типа могут накапливаться в организме рыб в ответ на паразитарные инфекции и воспалительные процессы, однако это не служит надежным подтверждением их антипаразитарной роли, как это наблюдается у млекопитающих (Lester, Daniels, 1976; Butterworth et al., 1980; Roubal, 1986).

Базофилы представляют собой наиболее малочисленную группу лейкоцитов. На полное отсутствие базофилов у многих исследованных рыб обращают внимание разные авторы. Функции базофилов изучены недостаточно.

Тромбоциты – это кровяные пластинки, которые играют ключевую роль в процессе свертывания крови. Данные клетки способствуют сокращению кровяного сгустка и его распаду, а также регулируют тонус сосудистой стенки.

Гематологический анализ показателей периферической крови и количественная оценка морфологии клеток крови являются наиболее важными инструментами оценки физиологического и иммунологического состояния рыб. Показатели крови обладают высокой чувствительностью, являются быстро реагирующими биомаркерами воздействия различных факторов и способствуют восстановлению равновесия между организмом и средой. Они способны отражать широкий спектр физиологических изменений, как адаптивных, так и деструктивных, и предоставляют обширную информацию о различных физиологических функциях организма.

Проведение гематологических исследований сопровождается определением биохимических показателей плазмы или сыворотки крови, что позволяет провести оценку воздействия факторов окружающей среды на организм рыб. На результаты данных исследований рыб оказывают влияние различные биотические и абиотические факторы, которые изменяются в зависимости от физико-химических параметров воды, таких как концентрация растворенного в воде кислорода, температура воды, pH или соленость. Кроме того, на значения гематологических показателей могут также влиять многие другие факторы, такие как фотопериодизм, режим и технология кормления, возраст, пол и цикл половой зрелости рыб. Однако анализ гематологических показателей рыб затруднен из-за отсутствия общепринятых эталонных значений для этой группы позвоночных. Определение гематологических референсных значений у рыб гораздо сложнее, чем в случае млекопитающих, из-за пойкилотермии и высокой пространственной, временной и индивидуальной изменчивости. Кроме того, значения гематологических показателей могут варьировать в зависимости от методов взятия пробы крови, обработки и анализа, применяемых различными исследователями.

Основными гематологическими показателями являются гематокрит (HCT), концентрация гемоглобина (HGB), скорость оседания эритроцитов (ESR), абсолютное количество эритроцитов (RBC), абсолютное количество лейкоцитов (WBC) и лейкоцитарная формула. Дополнительными параметрами красной крови являются средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в одном эритроците (MCH) и средняя концентрация гемоглобина в эритроцитарной массе (MCHC).

Концентрация гемоглобина, общее количество эритроцитов и гематокрит являются наиболее легко определяемыми гематологическими показателями у рыб, как в естественных, так и в заводских условиях (Bhaskar, Rao, 1990). Гематокрит среди всех гематологических показателей широко варьирует в отличие от других параметров периферической крови, и его следует использовать для удобства при подсчете уровня гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов (Wedemeyer et al., 1983; Pradhan et al., 2012). Абсолютное содержание лейкоцитов (WBC) служит индикатором иммунного состояния рыб, так как лейкоциты являются важным элементом врожденной иммунной системы и принимают участие в неспецифической защите организма рыб (Prasad, Charles, 2010; Pradhan et al., 2012). Эритроцитарные индексы и скорость оседания эритроцитов используются для измерения функционального состояния кровотока и в качестве биомаркеров загрязнения водной среды (Shah, Altindag 2005; Satheeshkumar et al., 2012).

Помимо гематологических показателей, важным компонентом диагностики заболеваний рыб в аквакультуре являются биохимические исследования сыворотки крови. Многие патологические изменения, отражающиеся в сыворотке крови задолго до появления клинических заболеваний, могут быть использованы в качестве одного из вспомогательных диагностических методов (Tripathi et al., 2003). Биохимические параметры сыворотки могут предоставить важную информацию о внутренней среде организма рыб (Masopust, 2000; Anver, 2004; Wagner, Congleton, 2004). В настоящее время как гематологические, так и биохимические показатели сыворотки крови имеют огромное диагностическое

значение для оценки физиологического состояния организма рыб, как в естественных, так и в искусственных условиях (Gul et al. 2011).

Центральное место в биохимических исследованиях занимают белки крови. Многообразная физиологическая роль группы белков, их способность отражать особенности функционального состояния организма, обусловленные внутренними и внешними факторами, определяют нарастающий интерес исследователей к данной биохимической системе крови. Одним из ключевых функционально специализированных белков крови является гемоглобин, который обладает способностью связывать и переносить кислород. Интерес исследователей к гемоглобину неизменно возрастает, что связано с открытием электрофоретической гетерогенности гемоглобина человека (Pauling et al., 1949; Kunkel, Wallenius, 1955).

Биохимические параметры крови варьируют от вида к виду и могут зависеть от многих эндогенных и экзогенных факторов (Zarejabad et al., 2010). Уровень белка в сыворотке часто связан с пищевым и физиологическим статусом и на него влияют голодание и стресс, которые могут быть вызваны структурными изменениями печени, снижающими активность аминотрансфераз, с соответствующим снижением способности к дезаминированию и нарушением контроля баланса жидкости (Prasad, Charles, 2010). Снижение концентрации белка в сыворотке крови можно объяснить катаболизмом белка. Повышение уровня холестерина в сыворотке может быть результатом повреждения печени или почек, а также вследствие применения пестицидов (Borges et al., 2004). Колебания концентрации сывороточного белка, глюкозы, холестерина в сыворотке крови могут быть обусловлены специфическими показателями симпатической активации в ответ на гипоксический стресс (Svobodova et al., 2001).

Таким образом, знание гематологических и биохимических показателей сыворотки крови является важным диагностическим инструментом для оценки физиолого-иммунологического состояния здоровья рыб.

1.3 Структурно-функциональная организация иммунной системы рыб

Рыбы, как одни из самых древних позвоночных животных в истории эволюции, характеризуются особым иммунным морфогенезом в сравнении с другими высшими позвоночными. Данная гетерогенная группа пойкилотермных животных включает бесчелюстных и челюстных рыб классов Chondrichthyes и Osteichthyes, физиология и развитие иммунной системы которых различаются и зависят от многих факторов окружающей среды. Внешние параметры, такие как фотопериодизм, температура и концентрация растворенного в воде кислорода влияют на развитие и функционирование как врожденных, так и приобретенных факторов иммунитета (Кондратьева и др., 2001).

Традиционно иммунную систему делят на врожденную или неспецифическую и приобретенную или специфическую. Иммунная система рыб имеет оба типа иммунитета: врожденный и специфический.

Врожденный иммунитет, или естественный, основывается на генетически обусловленных морфофизиологических и биохимических особенностях животных, характерных не только для вида, но и для более крупных таксономических категорий, таких как род, семейство, отряд и класс. Приобретенный иммунитет развивается в ответ на многократное воздействие антигенных факторов с разными временными интервалами. Он делится на две основные формы: активный, который возникает после перенесенного заболевания или вакцинации, и пассивный, который формируется при введении в организм различных биопрепаратов.

В основе врожденной и приобретенной резистентности организма лежит совместная деятельность многих гуморальных и клеточных факторов иммунной системы, обеспечивающая поддержание гомеостаза на всех этапах онтогенеза. Способность организма отвечать разнообразными иммунологическими реакциями в ответ на антигенное раздражение характеризует его иммунологическую реактивность, выраженность которой у разных видов на один и тот же антигенный раздражитель или на разные антигенные раздражители у одного и

того же вида широко варьирует. Отсутствие иммунологической реакции на первичное антигенное раздражение или слабое ее проявление называется «иммунологической ареактивностью» (Лукияненко, 1989).

Несмотря на некоторые различия, иммунная система рыб физиологически близка к иммунной системе высших позвоночных (Ланге, 2000). Одним из главных различий между иммунной системой рыб и млекопитающих являются органы, которые действуют как первичные и вторичные лимфоидные органы. У рыб, у которых отсутствует красный костный мозг, головная почка и тимус действуют как первичные лимфоидные органы, ответственные за кроветворение иммунных клеток, тогда как селезенка и лимфоидная ткань, связанная со слизистыми оболочками, действуют как вторичные лимфоидные органы, где взаимодействуют клетки иммунной системы и развивается иммунный ответ.

Различные морфофункциональные исследования позволили установить, что у рыб различных систематических групп наблюдаются различия в расположении лимфоидной и лимфомиелоидной тканей и органов. У костистых рыб лимфомиелоидные структуры выявлены преимущественно в головной и туловищной почках, а также в печени и кишечнике. У хрящевых рыб элементы лимфоидной ткани формируются в тимусе, селезенке, печени и почках. У представителей хрящевых ганойдов иммунокомпетентные ткани располагаются в области черепной коробки, перикардальной полости, почках и кишечнике (Микряков и др., 2001).

Почки являются одним из ключевых компактных органов иммунной системы, характерных для всех групп рыб. Они включают два функциональных отдела – передний (головной) и задний (туловищный), которые располагаются дорсально и удерживаются в полости тела за счет прикрепления к ее стенке мезотелием. Головная почка – главный кроветворный орган рыб, имеет большое сходство с костным мозгом позвоночных, отвечает за производство различных иммунных клеток, участвующих в клеточном иммунном ответе: макрофаги, гранулоциты, лимфоциты и т.д. В данном отделе почки отсутствуют нефроны и, следовательно, не выполняется почечная функция, тогда как туловищный отдел

этого органа выполняют обе функции: кроветворную и почечную. Известно, что головная почка костистых рыб одновременно действует как вторичный лимфоидный орган, вызывая индукцию иммунного ответа.

Тимус является наиболее важным лимфоидным органом, встречающимся у всех позвоночных, включая рыб классов Chondrichthyes и Osteichthyes, за исключением миног и миксин, которые, как известно, являются примитивными позвоночными. Тимус рыб очень похож на тимус млекопитающих, у которых эритроциты, нейтрофилы и гранулоциты обнаруживаются в селезенке, тогда как лимфоциты являются основным типом клеток, обнаруживаемых в тимусе (Rauta et al., 2012). Тимус продуцирует Т-лимфоциты, участвующие в стимуляции фагоцитоза, отторжении аллотрансплантата и выработке антител В-лимфоцитами (Bowden et al., 2005). Кроме того, данный орган контролирует и регулирует функционирование клеточного звена иммунитета (Петров, 1987; Галактионов, 2005). У осетровых рыб тимус представляет собой двухдольный однородный орган, расположенный в хрящевых капсулах черепа позади глаз рядом с жаберными крышками (Lange et al., 2000; Gradil et al., 2014; Salkova, Flajshans, 2017; Salkova et al., 2020).

Селезенка является третьим по значимости кроветворным органом. У костистых рыб данный орган функционирует как основной вторичный иммунный орган, а также играет важную роль в выведении переносимых кровью антигенов и иммунных комплексов, а также в представлении антигенов и инициации адаптивного иммунного ответа. У отдельных видов рыб селезенка состоит из красной и белой пульпы, при этом белая пульпа развита слабо и чаще всего располагается в рассеянном виде или сосредоточена вокруг артериол (Микряков и др., 2001; Иванов и др., 2015). Селезенка осетровых рыб, подобно млекопитающим, состоит из красной и белой пульпы, которые отличаются по своему составу гемопоэтической ткани (Gallo et al., 2004; Палатников, 2022). Красная пульпа несет в основном эритропоэтическую функцию, а белая пульпа образована фолликулоподобными скоплениями лимфоцитов, гранулоцитов и

макрофагов. Таким образом, очевидно, что селезенка осетровых рыб является настоящим иммунным органом.

Также селезенка является основным местом эритро- и тромбопоэза, однако роль в продукции лимфоцитов, гранулоцитов и плазматических клеток невелика (Микряков, Балабанова, 1979; Валедская, 2005). Спленоциты проявляют фагоцитарную активность в отношении микроорганизмов и старых клеток крови, а сама селезенка является «депо» эритроцитов (Fänge, Mattisson, 1981; Валедская, 2005).

Кроме вышеописанных органов, иммунная система рыб представлена диффузными скоплениями лимфомиелоидной и лимфоидной тканей. Незащищенные капсулой небольшие скопления лимфомиелоидной ткани у костистых рыб локализуются в базальной зоне кишечного эпителия и представлены малыми и средними лимфоцитами, зрелыми и незрелыми плазматическими клетками, а также небольшим числом базофилов. Данные клеточные структуры играют ключевую роль в иммунном ответе на антигены, проникающие в кишечник (Микряков и др., 2001). Известно, что у осетровых рыб обнаружены уникальные лимфоидные эпикардимальные образования, по строению аналогичные лимфатическим узлам млекопитающих. Содержание в них ретикулоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов позволило И.А. Кондратьевой и соавторами (2001), а также V.P. Gallo et al. (2004), выдвинуть предположение, что в этих образованиях, как и в лимфатических узлах, происходит фильтрация лимфы.

Врожденный иммунитет является первой линией защиты иммунной системы рыб от различных патогенов, нарушающих их гомеостаз. Данную защитную систему можно подразделить на три основных компонента: иммунитет слизистых оболочек, гуморальный иммунитет и клеточный иммунитет.

Иммунитет слизистых оболочек играет важную роль в иммунной системе рыб, выступая в качестве барьера и предотвращая попадание патогенов в организм. Помимо обеспечения механической и физической защиты слизистые оболочки содержат значительное количество иммунных комплексов, таких как

факторы комплемента, лектины, антимикробные пептиды (АМП), гидролитические ферменты (лизозим, катепсин В, протеазы), трансферрин, интерферон, иммуноглобулины, обладающие бактериостатической активностью (Ellis 2001; Rakers et al., 2013).

Внешняя поверхность тела рыб покрыта слоем слизи, образующимся в результате секреции специализированных бокаловидных клеток эпидермиса. Слизистый слой имеет сложный биохимический состав, включающий различные белки, углеводы и другие компоненты, что обеспечивает его защитные свойства и препятствует внедрению бактерий и других патогенов в организм рыбы (Журавлева и др., 2013). Так, например, в слизи, продуцируемой кожей, обнаружены лизоцим, антитела, С-реактивный белок в концентрации выше, чем в крови (Лукьяненко, 1989). Многими исследованиями доказана важность слизи в иммунологической защите организма рыб (Peatman et al., 2015; Dash et al., 2018). Установлено, что слизь рыб содержит иммуноглобулины (Ig), вырабатываемые локально, а не представляющими собой транссудаты из плазмы (Rombout et al., 1993; Zhang et al., 2010). Являясь физическими барьерами, отделяющими рыб от внешней среды, слизистые оболочки также являются активными иммунологическими участками, защищающими их от воздействия микробов и стрессоров.

Известно, что кожа рыб вырабатывает значительное количество антимикробных пептидов, таких как гепсидин (Shike et al., 2004; Hirono et al., 2005; Cuesta et al., 2008), дефенсинподобные пептиды (Zou et al., 2007; Van der Marel et al., 2012), кателицидины (Chang et al., 2005; Maier et al., 2008), некоторые аполипопротеины (Villarreal et al., 2007), пицидин (или моронецидин) (Silphaduang, Noga, 2001) и плевроцидин (Cole et al., 1997), обладающие селективными свойствами против патогенных бактерий, грибов, вирусов и паразитов (Rakers et al., 2010). Эпителиальные клетки кожи являются основными воротами проникновения патогенных микроорганизмов, и, следовательно, иммунитет слизистых оболочек играет важную роль в предотвращении инфекций, вызванных патогенами.

Желудочно-кишечный тракт рыб также покрыт слизистой оболочкой. Задний отдел кишечника состоит из лимфоидной ткани (GALT- gut associated lymphoid tissue). Известно, что лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником (GALT), несет клетки, экспрессирующие иммуноглобулины в интраэпителиальных лимфоцитах. Максимальное количество интраэпителиальных лимфоцитов обнаруживается в проксимальных и дистальных отделах кишечника, но их распределение и концентрация варьируют в зависимости от вида, режима кормления, температуры воды и других внешних факторов (Salinas et al., 2011). Задний отдел кишечника рыб содержит большую часть Ig-положительных лимфоцитов, а макрофаги, связанные с кишечником, выглядят иначе, чем макрофаги почек и селезенки.

Как и у млекопитающих, врожденная иммунная система рыб имеет различные гуморальные и клеточные компоненты. Гуморальные факторы врожденного иммунитета – это белки, присутствующие в сыворотке крови, секретах слизистых оболочек и некоторых других жидкостях организма, и оказывающие опсонизирующее, прямое цитолитическое действие на микроорганизмы, а также выступающие в роли хемоаттрактантов.

К гуморальным факторам врожденного иммунитета относятся: система комплемента, лизоцим, белки острой фазы, катионные противомикробные пептиды, противовоспалительные цитокины, интерфероны типа I, лектины, БАСК и др.

Одним из защитных механизмов врожденного иммунитета является система комплемента, представляющая собой комплекс белков сыворотки крови, находящийся в неактивном состоянии и активирующийся при соединении антигена с антителом или при агрегации антигена. В состав комплемента входят 20 взаимодействующих между собой белков, девять из которых являются основными компонентами комплемента и обозначаются цифрами: C1, C2, C3, ..., C9. Как и у высших позвоночных, система комплемента рыб активируется трехсторонним: классическим, альтернативным и лектиновым путями. Все они приводят к образованию пор в клеточной мембране возбудителя и последующей

гибели от осмотического шока. Комплемент является важнейшим фактором резистентности организма в условиях врожденного, так и приобретенного иммунитета. Уровень его активности отражает иммунобиологический потенциал организма. Комплемент принимает активное участие в осуществлении реакции антиген-антитело, определяя скорость, характер иммунной агрегации.

Лизоцим представляет собой низкополимерный белок, молекула которого характеризуется высоким содержанием основных и дикарбоновых аминокислот, и обладает ярко выраженными ферментативными свойствами (Лукияненко, 1989). В целом лизоцим оказывает прямое действие на пептидогликановый слой грамположительных микроорганизмов и эффективен против грамотрицательных микроорганизмов только тогда, когда такие бактерии повреждены комплементом. Как упоминалось ранее, рыбы постоянно подвергаются риску проникновения огромного количества бактерий в организм через слизь и кожу. В связи с этим считается, что лизоцим рыб играет важную роль в неспецифической защите организма-хозяина. Лизоцим в организме рыб выполняет не только защитную функцию против бактериальных инфекций, но также играет важную роль в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, а кроме того, способствует активации процессов синтеза антител (Лапирова и др., 2000; Субботкина, Субботкин, 2003; Валедская, 2005).

Лектины – это белки, специфически и обратимо связывающиеся с определенными углеводами. Они участвуют в различных биологических процессах на межклеточном уровне, а также в иммунных механизмах. Антимикробные пептиды представляют собой белки, естественным образом синтезируемые для защиты от грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов и вирусов. У рыб активность лектина наблюдается в слизи, крови, тканях и икре. Предполагается, что лектины в икре способствуют нормальному протеканию процесса оплодотворения (Murata et al., 2007) и агрегируют специфические микроорганизмы. Известно, что лектины также способствуют агрегации микроорганизмов на поверхности тела (Kamiya et

al., 1988). Кроме того, считается, что лектины кожи играют важную роль в борьбе с бактериальной инфекцией, проявляя наиболее высокую активность.

Интерферон представляет собой белковую молекулу с относительно невысокой молекулярной массой (примерно 25-38 кДа), отличающуюся высокой стабильностью в широком диапазоне pH от 2 до 11, однако чувствительную к действию ряда антибиотиков. Синтез этого белка запускается в клетках под влиянием различных индукторов, включая вирусы, бактерии и продукты их метаболизма, такие как эндотоксины, нуклеиновые кислоты и некоторые химические вещества. Функционально интерферон проявляет мощное подавляющее действие на репликацию вирусов в восприимчивых тканях, при этом, не воздействуя на вирусные частицы напрямую. Основным механизмом его действия связан с блокированием внутриклеточных стадий вирусного размножения, прежде всего за счет нарушения процесса синтеза вирусных белков посредством подавления трансляции вирусной РНК. Помимо этого, интерферон является важным элементом гуморальной противовирусной защиты и имеет особую значимость для рыб, где он выступает как дополнительный неспецифический фактор врожденного иммунитета. Его роль особенно велика ввиду того, что иммуноглобулиновый механизм, характерный для высших позвоночных и обеспечивающий специфический иммунитет, у рыб выражен слабее и функционирует менее эффективно (Журавлева и др., 2013).

Наличие защитных белков в крови рыб оценивают по бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК), являющейся важным инструментом для анализа врожденной иммунной системы. БАСК представляет собой интегральный показатель функционального состояния врожденных факторов гуморального иммунитета: систем комплемента, лизоцима, иммуноглобулинов, противомикробных пептидов, лектинов, преципитинов, β -лизина, пропердина, дефензина и др.

Реакция острой фазы представляет собой основную часть врожденной иммунной системы и включает ряд физиологических и биохимических реакций, в том числе белки острой фазы. Одним из наиболее значимых белков острой фазы

является С-реактивный белок (СРБ), который считается основным показательным маркером воспалительного процесса в организме. Он не является специфичным для каких-либо конкретных патологий и повышается в крови при широком спектре заболеваний, сопровождающихся воспалением и деструкцией тканей. СРБ играет ведущую роль в бактериальной агглютинации, активации факторов комплемента и клеток макрофагов, в ограничении роста бактерий и стимуляции иммунных клеток почек (Kodama et al., 2003) . По мнению многих исследователей динамика СРБ наиболее точно отражает ход развития и завершения воспалительного процесса, поэтому его можно использовать в качестве показателя достоверности для выявления физиологических и патологических проявлений.

Также у рыб гуморальный иммунитет связан с работой иммуноглобулинов (Ig), в функции которых входят нейтрализация вирусов, токсинов и бактериальных адгезинов, активация системы комплемента и опсонизация возбудителей. Иммуноглобулины, помимо своей роли в системном иммунитете, также играют важную роль в иммунитете слизистых оболочек. У рыб есть три типа иммуноглобулинов: IgM, IgD и IgT/Z (Wilson et al., 1997; Hansen et al., 2005). IgM является наиболее распространенным иммуноглобулином в иммунной системе рыб и, как и у млекопитающих, способен проходить через эпителиальные мембраны. В повышенных концентрациях данный иммуноглобулин выявляется в сыворотке крови и слизистых выделениях. Помимо кровяного русла, IgM обнаруживается в жаберном аппарате, кожном покрове, кишечнике и желчи. Этот класс антител играет важную роль в системе врожденного иммунитета, обеспечивая защиту от бактериальных и вирусных агентов. Кроме того, IgM участвует в фиксации компонентов комплемента, способствует опсонизации и инициирует цитотоксические реакции. IgD – второй иммуноглобулин, обнаруженный у рыб, названный из-за сходства его последовательности с IgD млекопитающих и являющийся эволюционно консервативной молекулой (Perdiguerro et al., 2019). IgD играет важную роль в иммунитете кожи и слизистой оболочки жабр. IgT играет важную роль в иммунитете слизистой оболочки

кишечника, где его роль аналогична IgA млекопитающих (Zhang et al., 2010). В гуморальном иммунитете рыб отсутствуют изотипы иммуноглобулинов IgG, IgA и IgE, обнаруженные у млекопитающих. Кроме того, у рыб не происходит переключения изотипа, как у млекопитающих, где первичный иммуноглобулин переключает свой изотип с IgM на IgG, сохраняя при этом специфичность. Хотя есть доказательства созревания аффинности антител у рыб: уровни созревания, наблюдаемые у рыб, ниже, чем у млекопитающих. Анамнестическая реакция, наблюдаемая у рыб, также не столь выражена, как у млекопитающих. Присутствие IgM и транскрипта в икре и только что вылупившихся личинках указывает на передачу материнского иммунитета потомству.

Пероральная или иммерсионная вакцинация рыб способствует секреции Ig на слизистых оболочках, таких как жабры, кожа и кишечник, при этом не вызывает системного иммунного ответа. Соотношение IgT к IgM на слизистых оболочках значительно выше, чем в крови. После иммунизации рыб иммерсионным методом наблюдается увеличение транскриптов мРНК IgD и IgT в тканях слизистых оболочек, что свидетельствует о существовании двух отдельных компартментов гуморального иммунитета: системного и местного (Makesh et al., 2015).

Клеточные факторы иммунитета рыб представлены разнообразными по структурной организации клетками: лейкоцитами, макрофагами, эндотелиоцитами и т.д. Одной из основных функций этих клеток является фагоцитоз. Кроме того, они участвуют в синтезе медиаторов иммунного ответа и антибиотических веществ: лизоцима, интерферона, агглютининов, интерлейкинов и др.

Лейкоциты рыб представлены разнообразными по структуре и характеру выполняемой функции клетками: лимфоцитами, моноцитами, нейтрофилами, эозинофилами и базофилами (Иванова, 1983). В основном лейкоциты рыб представлены лимфоцитами, тогда как у теплокровных животных – клетками нейтрофильного ряда. У рыб на долю лимфоцитов приходится 45-99 % клеток от общего числа лейкоцитов, а у высших позвоночных – 25-30%.

Количество лейкоцитов и отдельных типов клеток, его составляющих, в организме рыб колеблется и зависит от индивидуальных, возрастных особенностей, сезона года, зараженности их паразитами, присутствия в воде токсических факторов и условий содержания. На воздействие благоприятных и неблагоприятных факторов рыбы реагируют интенсивностью лейкопоза и изменением соотношения между лимфоцитами и гранулоцитами. В организме рыб, подвергнутых воздействию «агрессивных» факторов, увеличивается доля содержания клеток гранулоцитарного ряда (палочкоядерных, сегментоядерных нейтрофилов и эозинофилов, и аберрантных форм клеток).

Изменения в составе лейкоцитов отражаются на степени сопротивляемости рыб к инфекционным и инвазионным болезням. Снижение содержания лимфоцитов отражается на интенсивности синтеза антител, отторжения трансплантата, завершенности фагоцитоза и напряженности иммунитета к болезням.

Лимфоциты являются наиболее многочисленными видами лейкоцитов. Они подразделяются на Т- и В-лимфоциты, которые принимают непосредственное участие в специфическом иммунитете (Celik, 2004; Secombes, Wang, 2012). Т-лимфоциты играют ключевую роль в формировании активированных клеток, обеспечивающих клеточно-опосредованный иммунитет, участвуют в отторжении трансплантатов, презентации антигенов макрофагам и обладают цитотоксической активностью. Данные клетки образуются в тимусе и характеризуются длительным сроком жизни. В-лимфоциты, в свою очередь, отвечают за выработку антител, которые обеспечивают гуморальный иммунитет, и относятся к короткоживущим клеткам (Микряков, 2004). Т-лимфоциты делятся на: Т-киллеры (цитотоксические) и Т-хелперы. Т-киллеры формируют клеточный иммунитет и уничтожают три мишени: клетка, инфицированная вирусом; опухолевая клетка; трансплантат. Т-хелперы отвечают за усиление адаптивного иммунного ответа, активируют Т-киллеры, В-лимфоциты, моноциты, НК клетки, презентуя им фрагменты чужеродного антигена при прямом контакте, а также гуморально, выделяя цитокины.

Лимфоциты являются ключевыми клетками, реализующими специфический иммунитет. Специфический иммунитет рыб начинается с обнаружения Т-лимфоцитами молекул главного комплекса гистосовместимости (англ. МНС – Major Histocompatibility Complex). Молекулы МНС представляют собой семейство иммуноглобулинов, которые действуют как рецепторы. В отличие от высших позвоночных, у которых гены МНС объединены в одну хромосому, в иммунной системе рыб эти гены не связаны между собой и могут находиться в разных хромосомах. Два типа рецепторов МНС, описанные у высших позвоночных, присутствуют и у рыб (Маловастый, 2011). Молекулы МНС I, связанные с эндогенными антигенами, присутствуют во всех ядросодержащих клетках и распознаются CD8 или цитотоксическими Т-лимфоцитами. Молекулы МНС II родственны экзогенным антигенам и обнаруживаются только в антигенпрезентирующих клетках (дендритных клетках, макрофагах и В-лимфоцитах). В-лимфоциты обеспечивают гуморальный иммунитет, мигрируя в окружающую соединительную ткань и дифференцируясь там, в плазматические клетки, способные секретировать различные типы иммуноглобулинов.

Моноциты – активные фагоциты крови, увеличивающие защитные силы организма рыб, поглощая продукты распада клеток и тканей, и концентрирующиеся в очагах воспаления, где могут трансформироваться в макрофаги. Моноцитам принадлежит важнейшая роль в иммунных реакциях, защите организма от инфекций, а также восстановлении и перестройке тканей. В крови рыб моноциты составляют около 0,1% от общего числа клеток. Стадия их зрелости длится 48 часов, по истечении которых они покидают кровотоки и превращаются в макрофаги тканей. Из-за этого некоторые исследователи не рассматривают моноциты как отдельную группу клеток, относя их к «гематогенным» макрофагам. Тем не менее, экспериментальные данные показывают, что моноциты обладают выраженной хемотактической активностью по отношению к различным веществам и корпускулярным структурам, а также высокой фагоцитарной способностью (Иванов, 2003; До Хью Куэт, 2016).

Нейтрофилы представляют собой первую волну рекрутирования иммунных клеток в места повреждения или инфекции. Кроме того, нейтрофилы играют ключевую роль во врожденном иммунном ответе, являются наиболее распространенными клетками среди гранулоцитов и моноцитов в крови, проявляют фагоцитарную активность. Для того, чтобы фагоцитирующие клетки поглотили патоген, он должно прикрепиться к их поверхности с опсонической активностью. Опсонин представляет собой биологическое вещество, связывающееся с поверхностью чужеродных веществ и эффективно способствующее фагоцитозу нейтрофилов (Sunyer, Lambris, 1998). Фагоцитарная активность нейтрофилов в отношении патогенов варьирует и имеет индивидуальные особенности (Moritomo et al., 1988). По сведениям А.Е. Ellis (1981), нейтрофилы способны осуществлять внеклеточное бактерицидное действие, при этом их функциональная активность может варьировать в зависимости от вирулентности и таксономической принадлежности возбудителя (Ainsworth, Dexiang, 1990; Waterstrat et al., 1991). Фагоцитарная активность нейтрофилов у рыб также зависит от температуры окружающей среды (O'Neill, 1985). В результате было показано, что нейтрофилы большинства видов рыб способны осуществлять фагоцитоз как в условиях *in vivo* (MacArthur, Fletcher, 1985; Suzuki, 1988), так и при лабораторных исследованиях *in vitro* (Suzuki, 1986; Hine et al., 1986). В ходе воспаления фагоцитарная активность различных субпопуляций нейтрофилов может изменяться (До Хью Куэт, 2016).

Эозинофилы представляют собой особую группу гранулоцитов, обеспечивающих врожденный иммунитет, а также играющих важную роль в борьбе с болезнями и инфекциями. Кроме того, они способствуют иммунному ответу организма во время аллергических реакций. В периферической крови многих видов рыб эозинофилы обнаруживаются в небольшом количестве, что существенно осложняет возможность исследования их функции (Ezeasor, Stokoe, 1980; До Хью Куэт, 2016). Накопление этих клеток может наблюдаться при развитии паразитарных заболеваний (Lester, Daniels, 1976) и воспалительных процессов (Roubal, 1986); однако подобные наблюдения не могут рассматриваться

как однозначное подтверждение их участия в противопаразитарном ответе (Butterworth et al., 1980; До Хыу Куэт, 2016).

Приобретенный (специфический) иммунитет приобретается в результате контакта организма с антигеном и характеризуется формированием иммунологической памяти. Специфические антитела продуцируются специальными клетками – лимфоцитами. Необходимо учитывать, что для каждого вида антител существует свой тип лимфоцитов (клон). Первое взаимодействие антигена (бактерии или вируса) с лимфоцитом вызывает реакцию, названную первичным иммунным ответом, в ходе которого лимфоциты начинают развиваться в виде клонов. Затем некоторые из них становятся клетками памяти, другие превращаются в зрелые клетки, продуцирующие антитела. Главные особенности первичного иммунного ответа – существование латентного периода до появления антител, затем выработка их лишь в небольшом количестве. Вторичный иммунный ответ развивается при последующем контакте с тем же самым антигеном. Основная особенность – быстрое развитие лимфоцитов с дифференцировкой их в зрелые клетки и быстрая выработка большого количества антител, которые высвобождаются в кровь и тканевую жидкость, где могут встретиться с антигеном и эффективно побороть заболевание.

Таким образом, изучение иммунитета рыб является очень важной и актуальной задачей современной физиологии и иммунологии. Ограниченность данных об иммунном статусе рыб не позволяет дать полную картину состояния объектов аквакультуры. В связи с этим очевидна необходимость изучения иммунитета рыб в различных иммунно-физиологических состояниях, а также изменений иммунореактивности, обусловленных различными факторами как внутренней, так и внешней среды.

1.4 Опыт применения бактериофагов в аквакультуре и механизм их взаимодействия с организмом рыбы

Бактериофаги, также известные как «фаги», представляют собой вирус, избирательно поражающий бактериальные клетки. Фаги повсеместно распространены в окружающей среде и являются неотъемлемыми компонентами микробиома, заселяя все ниши организма. Они чрезвычайно разнообразны по размеру, морфологии и геномной организации. Однако все они состоят из капсида с нуклеиновой кислотой (ДНК или РНК) и хвоста, который может различаться по размеру (Kowalska et al., 2020). Капсид состоит из белков или липопротеинов, защищающих генетический материал фага, а хвост распознает бактериального хозяина через специфические рецепторы, расположенные в хвостовых волокнах (Letchumanan et al., 2016; Doss et al., 2017). Фаги могут иметь два различных цикла репликации: литический и лизогенный. Вирусы, которые используют только литический механизм репликации, называются вирулентными, в то время как вирусы, способные к обоим циклам — литическому и лизогенному, — называются умеренными фагами. В литическом цикле бактериальные клетки разрушаются напрямую в результате вирусной инфекции. Лизогенный цикл происходит, когда клетка-хозяин не уничтожается сразу, как при инфекциях вирулентных фагов, а когда фаговый геном интегрируется в виде профага в бактериальную хромосому и реплицируется вместе с геном хозяина (Kowalska et al., 2020). Альтернативно профаги могут существовать в клетках-хозяевах в форме плазмид, что может длиться в течение многих поколений до введения литического цикла, вызванного определенным стрессовым фактором (например, лечением антибиотиками, повреждением ДНК и т.д.) (Letchumanan et al., 2016; Doss et al., 2017). Умеренные фаги, проходящие через лизогенный цикл, рассматриваются как фаги, участвующие в горизонтальном переносе генов между бактериальными клетками. Они могут передавать гены вирулентности или антибиотикоустойчивости, что делает их непригодными для использования в лечении. В отличие от них, вирулентные фаги напрямую лизируют клетки

хозяина, и их способность переносить гены ограничена, что делает их более подходящими для терапевтических целей (Jassim, Limoges, 2014; Letchumanan et al., 2016; Kowalska et al., 2020).

Известно, что бактерии, инфицированные бактериофагами, погибают, т.к. размножение и выход дочерних популяций из бактерии сопровождается ее разрушением.

Д'Эрелль различал следующие этапы в цикле размножения фагов:

1. Заражение немногих бактерий в культуре несколькими фаговыми частицами, содержащимися в инокуляте;
2. Внутриклеточное размножение проникшего в бактерию фага, в результате которого образуется его многочисленное потомство;
3. Освобождение этого потомства при лизисе зараженных бактерий;
4. Новое заражение частицами-потомками уже значительно большего числа бактерий;
5. Повторение цикла «внутриклеточное размножение – лизис – повторное заражение» до тех пор, пока не образуется достаточное число фаговых частиц, чтобы заразить и в конце концов лизировать все клетки в культуре.

Процесс фагообразования в бактериальной клетке начинается с момента адсорбции фага на клетке хозяина. ДНК фага с небольшим содержанием внутреннего белка, проникая в клетку, выполняет роль инфекционного начала (Габрилович, 1968). С момента попадания фаговой ДНК в бактериальную клетку и до полного созревания в ней частицы фага проходит определенный период, называемый латентным или скрытым периодом. Каждая система «бактерия – фаг» имеет свой определенный латентный период, в течение которого в бактериальной клетке происходят резкие биохимические сдвиги, направленные на синтез нового, чужеродного для бактерий материала, из которого впоследствии формируются фаговые частицы. Биохимические процессы, протекающие в этот период, несомненно, должны сопровождаться морфологическими изменениями бактериальной клетки, приводящими к появлению новых структур, постепенно оформляющихся в частицы фага (Гольдфарб, 1961). После проникновения в

клетку нуклеиновая кислота диссоциирует. В этот момент вирус берет под контроль генетическое управление клеткой, осуществляя полный цикл репродукции фага. В конце этого периода составляющие фага образуют зрелый вирион. Разрушение ядра бактерии сопровождается образованием краевых вакуолей, содержащих ДНК, из которых образуется запас фаговой ДНК. Количество фаговой ДНК начинает увеличиваться спустя 6-7 минут после того, как произошло заражение, через 9 минут возникают предшественники белка (незрелые фаговые частицы), и, наконец, через 13 минут в инфицированной клетке появляются вполне сформировавшиеся частицы фага. После образования новых частиц фагов клетка хозяина подвергается лизису, высвобождая дочернюю популяцию (Покровский и др., 1987; Поздеев, 2010).

В настоящее время классификация бактериофагов находится в весьма неудовлетворительном состоянии по целому ряду причин, главной из которых является отсутствие единого таксономического критерия. В процессе изучения бактериофагов неоднократно предпринимались попытки их классификации по тем или иным признакам. С этой целью Холмс предложил для обозначения вирусов бактерий использовать биномиальную систему Линнея (Раутенштейн, 1955). Позднее, Bradley (1965) предложил разбить фаги на шесть морфологических групп: 1) фаги с отростком, чехол которого способен к сокращению; 2) фаги с длинным несокращающимся отростком; 3) фаги с коротким несокращающимся отростком; 4) фаги без отростка с капсомером; 5) фаги без отростка и капсомера; 6) нитевидные фаги.

Бактериофаготерапия, применяемая у сельскохозяйственных животных, может быть использована в качестве альтернативы антибиотикам, в частности в аквакультуре. Аквакультура относится к тем отраслям сельского хозяйства, использующих большое количество антибиотиков, что, помимо проблем повышения устойчивости микроорганизмов к ним, представляет собой прямую угрозу для водной среды, способствуя нарушению ее экологического баланса (Kowalska et al., 2020).

Бактериофаги действуют непосредственно на целевые бактерии, что способствует борьбе с бактериальными патогенами в аквакультуре и помогает ограничить распространение заболеваний (Kazi, Annappure, 2016; Sharma et al., 2016; Kowalska et al., 2020). Успех бактериофаготерапии в аквакультуре зависит от воздействия фагов на бактериальное сообщество, а именно при использовании полуинтенсивных и интенсивных технологий выращивания рыбы. В полуинтенсивной аквакультуре непатогенные микроорганизмы играют важную роль в функционировании и продуктивности водных экосистем, так как являются наиболее важным биологическим компонентом, участвующим в круговороте органического вещества (Nikaritiya et al., 2019; Hoang Hoang et al., 2019).

Бактериофаготерапия в аквакультуре уже доказала свою эффективность в многочисленных исследованиях. Проведенное исследование показало, что большинство экспериментальных методов лечения фагами *in vivo* сосредоточено на разновидностях бактерий р. *Vibrio*, но также были затронуты р. *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Acetobacter* и *Flavobacterium*.

Silva et al. (2014, 2016) применил фаготерапию для лечения *Solea senegalensis*, зараженную *Aeromonas salmonicida*. Было обнаружено, что бактериофаги не влияли на естественные бактериальные сообщества воды рыбоводных емкостей, и в то же время снижали зараженность *Aeromonas*. Vinod et al. (2006) смогли выделить бактериофаг, активный против 50 изолятов *V. harveyi* для защиты личинок креветок, а Zhang et al. (2018) выделили фаг активный против *V. parahaemolyticus*. Imbeault et al. (2006) показали, что фаги обладают аддитивным действием при защите рыбоводных хозяйств от *Aeromonas salmonicida*, а Kalatzis et al. (2016) доказали желаемый эффект комбинации двух литических фагов против *Vibrio alginolyticus*. Schulz et al. (2019) провели исследование, в котором фаговый коктейль «BAFADOR», содержащий 5 вирулентных бактериофагов, помогающих рыбам справляться с негативным воздействием бактерий *Aeromonas* и *Pseudomonas*, был использован для проверки выживаемости европейского угря. В другом эксперименте Stalin, Srinivasan (2017)

сосредоточились на выборе наиболее эффективных фагов для коктейля против *Vibrio harveyi* при выращивании креветок (Kowalska et al., 2020).

Известно, что фаги стимулируют иммунный ответ в организме. Попадая в систему, они вызывают как специфические, так и неспецифические иммунные ответы. Врожденная иммунная система реагирует первой, производя фагоциты для удаления бактериофагов. Затем адаптивная иммунная система усиливает этот первый ответ лимфоцитами и антителами. Эти две системы действуют вместе, предотвращая прикрепление вирусов к бактериям, и иногда может наблюдаться снижение терапевтического эффекта или его отсутствие (Kaur et al., 2012; Ly-Chatain, 2014; Majewska et al., 2015; Gorski et al., 2018; Dabrowska, 2019; Yun et al., 2019).

Тот факт, что лизаты бактериофагов могут обладать иммуномодулирующим действием и вызывать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ, исследовали Yun et al. (2019). Они использовали лизат фага *Aeromonas hydrophila* для иммуностимуляции сазана. Обнаружено, что рыбы, иммунизированные лизатом фага, имели более высокую выживаемость после заражения, чем рыбы, иммунизированные стандартной вакциной с инаktivированными бактериальными клетками. Schulz et al. (2019) проанализировали влияние препарата «BAFADOR» на иммунную систему радужной форели, зараженную бактериями р. *Aeromonas* и *Pseudomonas*. При использовании бактериофага был достигнут иммуномодулирующий эффект и наблюдалась более высокая выживаемость в обработанных группах.

В аквакультуре бактериофаготерапия находится в основном на научной стадии и требует дальнейшего изучения (Jassim, Limoges, 2014). Однако очевидно, что ее можно применять для профилактики и лечения инфекционных заболеваний, а в некоторых случаях было доказано, что она даже более эффективна, чем лечение антибиотиками (Letchumanan et al., 2016; Kowalska et al., 2020).

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили на базе Инновационного центра «Биоаквапарк – научно-технический центр аквакультуры» ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет» (г. Астрахань), лаборатории иммунологии ФГБУН «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук» (Ярославская область), Научно-производственной фирмы «Касатка» (Ярославская область), Сергиевского осетрового рыбоводного завода Каспийского филиала ФГБУ «Главрыбвод» (Астраханская область), КФХ Полякова Ю.С. (Астраханская область) по схеме, представленной на рисунке 1.

В качестве объектов исследований были использованы: русский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt et Ratzeburg, 1833), стерлядь (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758), бестер (*Huso huso* x *Acipenser ruthenus*), русско-ленский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii* x *Acipenser baerii*) и сибирский осетр (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) различных возрастных групп.

Для проведения исследований использовали шесть видов иммунобиологических препаратов микробного происхождения: пробиотический препарат на основе штаммов *Bacillus subtilis* ВКПМ В-8-130, *B. subtilis* ВКПМ В-2984, *B. subtilis* ВКПМ В-4099, *B. licheniformis* ВКПМ В-4162; синбиотический препарат на основе штаммов *Bacillus subtilis* ВКПМ В-8-130, *B. subtilis* ВКПМ В-2984, *B. subtilis* ВКПМ В-4099, *B. licheniformis* ВКПМ В-4162 и неочищенных порошков лекарственных растений – эхинацеи пурпурной и расторопши пятнистой; пробиотический препарат на основе штаммов *Bifidobacterium bifidum* 8-3, *B. longum* ДВА-13, *B. adolescentis* ГО-13, *Lactobacillus acidophilus* 57S, *L. plantarum* П-75, *L. casei* С6, иммобилизованных на энтеросорбенте СУМС-1; пробиотический препарат на основе штаммов *Bifidobacterium bifidum* 1, *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, сорбированных на активированном угле; пиобактериофаг на основе фильтрата фаголизатов бактерий *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*; интести-бактериофаг на основе фильтрата фаголизатов бактерий *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*.



Рисунок 1 – Схема исследований

Оценку влияния пробиотиков на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте, на эффективность выращивания молоди осетровых рыб проводили в лабораторных условиях Инновационного центра «Биоаквапарк – НТЦ аквакультуры» АГТУ. В качестве объектов исследований использовали молодь русского осетра средней массой $1,11 \pm 0,02$ г. Выращивание молоди осуществляли в стеклопластиковых бассейнах с закругленными углами объемом 1 м^3 с постоянной проточностью в течение 30 суток. Экспериментальные дозировки препаратов в стартовых комбикормах составили – 1; 2; 3 г/кг комбикорма.

Научно-производственные эксперименты по оценке эффективности применения пробиотических препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте, осуществляли на базе Сергиевского осетрового рыбоводного завода в течение 30 суток. В качестве объектов исследований выступила молодь русского осетра средней массой $8,03 \pm 0,21$. Для выращивания молоди использовали прямоугольные бассейны, изготовленные из армированного стекловолокна объемом 1 м^3 (рисунок 2). Экспериментальные дозировки препаратов в продукционных комбикормах составили: пробиотик – 2; 3; 4 г/кг, синбиотик – 1,5; 2,5; 3,5 г/кг комбикорма.



Рисунок 2 – Выращивание молоди осетровых рыб на Сергиевском ОРЗ

Исследования по определению эффективности использования пробиотиков на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на

фитосорбенте, при выращивании осетровых рыб до товарной массы проводили в производственных условиях КФХ Полякова Ю.С. в течение 150 суток. В качестве объекта исследований использовали русского осетра средней массой $1023,27 \pm 8,17$ г (рисунок 3). Выращивание рыб осуществляли в садках размером 2х2х1 м (рисунок 4). Экспериментальные дозировки препаратов при товарном выращивании составили: пробиотик – 3; 5; 7 г/кг, синбиотик – 2; 4; 6 г/кг комбикорма.



Рисунок 3 – Русский осетр (*Acipenser gueldenstadtii* Brandt, 1833)



Рисунок 4 – Садковый комплекс КФХ Полякова Ю.С.

В ходе проводимых исследований опытные корма производили в лабораторных условиях с применением кормовых ингредиентов отечественного производства (рисунок 5). Сухие формы пробиотических препаратов нового

поколения добавляли в состав комбикормов непосредственно на этапе их изготовления.



Рисунок 5 – Опытные комбикорма для осетровых рыб

Исследования по оценке влияния сорбированных пробиотических препаратов на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* на рыбоводно-биологические и физиолого-биохимические показатели осетровых рыб проводили в лабораторных условиях аквариального комплекса кафедры «Аквакультура и водные биоресурсы» АГТУ в течение 30 суток. В качестве объектов исследований использовали бестера и стерлядь средней массой $188,05 \pm 2,04$ г и $66,10 \pm 2,02$, соответственно (рисунок 6).



Рисунок 6 – Экспериментальное выращивание бестера и стерляди

Выращивание рыб осуществляли в стеклопластиковых бассейнах типа ИЦА-1 размером $1000 \times 1000 \times 700$ мм. Бассейновое выращивание проводили согласно опубликованным нормативным документам (Пономарев и др., 2013).

Экспериментальные дозировки препаратов составили: пробиотик на энтеросорбенте СУМС-1 – 5; 7; 9 г/кг, пробиотик на активированном угле – 4; 6; 8 г/кг комбикорма.

Научно-производственные эксперименты по оценке влияния иммобилизованных форм пробиотических препаратов на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* на иммунный статус осетровых рыб проводили в условиях ООО НПФ «Касатка» на русско-ленском осетре средней массой $1094,90 \pm 10,54$ и сибирском осетре средней массой $176,40 \pm 3,55$ в течение 30 суток (рисунок 7).



Рисунок 7 – Экспериментальное выращивание сибирского осетра

Экспериментальные дозировки препаратов составили: пробиотик на энтеросорбенте СУМС-1 – 5; 7; 9 г/кг, пробиотик на активированном угле – 4; 6; 8 г/кг комбикорма. Нанесение пробиотиков-энтеросорбентов на комбикорма осуществляли методом распределения желатиновой суспензии с последующим подсушиванием и образованием на гранулах плотного желатинового слоя, удерживающего препарат при его попадании в воду. Отбор проб проводили перед началом эксперимента, на 14-е и 30-е сутки. Непосредственно после вылова у рыб производили забор крови из хвостовой вены, а также осуществляли диссекцию для получения образцов печени, селезенки, почки и кишечника.

Оценка эффективности разработанных продукционных комбикормов с добавлением сорбированных пробиотических препаратов на основе штаммов

бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* проводилась в лабораторных условиях путем осуществления экспериментального кормления бестера средней массой $222,5 \pm 2,01$ г в течение 30 суток.

Исследование питательной ценности и качества разработанных комбикормов проводили на основе анализа органолептических и физико-химических показателей в соответствии с ГОСТ 10385-2014 «Комбикорма для рыб. Общие технические условия».

Исследования по оценке влияния бактериофагов на эффективность выращивания осетровых рыб в установках замкнутого водоснабжения проводили в течение 30 суток. В качестве объекта исследований использовали стерлядь средней массой $121,23 \pm 4,51$ г и $155,97 \pm 2,42$ г (рисунок 8).



Рисунок 8 – Выращивание стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758)

Выращивание рыб осуществляли в стеклопластиковых бассейнах типа ИЦА-1 размером $1000 \times 1000 \times 700$ мм. Бассейновое выращивание проводили согласно опубликованным нормативным документам (Пономарев и др., 2013). Обработку комбикормов фаговыми препаратами осуществляли методом поверхностного напыления на комбикорм в количестве 10 мл на суточную норму кормления.

Физиологическое состояние исследуемых рыб оценивали по комплексу биохимических и гематологических показателей, включая концентрации гемоглобина, общего белка, общих липидов, глюкозы, холестерина, β -липопротеидов и триглицеридов, а также среднее содержание гемоглобина в эритроците (СГЭ), уровень гематокрита, скорость оседания эритроцитов (СОЭ) и лейкоцитарную формулу (рисунок 9). Забор крови осуществляли из хвостовой вены с использованием медицинского шприца (рисунок 10). Для получения сыворотки кровь помещали в сухую стерильную пробирку и выдерживали при комнатной температуре в течение одного часа, после чего помещали в холодильник при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ на сутки для завершения процесса свертывания и ретракции сгустка. Сыворотку аккуратно отсасывали шприцем с тонкой иглой и переносили в пробирки Эппендорфа для дальнейшего анализа (рисунок 11).



Рисунок 9 – Проведение гематологических исследований



Рисунок 10 – Отбор крови у осетровых рыб



Рисунок 11 – Получение сыворотки крови

Определение количества гемоглобина проводили гемиглобинцианидным методом. Концентрацию гемоглобина в крови рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{E_0}{E_k} \times 120, \quad (1)$$

где: C – концентрация гемоглобина в опытной пробе, г/л;

E_0 – оптическая плотность опытной пробы;

E_k – оптическая плотность калибровочной пробы;

120 г/л – концентрация гемоглобина в калибровочном растворе (Van Kampen, Zijistra, 1961, 1966).

Определение содержания общего белка в плазме крови проводили биуретовым методом. Концентрацию общего сывороточного белка в крови рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{E}{E_x} \times 60 \quad (2)$$

где: C – концентрация общего сывороточного белка в опытной пробе, г/л;

E – оптическая плотность опытной пробы;

E_k – оптическая плотность калибровочной пробы;

60 г/л – концентрация общего сывороточного белка в калибровочном растворе (Weichselbaum, 1946).

Холестерин в сыворотке крови осетровых рыб определяли энзиматическим методом (Fish bach, Dunning, 2004). Расчет концентрации холестерина проводили по формуле:

$$C = \frac{E_{np}}{E_{\kappa}} \times 5,17, \quad (3)$$

где: C – концентрация холестерина в опытной пробе, ммоль/л;

E_{np} – оптическая плотность опытной пробы;

E_{κ} – оптическая плотность калибровочной пробы;

5,17 ммоль/л – концентрация холестерина в калибровочном растворе (Trinder, 1969).

Количественное определение β -липопротеидов проводили методом, предложенным Бурштейном в 1956 г. В основу метода положено осаждение β -липопротеидной фракции гепарином в присутствии хлористого кальция при определенной реакции среды. По степени помутнения раствора определяли содержание β -липопротеидов в сыворотке крови.

Содержание липопротеидов рассчитывали по формуле:

$$X = (E_2 - E_1) \times \frac{1165}{1000}, \quad (4)$$

где: X – суммарное количество β -липопротеидов, мг/%;

E_1 – исходная величина оптической плотности;

E_2 – повторная величина оптической плотности;

1165 – пересчетный коэффициент (Калашников, 1939).

Уровень триглицеридов в сыворотке крови определяли энзиматическим колориметрическим методом и рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{E_{np}}{E_{\kappa}} \times 2,29 \quad (5)$$

где: C – концентрация триглицеридов в опытной пробе, ммоль/л;

E_{np} – оптическая плотность опытной пробы;

E_k – оптическая плотность калибровочной пробы;

2,29 ммоль/л – концентрация триглицеридов в калибровочном растворе (Trinder, 1969).

Концентрацию глюкозы в сыворотке крови определяли энзиматическим колориметрическим методом без депротеинизации и рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{E_{np}}{E_k} \times 10 \quad (6)$$

где: C – концентрация глюкозы в опытной пробе, ммоль/л;

E_{np} – оптическая плотность опытной пробы;

E_k – оптическая плотность калибровочной пробы;

10 ммоль/л – концентрация глюкозы в калибровочном растворе (Trinder, 1969).

Содержание общих липидов определяли колориметрическим методом при длине волны 510-550 нм и температуре от +15 до +25°C (Барышков и др., 1996).

Определение СОЭ проводили при помощи прибора Т.П. Панченкова. Результаты выражали в миллиметрах/час (Голодец, 1955).

Среднее содержание гемоглобина в эритроците (СГЭ) определяли по формуле И.И. Гительзон, И.А. Терскова (1956):

$$\text{СГЭ} = \text{Hb (г/л)} / \text{количество эритроцитов} \times 10^{-12} \quad (7)$$

Количество эритроцитов (10^6 мкл) определяли пробирочным методом в камере Горяева. Расчет количества эритроцитов в 1 мкл крови производили, исходя из разведения крови (200), числа сосчитанных квадратов (80) и объема 1 малого квадрата (1/4000 мкл), по формуле:

$$X(10^6 \text{ мкл}) = \frac{(a \times 4000 \times 200)}{80}, \quad (8)$$

где: X – число эритроцитов в 1 мкл крови;

a – число сосчитанных эритроцитов (Иванова, 1983).

Гематокритную величину определяли при помощи центрифуги гематокритной МГ6-02.

Измерение оптической плотности полученных образцов проводили с использованием спектрофотометра Unico 2100. Для детального исследования морфологии клеток в гистологических препаратах применяли электронный микроскоп Olympus (Япония). Приготовление мазков крови осуществляли с помощью различных фиксаторов и красителей, включая эозин-метиленовый синий по Май-Грюнвальду и азури-эозин по Романовскому-Гимзе (Абрамов, 1985; Козинец, 1998; Полозюк, Ушакова, 2019).

Определение лейкоцитарной формулы выполняли на качественно окрашенных препаратах при увеличении $100\times$ с использованием иммерсионного масла. В каждом мазке подсчитывали не менее 200 лейкоцитов и рассчитывали их процентное соотношение (Иванова, 1983).

Для оценки влияния пробиотических препаратов нового поколения на бактериальную контаминацию рыб производили отбор микробиологических проб жабр и кишечника молоди русского осетра, выращенной в лабораторных условиях Инновационного центра «Биоаквапарк – НТЦ аквакультуры» АГТУ. Пробы для микробиологического анализа отбирали стерильным инструментом в стерильную посуду, закрытую двумя слоями бумаги, и упаковывали в стерильную бумагу. Из подготовленной навески готовили необходимые разведения в соответствии с СанПиНом 12.3.2.1078-01. Для определения количества молочнокислых микроорганизмов в жабрах и кишечнике рыб использовали метод глубинного посева на различные среды: Бликфильда, Ли, мясопептонный агар (МПА). Посев на среду МПА производили из разведений 10^{-6} , 10^{-7} , на среду Ли – из разведений 10^{-3} и 10^{-4} , Бликфельда – 10^{-3} и 10^{-4} . Посевы инкубировали в

течение 5 суток при температуре 30°C. Определение численности микроорганизмов определяли из расчетов на 1 г. Выделенные бактерии идентифицировали до рода по определителям Берджи (1997).

Для определения обсемененности комбикормов молочнокислыми микроорганизмами были использованы:

1) метод наиболее вероятных чисел (НВЧ) с применением жидких сред: Бликфельдта, МПБ (мясопептонный бульон), МПБ с NaCl согласно ГОСТ 10444.11-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов»;

2) метод глубинного посева на среды Ли, Бликфельдта из разведений 10^{-3} и 10^{-4} , на среду ПА (питательный агар) из разведений 10^{-5} , 10^{-6} .

Для определения общего микробного числа (ОМЧ) воды делали посевы по 1 мл в две чашки Петри. После внесения воды в каждую чашку вливали небольшое количество питательного агара (8-10 мл), охлажденного до температуры 45-46°C. Заливку питательного агара производили после фламбирования края емкости, в котором он содержится. Посев немедленно смешивали с питательным агаром равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха, попадания питательной среды на края и крышку чашки. Данную процедуру производили на горизонтальной поверхности, где чашки оставляли до полного застывания питательного агара. После полного застывания чашки Петри переворачивали крышкой вниз и инкубировали при температуре 37°C в течение 24-х часов. При учете результатов подсчитывали все колонии на двух параллельных чашках, видимые при увеличении в два раза, и вычисляли среднее арифметическое. Результат выражали числом колоний в 1 мл пробы воды (Лабинская, 1978).

Общий химический состав тканей рыб анализировали традиционными лабораторными методами: содержание влаги определяли сушкой образцов при температуре 105°C; количество жира – экстракцией в аппарате Сокслета; содержание протеина – по методу Кьельдаля с применением реактива Несслера;

концентрацию минеральных веществ – путем озоления при температуре 550°C (Щербина, 1983).

Для оценки иммунологических показателей исследовали: бактерицидную активность (БАСК), количество иммунодефицитных особей (ИМД), содержание неспецифических иммунных комплексов (ИК), лейкоцитарный состав крови, уровень С-реактивного белка (СРБ), антител и лизоцима, индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ), индекс обилия лейкоцитов (ИО), фагоцитарную активность нейтрофилов (ФА), бактериальное обсеменение в различных тканях и органах (кровь, печень, почка и кишечник), содержание общих липидов (ОЛ), интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровень антиокислительной защиты (АЗ).

БАСК, отражающую функциональное состояние неспецифических факторов иммунитета, определяли с помощью фотонейтриметрического колориметрирования согласно методике, описанной О.В. Смирновой и Т.А. Кузьминой (1966), адаптированной для рыб (Микряков, 1984, 1991). В зависимости от уровня БАСК выявляли долю ИМД, сыворотка крови которых не угнетала развитие тест-микробов.

Уровень СРБ определяли визуально по реакции агглютинации латекс-реагента с сывороткой крови, используя набор реагентов СРБ-Ольвекс (рисунок 12).

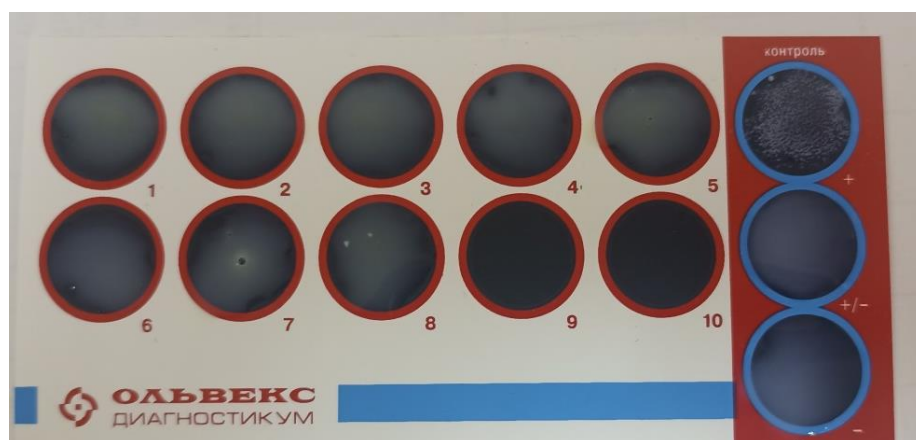


Рисунок 12 – Определение уровня СРБ в крови осетровых рыб

Содержание ИК устанавливали спектрофотометрически при длине волны 450 нм методом селективной преципитации с 4% полиэтиленгликолем молекулярной массой 6000 (Гриневич, Алферов, 1981).

Наличие антител в сыворотке крови рыб определяли реакцией агглютинации по методу Г.Д. Гончарова (1973).

Активность лизоцима определяли методом диффузии фермента в агар, основанным на способности данного белка осуществлять лизис бактерий *Micrococcus lysodeikticus*, равномерно распределенных в агаровой среде. Для проведения анализа готовили 1%-ный агаровый гель в цитратно-соляной буферной системе с $\text{pH}=6,2$, который растапливали и охлаждали до температуры 45-50°C, после чего в него вводили бактериальную суспензию (150 мг клеточной массы на 100 мл агара). После затвердения геля формировали лунки диаметром 6 мм. В экспериментальные лунки вносили по 25 мкл исследуемого раствора, предварительно стандартизированного 0,5%-ным раствором NaCl (разведение 1:1). Количественное содержание лизоцима устанавливалось по градуировочному графику, построенному на основе стандартного препарата, выделенного из белка куриных яиц. Инкубацию пластин проводили при температуре 36,6°C в течение 24 ч. Активность фермента оценивали по величине зон просветления и выражали в мкг/мл (Каграманова, Ермольева, 1966; Субботкина, Субботкин, 2003; Субботкина, Субботкин, 2012).

Для приготовления мазков крови использовали обезжиренные предметные стекла. Фиксацию препаратов проводили в 96%-ном этаноле в течение 30 минут, после чего осуществляли окрашивание по методике Романовского-Гимзе. Микроскопическое изучение образцов выполняли с использованием светового микроскопа «Биомед-6ПР1-ФК» при увеличении $\times 360$. Для определения лейкоцитарной формулы в каждом мазке подсчитывали не менее 200 лейкоцитов, которые идентифицировали согласно принятой морфологической классификации (Иванова, 1983).

Для оценки интенсивности лейкопоза и определения ИО, характеризующего частоту встречаемости лейкоцитов, проводили анализ мазков

периферической крови. Просмотр препаратов осуществляли при увеличении $\times 400$, изучая не менее 100 полей зрения, расположенных в разных зонах мазка. В каждом поле подсчитывали число выявленных лейкоцитов, после чего суммарное значение делили на количество просмотренных полей, что позволяло определить среднее число клеток в поле зрения. Показатель ИО используется как дополнительный критерий активности лейкопоза и может служить косвенной характеристикой концентрации лейкоцитов в единице объема крови (Микряков, Лапирова, 1997).

ФА определяли по содержанию неферментного катионного белка в лизосомах нейтрофилов периферической крови цитохимическим методом с бромфеноловым синим (Шубич, 1974), адаптированным для гидробионтов. Микроскопическое исследование мазков проводили под цифровым микроскопом Optika DM-15 с увеличением ($\times 600$), просматривая по 100 клеток в каждом мазке. По степени фагоцитарной активности исследуемые клетки делили на 4 группы (0-3 балла): 0 – гранулы катионного белка отсутствуют; 1 – единичные гранулы; 2 – гранулы занимают примерно $1/4$ цитоплазмы; 3 – гранулы занимают более $1/4$ цитоплазмы. Средний цитохимический коэффициент (СЦК) рассчитывали по формуле:

$$\text{СЦК} = \frac{(0 \times H_0 + 1 \times H_1 + 2 \times H_2 + 3 \times H_3)}{100}, \quad (9)$$

где: H_0, H_1, H_2, H_3 – соответственно число нейтрофилов с активностью 0, 1, 2 и 3 балла (Микряков и др., 2021). ФА – показатель клеточного иммунитета. Снижение содержания катионного белка в лизосомах нейтрофилов иммуноустойчивых особей фиксируют при контакте с патогенном, в т.ч. во время эпизоотий (Власенко, Вишневский, 2020).

Для определения бактериального обсеменения в различных тканях и органах (кровь, печень, почка и кишечник) делали посев на питательную среду (определение противомикробных свойств препарата). Посев делали на твердую

среду питательного агара с глюкозой в чашки Петри, разделенные на 4 сектора. После на 1-е сутки содержали в термостате при температуре 26°C. Далее подсчитывали количество бактериальных колоний в каждом секторе.

Для оценки активности процессов ПОЛ у рыб после вскрытия отбирали образцы иммунокомпетентных органов (почку, селезенку и печень), которые помещали в стерильные пробирки. Из полученных тканей готовили гомогенаты, используя физиологический раствор в соотношении 1:1 и механическое измельчение при помощи гомогенизатора. Интенсивность процессов ПОЛ оценивали по концентрации малонового диальдегида (МДА), являющегося одним из основных продуктов липопероксидации. Определение проводили на основе реакции МДА с тиобарбитуровой кислотой, в результате которой образуется окрашенный комплекс. Степень окрашивания фиксировали спектрофотометрически при длине волны 532 нм. Содержание МДА вычисляли с учетом коэффициента молярной экстинкции ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) и выражали в наномолях на грамм ткани (Андреева и др., 1988).

Уровень АЗ оценивали по скорости окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндифенола атмосферным кислородом в присутствии биологического материала согласно общепринятой методике (Семенов, Ярош, 1985). Повышение скорости окисления субстрата свидетельствует о снижении концентрации антиоксидантов в исследуемых тканях. Антиоксидантную активность характеризовали по величине константы ингибирования окисления субстрата (КОС), которую вычисляли относительно контрольного значения по установленной формуле:

$$K_i = \frac{K_{\text{кон}} - K_{\text{оп}}}{C}, \quad (10)$$

где: $K_{\text{кон}}$ и $K_{\text{оп}}$ – константы скорости окисления субстрата соответственно в контроле и опыте;

C – концентрация биологического материала в кювете.

ОЛ из тканей экстрагировали и определяли стандартным гравиметрическим методом по Фолчу (Folch et al., 1957).

Взвешивание и измерение рыбы проводили согласно рекомендациям И.Ф. Правдина (1966). Абсолютный прирост вычислялся по формуле (Правдин, 1966):

$$P_{аб} = m_K - m_0, \quad (11)$$

где: m_K – масса конечная, г;

m_0 – масса начальная, г.

Среднесуточный прирост вычислялся по формуле (Правдин, 1966):

$$P_{аб} = \frac{(m_K - m_0)}{t}, \quad (12)$$

где: m_K – масса конечная, г;

m_0 – масса начальная, г;

t – продолжительность опыта, сут.

Среднесуточную скорость роста молоди и старших возрастных групп вычисляли по формуле сложных процентов (Castell, Tiewes, 1979):

$$A = \left[\left(\frac{m_K}{m_0} \right)^{\frac{1}{t}} - 1 \right] \times 100(\%), \quad (13)$$

где: m_K и m_0 - масса рыбы в конце и в начале опыта, г;

t – продолжительность опыта, сут.

Для более точного определения скорости роста определяли коэффициент массонакопления (Купинский и др., 1986):

$$K_M = \frac{\left(\left(M_K^{\frac{1}{3}} - M_0^{\frac{1}{3}} \right) \times 3 \right)}{t}, \quad (14)$$

где K_M – общий продукционный коэффициент скорости роста;

M_K и M_0 – масса рыбы конечная и начальная, г;

t – период выращивания, сут.

Коэффициент упитанности определяли по Фультону (Fulton, 1902):

$$Q_\phi = \frac{W \times 100}{l^3(\%)}, \quad (15)$$

где W – масса рыбы, г;

l – длина всей рыбы, см.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием офисного программного комплекса «Microsoft Office» (программа Excel, «Microsoft») и пакета Statistica 10.0 («StatSoft Inc.»). Для оценки достоверности различий между группами применяли t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча (Welch's t-test) при трех уровнях статистической значимости ($P \leq 0,05$; $P \leq 0,01$; $P \leq 0,001$) (Лакин, 1990), а также однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с уровнем значимости $P \leq 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Использование пробиотического препарата на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте, при выращивании осетровых рыб

Пробиотики – это живые микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности, способные оказывать благоприятное воздействие на организм хозяина за счет нормализации кишечной микробиоты и активации обменных и иммунных процессов (Бурцева, 2013). Основные направления их биологического действия включают конкурентное вытеснение и подавление патогенной и условно-патогенной микрофлоры, а также регуляцию иммунного ответа (Fuller, Gibson, 1998; Lee, Salminen, 1995; Усенко, Горелов, 2004).

Известно, что бактерии пробиотических препаратов обладают колонизационной устойчивостью за счет: формирования агрессивной среды путем снижения pH в просвете кишечника при выработке короткоцепочечных жирных кислот; продукции антибиотикоподобных веществ; конкуренции за субстраты, питающие патогенные микроорганизмы (Fons et al., 2000; Усенко, Горелов, 2004).

Микроорганизмы, входящие в состав пробиотиков, должны отвечать нескольким важным требованиям: выживать при прохождении через желудочно-кишечный тракт, что означает их устойчивость к кислотной среде и желчи; прикрепляться к эпителиальным клеткам кишечника и обеспечивать последующую колонизацию; поддерживать стабильность микробиома кишечника; не быть патогенными; сохранять стабильность при хранении и оставаться жизнеспособными в течение длительного времени в условиях производства (Fuller, Gibson, 1998; Федорова и др., 2016).

В настоящее время наиболее широко применяются пробиотические препараты, основанные на бактериях р. *Bacillus*. Показано, что эти транзиторные микроорганизмы существенно участвуют в формировании и поддержании микробного сообщества пищеварительного тракта рыб, улучшая их

физиологические показатели и повышая продуктивность. При оценке целесообразности использования бактерий р. *Bacillus* в разработке пробиотиков следует учитывать ряд их биологических и технологических свойств. Большинство штаммов данного рода характеризуются высокой безопасностью для макроорганизма, даже при введении в значительных дозах; способны усиливать неспецифические механизмы защиты организма; проявляют выраженную антагонистическую активность в отношении широкого спектра патогенных и условно-патогенных бактерий; отличаются высокой ферментативной активностью. Кроме того, бактерии р. *Bacillus* устойчивы к действию литических ферментов и сохраняют жизнеспособность при прохождении через пищеварительный тракт, что повышает эффективность их применения. Данные микроорганизмы удобны для промышленного культивирования, стабильны при хранении и формируют экологически безопасные биопрепараты (Ушакова и др., 2012).

Кроме того, бактерии р. *Bacillus* являются активными продуцентами различных антибиотических веществ. В настоящее время известно около 200 антибиотиков, синтезируемых данными микроорганизмами. Наиболее продуктивными являются бактерии вида *B. subtilis*, для которых описано более 70 различных антибиотиков, и культуры *B. brevis*, продуцирующие около 30 антибиотиков. Также различные антибиотики синтезируют бактерии видов *B. polymyxa*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* и др. Многие антибиотики бактерий р. *Bacillus* нашли широкое применение в медицине, сельском хозяйстве и пищевой промышленности.

При рассмотрении биологической активности бактерий р. *Bacillus* следует учитывать их способность продуцировать и выделять в среду культивирования широкий спектр функциональных соединений. К числу таких веществ относятся сигнальные молекулы, обеспечивающие межклеточное взаимодействие, а также иммуноактивные и иные биологически активные пептиды. В составе этих соединений выявляются как пептидные антибиотики, так и вещества гормоноподобного действия, что обуславливает возможность их вовлечения в

регуляцию физиологических и иммунологических процессов организма-хозяина (Ушакова и др., 2012; Сверчкова, Коломиец, 2016).

Для создания пробиотических препаратов также используют различные штаммы бифидо- и лактобактерий: *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. breve* и *B. longum subsp. longum*. Бифидобактерии являются основными представителями индигенной микрофлоры рыб. Известно, что они надежно прикрепляются к стенке кишечника и определяют основные ниши сосуществования для других бактерий. Кроме того, данные микроорганизмы способствуют стабилизации кишечной биопленки и укреплению эпителиального барьера, что является важным условием нормального созревания эпителиоцитов. Они участвуют в обеспечении организма незаменимыми аминокислотами, включая триптофан, и проявляют антиканцерогенные и антимуtagenные свойства. Биологическая эффективность этих бактерий связана с их способностью модулировать различные компоненты иммунной системы, усиливать продукцию γ -интерферона и стимулировать синтез иммуноглобулинов. Лактобактерии играют значимую роль в формировании антибактериальной защиты, осуществляя бактерицидное и бактериостатическое действие за счет синтеза бактериоцинов, проявляющих активность против таких патогенов, как стафилококки и стрептококки.

Наиболее важное свойство микроорганизмов, входящих в состав пробиотических препаратов, заключается в антагонистической активности, что детерминирует формирование колонизационной резистентности как интегральной составляющей иммунитета. Защитная функция пробиотиков проявляется также в их антимуtagenной активности, что выражено их противоопухолевыми и гипоаллергенными свойствами.

3.1.1 Оценка влияния пробиотика на интенсивность роста и физиологическое состояние молоди русского осетра

Исследуемый пробиотический препарат содержит биомассу штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, а также комплекс молочнокислых бактерий и продукты их метаболизма, включая ферменты (целлюлазу, эндоглюканазу, амилазу, протеазу, липазу), органические кислоты, фитосорбенты, биологически активные соединения, витамины и аминокислоты. Микроорганизмы представлены в иммобилизованном состоянии на растительном носителе (свекловичный жом и пшеничные отруби), что повышает их устойчивость к воздействиям внешней среды и способствует усилению биологической активности препарата. Комплексный характер действия включенных компонентов обеспечивает в организме расщепление клетчатки, белков и полисахаридов, нейтрализацию токсических соединений и подавление роста патогенной микрофлоры. Эти процессы способствуют нормализации секреторной функции желудочно-кишечного тракта, улучшению его моторики и активизации кровообращения, что в совокупности повышает физиологическое состояние организма (Пат. 2412612).

Иммобилизация микробных клеток на фитосорбенте и связанная с этим повышенная защищенность бактерий обеспечивают значительные технологические и биологические преимущества пробиотического препарата. Такая форма позволяет сохранять жизнеспособность микроорганизмов при прохождении через кислую среду желудка и обеспечивает их активное функционирование в кишечнике, где они подавляют развитие патогенной и условно-патогенной микрофлоры и способствуют ускоренному, в 5-7 раз, росту полезных бактерий, в частности руминококков и лактобацилл. Иммобилизованные культуры устойчивы к температурным воздействиям, сопутствующим промышленному производству гранулированных комбикормов, включая нагрев до 105°C, что расширяет возможности их технологического применения. Кроме того, использование данной технологической формы

способствует длительному сохранению качественных и функциональных свойств препарата, обеспечивая его стабильность в широком диапазоне температур и при продолжительном хранении (Пат. 2412612).

Для оценки влияния данного пробиотического препарата, иммобилизованного на фитосорбенте, на эффективность выращивания осетровых рыб и их физиологическое состояние был проведен лабораторный опыт в условиях Инновационного центра «Биоаквапарк – НТЦ аквакультуры» АГТУ на молоди русского осетра. Для этого были сформированы три опытные группы, получавшие различное количество пробиотического препарата: 1; 2; 3 г/кг комбикорма (опытная 1, опытная 2, опытная 3, соответственно).

По результатам проведенных исследований была определена оптимальная дозировка пробиотического препарата для включения в стартовые корма для молоди осетровых рыб, составляющая 2 г/кг комбикорма (рисунок 13). При применении указанной нормы введения было отмечено достоверное повышение показателей роста: абсолютный прирост массы в опытной группе достигал 2,3 г, а среднесуточная скорость роста составляла 3,83%.

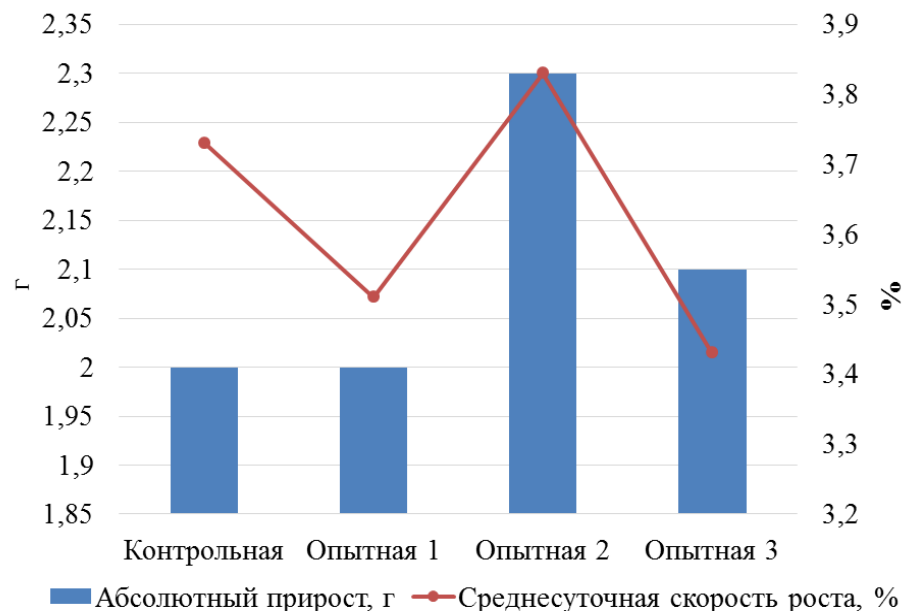


Рисунок 13 – Интенсивность роста молоди русского осетра при использовании пробиотика

Также при использовании данной дозировки наблюдались наиболее высокие результаты по выживаемости молоди, которые составили 84% (рисунок 14).

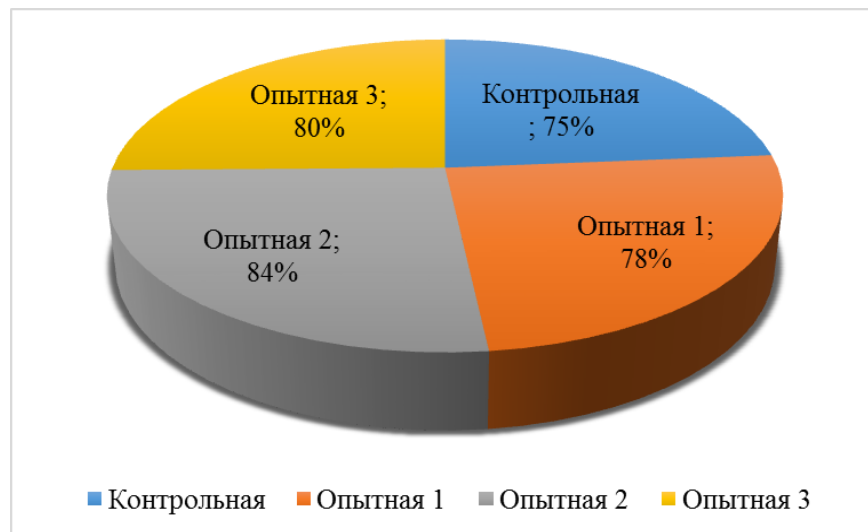


Рисунок 14 – Выживаемость молоди русского осетра, %

Необходимо отметить, что анализ темпа роста молоди русского осетра показал, что введение в комбикорм повышенной дозировки препарата 3 г/кг снижает эффективность кормления.

Известно, что рост рыб сопровождается закономерными изменениями химического состава их тела, что выражается снижением влажности и повышением уровня жирности, при этом относительное количество протеина в сухом веществе снижается (Elliott et al., 1998). Кроме того, на формирование химического состава рыб могут оказывать существенное влияние режим и условия кормления.

В связи с этим была проведена оценка физиологического состояния выращиваемой молоди осетровых рыб на основе анализа химического состава тела (рисунок 15).

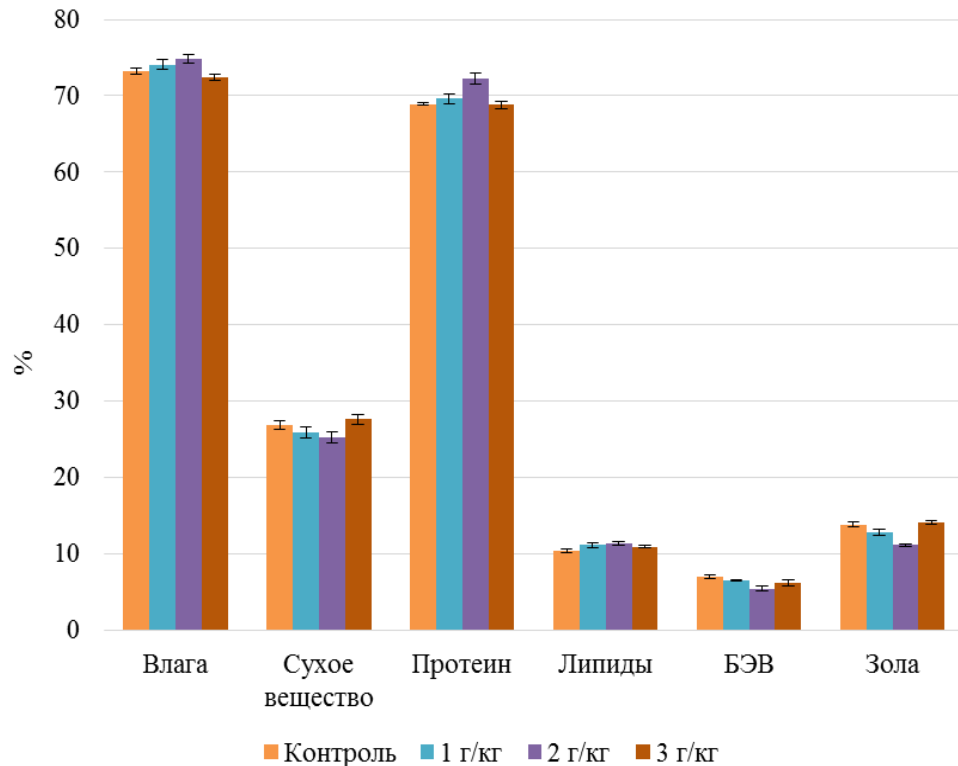


Рисунок 15 – Химический состав тела молоди русского осетра при использовании пробиотика в различных дозировках, %

Проведенный анализ позволил отметить, что введение пробиотического препарата в состав стартового комбикорма приводит к повышению уровня протеинов и липидов в анализируемых образцах. Наиболее высокие значения уровня белка и жира в теле ранней молоди русского осетра наблюдались при использовании препарата в дозировке 2 г/кг, что свидетельствует о хорошем физиологическом состоянии выращиваемых рыб. Также установлено, что при увеличении нормы ввода пробиотика до 3 г/кг в состав комбикорма отмечается снижение уровня протеина и незначительное снижение количества липидов.

Физиолого-биохимическую оценку состояния исследуемых рыб в условиях экспериментального выращивания проводили на основании определения ключевых гематологических и биохимических показателей крови, отражающих ее метаболическую активность, включая изменения в концентрациях транспортируемых белков и липидов. Результаты исследований показателей крови молоди русского осетра представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Физиолого-биохимические показатели крови молоди русского осетра при использовании пробиотика (n=20)

Группа	Показатель				
	Гемоглобин, г/л	СОЭ, мм/ч	Общий белок, г/л	Общие липиды, г/л	Холестерин, ммоль/л
Контрольная	40,5±1,18	2,2±0,06	14,3±0,44	3,9±0,07	1,9±0,06
Опытная 1	47,4±2,06***	2,0±0,07	17,9±0,73***	4,4±0,23	1,7±0,07
Опытная 2	52,3±0,83***	2,0±0,05	20,1±0,84***	4,7±0,20***	1,6±0,08
Опытная 3	50,9±1,14	2,1±0,04	19,7±0,60***	4,2±0,08**	1,8±0,07

Примечание: различия достоверны при ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Проведенные исследования показали, что у исследуемой молоди осетровых рыб в сыворотке крови был отмечен достаточно низкий уровень гемоглобина и общего белка, варьирующие в пределах 40,5-52,3 г/л и 14,3-20,1 г/л, соответственно. По данным П.П. Гераскина (1989) известно, что наиболее интенсивное формирование фракционной структуры гемоглобина и сывороточных белков у молоди осетровых рыб происходит в течение первого месяца жизни. В дальнейшем, по мере увеличения возраста и накопления массы тела, происходит нормализация обменных процессов, протекающих в организме, что способствует увеличению концентрации гемоглобина и общего белка в сыворотке крови.

Л.В. Банденко с соавторами (1989) были получены результаты, согласно которым для молоди осетровых рыб, выращенной на рыбоводных заводах, характерен следующий уровень гемоглобина: для белуги средней массой 1,6-5,2 г – 30-45 г/л, русского осетра массой 2,2-3,9 г – 40-50 г/л, севрюги массой 1,5-2,5 г – 40-52 г/л.

По результатам исследований Е.Г. Бойко и Е.В. Калинкиной (1961) установлено, что при выращивании молоди русского осетра в условиях Житнинского осетрового рыбоводного завода содержание гемоглобина в крови рыб увеличивалось в возрасте с 36 до 47 суток с 42,0 до 49,0 г/л. Данные,

полученные нами в процессе экспериментальных работ, согласуются с описанными выше результатами.

Необходимо отметить, что концентрация гемоглобина является одним из ключевых показателей дыхательной функции, и ее снижение может указывать на повышенную нагрузку системы обеспечения организма кислородом (Матишов и др., 2017). Анализ результатов, полученных по окончании экспериментального кормления, показал, что применение пробиотического препарата в дозировке 2 г/кг обуславливало повышение уровня гемоглобина до 52,3 г/л по сравнению с контрольной и остальными опытными группами, что может быть связано усилением метаболической активности организма.

Важнейшей функцией сывороточных белков является транспорт веществ, обеспечивающих клетки организма рыб строительным материалом и энергией. Входя в состав ферментов, белки обеспечивают протекание большинства необходимых для жизнедеятельности организма процессов. Сывороточные белки обладают способностью образовывать комплексы с жирными кислотами и стероидными гормонами (Филиппович и др., 1975). В белковом обмене исследуемых рыб отклонений не было выявлено, что свидетельствует об отсутствии дефицита сывороточных белков, принимающих активное участие в обменных процессах.

Общие липиды и холестерин выполняют в организме рыб разнообразные функции и служат одним из основных источников энергии. Пониженный уровень данных показателей в сыворотке крови может отражать как интенсификацию их использования на нужды организма, так и ослабление функциональной активности печени (Металлов и др., 2010). В результате проведенного биохимического анализа крови установлено, что особенности липидного обмена у выращиваемых рыб соответствовали нормальному физиологическому состоянию и обеспечивали адекватное формирование энергетических резервов организма. Это подтверждается тем, что значения энергетически значимых показателей не превышали нормативных диапазонов. При этом содержание общих липидов у рыб второй опытной группы было выше по сравнению с молодью из остальных

вариантов выращивания, что может свидетельствовать о более интенсивном накоплении липидных ресурсов в данных условиях.

При анализе гематологических показателей особое значение имеют величины гематокрита, количества эритроцитов и среднего содержания гемоглобина в эритроците, поскольку они характеризуют эффективность кислородтранспортной функции крови. Полученные результаты свидетельствовали о положительном влиянии оптимальной дозировки пробиотического препарата (2 г/кг), при которой показатель гематокрита достигал 27,0%. В контрольной группе данный показатель был ниже (24,2%), что коррелирует со снижением числа эритроцитов в крови молоди русского осетра ($0,84 \times 10^6$ мкл) (таблица 2).

Таблица 2 – Показатели крови молоди русского осетра (n=20)

Показатель	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
Гематокрит, %	24,2±0,27	26,1±0,39***	27,0±0,67***	26,4±0,96*
Эритроциты, 10^6 мкл	0,84±0,05	0,91±0,07	0,99±0,09	0,89±0,06
СГЭ, пг	48,21	52,09	52,83	57,19

Примечание: различия достоверны при * $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$

Известно, что основным показателем дефицита железа в организме или его недостаточной усваиваемости является среднее содержание гемоглобина в эритроците (СГЭ) (Бахарева, 2016). При включении пробиотических препаратов в рацион наблюдалось повышение данного показателя по сравнению с контролем, что может указывать на активизацию адаптационных реакций организма осетровых рыб в условиях воздействия пробиотических культур.

Таким образом, результаты гематологического и биохимического исследования молоди осетровых рыб при использовании пробиотического препарата соответствовали физиологическим нормам и не выявили отклонений от допустимых показателей.

Одним из информативных показателей, позволяющих судить о физиологическом состоянии рыб, является лейкоцитарная формула крови. Соотношение отдельных популяций лейкоцитов отражает особенности клеточного иммунитета и характеризует функциональное состояние организма рыб. Анализ лейкоцитарной формулы крови молоди русского осетра представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Лейкоцитарная формула крови русского осетра при использовании пробиотического препарата, % (n=10)

Показатель	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
Лимфоциты	76,9±2,41	77,8±1,90	78,9±1,80	77,1±1,61
Моноциты	2,7±0,19	2,8±0,21	2,4±0,24	2,6±0,33
Нейтрофилы сегментоядерные	7,7±0,14	7,4±0,12	9,9±0,27***	8,4±0,41
Нейтрофилы палочкоядерные	6,2±0,40	5,9±0,36	4,0±0,27***	6,2±0,62
Базофилы	4,7±0,22	4,6±0,37	3,6±0,28**	4,2±0,27
Эозинофилы	1,8±0,15	1,5±0,12	1,2±0,7***	1,5±0,11

Примечание: различия достоверны при ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Анализ лейкоцитарной формулы периферической крови показал преобладание лимфоцитов среди всех популяций лейкоцитов. Согласно данным литературы, пробиотические препараты могут оказывать положительное влияние на иммунный статус организма, усиливая фагоцитарные реакции и повышая функциональную активность лимфоцитов. В исследуемых группах содержание лимфоцитов у молоди русского осетра находилось в пределах 76,9-78,9% и не претерпевало достоверных изменений. Сопоставление показателей между опытными группами и контролем показало, что вариабельность данного показателя составляла 0,9-2,0% и носила статистически незначимый характер.

В лейкоцитарном профиле рыб второй опытной группы было отмечено относительное увеличение доли сегментоядерных нейтрофилов ($9,9 \pm 0,2\%$) при одновременном снижении числа палочкоядерных форм ($4,0 \pm 0,1\%$). Нейтрофилы относятся к наиболее чувствительным элементам крови и оперативно реагируют на изменения внутренней среды и воздействие стрессовых факторов. При нарушении гомеостаза эти клетки выделяют биологически активные вещества с бактерицидными и детоксикационными свойствами, участвуют в регенерации тканей и обеспечивают фагоцитоз иммунных комплексов (Волков, 1971).

Количество моноцитов в контрольной и опытных группах было сопоставимым и не превышало $2,8\%$ от общего числа просчитанных клеток. Стабильный и невысокий уровень моноцитов может рассматриваться как признак благоприятного физиолого-иммунологического состояния выращиваемых рыб.

В целом зарегистрированные изменения в количественном распределении лейкоцитов свидетельствуют о реакции осетровых рыб на включение пробиотического препарата в рацион и могут рассматриваться как проявления адаптационного ответа, направленного на повышение защитных свойств крови.

Таким образом, по результатам оценки физиологического состояния выращенной молодежи определена эффективность применения пробиотического препарата на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте, в стартовых комбикормах для молодежи осетровых рыб при его норме введения – 2 г/кг комбикорма.

3.1.2 Научно-производственная оценка эффективности применения пробиотика при выращивании молодежи русского осетра

На следующем этапе был проведен научно-производственный опыт по оценке эффективности использования пробиотика в составе продукционных комбикормов для молодежи осетровых рыб. Экспериментальное кормление проводили в условиях Сергиевского осетрового рыбоводного завода. Выращиваемая молодежь русского осетра была разделена на 4 группы с различной

нормой ввода пробиотика: 2; 3; 4 г/кг комбикорма (опытная 1, опытная 2, опытная 3, соответственно). Контрольную группу на протяжении всего периода выращивания кормили комбикормом без добавления пробиотического препарата.

Во всех опытных вариантах было зафиксировано положительное влияние применения пробиотического препарата на темп роста и выживаемость молоди русского осетра. Наибольший эффект от использования комбикормов с добавлением пробиотика наблюдался во второй опытной группе при дозировке 3 г/кг (рисунок 16).

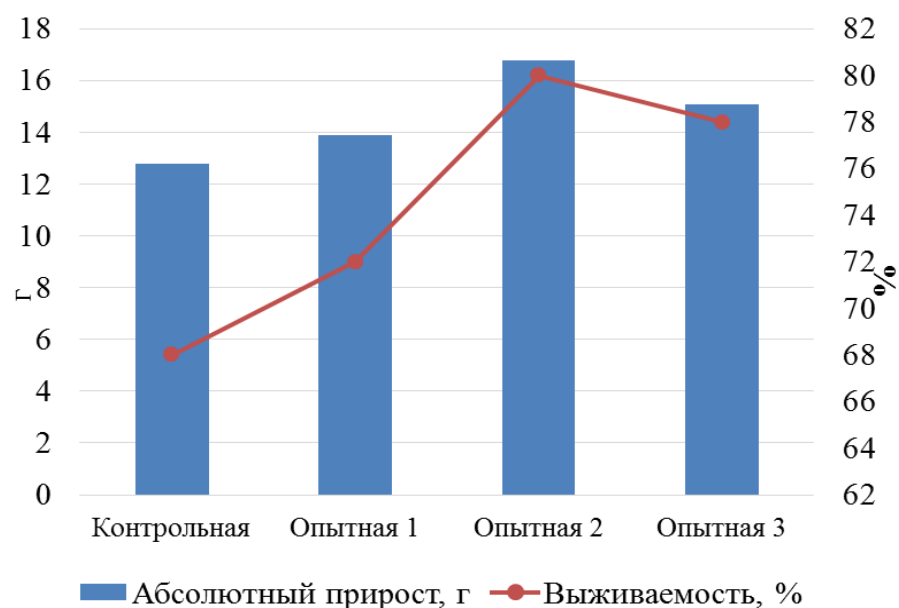


Рисунок 16 – Показатели темпа роста и выживаемости молоди русского осетра

Проведение гематологических и биохимических исследований является главным диагностическим инструментом, используемым для мониторинга физиологических и патологических изменений у рыб. В настоящее время в аквакультуре анализ картины крови рыб, в частности, изучение ее морфологических особенностей позволяет судить о физиологическом и иммунологическом состоянии организма (Серпунин, 2002).

Анализ гематологических показателей молоди русского осетра, выращенного при включении пробиотического препарата в состав комбикормов, показал отсутствие отклонений от нормальных физиологических значений

(рисунок 17). У рыб второй опытной группы было выявлено статистически значимое повышение уровня гемоглобина ($P \leq 0,001$) по сравнению с контрольными и остальными опытными вариантами, что может отражать повышение эффективности кислородтранспортной функции крови. Присутствие пробиотика в рационе, вероятно, оказывает благоприятное влияние на обменные процессы кишечника и печени, что способствует более рациональному удалению продуктов распада эритроцитов и поддержанию гомеостаза.

Установлено, что наиболее лучшие биохимические показатели были характерны для второй опытной группы (3 г/кг). В данной группе наблюдалось повышение концентрации общего сывороточного белка – $23,6 \pm 0,23$ г/л и общих липидов – $5,2 \pm 0,13$ г/л. Уровень холестерина во всех опытных группах не превышал 2,1 ммоль/л.

Стоит отметить, что при увеличении дозировки пробиотика в комбикормах содержание гемоглобина и общего белка в плазме крови уменьшалась. Разница в средних величинах содержания гемоглобина и общего белка в плазме крови в опытных группах 2 и 3 была достоверна при $P \leq 0,05$.

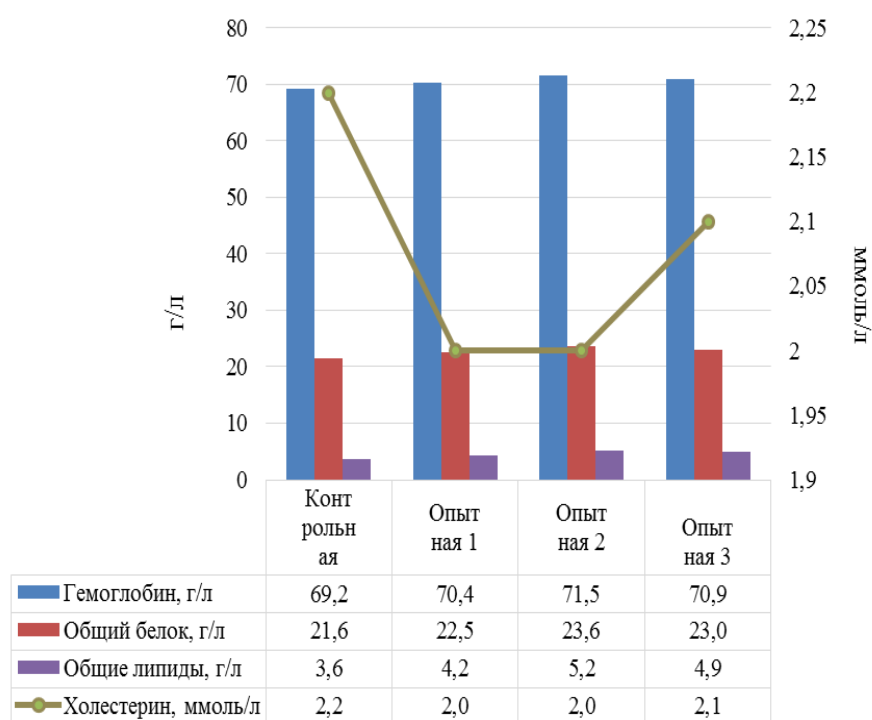


Рисунок 17 – Физиолого-биохимические показатели крови молоди русского осетра (n=20)

Лейкоцитарная формула является важным информативным показателем оценки физиологического состояния организма при комплексных исследованиях популяций рыб в естественных условиях и в аквакультуре (Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989). Изменения в соотношении лейкоцитов обнаруживаются задолго до появления клинических признаков заболевания и патологий. Сдвиги в лейкоцитарной формуле рыб при нормальном физиологическом состоянии незначительны, что позволяет использовать их в качестве маркеров разных физиологических и патологических процессов, происходящих в организме. Анализ лейкоцитарной формулы периферической крови молоди русского осетра представлен в таблице 4.

Таблица 4 – Лейкоцитарная формула периферической крови молоди русского осетра, % (n=10)

Показатели	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
Лимфоциты	77,0±1,71	78,8±1,38	80,4±0,62	79,1±0,61
Моноциты	3,2±0,12	2,9±0,21	2,4±0,25	3,0±0,31
Нейтрофилы сегментоядерные	8,0±0,44	7,5±0,27	7,9±0,26	7,8±0,18
Нейтрофилы палочкоядерные	5,9±0,39	5,6±0,39	4,9±0,51	5,2±0,39
Базофилы	3,8±0,10	3,3±0,22	2,8±0,29**	3,1±0,28*
Эозинофилы	2,1±0,11	1,9±0,14	1,6±0,12*	1,8±0,09*

Примечание: различия достоверны при * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$

В мазках периферической крови русского осетра выявлялись лейкоциты, характерные для большинства видов рыб. Во всех группах выращивания в лейкограмме доминировали лимфоциты, при этом их наибольшая доля была отмечена во втором и третьем опытных вариантах. Моноциты, участвующие в реализации фагоцитарных механизмов и обеспечивающие удаление из организма поврежденных, функционально неполноценных или атипичных клеток, а также

патогенных микроорганизмов и их фрагментов, встречались реже. В опытных группах их содержание снижалось до 2,4% от общего числа просчитанных клеток.

Установлено, что применение пробиотического препарата способствовало поддержанию стабильного уровня эозинофилов. Такое состояние может указывать на уменьшение влияния неблагоприятных факторов водной среды на иммунологические реакции организма. Важно подчеркнуть, что все полученные показатели находились в пределах физиологически допустимых значений, что свидетельствует об усилении клеточных механизмов иммунитета и отсутствии признаков воспалительных или патологических изменений у выращиваемой молодежи.

Одним из показателей физиологического состояния организма, стимулирующего ответ иммунной системы, является С-реактивный белок (СРБ). Это наиболее высокочувствительный показатель, активирующий фагоцитоз, основанный на захвате и переваривании клетками крови чужеродных частиц, участвующий во взаимодействии Т- и В-лимфоцитов при иммунном ответе и активирующий систему комплемента (специальных белков крови, участвующих в защитной реакции). По результатам проведенных исследований установлено, что у рыб перед началом опыта во всех группах был зафиксирован слабоположительный уровень СРБ (на уровне 6 мг/л) (таблица 5). Однако через 30 суток эксперимента у всех рыб из опытных групп был отмечен его отрицательный уровень (<6 мг/л). Полученные данные указывают на то, что данный препарат не вызывал воспалительную реакцию в организме молодежи русского осетра.

Таблица 5 – Уровень СРБ в крови молодежи русского осетра, мг/л (n=10)

Время отбора проб	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
до начала эксперимента	6	6	6	6
в конце эксперимента	6	<6	<6	<6

На основании изучения физиолого-биохимических показателей крови русского осетра можно сделать вывод о том, что наиболее эффективная норма ввода пробиотического препарата на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus*

licheniformis, иммобилизованных на фитосорбенте, в состав продукционных комбикормов для молоди осетровых рыб составляет 3 г/кг комбикорма.

3.1.3 Оценка эффективности применения пробиотического препарата при выращивании русского осетра в садковых условиях

Оценка эффективности введения пробиотического препарата на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте, в рацион осетровых рыб при их товарном выращивании проводилась на основании кормления двухлеток русского осетра в условиях садкового комплекса КФХ Полякова Ю.С.

Анализ рыбоводно-биологических показателей при использовании пробиотического препарата на основе спорообразующих бактерий р. *Bacillus* показал, что наибольший прирост массы был характерен для опытных групп. Максимальное значение абсолютного прироста наблюдалось у рыб второй опытной группы (5 г/кг). Показатель среднесуточной скорости роста отличался незначительно и во всех вариантах колебался в пределах 0,31-0,37% (рисунок 18).

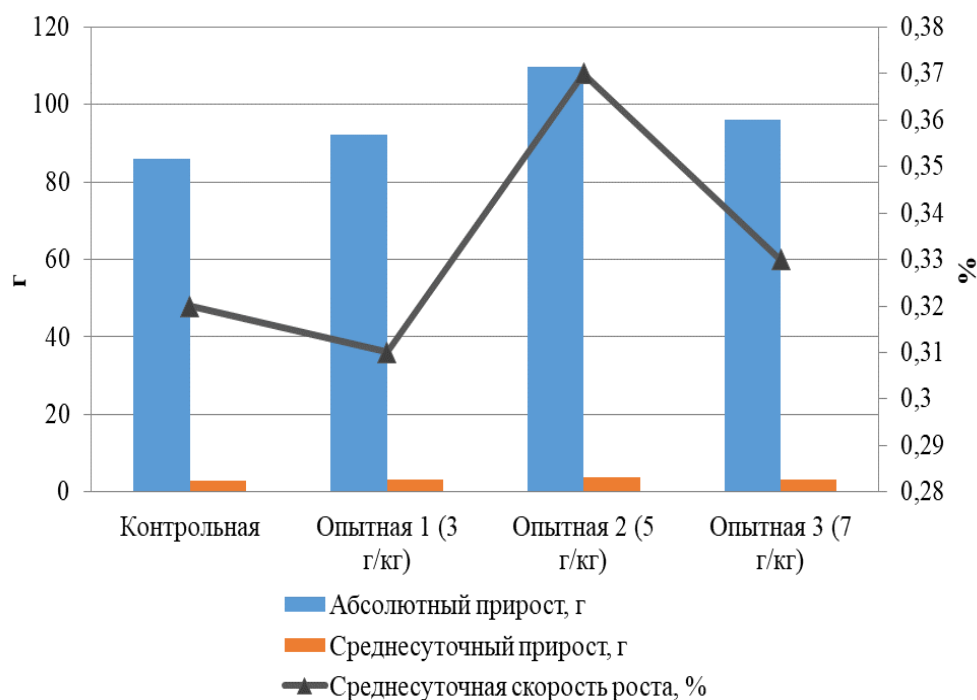


Рисунок 18 – Интенсивность роста русского осетра при использовании пробиотика

Гематологические и биохимические исследования являются важным инструментом оценки физиологического и иммунологического состояния рыб в условиях аквакультуры. Определение показателей крови, плазмы и сыворотки – таких как концентрация глюкозы, общего белка, составляющие липидного спектра и другие параметры – предоставляет объективные сведения о функциональной способности организма рыб, включая эффективность транспорта кислорода, уровень иммунной реактивности, степень стрессового воздействия, наличие воспалительных или токсических процессов и др. (Головина, 1998; Жандалгарова и др., 2023).

Данные основных гематологических и биохимических показателей осетровых рыб, выращенных с применением пробиотического препарата, представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Гематологические и биохимические показатели русского осетра при использовании пробиотика (n=20)

Ст. показате ли	Гемогло бин, г/л	Общий белок г/л	Холестерин, ммоль/л	В – липо- протеиды, г/л	СОЭ, мм/ч	Глюкоза, ммоль/л
Контроль						
M±m	64,5±0,6	21,8±0,5	3,7±0,3	2,5±0,2	2,1±0,3	2,5±0,4
CV%	7,6	17,7	21,7	7,7	54,0	19,4
Опытная 1 (3 г/кг)						
M±m	73,3±2,2	22,7±1,5	2,5±0,3	3,5±0,3	2,5±0,1	2,4±0,2
CV%	6,7	15,3	24,7	10,3	15,2	11,7
Опытная 2 (5 г/кг)						
M±m	77,5±0,9	27,8±0,6	1,8±0,6	2,6±0,4	2,0±0,5	2,1±0,6
CV%	6,1	13,1	25,4	14,8	14,2	14,2
Опытная 3 (7 г/кг)						
M±m	76,4±0,1	25,3±0,9	2,3±0,2	2,9±0,1	2,1±0,8	2,4±0,5
CV%	8,1	14,3	19,1	8,3	22,1	10,8

Известно, что гемоглобин является важным диагностическим показателем изменения содержания кислорода в крови. Опытные группы, выращенные с применением пробиотика, характеризовались достаточно высоким уровнем гемоглобина – 73,3-77,5 г/л, что свидетельствует об интенсивном протекании окислительно-восстановительных реакций в организме рыб.

Уровень углеводного обмена у рыб определяется по содержанию глюкозы в сыворотке крови (Головина, 1998). Глюкоза является важным поставщиком энергии для клеток организма и снижение данного показателя в сыворотке крови говорит об улучшении обменных процессов в организме (Жандалгарова и др., 2023). Установлено, что в опытной группе наблюдалась тенденция к уменьшению содержания глюкозы в сыворотке крови русского осетра второй опытной группы (5 г/кг) на 16%, первой и третьей – на 4%, однако полученные различия недостоверны.

Важное клиническое значение при оценке липидного обмена рыб имеет определение содержания холестерина в сыворотке крови. Холестерин представляет собой органическое соединение и является важным компонентом жирового обмена, а также служит основой для построения мембран клеток. По содержанию холестерина в крови русского осетра не было установлено достоверной разницы, все показатели находились в пределах референсных значений.

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) является информативным диагностическим показателем в аквакультуре. В норме у рыб данный показатель составляет 2-10 мм/ч (Аmineва, Яржомбек, 1984), а его повышение может свидетельствовать о наличии воспалительных реакций в организме. СОЭ зависит от степени агглютинации эритроцитов, а также от изменений электрического заряда клеток и содержания растворимых белков плазмы, что определяет скорость оседания форменных элементов крови (Жандалгарова и др., 2023).

По результатам проведенного гематологического анализа установлено, что значения СОЭ во всех опытных вариантах и в контрольной группе находились в пределах физиологических норм, что указывает на отсутствие воспалительных и патологических процессов у выращиваемых рыб.

Таким образом, по результатам проведенных исследований необходимо отметить, что пробиотический препарат на основе спорообразующих бактерий р. *Bacillus*, иммобилизованных на частицах твердого фитосубстрата, оказывают положительное влияние на интенсивность роста и физиолого-иммунологическое состояние выращиваемых рыб. Их использование в аквакультуре является примером создания новых экологических безопасных технологий с целью повышения резистентности рыб к неблагоприятным факторам внешней среды, а также для повышения их иммунного статуса.

3.2 Применение синбиотического препарата, содержащего иммобилизованные штаммы *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, при выращивании осетровых рыб

Синбиотики – это физиологически функциональные пищевые ингредиенты, включающие в себя комбинацию пробиотиков и пребиотиков, обладающую свойством взаимного усиливающего воздействия на физиологические функции и метаболические процессы в организме животных и рыб (Тараканов, Николичева, 2000). Основной особенностью синбиотических препаратов является проявление синергетического эффекта, достигаемого за счет увеличения скорости размножения полезных микроорганизмов, способности фиксировать пробиотики в кишечнике с помощью пребиотиков, увеличения скорости доставки пробиотиков к месту назначения за счет переноса на пребиотиках, активной разработки пробиотиков с продуцированием их метаболитов в процессе производства синбиотиков (Лебедева, 2011).

Одной из новейших биологически активных добавок является синбиотический препарат, представляющий собой иммобилизованные на фитосорбенте штаммы *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, комплекс молочнокислых бактерий, а также продукты их метаболизма – набор ферментов, органические кислоты, витамины и аминокислоты, а также неочищенные

порошки лекарственных растений – эхинацеи пурпурной и плодов расторопши пятнистой (рисунок 19).

Пробиотический компонент препарата способствует обеспечению биозащиты организма, предотвращает развитие дисбактериозов, стимулирует обменные и иммунные процессы, обеспечивает повышение перевариваемости комбикормов. Пребиотическая составляющая обеспечивает рост нормальной микрофлоры, нормализует перистальтику кишечника, способствует адсорбции токсических веществ. Специальный ферментативный комплекс увеличивает усвоение питательных веществ, обеспечивает биотрансформацию микотоксинов за счет превращения их в неактивные формы. Комплекс лечебных трав обладает иммуномодулирующими свойствами, повышающимися за счет естественных защитных сил организма.

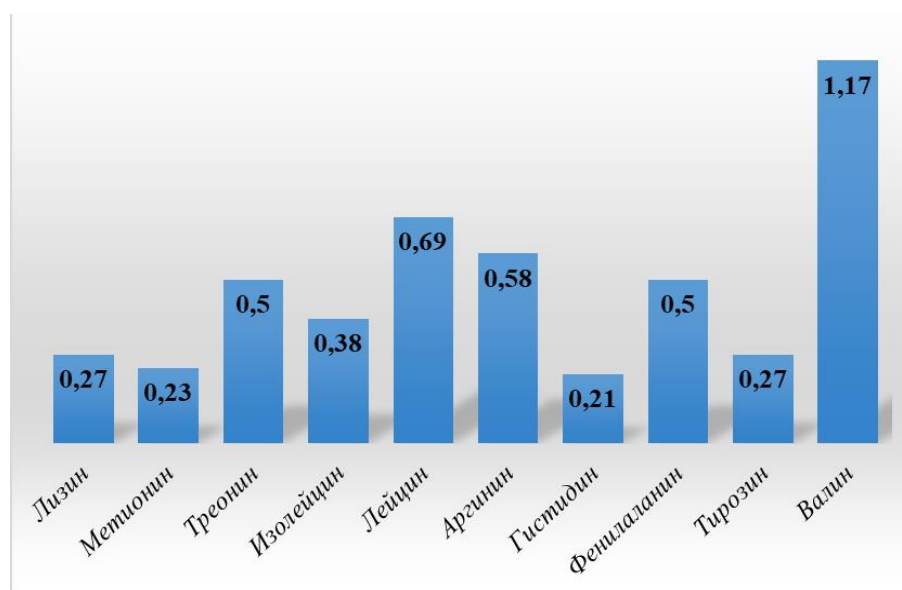


Рисунок 19 – Содержание аминокислот в синбиотическом препарате, %

Технология получения синбиотического препарата частично имитирует условия жизнедеятельности кишечных микросимбионтов и включает неполное твердофазное сбраживание пробиотической ассоциацией свекловичного жома (Ушакова и др., 2009). В результате образуется биопленка на поверхности фитоносителя, позволяющая сохранять жизнеспособные бактерии, их метаболиты и биологически активные вещества. Конечный продукт включает биомассу пробиотиков, продукты их метаболизма, продукты биотрансформации фитосубстрата и фитокомпоненты (Ушакова и др., 2019). Пробиотические

бактерии отличаются повышенной жизнеспособностью и устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды, поскольку находятся в виде биопленки на фитоносителе, а также адаптированы к условиям жизнедеятельности в кишечнике в процессе получения препарата.

3.2.1 Влияние синбиотического препарата на рыбоводно-биологические и физиолого-биохимические показатели молоди осетровых рыб

Для оценки влияния синбиотического препарата на фитосорбенте на эффективность выращивания осетровых рыб и их физиолого-иммунологический статус был проведен лабораторный опыт в Инновационном центре «Биоаквапарк – НТЦ аквакультуры» АГТУ на молоди русского осетра. Для этого были сформированы три опытные группы, получавшие различное количество синбиотического препарата: 1; 2; 3 г/кг комбикорма (опытная 1, опытная 2, опытная 3, соответственно).

Оценка эффективности различных норм ввода синбиотической добавки показала, что лучшие показатели выживаемости молоди русского осетра наблюдались во втором опытном варианте (80%) при добавлении в стартовые комбикорма препарата в дозировке 2 г/кг (рисунок 20).

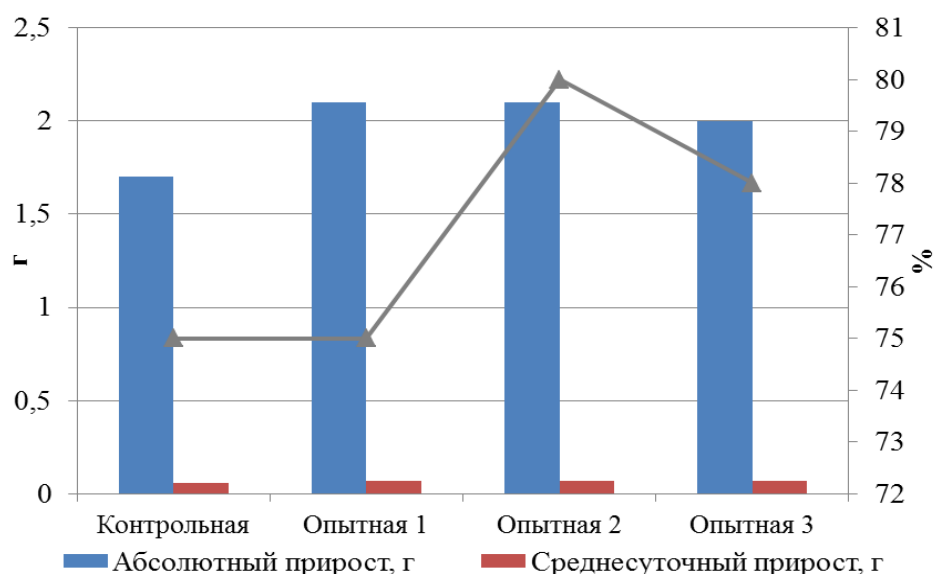


Рисунок 20 – Интенсивность роста молоди русского осетра при использовании синбиотика

Установлено, что показатели роста русского осетра в данной опытной группе характеризовались значительными изменениями в сравнении с остальными группами: линейный рост молоди был в 1,2 раза выше по сравнению с контролем при минимальных кормовых затратах. Положительное влияние препарата проявлялось и при дозировке 3 г/кг, однако полученные рыбоводно-биологические показатели оказались несколько ниже, чем во втором опытном варианте.

Физиологическое состояние ранней молоди русского осетра оценивалось по химическому составу тела (таблица 7). Установлено, что при выращивании молоди в условиях замкнутого водоснабжения добавление синбиотика в состав стартового комбикорма в количестве 2 г/кг оказывало благотворное влияние на показатели химического состава тела рыб.

Таблица 7 – Химический состав тела ранней молоди русского осетра %

Группа	Показатель					
	Влага	Сухое вещество	Протеин	Липиды	БЭВ	Зола
Контрольная	72,4±0,36	25,8±0,27	68,9±0,72	10,3±0,25	7,0±0,20	13,8±0,32
Опытная 1	73,6±0,34	26,4±0,35	67,4±0,81	10,9±0,31	6,8±0,22	14,9±0,25**
Опытная 2	72,9±0,24	27,1±0,29	71,6±0,99	10,1±0,38	6,5±0,22	11,8±0,29***
Опытная 3	73,3±0,33	26,7±0,45	69,9±0,88	10,7±0,30	6,7±0,24	12,7±0,25**

Примечание: различия достоверны при ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

На основе полученных данных о химическом составе тела выращенной молоди выявлено, что введение синбиотического препарата в рацион осетровых рыб способствует накоплению протеина и липидов в теле рыбы.

В условиях интенсификации аквакультуры качество кормов и их обогащение биологически активными веществами становятся ключевыми биотическими факторами, влияющими на физиологическое состояние рыб. Поскольку кровь является одной из наиболее чувствительных тканей, оперативно отражающих любые изменения в организме, оценка состояния молоди осетровых

рыб, получавших синбиотическую добавку, включала анализ основных физиолого-биохимических показателей (таблица 8).

Результаты исследования показали, что введение синбиотического препарата в дозировке 2 г/кг (опытная 2) обеспечило наиболее благоприятные изменения гематологических и биохимических показателей. У молоди данной группы выявлено повышение концентрации гемоглобина и общего сывороточного белка по сравнению с контролем и другими опытными вариантами. Все полученные величины находились в пределах физиологических норм для осетровых рыб (Гершанович и др., 1987; Гераскин и др., 1997), что свидетельствует о положительном влиянии препарата на состояние обменных и дыхательных процессов.

Таблица 8 – Показатели крови ранней молоди русского осетра при использовании синбиотического препарата (n=20)

Показатель	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
Гемоглобин, г/л	41,7±0,52	47,3±0,92***	49,2±0,60***	45,7±0,52***
СОЭ, мм/ч	2,1±0,11	2,0±0,13	2,0±0,22	1,9±0,21
Общий белок, г/л	14,6±0,31	18,8±0,51***	20,6±0,60***	17,9±0,66***
Холестерин, ммоль/л	1,9±0,07	1,8±0,04	1,7±0,04*	1,8±0,06
Общие липиды, г/л	3,1±0,05	3,8±0,10***	4,5±0,12***	4,0±0,14***

Примечание: различия достоверны при * $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$

Уровень гематокрита различается у разных видов рыб. Считается, что низкий уровень данного показателя свидетельствует о неудовлетворительном состоянии организма рыб. Так, у рыб опытных групп данный показатель варьировал в пределах от 26,7 до 28,4% и был достоверно выше контроля (таблица 9).

Таблица 9 – Показатели крови молоди русского осетра (n=20)

Показатель	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
Гематокрит, %	23,4±0,48	26,7±0,37***	28,4±0,28***	27,4±0,51***
Эритроциты, 10 ⁶ мкл	0,73±0,02	0,82±0,03**	0,90±0,02***	0,89±0,02***
СГЭ, пг	57,12	57,68	54,67	51,35

Примечание: различия достоверны при ** P≤0,01; *** P≤0,001

При изучении лейкоцитарной формулы крови молоди русского осетра был проанализирован качественный и количественный состав форменных элементов крови (таблица 10).

Таблица 10 – Лейкоцитарная формула крови русского осетра при использовании синбиотики, % (n=10)

Показатель	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
Лимфоциты	76,1±1,45	77,0±1,44	78,3±1,01	77,3±0,87
Моноциты	3,5±0,15	2,9±0,18**	2,6±0,22**	2,8±0,20**
Нейтрофилы сегментоядерные	7,7±0,25	8,3±0,25	9,7±0,21***	8,0±0,33
Нейтрофилы палочкоядерные	6,0±0,25	5,7±0,21	4,4±0,16***	6,2±0,29
Базофилы	4,8±0,20	4,5±0,21	3,7±0,21***	4,1±0,25*
Эозинофилы	1,9±0,08	1,6±0,07**	1,3±0,11***	1,6±0,18

Примечание: различия достоверны при * P≤0,05; ** P≤0,01; *** P≤0,001

Лейкоциты представляют собой кровяные тельца, основная функция которых – фагоцитарная. Их количество у рыб колеблется от десятков до сотен в 1 мкл и зависит от возраста, пола, стадии зрелости, упитанности, наличия заболеваний, температуры воды и т.д. Преобладающими клетками белой крови рыб являются лимфоциты, составляющие до 95% всех лейкоцитов. Изменения

лейкоцитарной формулы рыб наблюдаются при различных изменениях внутренней и внешней среды. У рыб под воздействием различных факторов, например, при интенсивном питании, повышении температуры, двигательной активности, наблюдается повышение количества гранулоцитов.

По результатам проведенных исследований установлено, что значительная часть клеток была представлена лимфоцитами, составляющими 76,1-78,3%. Уровень палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов достигал 14,2%. На эозинофилы и моноциты из числа всех лейкоцитов приходилось 1,3-1,9 и 2,6-3,5%, соответственно. Таким образом, морфологическая характеристика картины крови молоди, выращиваемой с применением синбиотика, отражала адаптивную реакцию организма рыб.

По результатам оценки физиологического состояния выращенной молоди определена эффективность применения синбиотического препарата на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* в стартовых комбикормах для молоди осетровых рыб при его норме введения – 2 г/кг комбикорма.

3.2.2 Научно-производственная оценка эффективности применения синбиотика при выращивании молоди русского осетра

Оценку эффективности применения данного синбиотического препарата в составе продукционных комбикормов проводили на основании экспериментального кормления русского осетра в условиях Сергиевского осетрового рыбоводного завода. Исследуемую молодь разделили на контрольную и три опытные группы с различной нормой ввода синбиотика: 1,5; 2,5; 3,5 г/кг комбикорма (опытная 1, опытная 2, опытная 3, соответственно).

Полученные данные динамики темпа роста свидетельствовали о положительном влиянии синбиотического препарата в составе продукционных кормов для молоди осетровых рыб (рисунок 21). За весь период экспериментальных работ абсолютный прирост рыб в опытных группах составил 12,4, 13,4 и 12,8 г, соответственно, тогда как в контроле он не превышал 11,5 г.

Среднесуточный прирост был выше во всех опытных группах по сравнению с контролем, при этом максимальное значение данного показателя (0,45 г) было зафиксировано при введении синбиотического препарата в дозировке 2,5 г/кг (опытная 2). Сопоставление темпов роста молоди русского осетра показывает, что использование повышенной дозировки добавки (3,5 г/кг) приводит к снижению эффективности выращивания и не обеспечивает дополнительного положительного эффекта.

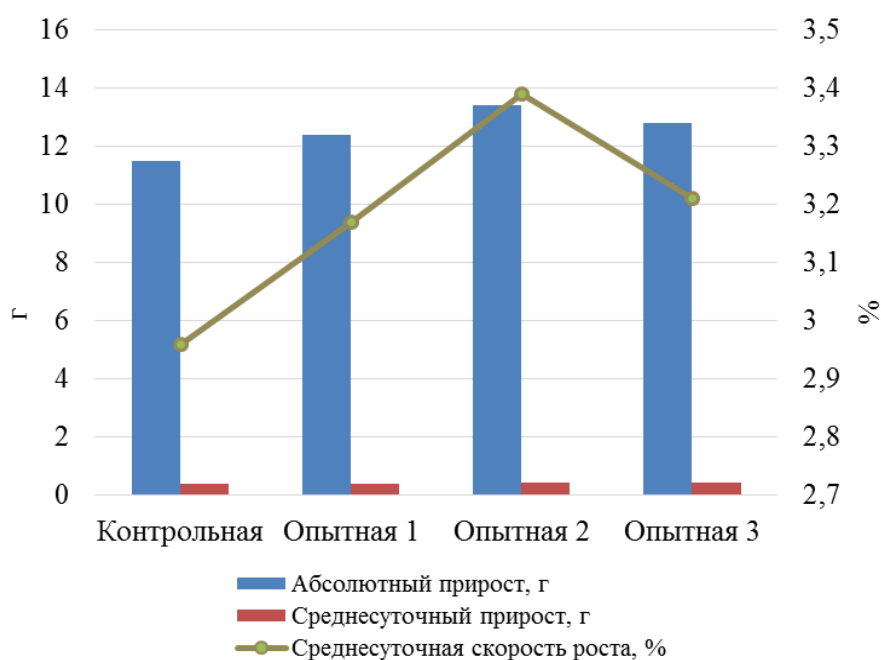


Рисунок 21 – Показатели выращивания молоди русского осетра

Таким образом, по результатам проведенных исследований установлено, что введение синбиотического препарата основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте, в состав комбикормов оказывает положительное влияние на рыб, способствуя повышению их продуктивных свойств. Отмечено, что концентрация 2,5 г/кг комбикорма является наиболее эффективной, что подтверждается результатами, полученными в ходе экспериментальных работ.

Анализ гематологических и биохимических показателей рыб является одним из важнейших аспектов оценки физиолого-иммунологического состояния организма. Изменение картины крови в ту или иную сторону позволяет сделать вывод о состоянии организма и диагностировать заболевания.

Анализ крови молоди русского осетра, получавшей синбиотик в количестве 2,5 г/кг (опытная 2), в целом соответствовал физиологическим нормам и характеризовался наилучшими показателями, чем в контрольной и других опытных группах (рисунок 22).

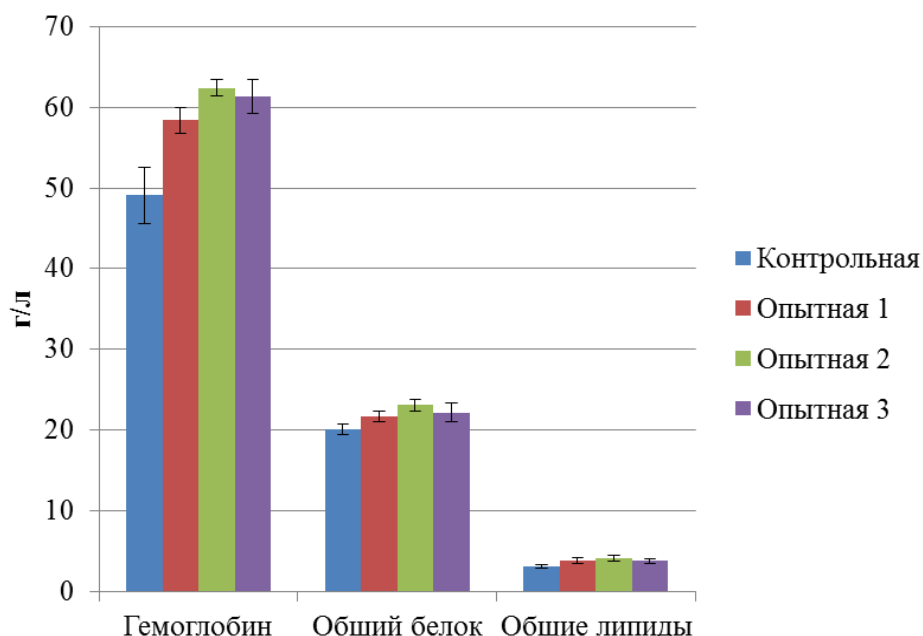


Рисунок 22 – Физиолого-биохимические показатели крови молоди русского осетра (n=20)

Установлено, что рыбы опытных групп характеризовались более благоприятными физиолого-биохимическими параметрами по сравнению с контролем. Концентрация общего белка во всех вариантах опыта сохранялась на уровне нижней границы, характерной для рыб из естественных водоемов (20-40 г/л) (Гершанович и др., 1987). Относительно низкий уровень общего белка достаточно часто наблюдается у рыб при выращивании в промышленных условиях, что может быть связано не только со спецификой питания, но и с уровнем стрессовой нагрузки. В таких условиях организм вынужден расходовать дополнительные энергетические ресурсы, включая белковые соединения, что может приводить к их снижению в сыворотке крови. Косвенным подтверждением наличия стрессового воздействия служили показатели холестерина: в контроле его уровень достигал 3,5 ммоль/л, тогда как у рыб, получавших корма с синбиотическим препаратом, он не превышал 2,9 ммоль/л (рисунок 23). Поскольку холестерин участвует в физиологических механизмах адаптации к

стрессу, его более низкие значения в опытных группах могут свидетельствовать о повышенной стрессоустойчивости рыб и возможной роли синбиотика в поддержании оптимального уровня стресс-гормонов, включая кортизол.

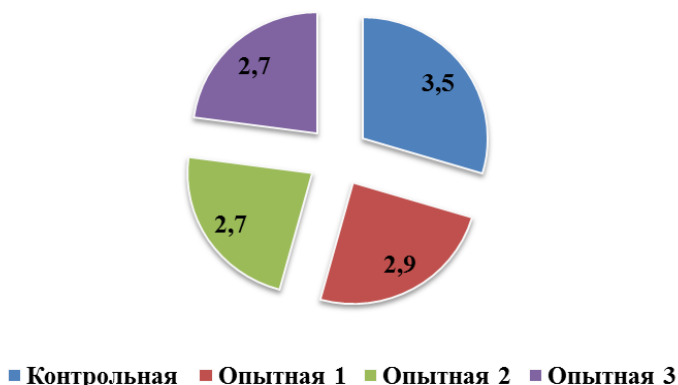


Рисунок 23 – Уровень холестерина в крови молоди русского осетра, ммоль/л

Показатели содержания общих липидов также отражали благоприятное состояние жирового обмена: в опытных группах их концентрация составляла 3,8-4,2 г/л, тогда как в контроле – 3,2 г/л. Все значения соответствовали референсным диапазонам, приведенным в литературе (Mastoi et al., 2012), что указывает на адекватное накопление энергетических ресурсов у молоди русского осетра.

Комплексная оценка гематологических и биохимических показателей позволила установить, что использование синбиотической добавки способствует улучшению физиологического состояния рыб. Наиболее выраженный положительный эффект отмечен при дозировке 2,5 г/кг, что позволяет рассматривать данный вариант как оптимальный для выращивания молоди русского осетра в условиях индустриальной аквакультуры.

Для полной картины физиологического и иммунологического состояний исследуемой молоди был проведен анализ лейкоцитарной формулы периферической крови русского осетра (таблица 11).

Анализ морфологического состава крови показал, что у всех исследованных особей молоди русского осетра преобладал лимфоидный тип кроветворения. Относительное содержание лимфоцитов находилось в диапазоне 77,5-83,2%, при этом наиболее высокая их доля была зарегистрирована у рыб второй опытной группы, получавших синбиотический препарат в дозировке 2,5 г/кг. Уровень

моноцитов в периферической крови изменялся незначительно: в первой и третьей опытных группах их содержание составляло 2,8%, тогда как во второй – 2,5%.

Таблица 11 – Лейкоцитарная формула крови молоди русского осетра, % (n=10)

Показатели	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
Лимфоциты	77,5±1,31	82,1±1,37**	83,2±1,37***	81,3±0,98**
Моноциты	3,9±0,20	2,8±0,15***	2,5±0,14***	2,8±0,11***
Нейтрофилы сегментоядерные	6,8±0,27	7,3±0,30***	7,7±0,28***	7,5±0,50*
Нейтрофилы палочкоядерные	3,9±0,17	2,3±0,13**	2,3±0,21	2,8±0,21
Эозинофилы	3,1±0,15	1,5±0,15***	1,3±0,07***	1,5±0,25***
Базофилы	4,8±0,13	4,0±0,17**	3,0±0,23***	4,1±0,23**

Примечание: различия достоверны при ** - $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Известно, что С-реактивный белок является компонентом врожденного иммунитета и обнаруживается как в сыворотке крови, так и в слизистом секрете рыб. Несмотря на то, что его биологические функции у гидробионтов изучены недостаточно полно, накопленные данные свидетельствуют о широком спектре его иммунологических свойств. В частности, СРБ опосредует опсонизацию антигенов, тем самым усиливая эффективность фагоцитоза, взаимодействует с системой комплемента и способствует ее активации, участвует в лизисе бактериальных клеток, повышает миграционную активность лейкоцитов. Кроме того, данный белок выполняет функцию адгезивного фактора, вызывая агглютинацию патогенов и ограничивая их распространение в организме (Журавлева и др., 2013). По результатам проведенных исследований установлено, что у рыб перед началом экспериментальных работ уровень СРБ имел отрицательный уровень (<6 мг/л) (таблица 12). При использовании синбиотического препарата данный показатель не изменялся и оставался стабильным.

Таблица 12 – Уровень СРБ в крови молоди русского осетра, мг/л (n=10)

Время отбора проб	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
до начала эксперимента	<6	<6	<6	<6
в конце эксперимента	<6	<6	<6	<6

Установлено, что применение синбиотического препарата оказало положительное влияние на продуктивность и физиолого-иммунологическое состояние молоди русского осетра. Наиболее эффективной дозировкой явилась 2,5 г/кг.

3.2.3 Влияние пробиотического препарата на динамику роста и показатели крови русского осетра при садковом выращивании

Изучение интенсивности роста двухлеток русского осетра при использовании синбиотика на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* в условиях садкового хозяйства позволило установить, что наиболее эффективной дозировкой препарата является 4 г/кг (опытная 2) (рисунок 24).

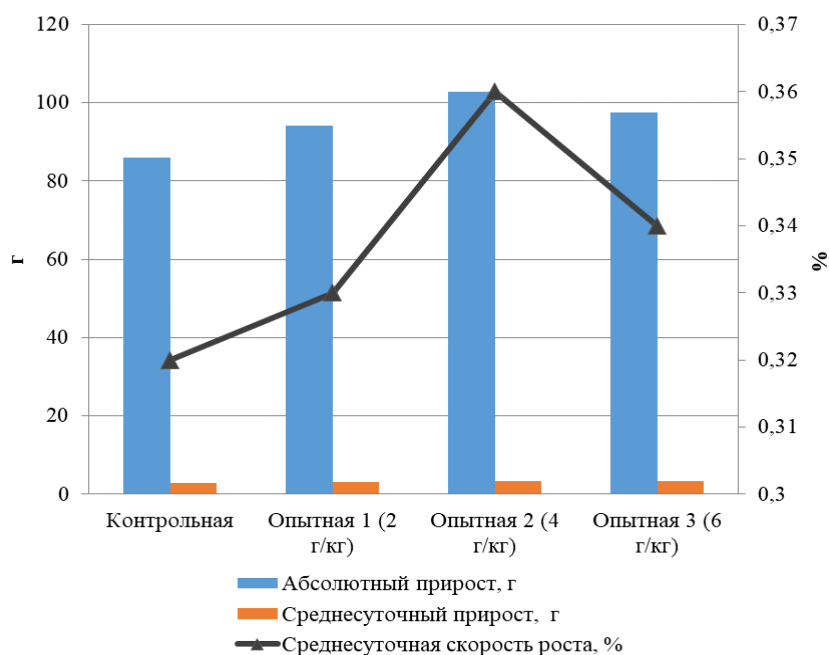


Рисунок 24 – Интенсивность роста русского осетра при использовании синбиотика

При изучении физиологического состояния двухлеток русского осетра, выращенных с использованием синбиотика, установлено, что дозировка 4 г/кг комбикорма является оптимальной и способствует получению более высоких гематологических показателей (таблица 13). Так, у рыб, потреблявших комбикорм с такой нормой ввода препарата, наблюдалось увеличение уровня гемоглобина на 13,3%, а также общего белка на 3,6% в сравнении с контролем. Кроме того, использование синбиотика способствовало снижению концентрации холестерина в крови исследуемых рыб. Это может быть связано с тем, что резидентная и транзитная микрофлора кишечника, синтезируя и трансформируя экзогенные и эндогенные стериды, принимает активное участие в холестериневом метаболизме. Таким образом, можно рассматривать микрофлору кишечника как важнейший метаболический и регуляторный орган, участвующий в кооперации с клетками хозяина в поддержании гомеостаза холестерина.

Таблица 13 – Физиолого-биохимические показатели крови русского осетра при использовании синбиотика (n=20)

Ст. показатель	Гемоглобин, г/л	Общий белок г/л	Холестерин, ммоль/л	β – липо-протеиды, г/л	СОЭ, мм/ч	Глюкоза, ммоль/л
Контроль						
M±m	64,5±0,6	21,8±0,5	3,7±0,3	2,5±0,2	2,1±0,3	2,5±0,4
CV%	7,6	17,7	21,7	7,7	54,0	19,4
Опытная 1 (2 г/кг)						
M±m	72,3±0,8	22,3±0,7	3,1±0,2	2,9±0,1	2,4±0,5	2,3±0,4
CV%	5,3	12,7	18,1	9,3	17,2	12,4
Опытная 2 (4 г/кг)						
M±m	75,2±0,5	26,9±0,3	1,6±0,8	2,7±0,5	2,2±0,1	2,2±0,6
CV%	6,1	14,1	15,2	7,8	12,2	14,1
Опытная 3 (6 г/кг)						
M±m	74,0±0,5	24,9±0,4	2,7±0,7	2,9±0,1	2,5±0,5	2,5±0,3
CV%	7,3	15,7	17,5	8,0	19,7	11,1

На основании полученных гематологических и биохимических данных установлено, что применение исследуемых пробиотических препаратов не сопровождалось развитием патологических изменений, нарушением обменных процессов или ухудшением общего физиологического состояния рыб. Введение пробиотиков в рацион осетровых рыб положительно влияло на функциональные показатели организма и способствовало поддержанию оптимального уровня физиологической нормы.

Таким образом, проведенные исследования подтвердили целесообразность применения синбиотического препарата на основе спорообразующих бактерий р. *Bacillus*, иммобилизованных на частицах твердого фитосубстрата, при выращивании осетровых рыб. Использование данного синбиотика способствует улучшению физиологического и иммунного статуса осетровых рыб, что обеспечивает повышение рыбоводных показателей и подтверждает перспективность его внедрения в современные технологии аквакультуры.

3.3 Микробиологическая оценка эффективности пробиотического и синбиотического препаратов при выращивании осетровых рыб

Современное развитие аквакультуры требует внедрения новых интенсивных методов ведения рыбного хозяйства, направленных на увеличение объемов производства аквапродукции. Это обусловлено как ограниченными возможностями использования водных ресурсов вследствие снижения качества воды в природных водоисточниках, так и необходимостью включения в производственный процесс ценных объектов аквакультуры, выращивание которых требует специализированных условий содержания и кормления, в том числе с применением комбикормов (Пономарев и др., 2013).

В последние годы значительное развитие аквакультуры связано с расширением индустриального рыбоводства, основанного на выращивании рыб в условиях полного контроля технологических параметров с использованием современной рыбоводной техники и специализированных комбикормов.

Применение рыбоводных систем с замкнутым циклом водообеспечения позволяет вести круглогодичное выращивание объектов аквакультуры независимо от климатических факторов, обеспечивая при этом высокие темпы роста и продуктивность, рациональное использование природных ресурсов и повышение экологической безопасности производства.

Однако содержание рыбы в УЗВ не решает проблемы болезней объектов аквакультуры. В последние годы отмечается тенденция увеличения количества рыбоводных хозяйств, неблагополучных по заразным болезням рыб, среди которых наибольший ущерб наносят заболевания бактериальной этиологии (Юхименко и др., 1998, 2001). Применение терапевтических мероприятий в замкнутых системах не дает положительного эффекта ввиду уничтожения полезных микроорганизмов биофильтра и, как следствие, ухудшения качества рециркулируемой воды (Спотт, 1983). Поэтому основополагающая роль в хозяйствах, использующих установки с замкнутым циклом водообеспечения, принадлежит комплексу профилактических и противозпизоотических мероприятий.

Таким образом, развитие индустриального рыбоводства с использованием установок с замкнутым циклом водообеспечения должно основываться на знаниях биологии объекта аквакультуры, технологии его выращивания, основ очистки воды, сбалансированности и качества кормов, а также на знаниях о закономерностях формирования микробных сообществ и их функционирования в замкнутых системах.

В связи с этим изучение структуры микробиоценозов выращиваемой рыбы, микроэкологии водной среды и кормов является весьма актуальным и обоснованным. Полученная информация поможет решить проблему предупреждения инфекционных заболеваний рыб в индустриальных хозяйствах и, таким образом, снизить отход рыбы от болезней бактериальной этиологии.

3.3.1 Клинико-микробиологическая оценка эффективности применения пробиотика и синбиотика с целью коррекции нарушений микробиоты осетровых рыб

В организме рыб отмечаются значительные отклонения в аутофлоре, вызванные такими явлениями, как нарушение условий содержания и кормления, постоянные стрессовые воздействия различной этиологии, способствующие отрицательными сдвигам микрофлоры. На фоне дефицита нормофлоры нарушаются нормальные соотношения между облигатными микроорганизмами кишечника, обуславливающие дисбаланс между нормо- и условно-патогенными микроорганизмами и дисбактериозы. Поэтому профилактические мероприятия включают в себя применение средств для формирования нормобиоза и колонизационной резистентности, среди которых немаловажное значение имеют пробиотические и синбиотические препараты.

Рассматривая современные пробиотики и синбиотики как иммуотропные средства, следует отметить устойчивость их иммуотропного действия. Известно, что они принимают активное участие в регуляции механизмов иммунитета в кишечнике (Rigo et al., 2019). Нормализация и стабилизация количественных и качественных показателей микробиоты желудочно-кишечного тракта, достигнутые в результате их применения, являются основой их длительного влияния на иммунный гомеостаз. Кроме того, данные препараты повторяют естественный путь регуляции системных иммунных реакций, обусловленный циркуляцией бактериальных компонентов и продуктов, а также иммунных медиаторов и клеток из ЖКТ в другие органы и ткани организма, что наиболее физиологично и безопасно.

3.3.1.1 Исследование численности молочнокислых микроорганизмов в жабрах молоди осетровых рыб на различных питательных средах

В современных условиях индустриального рыбоводства, особенно при использовании замкнутых систем водообеспечения, формируются специфические факторы среды, значительно отличающиеся от природных. К ним относятся высокая плотность посадки, ограниченная подвижность рыб, нестабильность параметров водной среды, особенности кормления, а также частые биотехнические вмешательства, направленные на интенсификацию производства (Щербина, 1960; Остроумова, 2001). Одновременно наблюдается накопление органических веществ и увеличение численности условно-патогенных микроорганизмов в воде, что, по данным Юхименко и Викторовой (1979), а также Шендерова (1998), приводит к повышенному бактериальному загрязнению органов и тканей рыб. Это, в свою очередь, вызывает угнетение общего физиологического состояния, способствует развитию заболеваний и снижению уровня естественной резистентности. В совокупности указанные факторы формируют выраженный стресс, оказывающий негативное влияние на здоровье рыб, и требуют применения эффективных профилактических и поддерживающих мер, в том числе направленных на укрепление иммунной системы.

Одним из важнейших индикаторов состояния здоровья рыб в таких условиях является состав их микробиоценоза, отражающий как физиолого-иммунологический статус, так и условия содержания. У рыб, находящихся в постоянном контакте с водой, бактериальная обсемененность внешних и внутренних органов напрямую зависит от микробной нагрузки окружающей среды (Паршуков, Сидорова, 2014). Поверхность тела может заселяться спорообразующими и неспорообразующими бактериями, кокками, актиномицетами, дрожжами и плесневыми грибами. Особенно уязвимыми в этом отношении являются жабры, высокая бактериальная контаминация которых обусловлена повышенным содержанием органических веществ в воде, ее интенсивной аэрацией и слабощелочной реакцией среды. Массовое развитие

водной сапрофитной микрофлоры в жабрах представляет собой дополнительный стресс-фактор, на нейтрализацию которого рыба вынуждена затрачивать значительные ресурсы, что приводит к ослаблению защитных функций организма и увеличению риска развития инфекционных заболеваний (Паршуков, Сидорова, 2014).

По литературным данным общее микробное число в жабрах может варьировать в широком диапазоне от $6,0 \times 10^2$ до $2,2 \times 10^6$ КОЕ/г (Trust, 1979; Паршуков, 2011). При неудовлетворительном качестве воды вследствие применения комплекса интенсификационных мероприятий или повреждения тканей жаберного эпителия уровень бактериальной обсемененности рыб значительно повышается.

Одним из перспективных направлений в решении данной проблемы является применение пробиотиков и синбиотиков, основу которых составляют молочнокислые бактерии, представляющие собой группу микроорганизмов, участвующих в сбраживании углеводов с образованием, главным образом, молочной кислоты. На сегодняшний день известны такие классические культуры молочнокислых бактерий: *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, все более значительную роль играют специальные культуры: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, а также бифидобактерии: *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*.

Известно, что штаммы *Lactobacillus acidophilus* способны выживать в процессе прохождения через желудочно-кишечный тракт, а также вырабатывать антимикробные компоненты. Кроме того, данные штаммы улучшают симптомы, связанные с избыточным ростом бактерий в тонкой кишке при дисбиотических состояниях (Watkins, Kratzer, 1983; Varel, 1987).

Наибольшее значение для микробиоты играют бактерии р. *Bifidobacterium*, которые способствуют поддержанию нормального баланса кишечной микрофлоры, так как являются ингибиторами патогенных микроорганизмов. Данные бактерии обладают иммуномоделирующей активностью, снижают уровень холестерина и концентрацию аммиака и аминов в крови, участвуют в

синтезе витаминов и других биологически активных веществ (тиамина, рибофлавина, группы К), аминокислот и ферментов (лизоцима и казеинфосфатазы). Установлено, что *Bifidobacterium lactis* имеет высокие адгезивные свойства, т.е. выживаемость в ЖКТ в процессе микробной трансформации.

Не менее значимы и ацидофильные бактерии, способные продуцировать природные антибиотики, подавляющие рост патогенной микрофлоры: кишечной палочки, сальмонелл, дизентерийных бактерий, коагулазоположительных стафилококков и других. Они оказывают направленное действие на некоторые метаболические процессы, важные для ускорения восстановления и повышения работоспособности организма; способствуют уменьшению роста патогенных микроорганизмов, что способствует предотвращению развития гнилостных и бродильных процессов. Кроме того, ацидофильная палочка помогает организму усваивать молочный белок, что характеризуется повышением кислотности и благоприятствует всасыванию и усвоению солей кальция организмом.

Таким образом, включение молочнокислых микроорганизмов в состав пробиотических и синбиотических препаратов способствует укреплению иммунного статуса рыб, снижению воздействия стрессовых факторов среды и повышению общей продуктивности объектов аквакультуры.

Проведенный анализ качественного состава микрофлоры молоди осетровых рыб позволил установить, что до начала применения пробиотического и синбиотического препаратов на основе спорообразующих бактерий р. *Bacillus* в жабрах были выделены грамположительные палочки р. *Lactobacillus*, грамположительные кокки р. *Pedococcus* и *Leuconostoc*. Количественный анализ показал, что до начала кормления рыб численность молочнокислых микроорганизмов в жабрах молоди осетровых рыб варьировала в пределах $3,54 \times 10^4$ – $4,36 \times 10^5$ КОЕ/г (таблица 14).

Таблица 14 – Численность микроорганизмов в жабрах молоди осетровых рыб на различных средах, КОЕ/г

Среда	Группа		
	Контрольная	Опытная 1 (синбиотик)	Опытная 2 (пробиотик)
до начала кормления			
МПА	$2,88 \times 10^5$	$3,02 \times 10^5$	$2,83 \times 10^5$
Бликфельдта	$3,14 \times 10^5$	$3,35 \times 10^5$	$4,36 \times 10^5$
Ли	$5,72 \times 10^4$	$6,52 \times 10^4$	$3,54 \times 10^4$
во время кормления			
МПА	$6,57 \times 10^5$	$4,92 \times 10^6$	$2,05 \times 10^6$
Бликфельдта	$5,13 \times 10^4$	$4,81 \times 10^5$	$5,94 \times 10^5$
Ли	$2,41 \times 10^5$	$2,71 \times 10^5$	$3,77 \times 10^5$
в конце кормления			
МПА	$1,42 \times 10^5$	$8,50 \times 10^6$	$5,25 \times 10^7$
Бликфельдта	$1,57 \times 10^5$	$8,57 \times 10^4$	$5,32 \times 10^5$
Ли	$1,42 \times 10^4$	$2,10 \times 10^4$	$1,62 \times 10^5$

Проведенный на 14-е сутки экспериментальных работ повторный посев жабр позволил установить, что численность молочнокислых микроорганизмов на среде МПА в контрольной группе составила $6,57 \times 10^5$ КОЕ/г, в группе с синбиотиком (опытная 1) – $4,92 \times 10^6$ КОЕ/г; пробиотиком (опытная 2) – $2,05 \times 10^6$ КОЕ/г. При изучении культуральных свойств микроорганизмов обнаружены бактериальные колонии: бледно-розового цвета, круглые, выпуклые глянцевые; бежево-молочного цвета, слизистые, округлые; желтого цвета, округлые, глянцевые; молочного цвета, стелящиеся по субстрату. Среди вышеперечисленных колоний были выявлены грамположительные палочки р. *Lactobacillus*, грамположительные кокки р. *Pediococcus*, *Leuconostoc* и грамположительные палочки неправильной формы.

При посеве на среду Ли численность выделенных микроорганизмов составила: контроль – $2,41 \times 10^5$ КОЕ/г; в первой опытной группе – $2,71 \times 10^5$ КОЕ/г; второй опытной группе – $3,77 \times 10^5$ КОЕ/г. Качественный состав микробиоценоза жабр был представлен грамположительными палочками р. *Lactobacillus*, грамположительными кокками р. *Pediococcus*, *Leuconostoc*.

Посев жабр на среде Бликфельдта позволил установить, что максимальная численность выделенных микроорганизмов была выявлена в группе рыб, выращиваемой с применением пробиотика (опытная 2) – $5,94 \times 10^5$ КОЕ/г, в то время как в контроле было выявлено минимальное их количество – $5,13 \times 10^4$ КОЕ/г. При этом анализ морфологических признаков выделенных микроорганизмов позволил выявить грамположительные палочки р. *Lactobacillus*, и грамположительные кокки р. *Pediococcus*, *Leuconostoc*.

В конце экспериментального выращивания было проведено очередное определение количества молочнокислых микроорганизмов в жабрах молоди осетровых рыб с использованием метода глубинного посева.

При посеве на среду МПА было обнаружено снижение численности молочнокислых микроорганизмов в контроле до $1,42 \times 10^5$ КОЕ/г, однако в опытных группах наблюдался наоборот незначительный рост ($5,25 \times 10^7$ КОЕ/г – опытная 2, $8,50 \times 10^6$ КОЕ/г – опытная 1). Установлено, что в качественном составе микробиоценоза жабр молоди русского осетра преобладали грамположительные палочки р. *Lactobacillus* и грамположительные кокки р. *Pediococcus*, *Leuconostoc*.

При изучении влияния кормления на наличие молочнокислых микроорганизмов в жабрах рыб на среде МПА, обнаружено, что наиболее высокая численность микроорганизмов наблюдалась в жабрах в конце экспериментального кормления бактериальными препаратами. Необходимо отметить, что во второй опытной группе после прекращения кормления, численность микроорганизмов оставалась на достаточно высоком уровне в сравнении с другими вариантами опыта (рисунок 25).

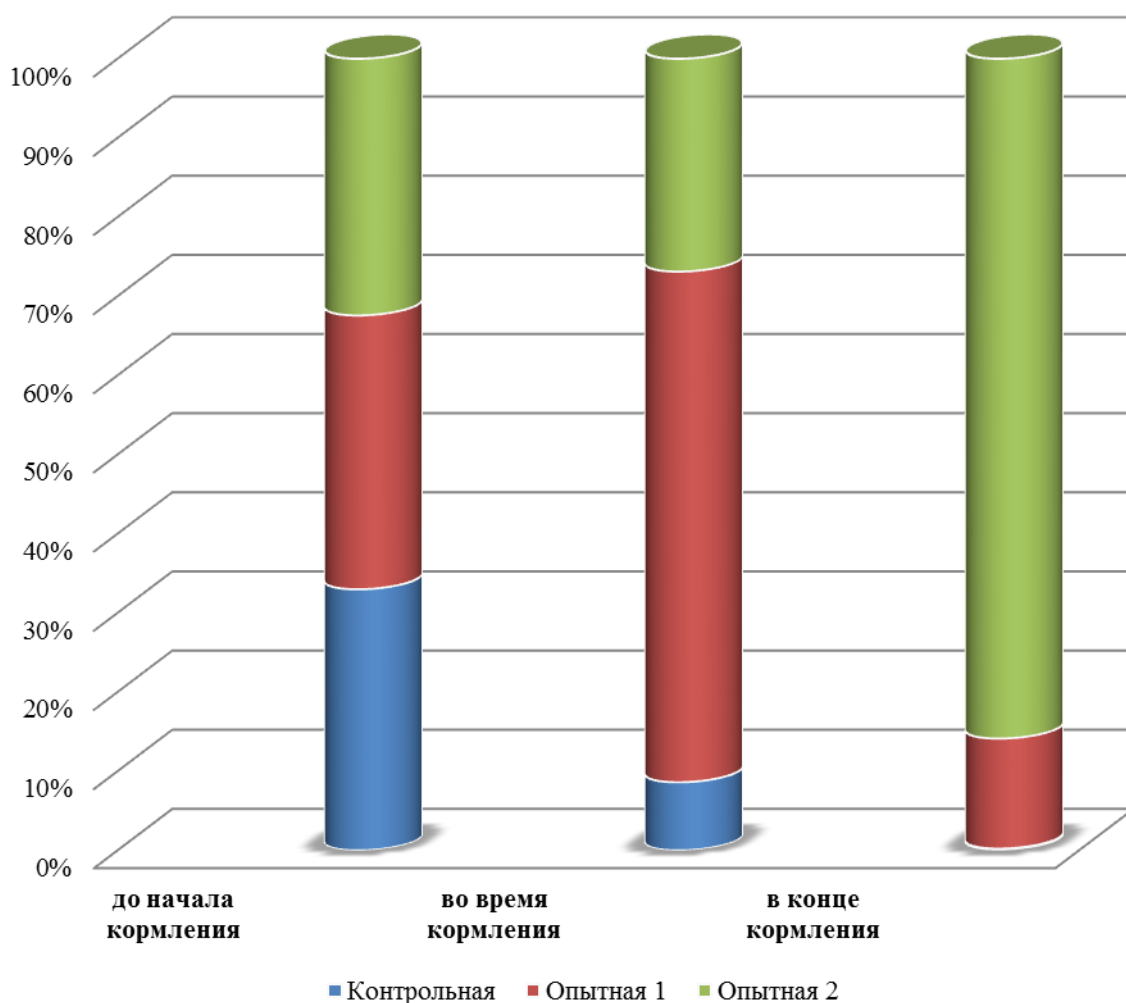


Рисунок 25 – Соотношение численности микроорганизмов на среде МПА в жабрах осетровых рыб

Количественный состав молочнокислых микроорганизмов, высеянных на среде Ли, характеризовался снижением их числа в контроле до $1,42 \times 10^4$ КОЕ/г и опытном варианте с синбиотиком (опытная 1) до $2,10 \times 10^4$ КОЕ/г, в то время как в группе с пробиотическим препаратом (опытная 2) произошло наоборот незначительное повышение до $1,62 \times 10^5$ КОЕ/г. При изучении морфологических признаков выделенных микроорганизмов были обнаружены грамположительные палочки р. *Lactobacillus*, грамположительные кокки р. *Pedococcus*, *Leuconostoc*.

Установлено, что при посеве на среду Ли численность молочнокислых микроорганизмов в жабрах возрастала во время кормления рыб пробиотиком и синбиотиком, а с прекращением кормления численность молочнокислых микроорганизмов постепенно снижалась (рисунок 26).

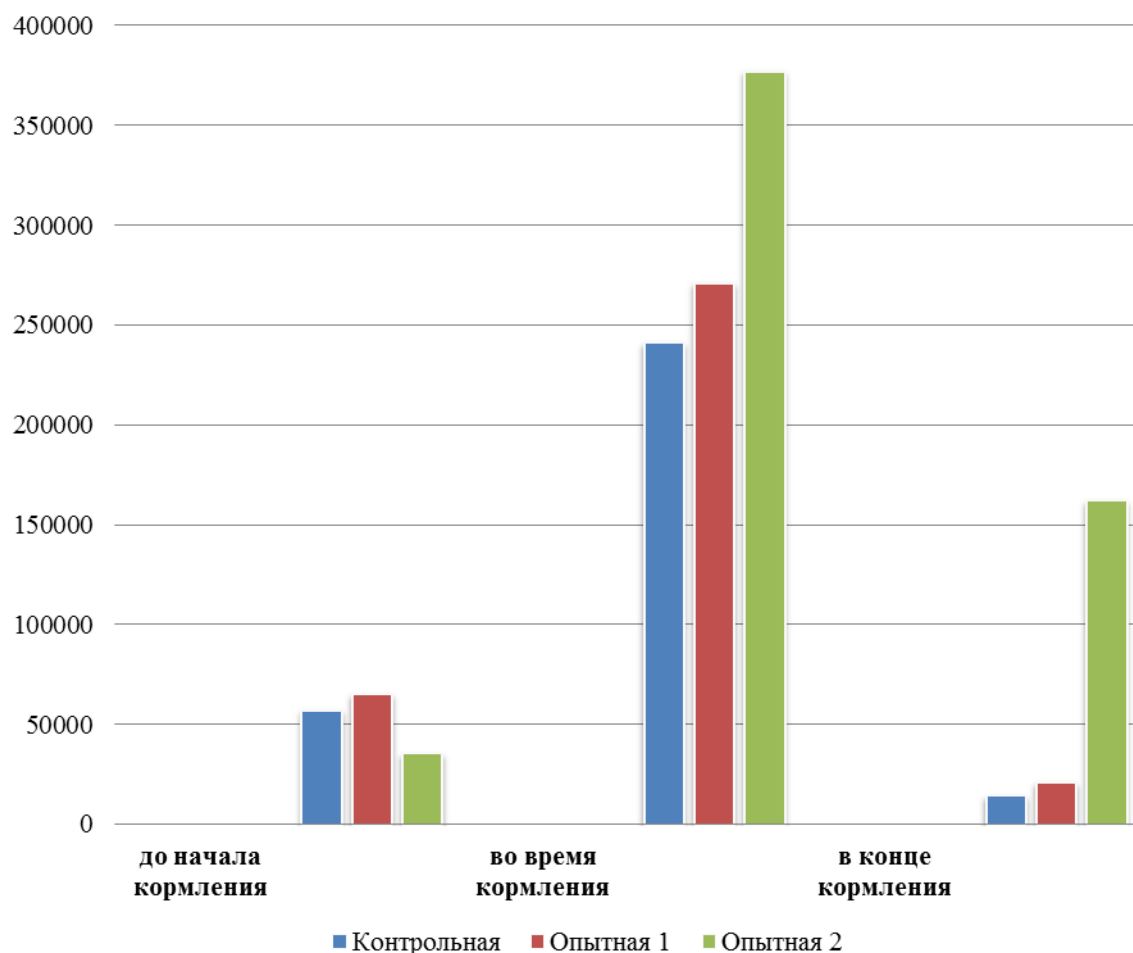


Рисунок 26 – Соотношение численности микроорганизмов на среде Ли в жабрах осетровых рыб

Микрофлора жабр русского осетра, высеянная на среде Бликфельдта, позволила установить, что в конце выращивания наибольшее количество молочнокислых микроорганизмов было характерно для рыб второй опытной группы – $5,32 \times 10^5$ КОЕ/г, а наименьшее в первой опытной группе – $8,57 \times 10^4$ КОЕ/г. При исследовании морфологических признаков выделенных микроорганизмов были высеяны грамположительные палочки *p. Lactobacillus*.

Установлено, что численность молочнокислых микроорганизмов в жабрах рыб при посеве на среде Бликфельдта возрастала во время кормления рыб бактериальными препаратами, а с прекращением кормления их численность снижалась в значительной мере в контрольной и первой опытной группах, в то

время как кормление пробиотиком давало более стойкий и стабильный результат (рисунок 27).

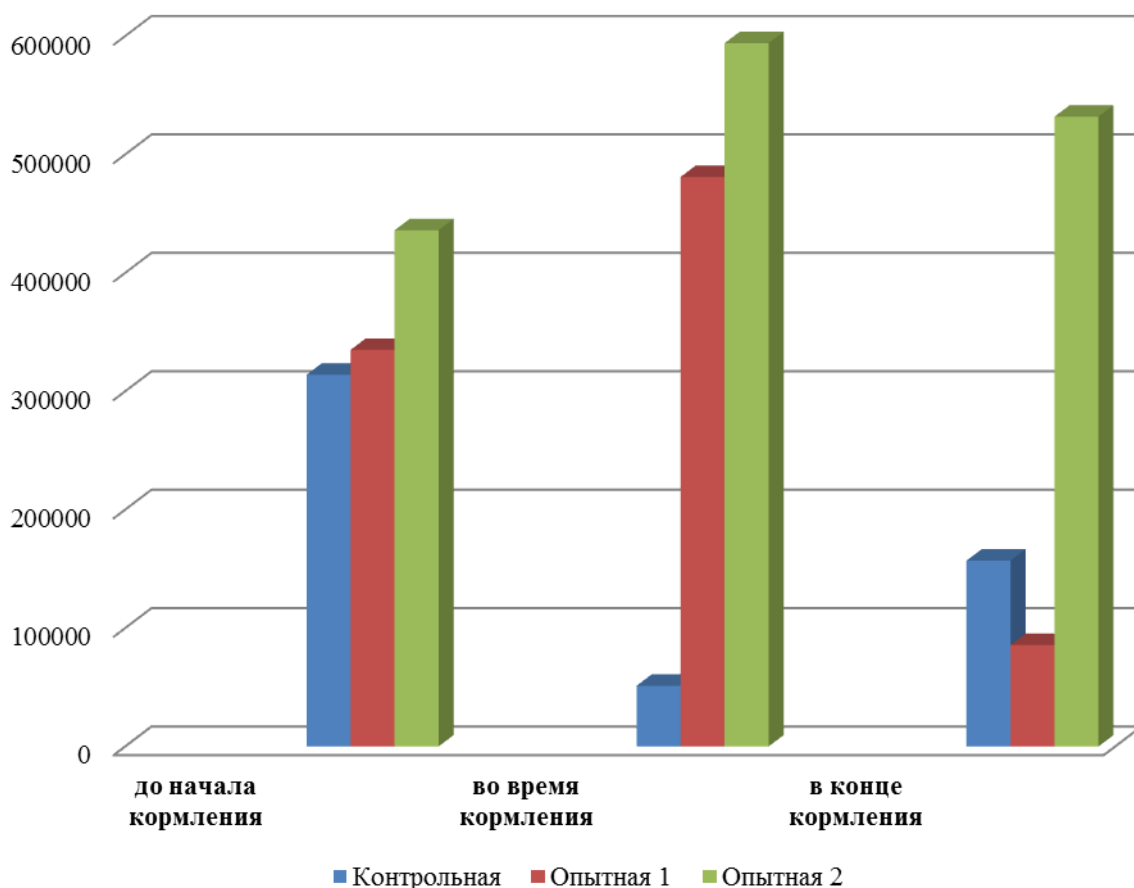


Рисунок 27 – Соотношение численности микроорганизмов на среде Бликфельдта в жабрах осетровых рыб

В результате проведенных экспериментальных работ в жабрах молоди русского осетра были выявлены следующие молочнокислые микроорганизмы: грамположительные палочки и кокки, относящиеся к родам *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*. Обнаружено, что в жабрах рыб на различных средах наблюдалось увеличение количества молочнокислых микроорганизмов при кормлении рыб с добавлением пробиотического и синбиотического препаратов, однако при прекращении кормления численность молочнокислых микроорганизмов снижалась. Анализируя полученные данные можно сделать вывод о том, что применение пробиотика и синбиотика в составе комбикормов для рыб оказывает положительное влияние на обсемененность жабр молочнокислыми микроорганизмами. Установлено, что пробиотический препарат

на основе спорообразующих бактерий р. *Bacillus* дает более стабильный результат. При его использовании у выращиваемых рыб наблюдалось незначительное и постепенное снижение количества молочнокислых микроорганизмов в жабрах после окончания экспериментального кормления.

3.3.1.2 Анализ численности молочнокислых микроорганизмов в кишечнике молоди осетровых рыб на различных питательных средах

Пищеварительная система является ключевым звеном, регулирующим взаимодействие рыб с окружающей средой. Она формирует физиологическую основу для обеспечения организма необходимыми питательными веществами и энергией и одновременно выполняет функцию барьерного механизма, защищающего внутреннюю среду от воздействия внешних факторов (Бурлаченко и др., 2007).

Микробиота кишечника оказывает значимое влияние на функционирование организма в целом. Микроорганизмы, заселяющие пищеварительный тракт, участвуют не только в процессах переваривания и усвоения пищи, но и являются важной составляющей системы неспецифического иммунитета, обеспечивая защитные реакции и поддержание гомеостаза (Грозеску, 2016).

Интестинальный микробиом рыб характеризуется повышенным содержанием патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, служащих источником различных инфекционных заболеваний (Литвина, 2000). Среди микробиоты кишечника встречаются все обитатели воды, а также анаэробные бактерии, наиболее распространенными среди которых являются патогенные клостридии и кишечные палочки (Сорокин и др., 1973).

Микробиота пищеварительного тракта рыб подразделяется на главную (основная, автохтонная, облигатная) и остаточную (транзитная, факультативная, аллохтонная). Главная микрофлора представлена анаэробами – бифидобактериями, лактобактериями, бактероидами, фузобактериями (90%), и аэробами – кишечной палочкой, энтерококками (9%), поддерживающими

колониционную резистентность слизистой кишечника к контаминации условно-патогенными микроорганизмами. Остаточная микрофлора представлена не более чем 1% сапрофитов (стафилококки, грибы) и условно-патогенных микроорганизмов (гемолитический стрептококк, золотистый стафилококк, грамотрицательные палочки), которые также являются составной частью кишечного биотопа (Жандалгарова, 2021).

Отделы желудочно-кишечного тракта рыб характеризуются неодинаковой численностью бактерий. Наибольшее их количество обнаружено в переднем и среднем отделах, что может свидетельствовать об участии микроорганизмов в расщеплении питательных веществ. Наличие большого числа бактерий в заднем отделе кишечника может быть связано с их участием в расщеплении балластных веществ и с обеспечением рыб вторичными нутриентами (Шивокене, 1989).

Микробиота кишечника представляет собой симбиотическую систему, участвующую в гидролизе питательных веществ, синтезе биологически активных соединений и формировании защитных механизмов организма. У рыб нарушение структурного и количественного состава кишечной микрофлоры приводит к ухудшению процессов пищеварения и снижению эффективности барьерных функций кишечника, что в свою очередь негативно отражается на резистентности и состоянии иммунной системы (Бурлаченко, 2007).

Выращивание рыбы в промышленных условиях, в связи с повышенной плотностью посадки, недостаточностью водообмена, характером и спецификой питания рыб, характеризуется повышенным содержанием в воде органических веществ и увеличением численности различных представителей микрофлоры, не свойственных нормофлоре рыб. Данное явление способствует формированию неспецифичного для рыб микробиоценоза, что в дальнейшем вызывает нарушение процессов переваривания и усвоения пищи, снижение темпа роста, естественной резистентности, что может привести к появлению различных заболеваний бактериальной этиологии (Грищенко, Рудиков, 1985; Грозеску, 2016).

С целью коррекции подобных состояний в аквакультуре наиболее эффективным представляется использование препаратов, способствующих стабилизации деятельности желудочно-кишечного тракта и повышению естественной резистентности рыб, в частности пробиотиков и синбиотиков, в состав которых входят живые культуры микроорганизмов, предназначенные для корректировки кишечной микрофлоры, профилактики и лечения различных заболеваний, связанных с нарушением постоянства внутренней среды организма. Данные препараты оказывают положительное влияние на функционирование желудочно-кишечного тракта, способствуют повышению адаптационных способностей организма, и стимулируют его неспецифический иммунитет. Кроме того, они проявляют антагонистическую активность в отношении широкого круга патогенных и условно-патогенных бактерий и участвуют в реализации ряда ключевых физиологических процессов. Их влияние охватывает регуляцию водно-солевого обмена, метаболические реакции углеводов, белков, липидов и нуклеиновых кислот, синтез и преобразование жирных кислот, формирование колонизационной резистентности, а также процессы иммуногенеза и восстановления тканей кишечника (Воробьев, Лыкова, 1999; Zhandalgarova et al., 2024).

Особую роль в составе пробиотических и синбиотических препаратов играют молочнокислые микроорганизмы. Известно, что они оказывают положительное влияние на морфологию кишечника за счет увеличения длины ворсинок, их плотности и количества. Все это способствует увеличению площади поверхности кишечника и, соответственно, всасыванию питательных веществ в организме (Umair et al., 2022).

Данные микроорганизмы являются естественными обитателями интестинального микробиома организма рыб, продукт метаболизма которых (молочная кислота) обладает рядом положительных свойств. Участвует в стимуляции перистальтики кишечника, выделения пищеварительных соков, а также способствует улучшению усвояемости микроэлементов. Кроме того, данные микроорганизмы обладают способностью противостоять различным

патогенным агентам. За счет выработки биологически активных веществ, в частности, органических кислот, перекиси водорода и антибиотиков, происходит вытеснение патогенных для деятельности кишечника микроорганизмов. Необходимо отметить также, что они оказывают положительное влияние на уровень холестерина в крови и улучшают функционирование печени.

В связи с этим были проведены экспериментальные работы по определению молочнокислых микроорганизмов в кишечнике молоди русского осетра, выращиваемой с использованием синбиотического (опытная 1) и пробиотического (опытная 2) препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте (таблица 15).

Таблица 15 – Численность микроорганизмов на различных средах до начала кормления, КОЕ/г

Среда	Группа		
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2
МПА	$2,15 \times 10^5$	$3,33 \times 10^5$	$2,38 \times 10^5$
Бликфельдта	$2,25 \times 10^5$	$2,68 \times 10^5$	$3,02 \times 10^5$
Ли	$2,78 \times 10^5$	$2,98 \times 10^5$	$3,12 \times 10^5$

При изучении культуральных свойств выделенных микроорганизмов до начала кормления были обнаружены следующие бактериальные колонии: молочного цвета, стелящиеся по субстрату; бежево-молочного цвета, слизистые, округлые; желтого цвета, округлые, глянцевые; коричневого цвета, неправильной формы; бледно-розового цвета, круглые, выпуклые глянцевые. Данные изоляты бактерий имели следующие морфологические признаки: грамположительные палочки р. *Lactobacillus* и грамположительные кокки р. *Pediococcus*, *Leuconostoc*. Анализ количественного состава выделенной микрофлоры позволил установить, что численность микроорганизмов варьировала в пределах $2,15-3,33 \times 10^5$ КОЕ/г.

На 14-е сутки экспериментальных работ был сделан повторный посев кишечника выращиваемых рыб (таблица 16).

Таблица 16 – Численность микроорганизмов на различных средах во время кормления, КОЕ/г

Среда	Группа		
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2
МПА	$1,75 \times 10^5$	$2,65 \times 10^7$	$8,57 \times 10^6$
Бликфельдта	$2,75 \times 10^5$	$3,05 \times 10^5$	$4,85 \times 10^5$
Ли	$8,45 \times 10^4$	$9,25 \times 10^5$	$3,35 \times 10^5$

Численность молочнокислых микроорганизмов на среде МПА в пробе кормов после 5 суток инкубации при 30°C составила: в контрольной группе – $1,75 \times 10^5$ КОЕ/г, в первой опытной группе – $2,65 \times 10^7$ КОЕ/г, во второй опытной группе – $8,57 \times 10^6$ КОЕ/г. Анализ морфологических признаков выделенных молочнокислых микроорганизмов позволил установить, что среди выделенных изолятов были обнаружены грамположительные палочки р. *Lactobacillus*, грамположительные кокки р. *Pediococcus*, *Leuconostoc*.

При посеве на среду Ли численность молочнокислых микроорганизмов в опытных вариантах варьировала в пределах $3,35-9,25 \times 10^5$ КОЕ/г, в то время как в контрольной группе данный показатель был значительно меньше и составил $8,45 \times 10^4$ КОЕ/г. Изучение морфологических свойств выделенных изолятов позволило установить, что в посевах преобладали грамположительные палочки р. *Lactobacillus*.

При посеве фрагментов кишечника на среде Бликфельдта были обнаружены следующие молочнокислые микроорганизмы: грамположительные палочки р. *Lactobacillus* и грамположительные кокки р. *Pediococcus*, *Leuconostoc*. Кроме того, выявлено, что применение пробиотика и синбиотика способствовало увеличению численности молочнокислых микроорганизмов до $4,85 \times 10^5$ КОЕ/г.

По окончании экспериментальных работ был осуществлен повторный посев проб кишечника на различные среды (таблица 17).

Таблица 17 – Численность микроорганизмов на различных средах в конце кормления, КОЕ/г

Среда	Группа		
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2
МПА	$1,25 \times 10^5$	$6,25 \times 10^6$	$8,57 \times 10^7$
Бликфельдта	$1,85 \times 10^5$	$7,37 \times 10^5$	$5,07 \times 10^5$
Ли	$1,63 \times 10^5$	$5,65 \times 10^5$	$3,46 \times 10^6$

В конце исследований численность молочнокислых микроорганизмов на среде МПА имела наибольшее значение во второй опытной группе и составила $8,57 \times 10^7$ КОЕ/г, в то время как наименьшее число колоний было высеяно в контрольной группе ($1,25 \times 10^5$ КОЕ/г). При изучении морфологических признаков выделенных микроорганизмов были обнаружены грамположительные палочки р. *Lactobacillus* и кокки р. *Pediococcus*, *Leuconostoc*.

При посеве на среду Ли численность молочнокислых микроорганизмов также имела максимальные показатели в опытной группе с пробиотиком ($3,46 \times 10^6$ КОЕ/г), в контроле и в опыте с синбиотиком численность варьировала в пределах $1,63-5,65 \times 10^5$ КОЕ/г. При изучении морфологических признаков выделенных молочнокислых микроорганизмов были выделены грамположительные палочки р. *Lactobacillus* и грамположительные кокки р. *Pediococcus*, *Leuconostoc*.

При посеве на среду Бликфельдта установлено, что высеянные бактериальные колонии относились к грамположительным палочкам р. *Lactobacillus*, грамположительным коккам р. *Pediococcus*, *Leuconostoc*.

При изучении влияния пробиотика и синбиотика в составе комбикормов на микрофлору кишечника рыб установлено, что количество выделенных микроорганизмов на средах МПА, Ли, увеличивалось после кормления препаратами во второй опытной группе. При выделении молочнокислых микроорганизмов на среде Бликфельдта происходило незначительное увеличение

микроорганизмов после кормления, при этом наибольший рост микроорганизмов был отмечен в первой опытной группе.

По результатам исследовательских работ можно сделать вывод о положительном влиянии бактериальных препаратов в составе комбикормов для рыб. Их применение способствует увеличению обсемененности кишечника молочнокислыми микроорганизмами, в частности р. *Lactobacillus*, поддерживающими колонизационную резистентность слизистой кишечника к контаминации условно-патогенными микроорганизмами, а также предупреждающими перенос патогенных бактерий из кишечника в органы и ткани рыб. Присутствующие в кишечной микрофлоре педиококковые и лейкопастоковые бактерии характеризуются способностью конвертировать недоступные для рыб углеводы в молочную кислоту, а также поддерживать баланс микрофлоры кишечника и улучшать конверсию корма.

3.3.2 Влияние пробиотического и синбиотического препаратов нового поколения на обсемененность комбикормов молочнокислыми микроорганизмами

Современные тенденции рационального и эффективного кормления требуют весьма значимого смещения акцентов в сторону надежного обеспечения безопасности кормов, используемых для выращивания рыб, в аспекте накопления в пищевых цепях негативных для человека факторов. Известно, что большинство компонентов комбикормов зачастую содержат контаминанты – микроорганизмы или химические вещества, обладающие высокой биологической активностью, присутствие которых в сырье несвойственно и может оказывать негативное воздействие на организм рыб. Поэтому в аквакультуре их присутствие в комбикормах регламентируется показателями безопасности, которые устанавливаются в соответствии с особенностями влияния этих веществ на организм. Имеются сведения, что микробная контаминация комбикормов способствует изменениям их химического состава, снижению пищевой ценности,

приводит к накоплению токсичных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов и нарушает нормальную микрофлору пищеварительного тракта (Незавитин и др., 2000; Бурлаченко, 2007; Бурлаченко, 2008).

В связи с этим возникает необходимость добавлять в состав комбикормов различные препараты, в частности пробиотики и синбиотики, способствующие снижению их микробиологической контаминации. Известно, что данные препараты характеризуются способностью выделять различные биологически активные вещества, препятствующие росту патогенной микрофлоры. Например, молочнокислые бактерии, входящие в их состав, вырабатывают слабые органические кислоты (молочную, уксусную), которые изменяют кислотность среды, создавая неблагоприятные условия для размножения патогенных микроорганизмов (Fidanza, et al., 2021).

Определение количества молочнокислых микроорганизмов в кормах высевом
в жидкие среды (метод НВЧ)

Для выделения молочнокислых микроорганизмов из комбикормов с добавлением пробиотического и синбиотического препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте, был использован метод наиболее вероятных чисел (НВЧ) с применением жидких сред: Бликфельдта, мясопептонный бульон (МПБ), МПБ с NaCl (таблицы 18, 19).

Таблица 18 – Количество молочнокислых микроорганизмов из пробы комбикорма с пробиотиком на среде МПБ

Разведение исходной суспензии	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Число засеянных пробирок	2	2	2	2	2	2
Число пробирок в которых обнаружен рост	2	2	2	1	1	0
НВЧ клеток микроорганизмов	211	-	-	-	-	-
Кол-во клеток микроорганизмов в 1 мл исходной суспензии	13×10^3	-	-	-	-	-

Таблица 19 – Количество молочнокислых микроорганизмов из пробы комбикорма с синбиотиком на среде МПБ

Разведение исходной суспензии	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Число засеянных пробирок	2	2	2	2	2	2
Число пробирок в которых обнаружен рост	2	2	2	1	0	0
НВЧ клеток микроорганизмов	210	-	-	-	-	-
Кол-во клеток микроорганизмов в 1 мл исходной суспензии	6×10^3	-	-	-	-	-

После 5 суток инкубации при температуре 30°C был во всех исследуемых пробах комбикормов был отмечен рост молочнокислых микроорганизмов, о чем свидетельствовало выпадение осадка, изменение цвета среды и наличие пленки.

При пересеве со среды МПБ из 10^{-4} разведения всех образцов комбикормов на плотную среду ПА (питательный агар) в течение 5 суток инкубации при температуре 30°C был выявлен рост микроорганизмов (рисунок 28).

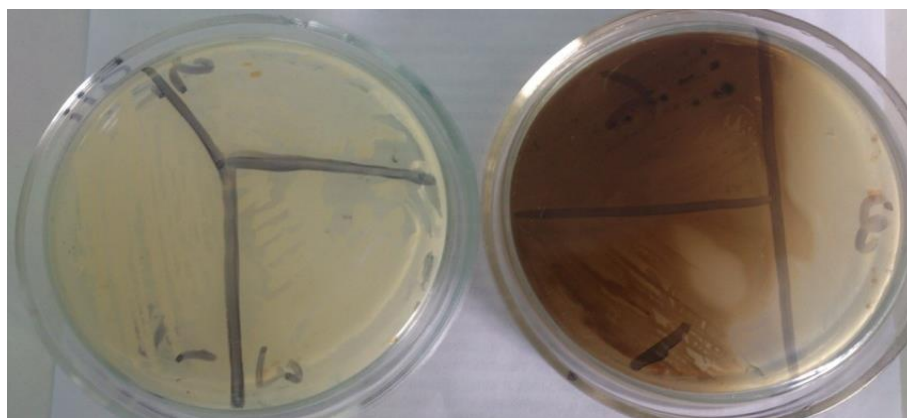


Рисунок 28 – Пересев со среды МПБ на плотную среду ПА

В результате изучения культуральных свойств микроорганизмов во всех образцах корма были обнаружены бактериальные колонии молочного цвета, выпуклые, неправильной формы. Исследования показали, что в жидкой среде МПБ при пересеве на плотную среду ПА не наблюдался рост грамположительных микроорганизмов, что позволяет сделать вывод о том, что во всех образцах комбикормов присутствуют молочнокислые микроорганизмы, относящиеся к р. *Streptococcus*.

При посеве проб комбикормов на жидкую среду МПБ с NaCl на 5-е сутки инкубации при температуре 30°C был выявлен рост молочнокислых микроорганизмов, что отмечено появлением небольшого количества осадка, изменением цвета среды и наличием пленки (таблицы 20, 21).

Таблица 20 – Количество молочнокислых микроорганизмов из пробы комбикорма с пробиотиком на среде МПБ с NaCl

Разведение исходной суспензии	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Число засеянных пробирок	2	2	2	2	2	2
Число пробирок в которых обнаружен рост	1	1	1	1	0	0
НВЧ клеток микроорганизмов	100	-	-	-	-	-
Кол-во клеток микроорганизмов в 1 мл исходной суспензии	$0,6 \times 10^4$	-	-	-	-	-

Таблица 21 – Количество молочнокислых микроорганизмов из пробы комбикорма с синбиотиком на среде МПБ с NaCl

Разведение исходной суспензии	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Число засеянных пробирок	2	2	2	2	2	2
Число пробирок в которых обнаружен рост	1	1	1	0	0	0
НВЧ клеток микроорганизмов	100	-	-	-	-	-
Кол-во клеток микроорганизмов в 1 мл исходной суспензии	$0,6 \times 10^3$	-	-	-	-	-

В результате пересева со среды МПБ с NaCl из 10^{-3} разведения всех образцов комбикормов на среду ПА в течение 5 суток инкубации при температуре 30°C были обнаружены признаки роста микроорганизмов. При изучении культуральных свойств выделенных микроорганизмов, были обнаружены бактериальные колонии молочного цвета, выпуклые, неправильной формы и светло-коричневого цвета (рисунок 29).

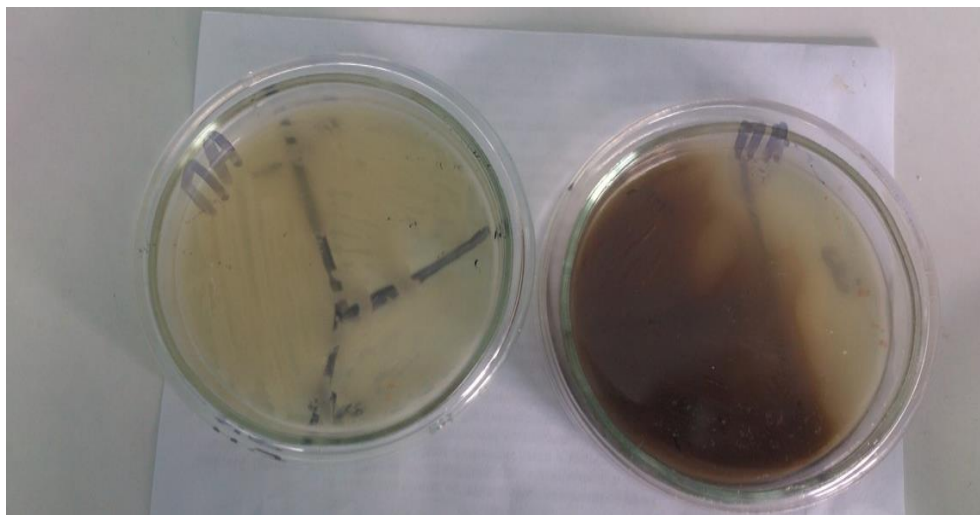


Рисунок 29 – Пересев со среды МПБ с NaCl на плотную среду ПА

При изучении морфологических признаков выделенных микроорганизмов были обнаружены грамположительные палочки р. *Lactobacillus* и грамположительные кокки р. *Pediococcus*, *Leuconostoc* (рисунок 30).

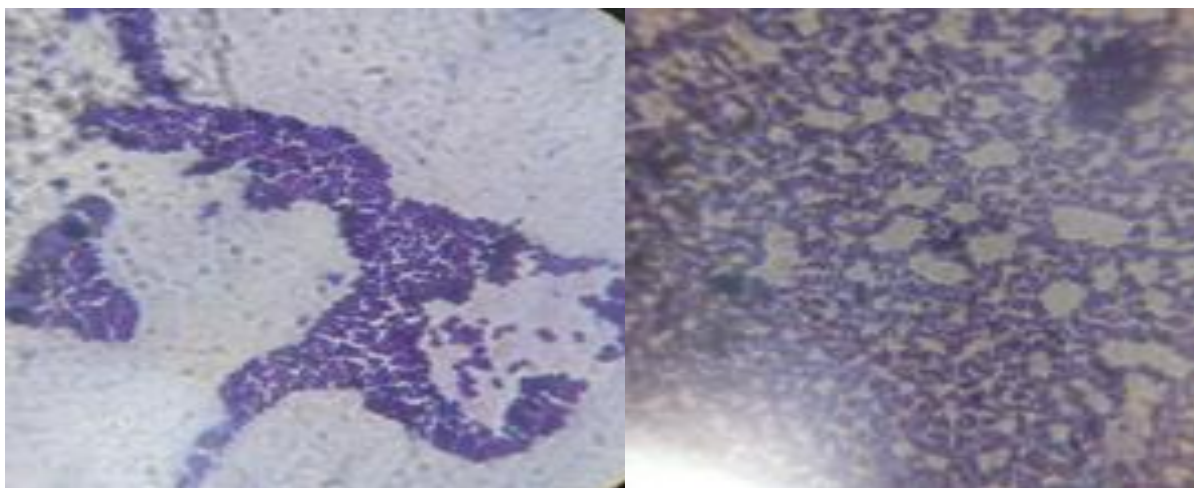


Рисунок 30 – Грамположительные палочки р. *Lactobacillus* и грамположительные кокки р. *Pediococcus*, *Leuconostoc*

При посеве проб комбикормов на среду Бликфельдта на 5-е сутки инкубации при температуре 30°C был выявлен рост молочнокислых микроорганизмов, сопровождающийся появлением осадка, изменением цвета среды и наличием пленки (таблицы 22, 23).

Таблица 22 – Количество молочнокислых микроорганизмов комбикорма с пробиотиком на среде Бликфельдта

Разведение исходной суспензии	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Число засеянных пробирок	2	2	2	2	2	2
Число пробирок в которых обнаружен рост	1	1	0	0	0	0
НВЧ клеток микроорганизмов	100	-	-	-	-	-
Кол-во клеток микроорганизмов в 1 мл исходной суспензии	$0,6 \times 10^2$	-	-	-	-	-

Таблица 23 – Количество молочнокислых микроорганизмов комбикорма с синбиотиком на среде Бликфельдта

Разведение исходной суспензии	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Число засеянных пробирок	2	2	2	2	2	2
Число пробирок в которых обнаружен рост	2	2	1	0	0	0
НВЧ клеток микроорганизмов	210	-	-	-	-	-
Кол-во клеток микроорганизмов в 1 мл исходной суспензии	$6,0 \times 10^3$	-	-	-	-	-

В результате пересева со среды Бликфельдта из 10^{-3} разведения всех образцов кормов на плотную среду Бликфельдта в течение 5 суток инкубации при температуре 30°C был обнаружен рост микроорганизмов (рисунок 31). В результате изучения культуральных свойств выделенных микроорганизмов, были выявлены бактериальные колонии: молочного цвета, выпуклые, неправильной формы; желтого цвета, матовые.



Рисунок 31 – Посев проб комбикормов на среду Бликфельдта

При изучении морфологических признаков выделенных микроорганизмов были обнаружены грамположительные палочки р. *Lactobacillus* (рисунок 32).

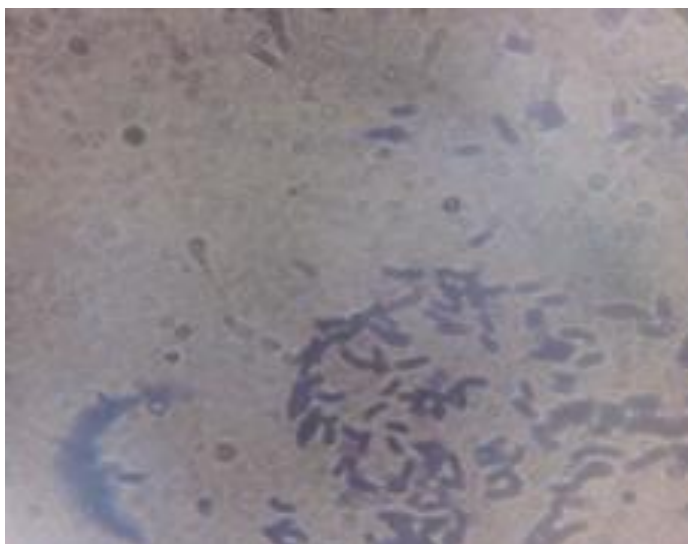


Рисунок 32 – Грамположительные палочки р. *Lactobacillus*

Таким образом, установлено, что в результате выделения молочнокислых микроорганизмов из комбикормов рыб с добавлением пробиотического и синбиотического препаратов в жидких средах был обнаружен рост грамположительных палочек и кокков, относящихся к родам *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*. Отсутствие роста грамположительных микроорганизмов на среде МПБ, свидетельствовало о наличие в кормах молочнокислых микроорганизмов, относящихся к р. *Streptococcus*.

Определение количества молочнокислых микроорганизмов в кормах высеваем на плотные среды

Выделение и изучение молочнокислых микроорганизмов из проб кормов с пробиотическим и синбиотическим препаратами производили методом глубинного посева на среды Ли, Бликфельдта из разведений 10^{-3} и 10^{-4} , на среду ПА из разведений 10^{-5} , 10^{-6} .

Установлено, что численность молочнокислых микроорганизмов на среде ПА в пробах кормов после 5 суток инкубации при 30°C составила: проба №1 (контроль) – $4,92 \times 10^5$ КОЕ/мл, проба № 2 (пробиотик) – $5,25 \times 10^7$ КОЕ/мл, проба № 3 (синбиотик) – $3,04 \times 10^7$ КОЕ/мл.

При изучении морфологических признаков выделенных микроорганизмов были обнаружены: грамположительные палочки р. *Lactobacillus*, грамположительные кокки р. *Pediococcus*, *Leuconostoc* и грамотрицательные палочки (рисунок 33).

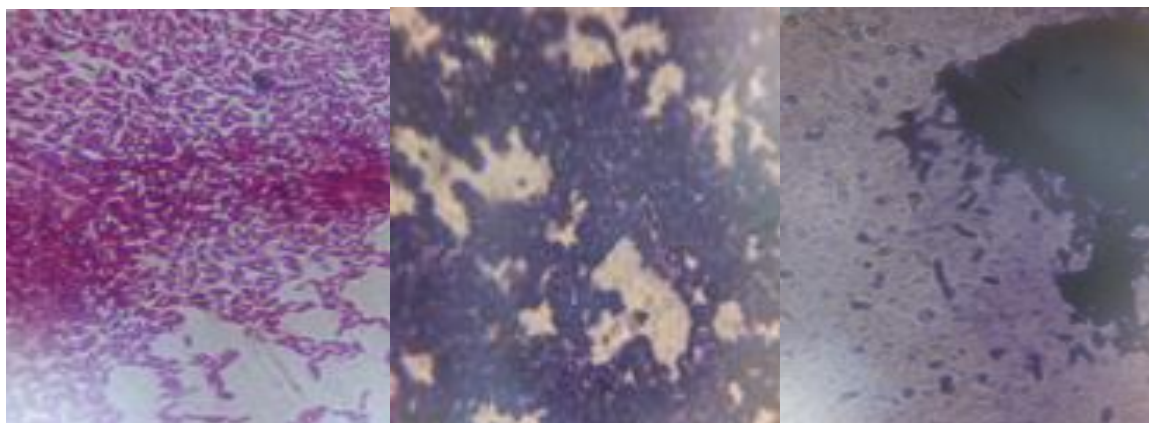


Рисунок 33 – Выделенные молочнокислые микроорганизмы на среде ПА

При посеве на среду Ли через 5 суток после инкубации численность выделенных микроорганизмов составила: проба № 1 (контроль) – $4,62 \times 10^5$ КОЕ/мл, проба № 2 (пробиотик) – $5,77 \times 10^5$ КОЕ/мл, проба № 3 (синбиотик) – $2,83 \times 10^5$ КОЕ/мл. При изучении морфологических признаков выделенных микроорганизмов были обнаружены грамположительные палочки р. *Lactobacillus* (рисунок 34).



Рисунок 34 – Выделенные молочнокислые микроорганизмы на среде ПА

При выделении микроорганизмов на среде Бликфельдта их численность составила: проба № 1 – $1,25 \times 10^5$ КОЕ/мл, проба № 2 – $1,51 \times 10^5$ КОЕ/мл, проба № 3 – $8,55 \times 10^4$ КОЕ/мл. При изучении морфологических признаков выделенных микроорганизмов были обнаружены грамположительные палочки р. *Lactobacillus* (рисунок 35).

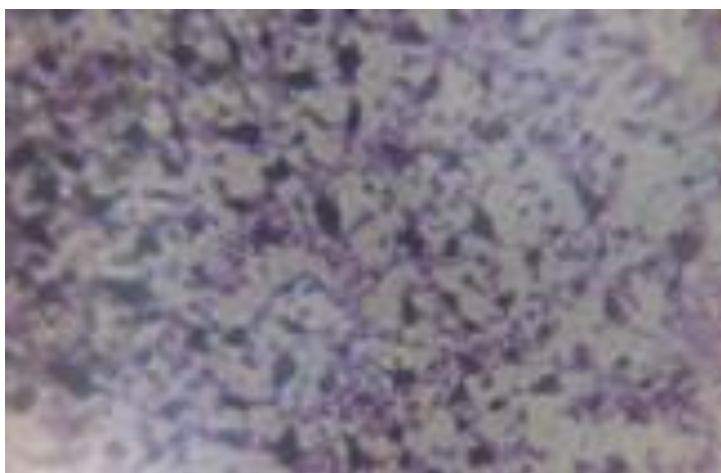


Рисунок 35 – Микроорганизмы р. *Lactobacillus*, высеянные на среде Бликфельдта

В результате проведенных исследований установлено, что при изучении соотношения роста выделенных микроорганизмов на различных средах наиболее интенсивный рост молочнокислых микроорганизмов был отмечен на среде ПА (рисунок 36).

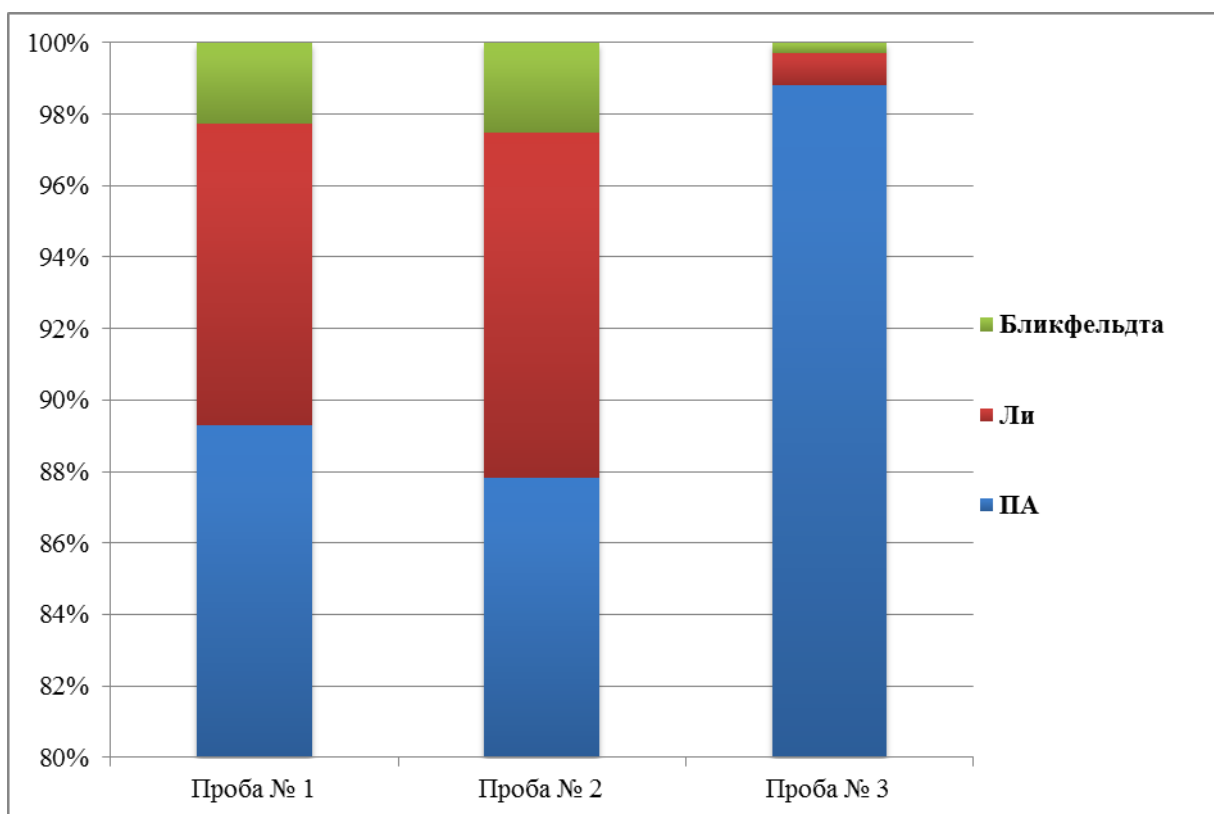


Рисунок 36 – Соотношение численности выделенных молочнокислых микроорганизмов в кормах на различных средах

Таким образом, проведенные микробиологические исследования в пробах кормов с препаратами позволили высеять молочнокислые микроорганизмы – грамположительные палочки и кокки, относящиеся к родам *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*.

3.3.3 Анализ санитарно-микробиологических показателей комбикормов с добавлением пробиотического и синбиотического препаратов

Комбикорма для рыб являются смесью сырьевых компонентов растительного, животного и микробного происхождения. Применяемые для изготовления комбикормов источники сырья, помимо питательных веществ, содержат контаминанты, представляющие собой структурные соединения, вызывающие токсические эффекты, а также ядовитые вещества, образуемые при неправильном хранении. Данные соединения оказывают повреждающее действие

на пищеварительные процессы и функции различных систем организма рыб (Бурлаченко и др., 2002; Бурлаченко, 2007).

Согласно данным В.В. Соколова (2002) общая микробная обсемененность сырья растительного происхождения и продуктов его переработки в кормах не превышает 5×10^5 КОЕ/г, а животного происхождения – $1,2 \times 10^6$ КОЕ/г. Среди компонентов животного происхождения наиболее высокой степенью контаминации характеризуется мясокостная мука ($2,4 \times 10^6$ КОЕ/г). Рыбная мука, содержание которой в кормах для объектов аквакультуры составляет 50-60%, является благоприятной средой для развития различных микроорганизмов. По данным Т.М. Сафроновой и В.И. Шендерюк (2001) непосредственно после изготовления рыбная мука с низким содержанием жира характеризуется меньшей обсемененностью ($4,9 \times 10^4$ КОЕ/г) в сравнении с мукой, содержащей более высокий процент жира ($6,5 \times 10^5$ КОЕ/г).

Общая бактериальная обсемененность комбикормов для рыб по данным различных источников варьирует в пределах от $1,0 \times 10^3$ до $1,0 \times 10^7$ КОЕ/г, однако в некоторых случаях может достигать $1,0 \times 10^{10}$ КОЕ/г (Мирзоева, 2000).

Согласно данным И.В. Бурлаченко (2008) диапазон микробной контаминации комбикормов для рыб составляет $2,9 \times 10^3$ - $2,0 \times 10^9$ КОЕ/г при средней степени не более чем 10^5 - 10^6 , что выше нормативных показателей безопасности – 5×10^5 КОЕ/г (Комбикорма для осетровых и лососевых рыб; ТУ, 2003). Высокий уровень обсемененности, возможно, связан с повышенным содержанием в рыбных кормах продуктов животного происхождения, в частности рыбной и мясокостной муки.

Комбикорма для осетровых рыб включают большое количество продуктов животного происхождения, что является благоприятной основой для массового развития патогенных микроорганизмов (Тец, 1994; Борисов и др., 1984). Негативное влияние данных контаминантов имеет непостоянный, однако быстро нарастающий характер. Поражая комбикорма, патогены не только уничтожают и разрушают их питательные вещества, но и выделяют токсические метаболиты, способные вызывать заболевания и гибель выращиваемых рыб. Предотвратить

негативное воздействие данных микроорганизмов на ослабленную иммунную систему рыб, содержащихся в промышленных условиях, можно путем введения в состав комбикормов пробиотических и синбиотических препаратов (Бурлаченко, 2007).

Исследуемые пробиотический и синбиотический препараты представляют собой комплексы различных штаммов бифидобактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, являющихся источниками пищеварительных ферментов и проявляющих антагонистическое действие в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, в частности *E. coli* и *B. clostridium* (Кулаков, 2003).

В период экспериментальных работ была определена оптимальная норма введения данных препаратов, которая способствовала снижению микробного фона комбикормов при повышенном уровне контаминации.

Сухую форму препаратов вводили в состав стартовых комбикормов в процессе изготовления в экспериментальных дозировках 1, 2, 3 г/кг комбикорма при начальном уровне обсемененности $6,1 \times 10^6$ КОЕ/кг (таблицы 24, 25).

Таблица 24 – Влияние пробиотика на микробный фон комбикормов, КОЕ/г

Продолжительность, сут	Группа			
	Контрольная	I (1 г/кг)	II (2 г/кг)	III (3 г/кг)
начало	$6,1 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$
10	$6,4 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$
30	$6,7 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$
50	$1,2 \times 10^7$	$6,7 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$	$6,9 \times 10^5$
70	$7,7 \times 10^6$	$3,9 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$
90	$6,4 \times 10^6$	$3,2 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$

Таблица 25 – Влияние синбиотика на микробный фон комбикормов, КОЕ/г

Продолжительность, сут	Группа			
	Контрольная	I (1 г/кг)	II (2 г/кг)	III (3 г/кг)
начало	$6,1 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$
10	$6,4 \times 10^6$	$5,9 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$	$5,9 \times 10^6$
30	$6,7 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$
50	$1,2 \times 10^7$	$8,0 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$6,9 \times 10^5$
70	$7,1 \times 10^6$	$4,9 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$
90	$6,4 \times 10^6$	$4,2 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$

В результате проведенных микробиологических исследований было обнаружено, что для кормов всех опытных групп было характерно постепенное снижение уровня бактериальной обсемененности. Необходимо отметить, что в течение первых 30 суток микробный фон комбикормов опытных групп претерпевал незначительные изменения и колебался в пределах от $3,0 \times 10^6$ до $6,1 \times 10^6$ КОЕ/г. Однако на 50-е сутки произошло резкое снижение общего количества микроорганизмов в комбикормах, а на 70-90-е сутки микробный фон стал более стабильным.

В результате наблюдений за бактериальным фоном кормов в течение 90 суток установлено, что в контрольном варианте было отмечено некоторое снижение общего уровня обсемененности. Необходимо отметить, что используемый корм хранился в благоприятных и стабильных условиях.

Установлено, что на 50-е сутки хранения зараженность контрольной партии корма микроорганизмами увеличилась, а к концу третьего месяца хранения его общая бактериальная обсемененность незначительно снизилась и далее уже не изменялась. Наблюдаемые изменения могут быть связаны с активным накоплением в кормах экзотоксинов, которые вырабатываются

микроорганизмами и токсичных соединений, которые способствуют подавлению роста и развития самих микроорганизмов.

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что все исследуемые дозировки пробиотического и синбиотического препаратов оказались эффективными и положительно отразились на микробиологических характеристиках кормов.

Таким образом, при обработке комбикормов дозировками 1-3 г/кг бактериальных препаратов происходило снижение уровня зараженности кормов микроорганизмами. Понижение уровня контаминации в опытных группах было обусловлено антагонистическим действием препаратов в отношении патогенных микроорганизмов.

3.3.4 Оценка микрoэкологического состояния водной среды при использовании пробиотика и синбиотика

Вода является естественной средой обитания многих микроорганизмов. Количество микроорганизмов в 1 мл воды зависит от наличия в ней питательных веществ: чем вода сильнее загрязнена органическими веществами, тем больше в ней микроорганизмов. Особенно опасно попадание болезнетворных бактерий в водопроводную сеть, поэтому за состоянием водоемов и подаваемой из них водопроводной воды установлен санитарно-бактериологический контроль. Возбудителями инфекционных заболеваний являются патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, которые населяют кожные покровы и слизистые оболочки рыб (Бурлаченко, 2008). К таким микроорганизмам можно отнести бактерии рода *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Streptococcus* и т.д. Слизистые оболочки являются естественным барьером, однако при возникновении неблагоприятных условий защитные функции организма могут нарушиться, и бактерии слизистых оболочек проникают во внутренние органы, активно размножаясь и вызывая ряд негативных явлений (Шульга, 2006).

На основании вышесказанного возникает острая необходимость изучения влияния пробиотического и синбиотического препаратов на обсемененность воды при выращивании рыб в промышленных условиях. Для этого был проведен анализ микробного фона воды до кормления, во время кормления и после кормления синбиотиком (опытная 1) и пробиотиком (опытная 2) (рисунок 37).

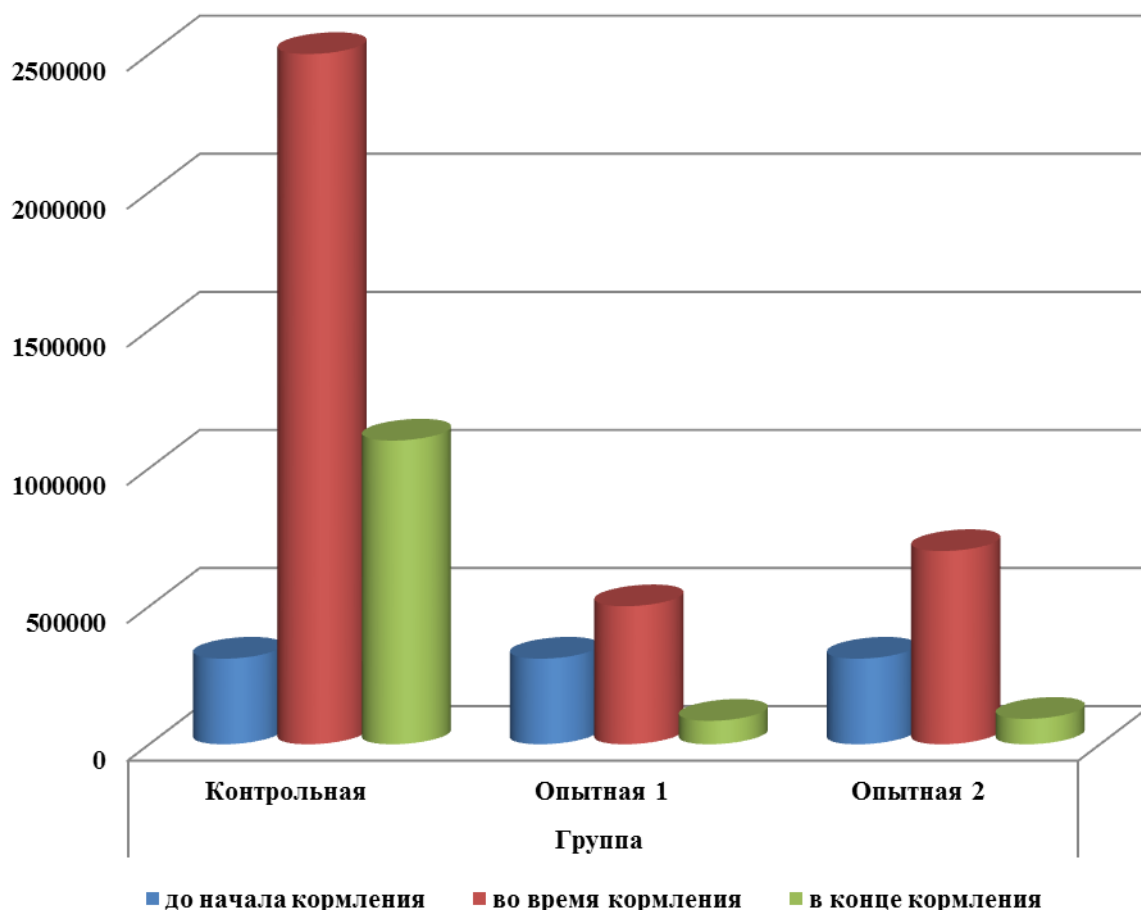


Рисунок 37 – Микробный фон воды при использовании препаратов

Оценка бактериальной обсемененности воды рыбоводных бассейнов позволила сделать вывод о том, что при кормлении рыб комбикормами, содержащими пробиотический и синбиотический препараты, общий микробный фон воды изменялся в сторону снижения общего микробного числа: в группе с синбиотиком (опытная 1) с $3,1 \times 10^5$ до $8,5 \times 10^4$ КОЕ/мл, с пробиотиком (опытная 2) – с $3,1 \times 10^5$ до $9,2 \times 10^4$ КОЕ/мл. Вода контрольного бассейна характеризовалась нестабильным микробным фоном, и наблюдалось его увеличение к концу экспериментальных работ с $3,1 \times 10^4$ до $1,1 \times 10^7$ КОЕ/мл (таблица 26).

Таблица 26 – Обсемененность оборотной воды в период выращивания русского осетра

Период	Группа		
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2
до начала кормления	$3,1 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$
во время кормления	$2,5 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$
в конце кормления	$1,1 \times 10^7$	$8,5 \times 10^4$	$9,2 \times 10^4$

При анализе морфологических свойств выделенных микроорганизмов были выявлены грамположительные палочки, грамположительные спорообразующие палочки, грамположительные кокки. Кроме того, вода контрольного варианта до начала и в конце эксперимента характеризовалась ростом мицелиальных колоний плесневых грибов *Aspergillus niger*, р. *Penicillium*, р. *Trichoderma*, что может быть связано с микробным фоном вносимых комбикормов. В опытных вариантах, в которых рыба выращивалась с применением бактериальных препаратов, патогенной и условно-патогенной микрофлоры выявлено не было.

Результаты бактериологических исследований указывают на положительное влияние пробиотического и синбиотического препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте, на бактериальную обсемененность воды, что выражалось снижением общего микробного числа, а также отсутствием патогенной микрофлоры. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что исследуемые препараты способствуют повышению естественной резистентности рыб благодаря содержащимся в них молочнокислым бактериям и *Bacillus subtilis*, а также служат антагонистом по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам.

3.4 Оценка влияния пробиотика на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, сорбированных на энтеросорбенте СУМС-1, на физиолого-иммунологический статус осетровых рыб

Известно, что применение пробиотических препаратов оказывает выраженное противoinфекционное и иммуномодулирующее действие на организм рыб, снижая вероятность проникновения патогенных вирусов, бактерий и токсичных соединений, а также повышая устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды (Калюжин, 2012; Ушакова и др., 2019; Жандалгарова и др., 2024). Эффективность пробиотиков во многом определяется технологией их производства, в частности, способностью сохранять жизнеспособность и активность микроорганизмов в условиях желудочно-кишечного тракта (Казюлин и др., 2019). Известные подходы основаны на иммобилизации пробиотических штаммов на твердых носителях, включая энтеросорбенты, что обеспечивает их стабильность и пролонгированное действие в организме рыб (Kutics et al., 1986; Boehm, 1994).

Энтеросорбенты проявляют высокую адсорбционную активность за счет развитой поверхности и специфических физико-химических свойств – буферных, ионообменных и сорбционных. Они эффективно связывают и выводят из организма токсичные вещества, включая фенолы, тяжелые металлы, радионуклиды, экзо- и эндотоксины, а также регулируют водно-солевой баланс и кислотно-щелочное состояние. Кроме того, сорбенты способны высвобождать макро- и микроэлементы, необходимые для нормального функционирования организма, тем самым способствуя поддержанию минерального обмена. Совместное использование энтеросорбентов и пробиотических культур способствует сохранению ферментативной активности, улучшению микробного состава кишечника и увеличению эффективности процессов пищеварения.

Таким образом, пробиотические препараты, иммобилизованные на энтеросорбентах, не только способствуют снижению численности патогенной и условно-патогенной микрофлоры, но и оказывают положительное влияние на

Исследуемый сорбированный пробиотический препарат представляет собой консорциум бифидобактерий: *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis* и лактобактерий: *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, иммобилизованный на пористом модифицированном углеродом энтеросорбенте СУМС-1.

Таблица 27 – Показатели выращивания бестера при использовании пробиотика

Показатель	Группа / Дозировка пробиотика			
	Контрольная	Опытная 1 (5 г/кг)	Опытная 2 (7 г/кг)	Опытная 3 (9 г/кг)
1	2	3	4	5
Масса, г: начальная	184,9±1,95	183,4±2,11	186,3±2,14	185,8±1,82
конечная	203,3±2,05	207,8±1,87	215,7±2,32	205,3±2,11
Абсолютный прирост, г	18,4	24,4	29,4	19,5
Среднесуточный прирост, г	0,61	0,81	0,98	0,65

Продолжение таблицы 27

1	2	3	4	5
Среднесуточная скорость роста, %	0,32	0,42	0,49	0,33
Коэффициент упитанности по Фультону	0,41	0,42	0,42	0,39
Коэффициент массонакопления	0,02	0,02	0,03	0,02
Период выращивания, сут.	30	30	30	30

У рыб данной группы были зафиксированы максимальные значения абсолютного прироста массы (29,4 г), среднесуточного прироста (0,98 г) и среднесуточной скорости роста (0,49%), что свидетельствует о более эффективном использовании питательных веществ и общей оптимизации роста.

Известно, что оценка физиологического статуса рыб является актуальной проблемой современной аквакультуры. Кровь является наиболее чувствительным и информативным индикатором изменений, происходящих в организме рыб. Она быстро и остро реагирует на воздействие различных неблагоприятных факторов окружающей среды и может служить одним из ранних показателей нарушения функционального состояния рыб (Жандалгарова и др., 2023).

Установлено, что применение пробиотического препарата в сорбированной форме положительно отразилось на физиолого-биохимических показателях крови бестера (таблица 28). В опытных группах была отмечена выраженная тенденция к увеличению содержания гемоглобина и общего белка на протяжении всего эксперимента: в первой группе – до 58,7 и 23,2 г/л, во второй – до 64,2 и 23,6 г/л, в третьей – до 63,8 и 22,6 г/л, соответственно. Дополнительно выявлено, что применение пробиотика-энтеросорбента сопровождалось снижением уровней холестерина и глюкозы в крови, что указывает на нормализацию отдельных звеньев обмена веществ и улучшение общего физиологического состояния выращиваемых рыб. Известно, что на уровень глюкозы в крови рыб оказывают

огромное влияние условия их содержания. Так, например, Попов (1973) считает, что концентрация сахара в крови рыб увеличивается при их содержании в аквариумах и садках, а понижение данного показателя характерно для рыб, выращиваемых в бассейнах.

Установлено, что в конце экспериментальных работ произошло снижение СОЭ до 1,9 мм/ч в крови рыб контрольной группы, что ниже нормативных показателей (2-10 мм/ч), и свидетельствует о нарушении в физиологическом статусе исследуемых рыб.

Таблица 28 – Физиолого-биохимические показатели крови бестера при использовании пробиотика-энтеросорбента (n=20)

Показатель	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
до начала исследования				
Гемоглобин, г/л	58,4±1,01	57,3±1,21	59,1±0,82	58,1±1,09
СОЭ, мм/ч	2,2±0,09	2,5±0,12	3,0±0,12***	2,4±0,11
Общий белок, г/л	20,4±0,81	21,2±0,65	21,4±0,52	20,5±0,57
Холестерин, ммоль/л	3,62±0,13	3,59±0,10	3,44±0,10	3,32±0,08
Глюкоза ммоль/л	0,89±0,05	0,92±0,05	1,20±0,07***	1,04±0,06
в конце исследования				
Гемоглобин, г/л	58,6±1,38	58,7±1,35	64,2±0,99**	63,8±1,02**
СОЭ, мм/ч	1,9±0,13	2,2±0,09	2,4±0,14**	2,0±0,03
Общий белок, г/л	20,6±0,27	23,2±0,43***	23,6±0,29***	22,6±0,58**
Холестерин, ммоль/л	4,62±0,12	3,02±0,09***	2,74±0,05***	2,76±0,06***
Глюкоза ммоль/л	1,10±0,04	0,98±0,06	0,67±0,02***	0,83±0,04***

Примечание: различия достоверны при ** - $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Таким образом, использование пробиотического препарата, иммобилизованного на энтеросорбенте СУМС-1, способствует улучшению

физиолого-биохимических показателей и в целом положительно влияет на функциональное состояние выращиваемых рыб.

Проведенный анализ лейкограммы периферической крови бестера при использовании пробиотика-энтеросорбента представлен в таблице 29, рисунках 38-41.

Таблица 29 – Лейкоцитарная формула периферической крови бестера, % (n=10)

Показатели	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
Лимфоциты	72,94±1,03	73,94±1,12	76,65±1,37**	75,46±1,42**
Моноциты	4,41±0,13	3,95±0,12**	2,24±0,08***	3,42±0,13***
Сегментоядерные нейтрофилы	15,80±0,40	16,84±0,44***	16,25±0,43***	15,65±0,42***
Палочкоядерные нейтрофилы	4,30±0,07	3,12±0,33***	3,21±0,12***	3,37±0,28*
Эозинофилы	2,55±0,18	2,15±0,10	1,65±0,14	2,10±0,13

Примечание: различия достоверны при ** - $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

В лейкоцитарной формуле исследуемых рыб наблюдалось перераспределение различных групп лейкоцитов. Так, у бестера отмечался сдвиг в сторону увеличения лимфоцитов за счет снижения нейтрофилов и эозинофилов. Доля лимфоцитов в опытных группах колебалась в пределах от 72,94 до 76,65%. Разница между содержанием лимфоцитов в вариантах опыта и контролем составляла от 1,4 до 4,8% и была статистически достоверной. Данным клеткам принадлежит ведущая роль во всех реакциях приобретенного иммунитета, поскольку они специфически распознают конкретный возбудитель вне зависимости от его месторасположения: внутри или вне клеток, в тканевой жидкости или в крови. Эти процессы основаны на неспецифических механизмах распознавания, позволяющих связывать самые разнообразные микробные продукты, и относятся к проявлениям врожденного иммунитета и образуют первую линию защиты против инфекции (Ройт и др., 2000; Койхо и др., 2008).

Известно, что пробиотики оказывают положительное влияние на иммунный статус организма, стимулируя фагоцитоз и вызывая кратковременное повышение функциональной активности лимфоцитов (Kazimierczak et al., 2019).

Полиморфноядерные нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы) составляют вторую значительную группу фагоцитирующих клеток. Данные клетки мигрируют в ткани, отвечая на определенные стимулы, и относятся к короткоживущим клеткам, которые поглотив чужеродный материал, разрушают его и затем погибают. В анализируемой лейкоцитарной картине крови бестера у рыб экспериментальных групп было отмечено снижение доли нейтрофилов до 19,96%. В контрольной группе наблюдалось небольшое увеличение данного показателя (20,1%), что может отражать активацию гранулопоэза в ответ на неблагоприятные воздействия, при которых нейтрофилы выделяют в кровотоки биологически активные вещества с бактерицидными и детоксикационными свойствами. Доля моноцитов в контрольной и опытных группах оставалась сопоставимой и не превышала 4,41% от общего числа просчитанных клеток. Низкий процент моноцитов расценивается как индикатор удовлетворительного физиологического состояния исследуемых рыб (Волков, 1971).

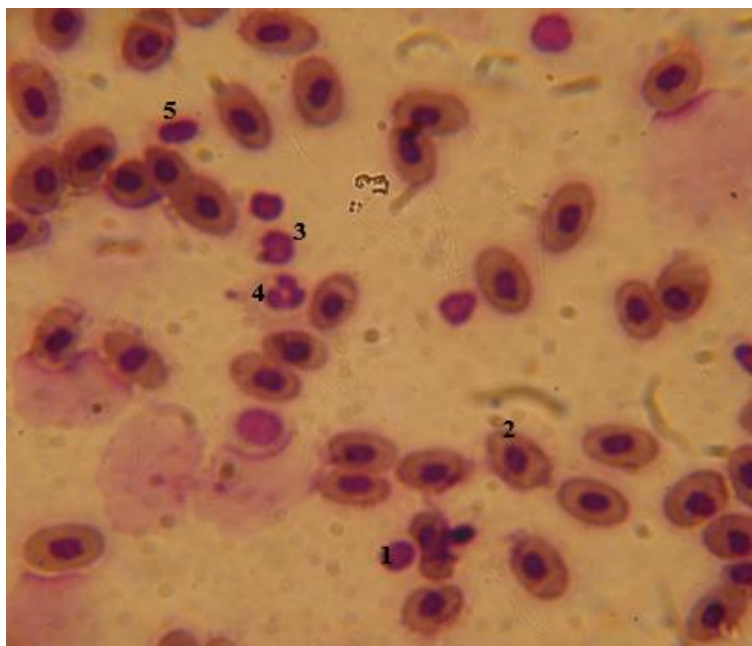


Рисунок 38 – Мазок крови рыб контрольной группы:

1 – лимфоцит; 2 – эритроцит; 3 – моноцит; 4 – сегментоядерный нейтрофил; 5 – тромбоцит. Окраска азур-эозином по Романовскому-Гимзе. Увеличение 1000

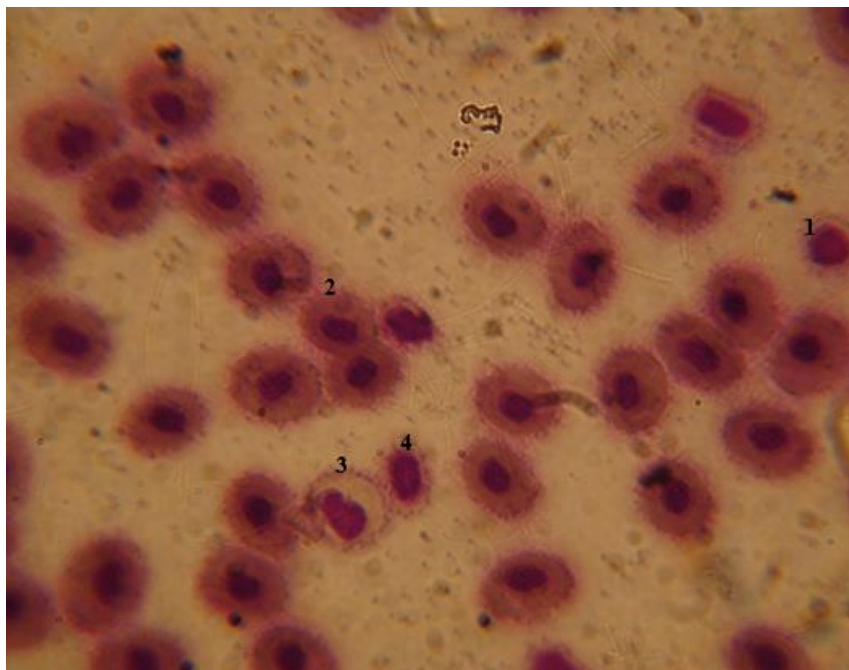


Рисунок 39 – Мазок крови рыб первой опытной группы:

1 – лимфоцит; 2 – эритроцит; 3 – моноцит; 4 – тромбоцит. Окраска азур-эозином по Романовскому-Гимзе. Увеличение 1000

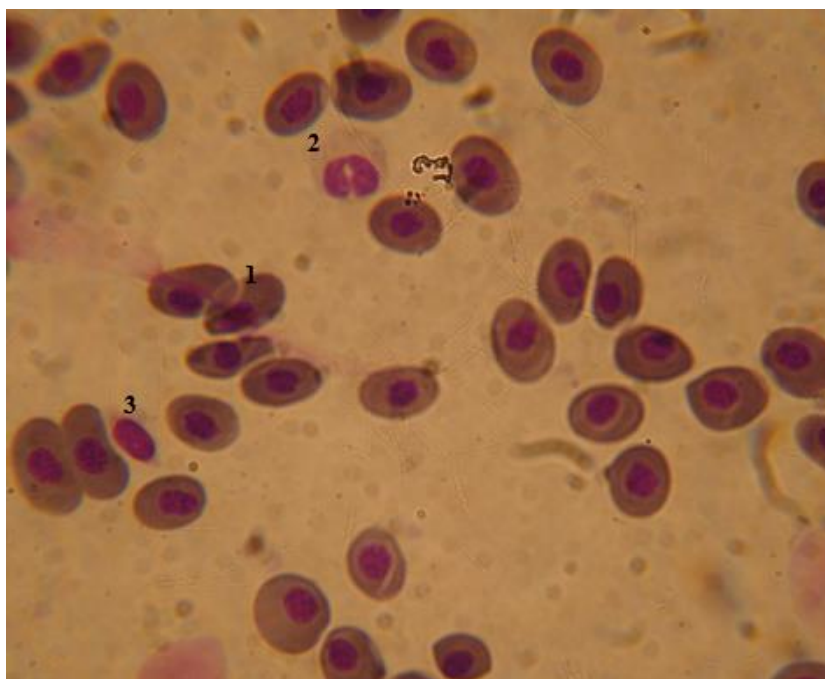


Рисунок 40 – Мазок крови рыб второй опытной группы:

1 – эритроцит; 2 – палочкоядерный нейтрофил; 3 – тромбоцит. Окраска азур-эозином по Романовскому-Гимзе. Увеличение 1000

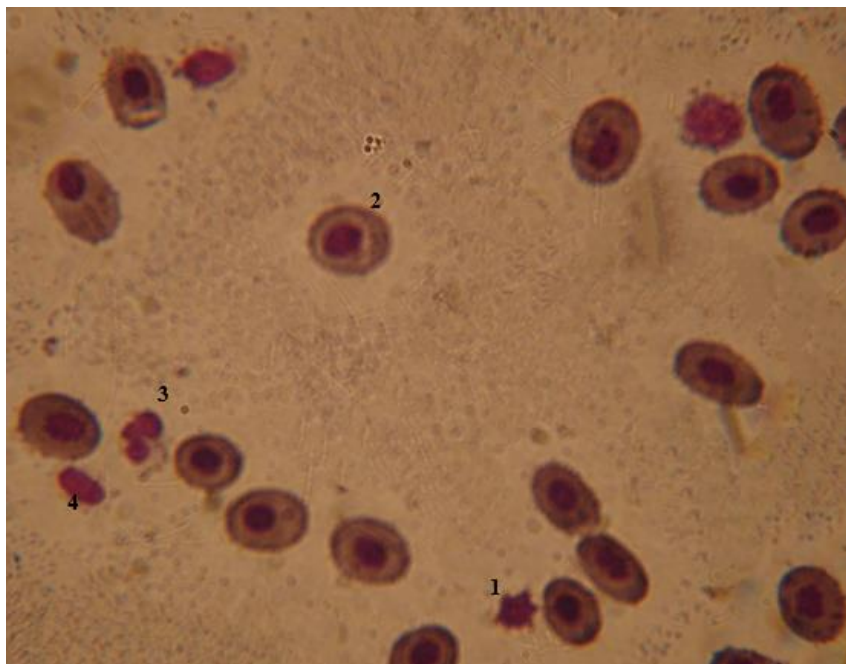


Рисунок 41 – Мазок крови рыб третьей опытной группы:

1 – лимфоцит; 2 – эритроцит; 3 – сегментоядерный нейтрофил; 4 – тромбоцит. Окраска азур-эозином по Романовскому-Гимзе. Увеличение 1000

Таким образом, результаты проведенных экспериментальных исследований свидетельствуют о выраженном положительном влиянии сорбированной формы пробиотического препарата на рыбоводно-биологические и физиолого-биохимические показатели выращиваемых рыб. Наиболее значимый эффект отмечен при использовании дозировки 7 г/кг, при которой наблюдались оптимальные темпы роста, улучшение состояния крови и стабилизация метаболических показателей. Совокупность полученных данных подтверждает благополучное физиологическое состояние рыб и адекватность условий их содержания в ходе эксперимента.

3.4.2 Анализ влияния пробиотика на энтеросорбенте СУМС-1 на рыбоводно-биологические и физиолого-иммунологические показатели стерляди

В результате проведенных исследований установлено, что при выращивании стерляди наиболее эффективной оказалась дозировка

пробиотического препарата 7 г/кг (опытная 2) (таблица 30). Величина абсолютного прироста в данной группе составила 28,88 г, что выше всех исследуемых групп, в том числе на 5,14 г выше, чем в контроле. Показатель среднесуточной скорости роста был также выше во второй опытной группе и составил 1,20%. Коэффициент упитанности по Фультону не претерпевал значительных изменений и колебался в пределах 0,30-0,31.

Таблица 30 – Результаты выращивания стерляди с применением пробиотика на энтеросорбенте

Показатель	Группа / Дозировка пробиотика			
	Контрольная	Опытная 1 (5 г/кг)	Опытная 2 (7 г/кг)	Опытная 3 (9 г/кг)
Масса начальная, г	66,51±1,23	67,19±2,58	67,25±2,76	65,91±2,87
Масса конечная, г	90,25±2,54	94,85±1,83	96,13±2,49	92,68±3,21
Абсолютный прирост, г	23,74	27,66	28,88	26,77
Среднесуточный прирост, г	0,79	0,92	0,96	0,89
Среднесуточная скорость роста, %	1,02	1,16	1,20	1,14
Коэффициент массонакопления	0,04	0,05	0,05	0,05
Коэффициент упитанности по Фультону	0,30	0,30	0,31	0,30
Выживаемость, %	100	100	100	100
Период выращивания, сут.	30	30	30	30

Кровь является ключевым компонентом внутренней среды организма и оперативно реагирует на широкий спектр внешних и внутренних воздействий. В гематологических исследованиях рыб диагностически значимыми считаются показатели, характеризующие состояние эритроцитарного и лейкоцитарного звеньев крови: концентрация гемоглобина, численность эритроцитов и

лейкоцитов, распределение клеток в лейкоцитарной формуле, а также абсолютное содержание отдельных популяций лейкоцитов. Комплексная оценка расширенного набора гематологических параметров обеспечивает более точное и объективное представление о физиологическом статусе организма рыб (Головина, 1998; Вараксина и др., 2023).

Анализ гематологических показателей стерляди, в рацион которых входили комбикорма с пробиотическим препаратом, иммобилизованным на энтеросорбенте, не показал никаких признаков заболеваний рыб (таблица 31).

Таблица 31 – Гематологические показатели стерляди при использовании пробиотика-энтеросорбента (n=20)

Показатель	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
до начала исследования				
Гемоглобин, г/л	39,78±1,42	40,58±1,16*	41,96±1,45**	38,16±1,76
СОЭ, мм/ч	2,50±0,17	3,50±0,16***	3,13±0,20*	3,04±0,22
Гематокрит, %	26,3±0,73	28,2±0,44	29,7±0,51***	27,9±0,82
Эритроциты, 10 ⁶ мкл	0,78±0,03	0,91±0,03	0,92±0,02***	0,82±0,02***
СГЭ, пг	51,0±2,03	44,6±2,77	45,6±2,12	46,5±2,00
в конце исследования				
Гемоглобин, г/л	43,29±1,53	47,37±0,70*	49,17±0,77***	44,64±1,18
СОЭ, мм/ч	3,25±0,26	3,10±0,22	3,05±0,17	2,50±0,24
Гематокрит, %	22,7±0,84	25,3±0,47**	27,6±0,60***	26,1±0,73**
Эритроциты, 10 ⁶ мкл	0,69±0,03	0,80±0,06	0,84±0,05**	0,77±0,04*
СГЭ, пг	62,7±2,06	59,2±1,84	58,5±1,61	58,0±1,33

Примечание: различия достоверны при * P≤0,05; ** P≤0,01; *** P≤0,001

В результате анализа гематологических параметров стерляди была выявлена выраженная положительная реакция организма на включение пробиотика-

энтеросорбента в состав комбикормов. Наиболее существенные изменения были отмечены по уровню гемоглобина: в опытных вариантах его концентрация возрастала по сравнению с контролем и достигала максимального значения в группе с дозировкой 7 г/кг – 49,17 г/л. Данное увеличение, оставаясь в пределах физиологической нормы, может отражать усиление обменных процессов и улучшение обеспеченности тканей рыб кислородом при применении пробиотика.

Особое диагностическое значение имеют показатели гематокрита, численности эритроцитов и среднее содержание гемоглобина в эритроците (СГЭ). Гематокритный показатель, характеризующий долю форменных элементов в общем объеме крови, был статистически достоверно выше в варианте с дозировкой 7 г/кг и составил 27,6% ($P \leq 0,001$). У стерляди контрольной группы данный параметр был сниженным (22,7%), что согласуется с меньшим количеством эритроцитов ($0,69 \times 10^6$ мкл). Эти различия подтверждают стимулирующее влияние пробиотика на эритропоэз и функциональную активность кроветворной системы. Показатель СГЭ оставался относительно стабильным во всех вариантах, однако в контроле достигал 62,7 пг, тогда как в опыте имел тенденцию к умеренному снижению. Подобная динамика может свидетельствовать о более рациональном распределении гемоглобина между клеточными элементами и повышении эффективности кислородного обмена у рыб, получавших пробиотик-энтеросорбент.

В целом, использование пробиотического препарата способствовало улучшению состояния кроветворной и микроциркуляторной систем стерляди, что выражалось в увеличении уровня гемоглобина, гематокрита и числа эритроцитов. Данные изменения свидетельствуют о повышении физиологической устойчивости и адаптационного потенциала рыб в условиях индустриального выращивания.

Анализ биохимических показателей крови показал, что применение сорбированной формы пробиотического препарата способствует улучшению картины крови стерляди (таблица 32). Так, у рыб опытных групп наблюдалась тенденция к повышению концентрации общего белка от начала эксперимента к его окончанию (опытная 1 – 25,76 г/л, опытная 2 – 27,88 г/л, опытная 3 – 26,79 г/л,

соответственно). Уровень триглицеридов, глюкозы и холестерина снижался в конце выращивания, но находился в пределах физиологической нормы, что может быть связано с адаптацией стерляди к условиям содержания и ее способностью поддерживать гомеостаз. Отмечено, что у рыб опытных групп данный процесс протекал более интенсивно, что может свидетельствовать о положительном влиянии пробиотического препарата.

Таблица 32 – Биохимические показатели крови стерляди при применении пробиотика-энтеросорбента (n=20)

Показатель	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
до начала исследования				
Общий белок, г/л	17,33±0,27	16,89±0,33	17,55±0,41	17,28±0,30
Триглицериды, ммоль/л	5,05±0,15	4,97±0,13	4,83±0,07	4,74±0,13
Глюкоза, ммоль/л	5,27±0,10	4,79±0,12**	4,57±0,13***	5,17±0,20
Холестерин, ммоль/л	2,64±0,04	2,81±0,07*	2,74±0,06	2,59±0,07
СРБ, мг/л	< 6	< 6	< 6	< 6
в конце исследования				
Общий белок, г/л	20,39±0,78	25,76±0,69***	27,88±0,52***	26,79±0,45***
Триглицериды, ммоль/л	4,98±0,13	3,87±0,14***	3,54±0,09***	3,79±0,10***
Глюкоза, ммоль/л	4,62±0,16	3,97±0,08***	3,28±0,05***	4,05±0,06**
Холестерин, ммоль/л	2,37±0,19	2,01±0,10	1,96±0,10	2,16±0,11
СРБ, мг/л	< 6	< 6	< 6	< 6

Примечание: различия достоверны при * P≤0,05; ** P≤0,01; *** P≤0,001

Проведенный анализ лейкограммы периферической крови стерляди при использовании пробиотика-энтеросорбента представлен в таблице 33, на рисунке 42.

Таблица 33 – Лейкоцитарная формула периферической крови стерляди, % (n=10)

Показатели	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
Лимфоциты	71,15±1,11	74,54±1,14*	76,23±1,13**	75,21±1,39*
Моноциты	5,11±0,22	4,25±0,32*	3,79±0,33**	3,85±0,28***
Сегментоядерные нейтрофилы	18,46±0,61	15,49±0,30	14,29±0,35	15,15±0,44
Палочкоядерные нейтрофилы	2,95±0,18	3,55±0,17*	3,44±0,12*	3,23±0,17
Эозинофилы	2,33±0,18	2,17±0,15	2,25±0,08	2,56±0,14

Примечание: различия достоверны при * P≤0,05; ** P≤0,01; *** P≤0,001

Анализ лейкоцитарной формулы годовиков стерляди показал изменение количественного соотношения отдельных популяций лейкоцитов в условиях применения пробиотического препарата. Для рыб опытных групп было характерно увеличение доли лимфоцитов, достигавшее наиболее высоких значений во второй опытной группе (76,23%), что может рассматриваться как признак активации иммунных реакций и повышения функциональной активности лимфоидного звена иммунной системы. Одновременно отмечалось уменьшение содержания моноцитов до 3,79%, что соответствует нормализации процессов фагоцитоза и поддержанию иммунного гомеостаза при воздействии биологически активной добавки.

В опытных вариантах выращивания также было зарегистрировано снижение относительной численности сегментоядерных нейтрофилов, что отражает перестройку баланса иммунокомпетентных клеток, а выявленное незначительное увеличение палочкоядерных форм может указывать на вовлечение компенсаторных механизмов иммунной системы. Содержание эозинофилов во

всех вариантах опыта находилось на стабильном уровне, что соответствует отсутствию признаков аллергических и паразитарных реакций.

Необходимо отметить, что наиболее оптимальные изменения в лейкоцитарном профиле стерляди наблюдались во второй опытной группе (7 г/кг). Здесь было зафиксировано максимальное достоверное увеличение уровня лимфоцитов ($P \leq 0,01$) наряду с наибольшим снижением количества моноцитов ($P \leq 0,01$) и минимальным уровнем сегментоядерных нейтрофилов (14,29%), что в совокупности свидетельствует о благоприятном влиянии пробиотического препарата на иммунную систему стерляди.

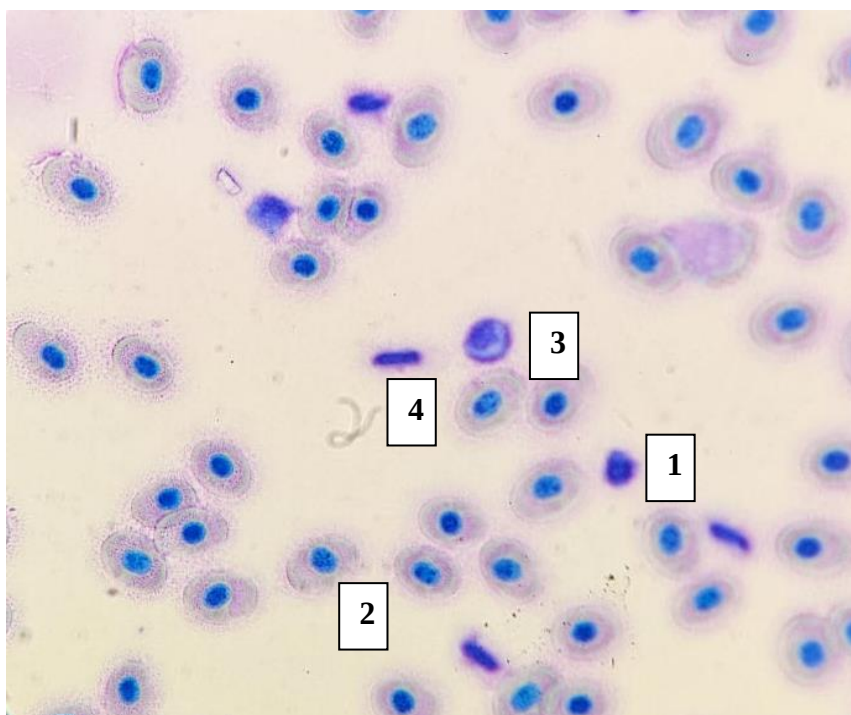


Рисунок 42 – Мазок крови стерляди:

1 – лимфоцит; 2 – эритроцит; 3 – моноцит; 4 — тромбоцит. Окраска азуро-эозином по Романовскому-Гимзе. Увеличение 1000

Анализ индекса сдвига лейкоцитов показал, что во всех опытных группах наблюдалось его снижение в сравнении с контролем, что свидетельствует о снижении напряженности иммунного ответа (таблица 34).

Таблица 34 – Влияние пробиотика на ИСЛ в крови стерляди (n=10)

Группа	Индекс сдвига лейкоцитов
Контрольная	0,31±0,02
Опытная 1	0,27±0,03
Опытная 2	0,25±0,01**
Опытная 3	0,27±0,11

Примечание: различия достоверны при ** $P \leq 0,01$

Наиболее выраженное уменьшение ИСЛ было зафиксировано во второй опытной группе (0,25±0,01), что может указывать на стабилизацию иммунного состояния и снижение воспалительных процессов. В остальных опытных группах также было отмечено снижение данного показателя, однако оно было менее выражено. Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии пробиотического препарата на энтеросорбенте на иммунную систему осетровых рыб.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования позволили сделать вывод о том, что применение пробиотика-энтеросорбента оказывает положительное влияние на рыбоводно-биологические, гематологические, морфобиохимические и иммунологические показатели крови выращиваемых рыб.

3.4.3 Оценка влияния пробиотика, иммобилизованного на энтеросорбенте СУМС-1, на иммунологическое состояние русско-ленского осетра

В условиях интенсивного развития индустриальной аквакультуры возросла необходимость углубленного исследования иммунной системы и механизмов иммунного ответа у рыб. При организации выращивания объектов аквакультуры важно создавать такие условия содержания, которые обеспечивали бы поддержание оптимальной активности врожденных защитных реакций. Доказано, что иммунный статус рыб в значительной степени определяется внешними

факторами, а среда их обитания выступает одним из ключевых регуляторов иммунной реактивности и адаптационных возможностей организма (Микряков, 1991; Жандалгарова и др., 2023).

Установлено, что нормальный микробиоценоз пищеварительного тракта является важнейшим фактором поддержания гомеостаза организма, обеспечивая участие в ключевых метаболических процессах и оказывая значимое влияние на формирование и функционирование иммунной системы, что в совокупности обеспечивает эффективную противoinфекционную защиту. В последние годы накоплены сведения, подтверждающие центральную роль кишечной микробиоты в регуляции иммунного ответа и поддержании иммунного гомеостаза. Несмотря на это, остается актуальным вопрос о возможностях и механизмах применения пробиотических препаратов для целенаправленного модулирования иммунной реактивности рыб.

Пробиотики различного состава и разных производителей отличаются как по пробиотическим, так и по иммунотропным эффектам. Между их способностью восстанавливать расстройства микробиоты и их иммуномодулирующей активностью не всегда существует прямая связь. Установлено, что пробиотические препараты, прикрепляясь к различным рецепторам, способны взаимодействовать с иммунной системой рыб, в частности влиять на врожденный и адаптивный иммунный ответ, а также локальный и системный ответ (Ермоленко, 2014).

Кроме того, пробиотики на системном уровне улучшают гематологическую и иммунологическую картину, тогда как на локальном уровне они могут улучшить барьерную функцию и модулировать пути экспрессии генов. Так как у рыб основная роль отводится врожденной иммунной системе, этот механизм может обеспечить широкий спектр устойчивости к заболеваниям, вызываемым различными патогенами (Плотникова, Захарова, 2020).

В некоторых пробиотических препаратах, помимо симбиотических бактерий, могут присутствовать дополнительные компоненты, включая энтеросорбенты, которые в совокупности оказывают комплексное влияние на

иммунные реакции организма. Эффективность таких сорбированных пробиотиков во многом определяется формой их выпуска, обеспечивающей повышенную биодоступность и доставку живых бактерий в оптимальном количестве в необходимые отделы кишечника, что способствует реализации их биологического действия.

В связи с этим использование иммобилизованных форм пробиотических препаратов в условиях индустриальной аквакультуры с целью повышения физиолого-иммунологического статуса рыб является актуальным.

3.4.3.1 Влияние пробиотика-энтеросорбента на показатели гуморального иммунитета русско-ленского осетра

В защите рыб от неблагоприятных факторов окружающей среды и поддержании иммунного гомеостаза принимают активное участие гуморальные компоненты иммунной системы, к которым относят иммуноглобулины, систему комплемента, лизоцим, бактерицидную активность сыворотки крови, интерферон, пропердин и т.д. (Лукьяненко, 1989; Микряков, 1991, 2001; Валедская, 2005).

В настоящее время в полной мере у рыб изучены такие факторы, как комплемент, пропердин, лизоцим, естественный антитела и БАСК (Микряков, 2001). Бактерицидная активность сыворотки крови является наиболее лабильным параметром иммунореактивности, что связано с многокомпонентностью данного показателя. БАСК обеспечивается комплексом гуморальных факторов, таких как пропердин, естественные антитела, лизоцим, комплемент и др. Данный показатель отражает общую неспецифическую иммунореактивность организма и характеризует напряженность гуморального звена естественного иммунитета (Валедская, 2005). Установлено, что до начала экспериментальных исследований уровень БАСК русско-ленского осетра составил 48%, однако через 14 суток под влиянием пробиотического препарата на энтеросорбенте СУМС-1 он повысился во всех опытных группах (таблица 35, рисунок 43).

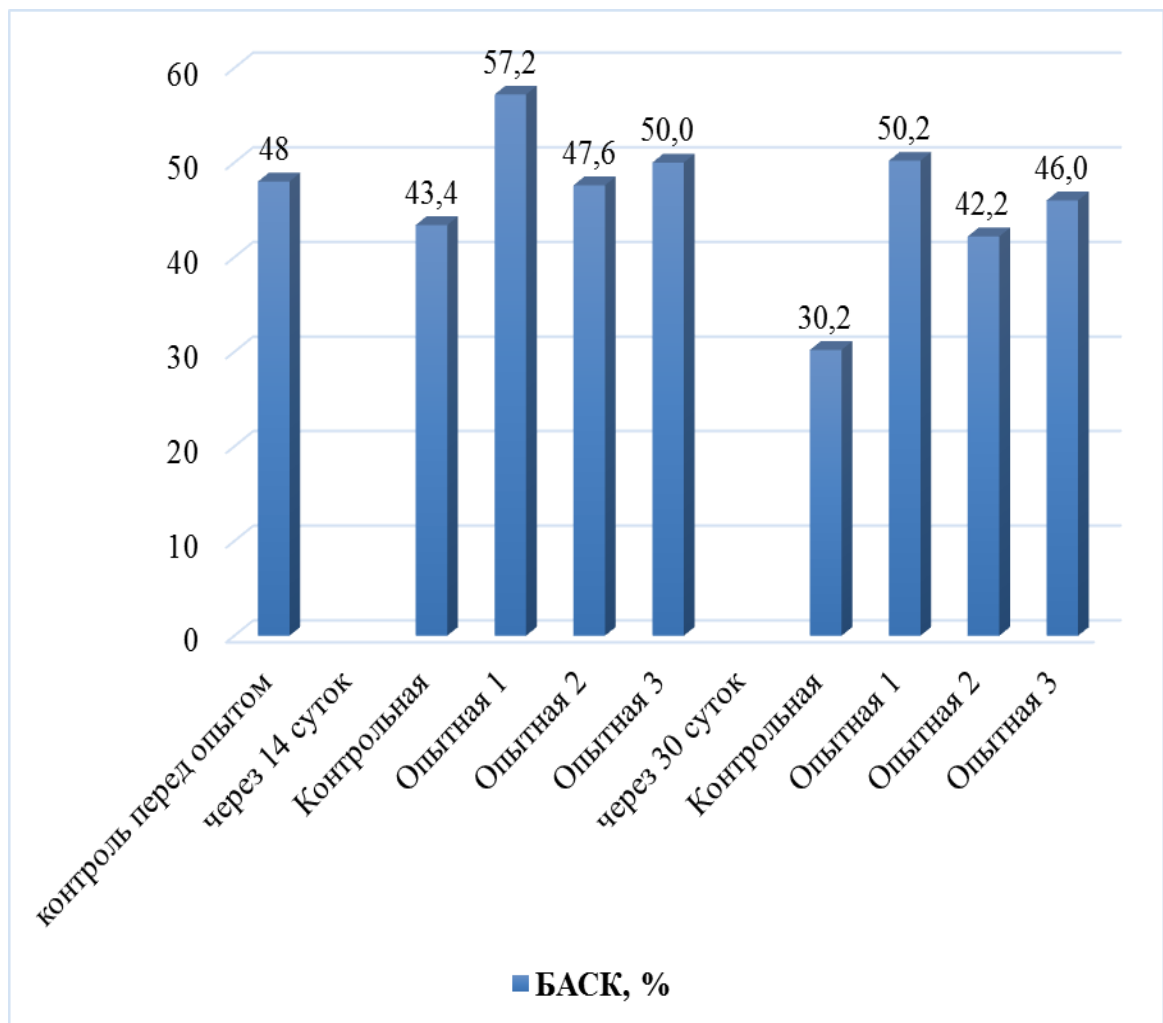


Рисунок 43 – Уровень бактерицидной активности сыворотки крови, %

На 30-е сутки исследования данный показатель значительно снизился в контрольной группе и составил 30,2%, а наиболее высокий результат был характерен для первой опытной группы, получавшей пробиотик в дозировке 5 г/кг, что, вероятно, обусловлено восстановлением синтеза неспецифических факторов иммунитета и подтверждает наличие благоприятных условий формирования иммунного статуса русско-ленского осетра. Кроме того, необходимо отметить отсутствие иммунодефицитных особей в течение всего периода проведения экспериментальных работ.

Таблица 35 – Гуморальные факторы иммунитета русско-ленского осетра (n=10)

Группа	БАСК, %	ИМД особи, %	СРБ, мг/л	ИК, ус. ед	Лизоцим, мкг/мл
контроль перед опытом *	48,0±0,83	0	<6	5,56±0,94	0,30±0,12
через 14 суток					
Контрольная ^а	43,4±0,15	0	<6	7,40±0,13	5,36±0,39
Опытная 1 ^б	57,2±0,25 ^а	0	<6	2,96±0,22* ^а	8,26±0,80*
Опытная 2 ^в	47,6±0,18	0	<6	3,20±0,40 ^а	13,48±0,30
Опытная 3 ^г	50,0±1,04	0	<6	4,62±0,21 ^{абв}	7,36±0,82*
через 30 суток					
Контрольная ^а	30,2±0,80*	0	<6	5,70±0,35	14,48±0,87*
Опытная 1 ^б	50,2±0,55 ^а	0	<6	10,00±0,73* ^а	14,98±0,67*
Опытная 2 ^в	42,2±0,32 ^а	0	<6	4,20±0,54 ^б	16,50±0,49*
Опытная 3 ^г	46,0±1,08 ^а	0	<6	5,00±0,19 ^б	16,38±0,97*

Примечание: * - достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при P≤0,05.

С-реактивный белок рыб – белок острой фазы, наиболее чувствительный лабораторный маркер инфекции, воспаления и тканевого повреждения, уровень которого повышается при воспалительных процессах в организме (Назаров, 2010). Установлено, что уровень СРБ во все сроки исследования в контрольной и опытных группах имел отрицательное значение (<6 мг/л), что указывает на отсутствие воспалительных процессов и патогенных антигенов в организме рыб. Исследуемый пробиотический препарат не вызывал воспалительную реакцию в организме русско-ленского осетра, что также подтверждают проведенные исследования на наличие антител и низкие показатели уровня иммунных комплексов в сыворотке крови рыб.

В реализации защитных функций иммунной системы и формировании иммунологической памяти ключевую роль играют антитела (иммуноглобулины),

обладающие специфическими рецепторами к антигенам. Основу иммуноглобулинов рыб составляет растворимая фракция γ -глобулинов, способная нейтрализовать антигенные структуры за счет их специфического связывания (Микряков, 2004).

Иммунные комплексы состоят из антигена, антител и связанных с ними компонентов системы комплемента, играющих важную роль в процессах регуляции иммунных реакций, элиминации антигенов из организма и поддержания иммунофизиологического гомеостаза. На макрофагах, нейтрофилах и эритроцитах экспрессирован рецептор CR1, который через компоненты комплемента C4b и C3b связывает растворимые ИК и доставляет их к макрофагам селезенки и печени, что обеспечивает клиренс крови, однако при нарушении данного механизма происходит избыточное образование ИК. Установлено, что при инфекционных и инвазионных заболеваниях у рыб обнаруживаются иммунные комплексы. Чрезмерно образовавшиеся при взаимодействии антигенов и антител в крови иммунные комплексы указывают на вероятность их накопления в тканях и развития воспалительного процесса в местах их отложения. В период проведенных исследований обнаружено, что содержание ИК в сыворотке крови русско-ленского осетра варьировало в широких пределах. До начала экспериментальных работ их количество не превышало $5,56 \pm 0,94$. Введение в рацион пробиотического препарата способствовало снижению данного показателя на 14-е сутки. Так, в опытных группах 1 и 2 содержание ИК составило $2,96 \pm 0,22$ и $3,20 \pm 0,40$, соответственно. Однако в конце исследований наблюдалось резкое повышение ИК в первой опытной группе, получавшей пробиотик в дозировке 5 г/кг ($10,00 \pm 0,73$). В то время как вторая опытная группа, характеризовалась пониженным уровнем данного показателя ($4,20 \pm 0,54$), что свидетельствовало о положительном влиянии дозировки 7 г/кг на снижение антигенной нагрузки на организм осетровых рыб.

Лизоцим относится к антибактериальным ферментам и представляет собой мурамидазу из группы гликозидаз. Его бактерицидное действие обусловлено способностью гидролизовать гликозидные связи в полисахаридных структурах

бактериальной клеточной стенки, что приводит к нарушению целостности оболочки и гибели микроорганизма. Помимо прямого антимикробного эффекта, лизоцим участвует в регуляции пролиферативных и дифференцировочных процессов и способен усиливать антителообразование (Бухарин, Васильев, 1974).. Основным источником данного фермента в крови и тканях являются клетки гранулоцитарного ряда, прежде всего нейтрофилы (Микряков, 2004).

Изучение уровня лизоцима у различных видов рыб в зависимости от их систематического положения позволило установить, что наиболее высокий уровень данного показателя характерен для осетровых рыб. Оценка уровня лизоцима в сыворотке крови осетровых рыб проводилась в основном у рыб, выловленных из естественных водоемов (Субботкина, Субботкин, 2003; Куровская и др., 2015). Однако же полноценные данные относительно осетровых рыб, выращиваемых в аквакультуре, отсутствуют. Куровской с соавторами (2015) определено, что лизоцим сыворотки крови бестера и русского осетра в возрасте 3 месяца, выращенных в УЗВ, составлял 27,7 и 7,1 мкг/мл, соответственно, а у осетровых рыб в возрасте 8 месяцев: сибирского осетра – 35,7 мкг/мл, бестера – 5,9 мкг/, стерляди – 36,1 мкг/мл. В наших исследованиях установлено, что до начала экспериментальных работ лизоцим не превышал $0,30 \pm 0,12$ мкг/мл, однако на 14-е сутки приема пробиотического препарата наблюдалось усиление иммунологических реакций за счет повышения уровня лизоцима во всех опытных группах. Максимальное значение данного показателя обнаружено в конце исследования во второй опытной группе ($16,50 \pm 0,49$ мкг/мл), получавшей пробиотик в дозировке 7 г/кг.

По результатам исследований можно предположить, что иммунная система осетровых рыб на применение исследуемого пробиотического препарата отвечает изменением общей функциональной активности гуморальных факторов неспецифического иммунитета.

3.4.3.2 Влияние пробиотического препарата на показатели клеточного иммунитета русско-ленского осетра

В настоящее время среди компонентов естественного иммунитета наиболее всесторонне изучены количественный и качественный состав иммуноцитов, фагоцитарная активность лейкоцитов, а также механизмы антителогенеза. Эти показатели отражают функциональное состояние ключевых звеньев врожденного и адаптивного иммунного ответа, позволяя объективно оценивать иммунологический статус организма в норме и под влиянием различных внешних и внутренних факторов (Микряков, 2001). Фагоцитоз был изучен у таких видов рыб, как стерлядь, карп, сазан. Для данных видов рыб характерна достаточно низкая фагоцитарная активность – 14-25%, а также низкий фагоцитарный индекс – 0,7-1,55 (Валедская, 2005).

Оценку влияния пробиотика-энтеросорбента на клеточные факторы иммунитета осуществляли по составу и относительному содержанию лейкоцитов в периферической крови, фагоцитарной активности нейтрофилов, индексам сдвига и обилия лейкоцитов. Исследования изменений, происходящих в лейкоцитарной формуле периферической крови двухлеток русско-ленского осетра, показали, что в крови гидрида обнаружены отличия процентного соотношения разных форм лейкоцитов (таблица 36). Лейкоциты относятся к основным компонентам иммунной системы, выполняющие различные иммунологические функции: распознавание, разрушение антигена, синтез медиаторов иммунного ответа и т.д.

Обнаружено, что под влиянием пробиотического на энтеросорбенте СУМС-1 содержание лимфоцитов – центральных клеток иммунной системы рыб – на 14-е сутки опыта незначительно снизилось до 65,0%. Однако на 30-е сутки во второй опытной группе, получавшей пробиотик в дозировке 7 г/кг, произошло повышение данного показателя до 78,33%.

Таблица 36 – Лейкоцитарная формула крови русско-ленского осетра, % (n=10)

Группа	Периферическая кровь					
	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы		Эозинофилы	Бластные формы
			ПЯ	СЯ		
контроль перед опытом *	69,68±0,88	2,33±0,06	9,33±0,03	7,00±0,17	8,00±0,54	3,66±0,33
через 14 суток						
Контрольная ^а	64,33±0,84	1,33±0,03	5,66±0,06*	21,33±0,20	6,66±0,32	0,69±0,06*
Опытная 1 ^б	65,00±0,73	2,00±0,07	6,33±0,08*	19,00±0,23*	7,33±0,40	0,34±0,33*
Опытная 2 ^в	65,34±1,02	2,00±0,07	7,00±0,07*	17,66±0,15*	7,00±0,64	1,00±0,02*
Опытная 3 ^г	67,00±0,52	1,66±0,03	7,00±0,05*	16,66±0,28*	7,00±0,30	0,68±0,03*
через 30 суток						
Контрольная ^а	70,00±1,52*	2,33±0,06	9,00±0,07*	8,33±0,72	5,34±0,35	5,00±0,07*
Опытная 1 ^б	70,66±0,32* ^а	2,00±0,02	9,33±0,16 ^а	13,66±0,44	3,00±0,13	1,35±0,08
Опытная 2 ^в	78,33±0,85	1,33±0,06	6,00±0,07	11,66±0,33	2,00±0,15	0,68±0,03*
Опытная 3 ^г	75,00±0,22	3,35±0,08	5,66±0,08*	9,66±0,53	2,33±0,60	4,00±0,11

Примечание: * - достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при P≤0,05.

Кроме того, у всех исследованных рыб были зафиксированы незначительные изменения доли моноцитов – активных фагоцитов крови, поглощающих продукты распада клеток и тканей, принимающих участие в регуляции иммуно- и гранулопоэза.

Понижение процентного содержания лимфоцитов сопровождалось повышением доли зрелых сегментоядерных нейтрофилов, которым принадлежит важная роль в антибактериальной защите организма, а также снижением эозинофилов – клеток, отражающих аллергизацию организма. Также было зафиксировано снижение доли бластных (молодых) форм клеток во всех группах.

Анализ полученных данных показал, что исследуемый пробиотический препарат не оказал негативного влияния на лейкограмму крови русско-ленского осетра.

В качестве индикаторов, отражающих иммунный статус исследуемых рыб, были изучены следующие интегральные показатели: индекс сдвига лейкоцитов и индекс обилия лейкоцитов. Данные показатели являются объективными индикаторами иммунного статуса рыб, отражающими взаимосвязь клеток крови и характеризующими работу эффекторных механизмов иммунной системы (Sabagna et al., 2005; Ткаченко, Дерхо, 2014).

Индекс сдвига лейкоцитов является наиболее информативным показателем реактивности организма и представляет собой отношение суммарного содержания гранулоцитов к агранулоцитам. Отклонение ИСЛ от условной нормы является признаком заболеваний различной этиологии и негативного воздействия факторов окружающей среды (Zhandalgarova et al., 2024). Известно, что индекс сдвига лейкоцитов в крови осетровых рыб колеблется в пределах от 0,25-0,40 (Житенева и др., 1997). Проведенный анализ ИСЛ крови русско-ленского осетра позволил установить, что у рыб опытных групп, получавших пробиотический препарат на энтеросорбенте СУМС-1, данный показатель в разной степени увеличивался на 14-е сутки эксперимента (таблица 37).

Таблица 37 – ИСЛ, ИО и ФА в крови русско-ленского осетра (n=10)

Группа	Индекс сдвига лейкоцитов	Индекс обилия, ед./п. зр.	СЦК, ед.
контроль перед опытом *	0,39±0,01	101,40±2,28	1,09±0,04
через 14 суток			
Контрольная ^а	0,52±0,09	42,10±1,43*	1,00±0,15
Опытная 1 ^б	0,49±0,02*	63,76±1,46* ^а	1,48±0,10*
Опытная 2 ^в	0,49±0,04	63,40±0,98*	1,45±0,09*
Опытная 3 ^г	0,46±0,03	104,00±2,11	1,52±0,12*
через 30 суток			
Контрольная ^а	0,38±0,03*	57,30±1,40*	1,05±0,45
Опытная 1 ^б	0,38±0,04* ^а	76,43±1,63	1,46±0,10*
Опытная 2 ^в	0,26±0,15	61,56±1,46*	1,49±0,12*
Опытная 3 ^г	0,28±0,34	55,70±1,48*	1,54±0,14*

Примечание: * - достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при $P \leq 0,05$.

В конце экспериментальных исследований ИСЛ, применяемый для выявления отклонений в гематологических показателях, во всех исследованных группах русско-ленского осетра не превышал нормативные показатели. Его изменения согласовываются с увеличением встречаемости клеток белой крови (индекс обилия лейкоцитов) и нарастанием фагоцитарной активности нейтрофилов, что можно объяснить увеличением доли указанного типа клеток, отмеченным при исследовании лейкоцитарной формулы периферической крови и возможной активацией лейкопоза. Необходимо отметить, что применение пробиотика в дозировке 7 г/кг способствовало снижению ИСЛ до нижней границы референсных значений (0,26±0,15).

Индекс обилия лейкоцитов или частоты встречаемости клеток белой крови в одном поле зрения в отличие от лейкоцитарной формулы дает представление об интенсивности процесса лейкопоза и о темпах поступления иммуноцитов из гемопоэтических органов в кровяное русло (Лапирова, 2009). Как показывают

результаты исследования, пробиотический препарат не вызывал угнетение данного процесса на протяжении всего периода его применения. Индекс обилия лейкоцитов в период экспериментальных работ варьировал в пределах от 42,10-104,00.

Кроме того, необходимо отметить, что в период исследований произошло достоверное повышение показатель СЦК во всех опытных группах по сравнению с контрольными данными, что указывает на положительное влияние пробиотического препарата на фагоцитарную активность нейтрофилов.

Таким образом, проведенные исследования позволили сделать вывод о том, что применение пробиотического препарата на энтеросорбенте СУМС-1 способствовало активизации неспецифической резистентности в организме осетровых рыб.

3.4.3.3 Анализ бактериальной обсемененности внутренних тканей и органов русско-ленского осетра при использовании пробиотика-энтеросорбента

Выращивание рыб в условиях замкнутой системы водоснабжения характеризуется увеличением уровня органического загрязнения и числа патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в водной среде. Определенная концентрация бактерий в воде рыбоводных емкостей приводит к их резкому увеличению в органах и тканях рыб. В данном случае отмечается ослабление общего состояния организма и возникновение различных заболеваний, что может привести к формированию иммунной супрессии и иммунодефицита у рыб.

В настоящее время в аквакультуре возникает острая необходимость изучения иммунных состояний организма рыб, в частности по получению данных по инфекционной иммунологии – врожденному и приобретенному иммунитету, способам его повышения, а также неинфекционной иммунологии – анализу антигенного состояния тканевых, клеточных и сывороточных белков.

Рыба и водная среда образуют единую экологическую систему, находящуюся в биологическом равновесии между макро- и микроорганизмами. Число микроорганизмов, заселяющих все органы рыбы, составляет около 10^{14} , что примерно в десять раз больше количества собственных клеток организма. Самая значительная часть (около 60%) микрофлоры заселяет различные отделы желудочно-кишечного тракта, примерно 25% приходится на жабры и поверхность тела. В пищеварительном тракте рыб находятся различные микроорганизмы, большинство которых являются различными штаммами бактерий-комменсалов, обильно колонизирующих кишечник. Слизистая оболочка кишечника с ее криптами и ворсинками представляет собой наибольший по площади барьер между внешней и внутренней средой в организме рыб. Вместе организм и микрофлора составляют единую экологическую систему, которая пребывает в состоянии гомеостатического равновесия или эубиоза.

Нормальный состав кишечной микробиоты сохраняется лишь при отсутствии нарушений физиологического состояния организма. Под воздействием неблагоприятных факторов структура и функциональная активность микробиоценоза могут изменяться, что приводит к формированию количественных и качественных сдвигов в его составе. Такие нарушения могут возникать при использовании низкокачественных кормов, несоблюдении норм и режимов кормления, воздействии стрессовых факторов, снижении иммунной реактивности, а также вследствие влияния экологических и физико-химических условий среды. Дополнительное влияние оказывает и необоснованное применение лекарственных препаратов, способных изменять бактериальный баланс кишечника.

К основным функциям микрофлоры кишечника, отвечающим за реализацию иммунных реакций организма можно отнести колонизационную резистентность, заключающуюся в межмикробном антагонизме, снижении роста и развития патогенных микроорганизмов, а также иммунную функцию, проявляющуюся в индукции синтеза иммуноглобулинов, лизоцима, интерферона,

стимуляции фагоцитоза, регуляции неспецифического и специфического клеточного и гуморального иммунитета (Литвина, Стрижак, 2003).

В связи с разнообразием функций интестинального микробиома одним из подходов в профилактике и комплексном лечении при многих заболеваниях в настоящее время считают применение пробиотических препаратов, содержащие в адекватном количестве определенные виды живых микроорганизмов, вызывающие изменения микрофлоры организма посредством имплантации или колонизации. Наиболее важным механизмом действия пробиотиков является участие в активации защитных местных и общих иммунных реакций, а также формирование иммунологической толерантности макроорганизма.

На основании вышеизложенного, необходимо сделать вывод о том, что использование пробиотических препаратов в качестве иммунотропных средств является актуальным в связи с доказанной ролью микробиоты ЖКТ в регуляции иммунного гомеостаза, а также возможности количественно и качественно корректировать микробиологические и иммунные показатели при введении симбионтных бактерий.

При исследовании уровня бактериальной обсемененности внутренних тканей и органов русско-ленского осетра были обнаружены отличия, как в разные сроки отбора проб, так и между различными группами рыб, а также тканями и органами (таблица 38). Анализ бактериальной обсемененности сыворотки крови показал, что во все сроки наблюдения практически во всех контрольных и опытных группах не было зафиксировано колоний бактерий. Исключение составляла опытная группа, получавшая пробиотик в дозировке 7 г/кг, на 14-е сутки и контрольная – в конце эксперимента.

Таблица 38 – Бактериальная обсемененность внутренних тканей и органов русско-ленского осетра

Группа	Количество колоний бактерий в тканях и органах, шт.			
	кровь	почка	печень	кишечник
контроль перед опытом *	0	33,60±1,99	0	1,60±0,81
через 14 суток				
Контрольная ^а	0	0	0	0
Опытная 1 ^б	0	19,20±0,54	1,00±0,63	5,20±0,73* ^а
Опытная 2 ^в	5,60±0,97	47,20±1,42	4,60±0,80* ^а	20,40±0,70 ^а
Опытная 3 ^г	0	0	0	3,20±0,07 ^а
через 30 суток				
Контрольная ^а	3,00±0,67	3,00±0,14	6,20±0,58*	11,40±0,17*
Опытная 1 ^б	0	0,60±0,40	15,20±0,76*	5,40±0,28*
Опытная 2 ^в	0	7,20±0,03	18,60±0,10*	7,60±0,06*
Опытная 3 ^г	0	10,40±0,46 ^{аб}	6,00±0,70*	4,20±0,24

Примечание: * - достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при $P \leq 0,05$.

При изучении бактериальной обсемененности паренхиматозных органов, в частности, печени и почек, существует мнение, что у здоровых рыб данные органы практически всегда свободны от бактерий. Однако многие авторы утверждают, что внутренние органы часто, а возможно, и постоянно характеризуются бактериальной обсемененностью. К интродукции бактерий в паренхиматозные органы способствует воздействие различных абиотических и биотических факторов. В частности, смена режимов кормления, использование недоброкачественных и контаминированных патогенными микроорганизмами комбикормов, наличие органических загрязнений, сублетальных доз тяжелых металлов, содержание поллютантов, переуплотненные посадки (Морозова и др., 2018; Зайцева и др., 2022). Все эти факторы способствуют увеличению биомассы бактерий в воде рыбоводных емкостей. Достигнув определенной пороговой

концентрации в воде, начинается резкое возрастание их количества уже в органах и тканях.

Анализ бактериальной обсемененности почек показал, что в конце экспериментального исследования в опытных группах количество микроорганизмов не превышало $10,40 \pm 0,46$, и было ниже контрольных значений до начала эксперимента. При исследовании микробной контаминации печени опытных групп обнаружено, что количество колоний бактерий в середине эксперимента незначительно увеличивалось до $4,60 \pm 0,80$, а к концу повышалось в несколько раз и варьировало в пределах от $6,00 \pm 0,70$ до $18,60 \pm 0,10$. В кишечнике исследуемых рыб данный показатель увеличился во всех опытных группах по сравнению с первоначальными данными, полученными перед началом опыта. Однако данные опытных групп были ниже, чем в контроле, что, вероятно, связано с подавляющим действием пробиотического препарата на патогенную микрофлору пищеварительного тракта.

3.4.3.4 Оценка перекисного окисления липидов тканей и органов русско-ленского осетра при применении пробиотика на энтеросорбенте

Основными иммунокомпетентными органами, ответственными за реализацию иммунологических функций у рыб, являются печень, почки и селезенка (Микряков, 2004; Суворова, Силкина, 2019). Проведенные исследования уровня МДА в печени, почках и селезенке русско-ленского осетра показали отличия данного показателя между разными органами и изменения по срокам отбора проб (таблица 39). В печени рыб опытных групп под влиянием сорбированного пробиотического препарата содержание МДА незначительно увеличивалось на 14-е сутки до $48,88 \pm 0,78$ нмоль/г, кроме второй опытной группы, в которой произошло снижение данного показателя до $38,03 \pm 0,33$ нмоль/г. На 30-е сутки эксперимента обнаружено, что в данной группе произошло повышение МДА до $40,23 \pm 1,45$ нмоль/г. В почках контрольных и опытных рыб содержание МДА отличалось незначительно. В селезенке на 14-е сутки был

зафиксирован достоверно более высокий уровень ПОЛ у опытных групп по сравнению с контролем, однако к концу эксперимента отличия не были значительны.

Сравнение содержания МДА в различных группах выращивания показало, что используемый пробиотический препарат не вызывал негативного воздействия на окислительные процессы в организме русско-ленского осетра. Незначительное повышение ПОЛ в печени и почках русско-ленского осетра, вероятно, связано с воздействием компонентов пробиотического препарата.

Таблица 39 – Уровень ПОЛ в иммунокомпетентных органах русско-ленского осетра

Группа	Уровень МДА, нмоль/г		
	печень	почка	селезенка
контроль перед опытом *	41,65±1,32	6,98±0,09	5,69±0,07
через 14 суток			
Контрольная ^а	43,82±1,09	6,16±0,17	3,56±0,49
Опытная 1 ^б	45,27±0,44	6,64±0,61	5,71±0,47 ^а
Опытная 2 ^в	38,03±0,33	9,38±0,38	8,38±0,93 ^а
Опытная 3 ^г	48,88±0,78	7,70±0,96	7,79±0,08 ^а
через 30 суток			
Контрольная ^а	39,41±0,83	7,94±0,33	6,08±0,77
Опытная 1 ^б	40,58±0,49	6,50±0,88	5,92±0,12
Опытная 2 ^в	40,23±1,45	4,19±0,39	4,96±0,15
Опытная 3 ^г	45,07±1,10	7,03±0,67	5,36±0,58

Примечание: * - достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при $P \leq 0,05$.

Полученные данные по влиянию пробиотика-энтеросорбента на уровень АЗ указывали на отсутствие существенных изменений между опытными и контрольными группами (таблица 40), однако были зафиксированы отличия от контроля перед началом эксперимента. На 14-е сутки было отмечено повышение показателя КОС в селезенке опытных рыб, получавших пробиотик в дозировках 7

и 9 г/кг, что указывает на снижение уровня АЗ. На 30-е сутки был отмечен значимо низкий показатель КОС печени опытных рыб, получивших 5 и 7 г/кг пробиотика, что указывает на повышенную активность АЗ по сравнению с контрольной группой.

Таблица 40 – Уровень АЗ в иммунокомпетентных органах русско-ленского осетра

Группа	Показатель КОС, л/(мл*мин)		
	печень	почка	селезенка
контроль перед опытом *	5,49±0,04	4,25±0,05	3,31±0,05
через 14 суток			
Контрольная ^а	4,86±0,07	2,56±0,02	2,34±0,03
Опытная 1 ^б	6,31±0,09	3,90±0,07	2,54±0,03
Опытная 2 ^в	3,23±0,02	3,00±0,05*	4,62±0,04 ^{аб}
Опытная 3 ^г	4,09±0,07	3,02±0,07	4,54±0,07 ^{аб}
через 30 суток			
Контрольная ^а	6,83±0,07	3,15±0,06*	4,40±0,01
Опытная 1 ^б	3,25±0,05 ^а	3,25±0,05	4,20±0,02
Опытная 2 ^в	2,80±0,44 ^а	2,92±0,06	2,87±0,06
Опытная 3 ^г	2,25±0,05	4,70±0, 6	3,43±0,03

Примечание: * - достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при $P \leq 0,05$.

Аналогичное отсутствие отрицательного воздействия пробиотического препарата было зафиксировано при исследовании содержания ОЛ в тканях в печени, почки и селезенки гибрида (таблица 41).

Таблица 41 – Содержание ОЛ в иммунокомпетентных органах русско-ленского осетра

Группа	Уровень ОЛ, мг%	
	печень	почка
1	2	3
контроль перед опытом	10100,00±341,44	10830,00±320,00

Продолжение таблицы 41

1	2	3
через 14 суток		
Контрольная	10245,00±238,46	10150,00±240,00
Опытная 1	9545,00±166,31	10940,00±350,00
Опытная 2	11730,72±211,15	11120,00±270,00
Опытная 3	10170,00±146,51	10730,00±350,00
через 30 суток		
Контрольная	10940,00±283,07	10520,00±295,00
Опытная 1	11739,30±192,50	10310,00±280,00
Опытная 2	10539,00±175,34	10520,00±220,00
Опытная 3	10845,40±138,45	10970,00±340,00

Анализ содержания общих липидов в печени и почках русско-ленского осетра показал, что применение пробиотического препарата оказывало дозозависимое влияние на липидный обмен. В печени через 14 суток наиболее выраженное снижение уровня ОЛ отмечалось в первой опытной группе, тогда как во второй опытной наблюдался рост, сохранявшийся и через 30 суток выращивания. В остальных группах изменения были незначительными. В почках через 14 суток в опытных группах, особенно во второй и третьей, было отмечено повышение уровня липидов по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют о метаболической адаптации рыб и модулирующем влиянии пробиотика на липидный обмен, в частности, при использовании дозировки 7 г/кг.

Таким образом, отмечено, что 30-тидневный курс применения пробиотика-энтеросорбента способствовал увеличению активности неспецифических гуморальных и клеточных факторов иммунитета осетровых рыб.

3.4.4 Оценка влияния пробиотического препарата, иммобилизованного на энтеросорбенте СУМС-1, на иммунный статус сибирского осетра

Интенсификация аквакультуры, основными элементами которой являются сверхплотные посадки и кормление рыб, приводит к значительному ухудшению экологических условий в интенсивно эксплуатируемых водоемах и, как следствие этого, к снижению резистентности рыб, возникновению инфекционных и инвазионных заболеваний, что свидетельствует о глубоких изменениях в иммунной системе рыб, приводящих к появлению иммунодефицитных особей. Именно поэтому особую актуальность приобретают поиски методов повышения устойчивости иммунной системы рыб к различным заболеваниям. Один из таких методов основан на использовании пробиотических препаратов в кормлении рыб.

В современной аквакультуре пробиотические препараты применяются для увеличения иммунологически обусловленной естественной резистентности организма рыб, регуляции их иммунного гомеостаза, профилактики стресса, профилактики заболеваний и формирования нормальной микрофлоры кишечника рыб на всех стадиях развития.

3.4.4.1 Влияние пробиотика-энтеросорбента на факторы гуморальной неспецифической иммунной защиты сибирского осетра

В результате проведенных исследований установлено, что применение сорбированного пробиотического препарата оказало положительное влияние на иммунологические показатели сибирского осетра, в частности на уровень бактерицидной активности сыворотки крови, лизоцима и иммунных комплексов, что свидетельствует о стимулирующем эффекте пробиотика на иммунную активность и обменные процессы (таблица 42).

Известно, что бактерицидная активность сыворотки крови является комплексным показателем, отражающим состояние врожденных гуморальных механизмов иммунной защиты. Она определяется функционированием таких

компонентов, как система комплемента, лизоцим, иммуноглобулины, антимикробные пептиды, лектины, преципитины, β -лизин, пропердин, дефензины и другие защитные молекулы (Микряков, 1984, 1991; Ройт и др. 2000; Van Muiswinkel, Vervoorn-Van der Wal, 2006; Койхо и др., 2008; Van der Marel, 2012; Campoverde et al., 2017).

Таблица 42 – Гуморальные факторы иммунитета сибирского осетра (n=10)

Группа	БАСК, %	ИМД особи, %	СРБ, мг/л	ИК, ус. ед	Лизоцим, мкг/мл
контроль перед опытом *	65,28±2,92	0	<6	6,58±0,87	7,20±1,52
через 14 суток					
Контрольная ^а	53,42±2,84*	0	<6	6,00±0,72	6,50±2,60
Опытная 1 ^б	62,66±2,05 ^а	0	<6	2,64±0,27* ^а	9,30±3,40
Опытная 2 ^в	61,32±1,53 ^а	0	<6	1,82±0,69* ^а	11,40±3,30
Опытная 3 ^г	58,40±1,79	0	<6	4,64±0,41 ^{бв}	8,10±2,43
через 30 суток					
Контрольная ^а	32,40±2,46*	0	<6	1,90±0,38*	16,15±3,35*
Опытная 1 ^б	42,24±3,12* ^а	0	<6	5,76±1,15 ^а	17,15±3,45*
Опытная 2 ^в	39,42±1,00* ^а	0	<6	3,30±0,45*	15,04±1,82*
Опытная 3 ^г	37,40±2,25*	0	<6	2,56±0,64* ^б	15,46±2,95*

Примечание: * – достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при $P \leq 0,05$

Установлено, что уровень БАСК в контрольной группе достоверно снизился с 65,28% до 53,42% через 14 суток, что свидетельствует о снижении иммунной активности выращиваемых рыб (рисунок 44). В опытных группах данный показатель оставался выше, чем в контроле, при этом первая и вторая опытные группы показали статистически значимое улучшение (62,66% и 61,32%, соответственно). Через 30 суток БАСК снизился во всех вариантах выращивания, однако в контроле наблюдалось наибольшее снижение – до 32,40%, тогда как в

опытных группах данный показатель был выше (42,24% – опытная 1, 39,42% – опытная 2, 37,40% – опытная 3), что свидетельствует о поддержании защитных функций у рыб, получавших пробиотик.

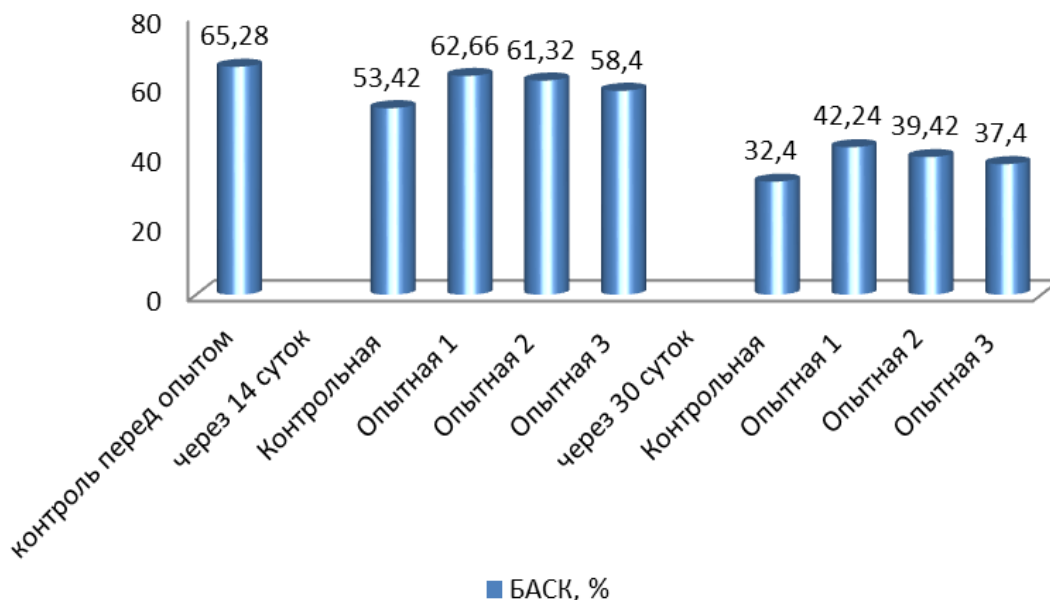


Рисунок 44 – Уровень БАСК сибирского осетра, %

Уровень иммунных комплексов перед началом исследования составлял $6,58 \pm 0,87$. Через 14 суток в контрольной группе значительных изменений не наблюдалось ($6,00 \pm 0,72$), тогда как в опытных вариантах было зафиксировано их статистически достоверное снижение, особенно во второй опытной группе ($1,82 \pm 0,69$), свидетельствующее о снижении иммунной нагрузки. Через 30 суток ИК в контрольной группе резко снизились ($1,90 \pm 0,38$), при этом максимальное повышение данного показателя было характерно для рыб, получавших пробиотический препарат в дозировке 5 г/кг (опытная 1). В остальных опытных группах уровень ИК повысился в меньшей степени, что вероятно связано с активацией адаптационных механизмов и поддержанием гуморального иммунитета у рыб, получавших пробиотик.

Концентрация лизоцима перед началом исследования составляла 7,20 мкг/мл. Через 14 суток в контрольной группе наблюдалось его снижение (6,50 мкг/мл), тогда как в опытных вариантах уровень данного показателя повышался, достигая максимальных значений в опыте с дозировкой 7 г/кг (11,40 мкг/мл), что

свидетельствует об усилении врожденных механизмов иммунной защиты. Через 30 суток уровень лизоцима значительно увеличился во всех группах, достигая максимальных значений в первой опытной группе (17,15 мкг/мл). Однако учитывая, что для данной группы был характерен наиболее высокий уровень ИК ($5,76 \pm 1,15$), можно предположить, что повышение лизоцима было компенсаторной реакцией на протекающий воспалительный процесс. В других опытных вариантах уровень лизоцима также оставался высоким (опытная 2 – 15,04 мкг/мл, опытная 3 – 15,46 мкг/мл), при этом ИК были значительно ниже, что свидетельствует о нормализации иммунного ответа.

Таким образом, по результатам проведенного исследования можно сделать вывод о том, что применение сорбированного пробиотического препарата оказывает положительное влияние на факторы гуморальной защиты осетровых рыб, выраженное снижением уровня иммунных комплексов при сохранении высокой бактерицидной активности сыворотки крови и лизоцимной активности.

3.4.4.2 Исследование влияния сорбированного пробиотика на клеточные факторы врожденного иммунитета сибирского осетра

Кровь, являясь лабильной тканью, быстро реагирует на действие различных факторов, и приводит к восстановлению равновесия между организмом и средой. Ее показатели характеризуются чувствительностью и широко используются в аквакультуре для оценки физиологического состояния организма рыб и диагностики патологических процессов. Известно, что показатели крови объективно отражают интенсивность обменных процессов, протекающих в организме рыб, и имеют высокие коррелятивные связи с возрастом, темпом роста, интенсивностью кормления и т.д. (Головина, 1998).

Морфологические характеристики и относительное содержание лейкоцитов в периферической крови представляют собой информативные показатели, позволяющие оценивать комплекс особенностей состояния рыб. Эти параметры отражают видовые и сезонные вариации, особенности питания и образа жизни,

условия обитания, а также изменения, связанные с различными стадиями жизненного цикла (Головина, Тромбицкий, 1989; Житенева и др., 2004; Яхненко, Клименков, 2009; Заботкина и др., 2015).

Иммунные функции крови, включающие синтез и транспорт факторов иммунитета, а также реализацию процессов фагоцитоза, обеспечиваются лейкоцитарным звеном и гуморальными компонентами сыворотки крови. Показатели количественного и качественного состава лейкоцитов в периферической крови рыб, наряду с характеристиками иммунокомпетентных органов, являются важным диагностическим индикатором, отражающим уровень иммунной реактивности и общее состояние здоровья рыб (Nazarova, Zabotkina, 2010; Заботкина и др., 2015).

Анализ полученных данных показал, что пробиотический препарат оказал влияние на лейкограмму сибирского осетра, способствуя увеличению доли лимфоцитов и снижению уровня моноцитов, что может свидетельствовать об активации иммунных механизмов и уменьшении воспалительных процессов (таблица 43). Обнаружено, что на 14-е сутки выращивания наиболее выраженный эффект наблюдался в первой опытной группе, где зафиксировано максимальное повышение уровня лимфоцитов (78,20%) и минимальное количество моноцитов (1,40%). В то же время по завершении эксперимента было зафиксировано снижение доли лимфоцитов во всех группах, а в третьей опытной группе наблюдалось минимальное содержание моноцитов (1,40%), что может указывать на выраженное противовоспалительное влияние применяемого пробиотического препарата. Кроме того, увеличение доли нейтрофилов в первой и второй опытных группах к 30-м суткам может указывать на усиление антибактериальной защиты, в то время как в третьей опытной группе их уровень оставался более стабильным. Это может свидетельствовать о том, что именно в данной группе наблюдался наиболее сбалансированный иммунный ответ, предотвращающий как иммунное перенапряжение, так и избыточную воспалительную реакцию.

Таблица 43 – Лейкограмма крови сибирского осетра, % (n=10)

Группа	Периферическая кровь					
	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы		Эозинофилы	Бластные формы
			ПЯ	СЯ		
контроль перед опытом*	58,00±11,75	3,25±0,25	11,00±3,10	23,75±8,96	1,75±0,62	2,25±0,47
через 14 суток						
Контрольная ^а	47,60±1,91	2,20±0,37	20,80±0,86*	22,00±1,41	5,40±0,87*	2,00±0,31
Опытная 1 ^б	78,20±7,34 ^а	1,40±0,40*	9,20±3,02 ^а	8,00±3,13 ^а	2,20±0,96 ^а	1,00±0,44
Опытная 2 ^в	70,20±0,86 ^а	2,00±0,54	14,00±1,37 ^а	9,40±1,12 ^а	3,20±1,28	1,20±0,20
Опытная 3 ^г	67,00±1,18 ^а	2,80±0,48	18,00±0,70* ^{абв}	7,40±0,92 ^а	3,40±0,40	1,40±0,24
через 30 суток						
Контрольная ^а	60,40±3,41	2,20±0,20*	14,00±0,89	17,20±3,66	4,80±1,35	1,40±0,24
Опытная 1 ^б	53,80±0,80	2,00±0,31*	17,40±0,87 ^а	20,20±2,28	4,40±1,80	2,20±0,37
Опытная 2 ^в	54,80±2,35	2,20±0,20*	17,60±0,81 ^а	19,00±1,92	4,80±1,39	1,60±0,24
Опытная 3 ^г	59,80±1,80 ^б	1,40±0,24* ^{аб}	15,00±1,22	19,40±1,12	2,60±1,02	1,80±0,20

Примечание: * – достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при P≤0,05

В качестве индикаторов, отражающих иммунный статус исследуемых рыб, были изучены следующие интегральные показатели: индекс сдвига лейкоцитов, индекс обилия лейкоцитов и фагоцитарная активность нейтрофилов. Данные показатели являются объективными индикаторами иммунного статуса рыб, отражающими взаимосвязь клеток крови и характеризующими работу эффекторных механизмов иммунной системы. Анализ проведенных исследований показал, что исследуемый пробиотический препарат оказывал положительное влияние на иммунный статус сибирского осетра, способствуя снижению индекса сдвига лейкоцитов, стабилизации индекса обилия лейкоцитов и повышению фагоцитарной активности нейтрофилов (таблица 44).

Таблица 44 – Показатели иммунологической реактивности крови сибирского осетра (n=10)

Группа	Индекс сдвига лейкоцитов	Индекс обилия, ед./п.зр.	СЦК, ед.
контроль перед опытом*	0,80±0,30	41,90±8,68	1,12±0,04
через 14 суток			
Контрольная ^а	1,01±0,07	52,44±3,66	1,10±0,35
Опытная 1 ^б	0,29±0,10 ^а	42,04±4,05	1,57±0,10*
Опытная 2 ^в	0,38±0,02 ^а	53,32±6,62	1,48±0,08*
Опытная 3 ^г	0,43±0,02 ^а	42,62±4,43	1,50±0,13*
через 30 суток			
Контрольная ^а	0,61±0,08	50,24±4,09	1,15±0,35
Опытная 1 ^б	0,79±0,02	40,12±1,84	1,48±0,11*
Опытная 2 ^в	0,76±0,06	44,74±1,49	1,51±0,13*
Опытная 3 ^г	0,63±0,04 ^б	43,58±4,39	1,58±0,15*

Примечание: * – достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при P≤0,05

ИСЛ является важным показателем иммунного статуса, отражающим баланс между зрелыми и молодыми формами нейтрофилов. Перед началом эксперимента его значение составляло 0,80±0,30, что превышает

физиологическую норму для осетровых рыб (0,25-0,40). На 14-е сутки в контрольной группе ИСЛ увеличился до $1,01 \pm 0,07$, что может свидетельствовать о наличии воспалительной реакции. В опытных группах, получавших пробиотик, данный показатель, напротив, снизился и составил $0,29 \pm 0,10$ (опытная 1), $0,38 \pm 0,02$ (опытная 2) и $0,43 \pm 0,02$ (опытная 3). Данные результаты указывают на отсутствие выраженных воспалительных процессов в группах с пробиотическим препаратом. На 30-е сутки исследований во всех опытных группах ИСЛ повысился и был выше физиологической нормы (0,25-0,40), что напрямую связано с изменениями в лейкоцитарной формуле.

Индекс обилия лейкоцитов перед началом исследования составлял $41,90 \pm 8,68$. Через 14 суток его повышение в контрольной группе ($52,44 \pm 3,66$) может свидетельствовать о реакции на условия среды установок замкнутого водоснабжения. В опытных группах данный показатель варьировал, достигая максимума во второй опытной группе ($53,32 \pm 6,62$), тогда как в первой и третьей группах он оставался на уровне контрольных значений, что говорит о стабильности иммунного статуса выращиваемых рыб. Через 30 суток в контрольной группе ИО снизился до $50,24 \pm 4,09$, а в опытных группах наблюдались умеренные колебания, свидетельствующие о сбалансированности состава лейкоцитов.

Особое внимание заслуживает фагоцитарная активность нейтрофилов, являющаяся ключевым показателем неспецифической защиты организма. В опытных группах данный показатель достоверно увеличился по сравнению с контрольными значениями, что может указывать на стимуляцию иммунной системы пробиотиком. Наибольшая фагоцитарная активность была зафиксирована в третьей опытной группе ($1,58 \pm 0,15$), подтверждающая повышение защитных функций сибирского осетра.

Таким образом, применение пробиотического препарата оказывает положительное влияние на иммунный статус сибирского осетра, снижая риск воспалительных реакций, стабилизируя состав лейкоцитов и повышая фагоцитарную активность нейтрофилов.

3.4.4.3 Анализ антибактериальных свойств сибирского осетра при использовании пробиотика на энтеросорбенте

При исследовании уровня бактериальной обсемененности внутренних тканей и органов сибирского осетра были выявлены отличия, как в разные сроки отбора проб, так и между различными группами рыб, а также тканями и органами (таблица 45).

Таблица 45 – Бактериальная обсемененность внутренних тканей и органов сибирского осетра

Группа	Количество колоний бактерий в тканях и органах, шт.			
	кровь	почка	печень	кишечник
контроль перед опытом*	19,40±7,92	2,00±1,04	1,40±0,60	1,40±0,67
через 14 суток				
Контрольная ^а	38,60±22,46	38,40±21,83	39,20±22,04	34,80±18,75
Опытная 1 ^б	1,60±0,67	3,80±1,88	2,60±1,40	2,40±0,50
Опытная 2 ^в	3,40±2,27	2,80±1,46	3,20±1,39	5,20±1,56
Опытная 3 ^г	1,20±1,20	2,40±1,12	12,20±2,81* ^{бв}	3,60±0,81
через 30 суток				
Контрольная ^а	198,60±47,92*	15,20±7,43	74,00±19,50*	225,20±71,75*
Опытная 1 ^б	304,40±2,20*	33,00±25,20	51,80±20,21*	126,80±37,00*
Опытная 2 ^в	278,80±62,94*	15,80±5,54*	51,20±16,15*	119,20±34,78*
Опытная 3 ^г	52,40±8,94* ^{абв}	13,00±3,78*	13,00±3,31* ^{аб}	34,80±17,53 ^а

Примечание: * – достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при P≤0,05

Установлено, что к концу экспериментальных работ количество колоний бактерий во всех исследуемых тканях и органах достоверно увеличивалось по сравнению с показателями перед началом эксперимента. Так, на 14-е сутки в контрольной группе наблюдалось значительное увеличение бактериальной обсемененности во всех органах, особенно в крови и кишечнике, где количество

колоний было значительно выше по сравнению с исходными данными. В то же время, в опытных группах с применением пробиотика на 14-е сутки количество колоний бактерий было ниже контрольных значений, что свидетельствует о положительном влиянии пробиотического препарата на снижение бактериальной нагрузки. На 30-е сутки выращивания наблюдалось более ярко выраженное увеличение количества бактериальных колоний в контрольной группе, в частности в крови и печени, что может указывать на рост патогенной флоры в условиях УЗВ. В то же время в опытных группах с пробиотиком количество бактерий в органах оставалось значительно ниже контрольных значений. Особенно выраженный эффект наблюдался в третьей опытной группе, где количество колоний в крови, почках, печени и кишечнике было ниже, чем в контроле, что подтверждает повышение уровня антибактериальной защиты и улучшение состояния иммунной системы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что применением пробиотического препарата способствует повышению защитных функций организма осетровых рыб, предотвращая избыточное размножение бактерий в их тканях и органах.

3.4.4.4 Влияние пробиотического препарата на биохимические показатели иммунокомпетентных органов сибирского осетра

Исследование уровня МДА в печени, почках и селезенке сибирского осетра показало существенные отличия по органам и срокам отбора проб (таблица 46).

Таблица 46 – Уровень ПОЛ в иммунокомпетентных органах сибирского осетра

Группа	Уровень МДА, нмоль/г		
	печень	почка	селезенка
1	2	3	4
контроль перед опытом*	69,27±7,58	14,83±0,89	7,67±0,43
через 14 суток			

Продолжение таблицы 46

1	2	3	4
Контрольная ^а	89,07±4,69	20,12±1,24*	10,41±0,65*
Опытная 1 ^б	76,13±5,06	20,69±1,35*	8,81±1,41
Опытная 2 ^в	100,87±8,11* ^б	21,32±1,37*	8,96±0,76
Опытная 3 ^г	96,46±4,89* ^б	24,01±2,85*	13,28±0,95* ^{абв}
через 30 суток			
Контрольная ^а	90,76±10,27	20,85±1,07*	13,01±1,41*
Опытная 1 ^б	63,46±5,23 ^а	19,87±1,12*	10,60±0,30*
Опытная 2 ^в	82,30±9,46	20,66±1,00*	13,98±0,45* ^б
Опытная 3 ^г	81,92±5,35 ^б	19,33±0,60*	11,57±0,60* ^в

Примечание: * – достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при P≤0,05

Обнаружено, что в печени рыб опытных групп, получавших пробиотический препарат, наблюдалось незначительное изменение уровня МДА, в частности в первой опытной группе, по сравнению с исходными данными. Однако в двух других опытных группах, получавших более высокие дозировки пробиотика, уровень ПОЛ значительно повышался, что может свидетельствовать о повышенной активности свободных радикалов и окислительного стресса в данных вариантах выращивания. В почках сибирского осетра во всех опытных группах отмечалось достоверное повышение уровня ПОЛ относительно исходных значений. В селезенке выращиваемых рыб на 14-е сутки уровень МДА в первой и второй опытных группах не отличался от начальных данных, что может указывать на стабильность антиоксидантной активности и минимизацию окислительного стресса в этих органах. В то же время у рыб третьей опытной группы уровень МДА был значительно выше, что может быть связано с усилением метаболической активности и стрессом, вызванным более высокой дозой пробиотика. Через 30 суток уровень МДА в печени контрольной группы оставался повышенным по сравнению с исходными данными. Однако в первой опытной группе был зафиксирован более низкий уровень ПОЛ (63,46 нмоль/г),

что может свидетельствовать о положительном эффекте данной дозировки на снижение окислительного стресса.

Исследование влияния пробиотика на энтеросорбенте на уровень антиокислительной защиты в иммунокомпетентных органах сибирского осетра показало значительные различия между контрольными и опытными группами рыб (таблица 47).

Таблица 47 – Уровень АЗ в иммунокомпетентных органах сибирского осетра

Группа	Показатель КОС, л/(мл*мин)		
	печень	почка	селезенка
контроль перед опытом*	8,10±1,90	3,04±0,80	2,58±1,21
через 14 суток			
Контрольная ^а	10,37±1,10	2,70±1,09	5,94±0,53*
Опытная 1 ^б	7,18±1,37	2,39±0,63	2,22±1,41 ^а
Опытная 2 ^в	5,49±0,81 ^а	4,91±1,45	4,14±0,37 ^а
Опытная 3 ^г	3,87±1,15 ^а	5,01±1,79	3,62±0,11 ^а
через 30 суток			
Контрольная ^а	3,54±0,56	4,24±1,59	2,53±0,71
Опытная 1 ^б	6,71±1,25 ^а	5,78±0,42*	5,46±0,27* ^а
Опытная 2 ^в	4,34±0,69	6,71±0,59*	4,02±0,49 ^б
Опытная 3 ^г	7,62±0,89 ^{ав}	4,48±1,01	1,92±0,57 ^{бв}

Примечание: * – достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при P≤0,05

Установлено, что в печени рыб опытных групп, получавших пробиотический препарат, уровень КОС был ниже исходных значений на всех этапах исследования. На 14-е сутки данный показатель был достоверно ниже, чем в контрольной группе, что может свидетельствовать о том, что пробиотик снижает окислительные процессы в организме выращиваемых рыб. Однако на 30-е сутки уровень КОС в печени опытных рыб возрос, и в некоторых группах даже превысил контрольные значения, что может указывать на повышение антиоксидантной активности и адаптацию к пробиотическому препарату. В

почках сибирского осетра было зафиксировано значительное различие между результатами, полученными до эксперимента, и показателями рыб, получавших пробиотик в дозировке 5 г/кг (опытная 1). На 14-е сутки уровень КОС в данной группе был существенно ниже, что может свидетельствовать о снижении окислительного стресса и улучшении состояния почки. На 30-е сутки уровень КОС в почках контрольных рыб был ниже, чем в опытных вариантах, что подтверждает влияние пробиотика на повышение окислительных процессов в данном органе. Это может указывать на то, что пробиотический препарат не только способствовал адаптации организма, но и активировал антиоксидантные механизмы, что привело к более интенсивному метаболизму и, вероятно, усиленному восстановлению клеток. Несмотря на то, что повышение КОС свидетельствует о некотором стрессе, это также может быть частью ответа на улучшение функциональной активности почек и других иммунокомпетентных органов. В селезенке также наблюдались отличия в уровне КОС в зависимости от дозировки препарата. Так, на 14-е сутки в первой и третьей опытных группах, уровень КОС был ниже, что свидетельствует о снижении воспалительных реакций и улучшении антиоксидантной активности. На 30-е сутки уровень КОС в селезенке первой и второй опытных групп несколько возрос, а в третьей наблюдалось минимальное его значение – 1,92 л/(мл*мин), что может указывать на снижение окислительного стресса и улучшение антиоксидантной активности в организме выращиваемых рыб, получавших пробиотический препарат в дозировке 8 г/кг. Кроме того, это может указывать на то, что третья опытная группа достигла наилучшей адаптации к действию пробиотика, с минимальными показателями окислительных процессов, что свидетельствует о стабилизации физиологических функций и нормализации иммунных реакций.

Исследование содержания общих липидов в тканях печени и почек сибирского осетра показало, что у всех опытных рыб уровень данного показателя был ниже, чем в контрольной группе, что указывает на влияние препарата на липидный обмен (таблица 48).

Таблица 48 – Содержание ОЛ в иммунокомпетентных органах сибирского осетра

Группа	Уровень ОЛ, мг%	
	печень	почка
контроль перед опытом*	10216,00±91,73	11140,00±85,30
через 14 суток		
Контрольная ^а	11272,00±131,24*	12060,00±240,60
Опытная 1 ^б	10508,00±100,91 ^а	11256,00±216,73
Опытная 2 ^в	10016,00±120,39 ^{аб}	10113,33±87,43* ^{аб}
Опытная 3 ^г	10500,00±216,05 ^а	11206,67±287,59 ^в
через 30 суток		
Контрольная ^а	11280,00±226,89*	12525,00±251,57
Опытная 1 ^б	10436,00±110,88 ^а	11575,00±178,58 ^а
Опытная 2 ^в	10612,00±198,65	11460,00±197,18 ^а
Опытная 3 ^г	9980,00±132,21 ^{абв}	12130,00±290,00

Примечание: * – достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при $P \leq 0,05$

Установлено, что на 14-е сутки в печени рыб опытных групп, получавших пробиотический препарат, наблюдалось снижение уровня ОЛ по сравнению с контрольной группой. Однако наиболее значительное снижение содержания ОЛ в печени было зафиксировано на 30-е сутки у рыб третьей опытной группы, что может быть связано с влиянием компонентов пробиотика на процессы липидного обмена, способствующего снижению общего уровня липидов в печени. В почках сибирского осетра на 14-е сутки уровень ОЛ в опытных группах также был ниже, чем в контроле, что свидетельствует о влиянии препарата на обмен липидов в этих тканях. Однако на 30-е сутки различия в уровне ОЛ между контрольной и опытными группами в почках не были столь выраженными, хотя в группе, получавшей пробиотик в дозировках 5 и 7 г/кг, данный показатель оставался ниже контроля.

Таким образом, результаты проведенного исследования показывают, что применение сорбированного пробиотического препарата оказывает влияние на

снижение содержания общих липидов, как в печени, так и в почках сибирского осетра.

Таким образом, установлено, что включение сорбированных пробиотических препаратов в состав рационов осетровых рыб благоприятно влияет на их функциональное состояние, обеспечивая оптимизацию физиологических процессов и повышение иммунологической реактивности организма. Полученные данные обосновывают возможность применения данных препаратов в практике аквакультуры, как средства поддержания физиологического гомеостаза, естественной резистентности и адаптационного потенциала рыб.

3.5 Влияние пробиотика на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, сорбированных на активированном угле, на функциональное состояние и иммунный статус осетровых рыб

3.5.1 Оценка влияния сорбированного на активированном угле пробиотического препарата на рост и физиологическое состояние бестера

Исследуемый поликомпонентный сорбированный пробиотический препарат представляет собой комплекс бифидобактерий штамма *Bifidobacterium bifidum* 1, сорбированных на активированном угле (5×10^7 КОЕ), и лактобактерий штамма *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (5×10^7 КОЕ) (Жандалгарова и др., 2023). Технология сорбции, применяемая при создании данного пробиотического препарата, обеспечивает таргетную доставку микроколоний бифидо- и лактобактерий в пристеночную биопленку кишечника, способствуя тем самым нормализации ее состава и функции, а также восстановлению интестинального микробиома.

В результате проведенных исследований установлено, что наиболее эффективной оказалась дозировка пробиотика 6 г/кг (таблица 49). Так, величина абсолютного прироста в данной группе составила 25,9 г, что на

Показатель	Группа / Дозировка пробиотика			
	Контрольная	Опытная 1 (4 г/кг)	Опытная 2 (6 г/кг)	Опытная 3 (8 г/кг)
Масса, г: начальная	191,7±2,12	190,1±1,91	191,4±2,31	190,8±1,94
конечная	205,5±1,81	208,4±2,54	217,3±2,05	207,5±2,25
Абсолютный прирост, г	13,8	18,3	25,9	16,7
Среднесуточный прирост, г	0,46	0,61	0,86	0,56
Среднесуточная скорость роста, %	0,23	0,31	0,42	0,28
Коэффициент упитанности по Фультону	0,41	0,42	0,42	0,40
Коэффициент массонакопления	0,01	0,02	0,02	0,02
Период выращивания, сут.	30	30	30	30

В современных условиях интенсивной аквакультуры особую значимость приобретает контроль за физиолого-биохимическими показателями крови выращиваемых рыб, поскольку эти параметры являются индикаторами адаптивных реакций и общего состояния организма (Головина, 1998). Кровь, представляющая собой специализированную жидкую соединительную ткань, отражает динамику метаболических процессов и реагирует на изменения внешних и внутренних условий среды (Пучков, 1954). Благодаря высокой лабильности ее компонентов изменения в составе крови могут служить ранним маркером нарушения гомеостаза и развития патологических процессов. Поэтому для оценки состояния здоровья и оперативной диагностики заболеваний наряду с

патологическими и микробиологическими исследованиями широко применяются клинические и биохимические анализы крови.

В практику рыбоводных исследований включают определение комплекса показателей, характеризующих состояние кровеносной системы и обменные процессы. Наиболее информативными являются концентрация гемоглобина, скорость оседания эритроцитов, содержание общего белка и глюкозы в сыворотке, липидный спектр, а также количественные и качественные параметры лейкоцитарного звена. Совокупность этих показателей позволяет объективно оценить физиологическое состояние рыб, их реактивность и адаптивные возможности при выращивании в различных условиях (Головина, 1998; Жандалгарова и др., 2023).

Полученные данные показали, что концентрация гемоглобина в крови рыб опытных групп, получавших пробиотический препарат, была выше по сравнению с контрольными значениями. У бестера уровень данного показателя составлял 59,5-64,9 г/л, тогда как у рыб контрольной группы он не превышал 57,9 г/л, что также соответствует физиологическим нормам для данного вида. Следует учитывать, что уровень гемоглобина является интегральным показателем кислородтранспортной функции крови и отражает степень обеспечения организма газообменом. Снижение его концентрации рассматривается как признак функциональной перегрузки дыхательной системы и может свидетельствовать о нарушении адаптивных реакций организма (Матишов и др., 2017).

Общий белок является важнейшим компонентом плазмы крови рыб и участвует в обеспечении энергетического обмена, поддержании осмотического давления, формировании иммунного ответа и ряде других физиологических процессов (Матишов и др., 2017).. Анализ полученных данных показал, что концентрация общего белка в сыворотке крови бестера, получавшего пробиотик-энтеросорбент, возрастала по мере продолжения опыта, что может свидетельствовать об активизации обменных процессов и улучшении обеспечения организма питательными веществами. Наиболее высокие значения фиксировались во второй опытной группе (6 г/кг), где данный показатель достигал 23,6 г/л. В

контрольном варианте наблюдалось умеренное снижение его уровня (на 0,8 г/л), что вероятно связано с особенностями энергетического и пластического обмена при отсутствии дополнительного воздействия пробиотического препарата.

Изменение концентрации холестерина в сыворотке крови осетровых рыб в целом коррелирует с динамикой содержания общего белка и отражает особенности липидного обмена и энергетического обеспечения организма (Металлов и др., 2016; Матишов и др., 2017). Анализ полученных данных показал, что у рыб контрольной группы уровень холестерина был несколько выше и достигал 4,92 ммоль/л. В опытных вариантах выращивания, где в рацион вводился сорбированный пробиотический препарат, наблюдалась тенденция к снижению данного показателя: к завершению эксперимента концентрация холестерина у бестера уменьшилась до 2,60 ммоль/л. Такая динамика может свидетельствовать о нормализации процессов липидного обмена и улучшении метаболического статуса рыб при использовании пробиотика-энтеросорбента.

Одним из ключевых показателей углеводного обмена у рыб является содержание глюкозы в сыворотке крови, поскольку данный метаболит выступает главным источником энергии и отражает интенсивность обменных процессов в организме (Матишов и др., 2017). Концентрация глюкозы повышается при воздействии стрессорных факторов и считается чувствительным индикатором адаптивного ответа, а также является необходимым субстратом для функционирования высокоэнергозатратных тканей, включая центральную нервную систему. По результатам проведенного исследования установлено, что во всех опытных группах наблюдалась устойчивая тенденция к снижению уровня глюкозы к завершению эксперимента, что может рассматриваться как признак улучшения физиологического состояния и уменьшения стрессовой нагрузки. Так, у бестера, получавшего пробиотик в дозировке 4 г/кг (опытная 1), уменьшение концентрации глюкозы составило примерно 1,5 раза; при дозировке 6 г/кг (опытная 2) – около 1,3 раза; при максимальной дозировке 8 г/кг (опытная 3) показатель снизился более чем в два раза. Различия между начальными и конечными значениями были статистически значимыми, что подтверждает

влияние пробиотического препарата на углеводный обмен выращиваемых рыб (таблица 50).

Таблица 50 – Показатели крови бестера при использовании пробиотика на энтеросорбенте (n=20)

Показатель	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
до начала исследований				
Гемоглобин, г/л	59,6±0,78	58,9±1,02	59,8±1,04	57,4±0,79
СОЭ, мм/ч	2,1±0,05	2,4±0,10**	2,2±0,09	3,1±0,18***
Общий белок, г/л	21,4±0,18	21,1±0,21	19,6±0,30***	19,3±0,21***
Холестерин, ммоль/л	3,73±0,10	3,68±0,11	3,22±0,10***	3,57±0,10
Глюкоза ммоль/л	0,90±0,03	0,95±0,02	0,99±0,01**	1,19±0,04***
в конце исследований				
Гемоглобин, г/л	57,9±0,80	59,5±0,49	64,9±0,76***	61,6±0,50***
СОЭ, мм/ч	2,4±0,09	2,0±0,05***	2,0±0,03***	2,1±0,06**
Общий белок, г/л	20,6±0,21	22,2±0,41***	23,6±0,33***	20,6±0,33
Холестерин, ммоль/л	4,92±0,10	2,95±0,10***	2,74±0,05***	2,60±0,07***
Глюкоза ммоль/л	0,94±0,02	0,65±0,04***	0,74±0,04***	0,55±0,03***

Примечание: различия достоверны при ** - $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Таким образом, применение пробиотического препарата на энтеросорбенте оказало положительное влияние на показатели крови двухлеток бестера, выраженное повышением уровня гемоглобина, общего белка, снижением концентрации холестерина и глюкозы.

Лейкоцитарная формула крови является одним из наиболее информативных показателей иммунного статуса рыб, поскольку распределение и относительное содержание различных популяций лейкоцитов характеризует не только состояние неспецифического иммунитета, прежде всего его клеточного звена, но и отражает общий функциональный уровень организма. Изменения в лейкоцитарном спектре могут служить индикатором адаптивных реакций, стрессовых воздействий и

возможных патологических процессов (Жандалгарова и др., 2021). Анализ лейкоцитарной формулы периферической крови бестера представлен в таблице 51.

Таблица 51 – Лейкоцитарная формула периферической крови бестера, % (n=10)

Показатели	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
Лимфоциты	72,68±0,25	74,71±0,58***	76,73±0,40***	75,63±0,33***
Моноциты	4,31±0,06	3,89±0,06***	3,02±0,07***	3,36±0,08***
Сегментоядерные нейтрофилы	14,79±0,21	16,29±0,25***	15,07±0,37***	15,53±0,98**
Палочкоядерные нейтрофилы	6,15±0,05	2,96±0,05***	3,15±0,15	2,98±0,16**
Эозинофилы	2,07±0,05	2,15±0,06	2,03±0,08***	2,50±0,18*

Примечание: различия достоверны при *P≤0,05; ** - P≤0,01; *** P≤0,001

Анализ лейкоцитарной формулы показал, что исследуемые рыбы находились в удовлетворительном физиологическом состоянии. Периферическая кровь характеризовалась доминированием лимфоидного звена: доля лимфоцитов составляла 72,68-76,73%. Содержание моноцитов оставалось низким и не превышало 4,31%, что соответствует нормальным показателям для данного вида и свидетельствует об отсутствии признаков воспалительной реакции. В спектре гранулоцитов существенную часть составляли сегментоядерные нейтрофилы (14,79-16,29%) и палочкоядерные нейтрофилы (2,96-6,15%), что отражает стабильность состояния системы неспецифического иммунитета. Мазки крови контрольных и опытных групп рыб представлены на рисунках 45-48.

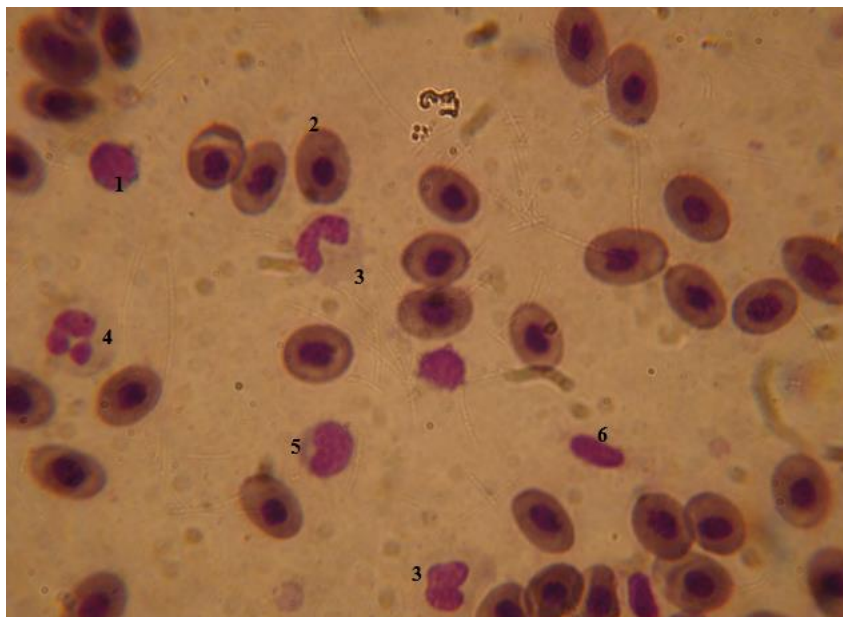


Рисунок 45 – Мазок крови бестера контрольной группы:

1 – лимфоцит; 2 – эритроцит; 3 – моноцит; 4 – сегментоядерный нейтрофил;
5 – нейтрофильный миелоцит; 6 – тромбоцит. Окраска азур-эозином по Романовскому-Гимзе. Увеличение 1000

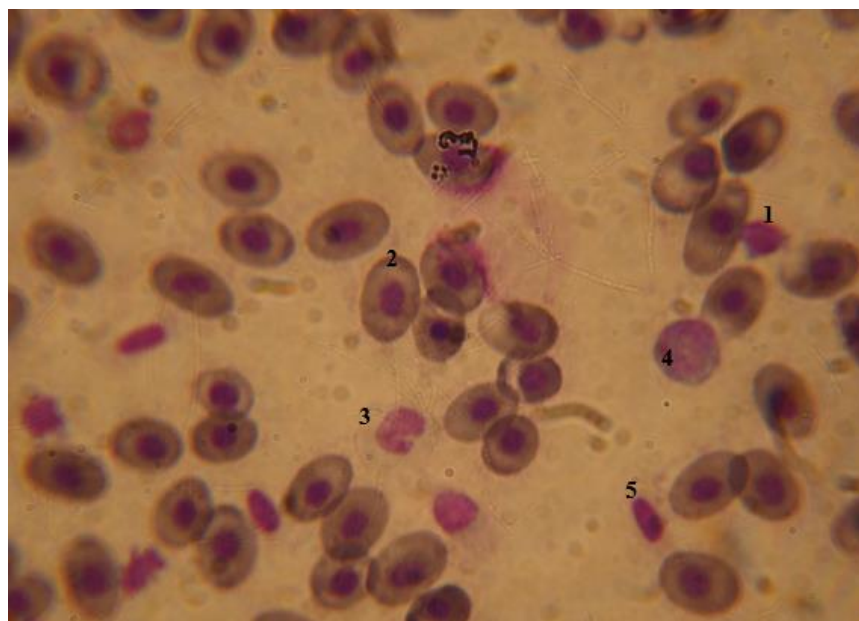


Рисунок 46 – Мазок крови бестера первой опытной группы:

1 – лимфоцит; 2 – эритроцит; 3 – моноцит; 4 – промиелоцит; 5 – тромбоцит.
Окраска азур-эозином по Романовскому-Гимзе. Увеличение 1000

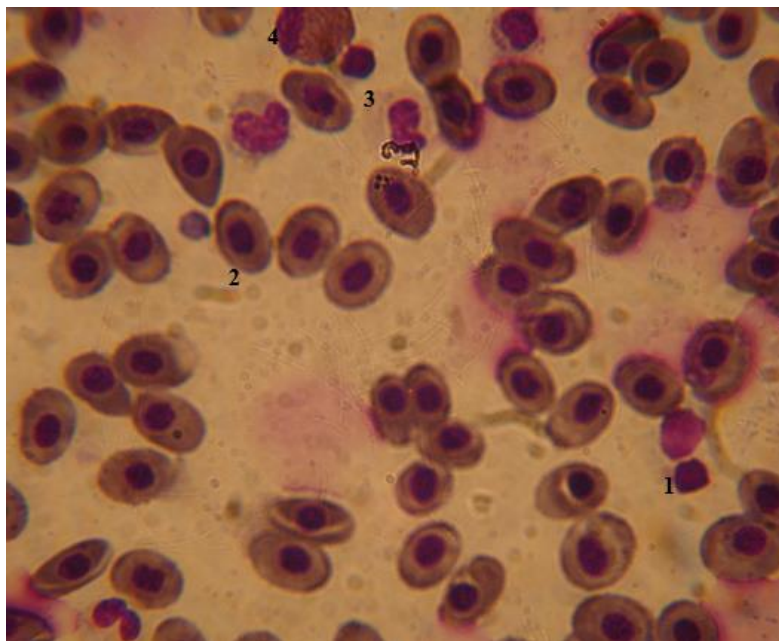


Рисунок 47 – Мазок крови бестера второй опытной группы:

1 – лимфоцит; 2 – эритроцит; 3 – моноцит; 4 – эозинофил. Окраска азур-эозином по Романовскому-Гимзе. Увеличение 1000

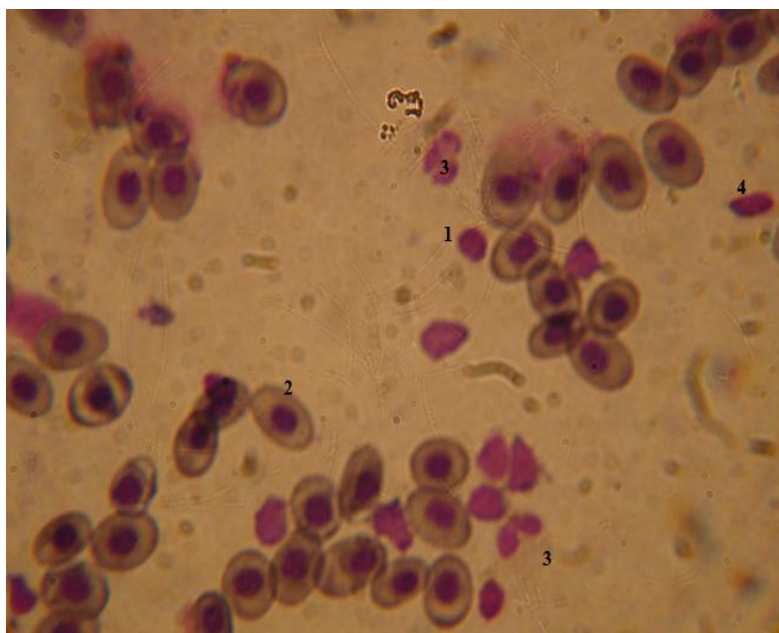


Рисунок 48 – Мазок крови бестера третьей опытной группы:

1 – лимфоцит; 2 – эритроцит; 3 – моноцит; 4 – тромбоцит. Окраска азур-эозином по Романовскому-Гимзе. Увеличение 1000

Таким образом, анализ лейкоцитарной формулы периферической крови бестера позволил установить, что популяция лейкоцитов была представлена лимфоцитами и моноцитами, относящимися к агранулоцитам, и нейтрофилами, и эозинофилами, относящимися к гранулоцитарному ряду, находящимися на

различных стадиях развития. Обнаружено, что лимфоциты занимали доминирующее положение, как в контрольной (72,68%), так и в опытных группах (74,71-76,73%).

3.5.2 Исследование влияния пробиотика, сорбированного на активированном угле, на рыбоводно-биологические и иммунно-физиологические показатели стерляди

В ходе проведения сравнительного анализа линейно-весовых показателей стерляди при введении в их рацион сорбированного пробиотического препарата установлено, что наиболее эффективным оказался комбикорм с дозировкой пробиотика 6 г/кг (опытная 2) (таблица 52).

Таблица 52 – Результаты выращивания стерляди с применением пробиотика

Показатель	Группа / Дозировка пробиотика			
	Контрольная	Опытная 1 (4 г/кг)	Опытная 2 (6 г/кг)	Опытная 3 (8 г/кг)
Масса начальная, г	65,69±1,21	64,36±2,34	66,10±1,54	65,74±1,59
Масса конечная, г	91,53±0,87	91,90±1,26	94,54±1,26	92,56±2,19
Абсолютный прирост, г	25,84	27,54	28,44	26,82
Среднесуточный прирост, г	0,86	0,92	0,95	0,89
Среднесуточная скорость роста, %	1,11	1,19	1,20	1,15
Коэффициент массонакопления	0,05	0,05	0,05	0,05
Коэффициент упитанности по Фультону	0,32	0,30	0,31	0,29
Период выращивания, сут.	30	30	30	30

На рисунке 49 видно, что величина абсолютного прироста во второй опытной группе составила 28,44 г и была выше, чем в остальных вариантах выращивания.

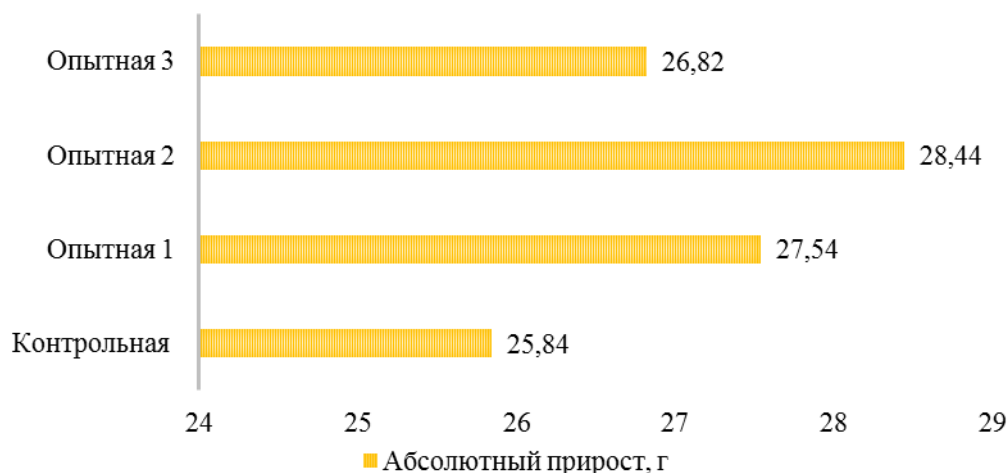


Рисунок 49 – Интенсивность роста годовиков стерляди

Значение среднесуточного прироста также было выше во второй опытной группе и составило 0,95 г, как и показатель среднесуточной скорости роста – 1,20%. Коэффициент упитанности и коэффициент массонакопления были в пределах нормы и не претерпевали значительных изменений во всех исследуемых группах (рисунок 50).

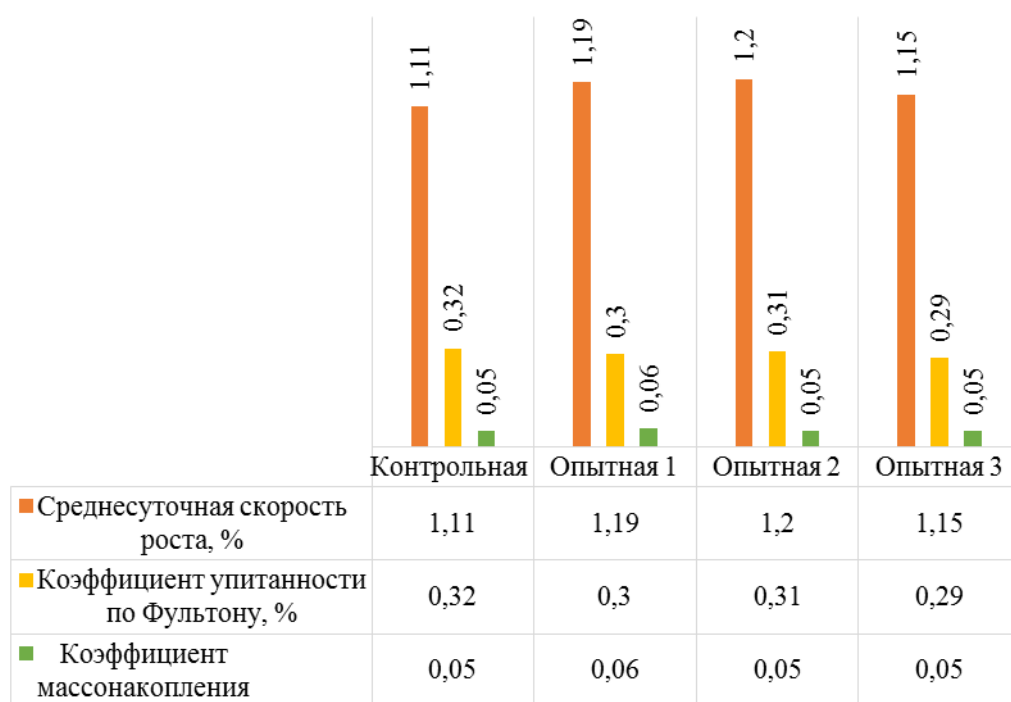


Рисунок 50 – Рыбоводно-биологические показатели стерляди

Для оценки физиологического состояния выращиваемых рыб были проведены исследования гематологических и биохимических показателей крови (таблицы 53, 54). Клиническое исследование крови необходимо для определения физиолого-иммунологического статуса рыб, поскольку она не только транспортирует кислород, воду и питательные вещества, но и выводит продукты обмена. Кроме того, кровь играет ключевую роль в иммунной защите, обеспечивая нейтрализацию инфекционных агентов и токсинов. В данном процессе важную функцию выполняют лимфоциты, отвечающие за выработку антител и активацию иммунного ответа (Головина, 1989).

Таблица 53 – Гематологические показатели стерляди при использовании сорбированного пробиотика (n=20)

Показатель	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
до начала исследования				
Гемоглобин, г/л	47,50±1,76	44,26±1,19	43,98±1,20	46,25±1,35
СОЭ, мм/ч	3,50±0,31	3,50±0,23	2,50±0,33*	3,01±0,30
Гематокрит, %	29,5±1,58	28,4±1,78	27,9±1,63	29,1±2,33
Эритроциты, 10 ⁶ мкл	0,82±0,03	0,76±0,02	0,69±0,03**	0,79±0,03
СГЭ, пг	57,9±1,52	58,2±2,09	63,7±2,04**	58,5±2,47
в конце исследования				
Гемоглобин, г/л	49,29±1,49	53,89±1,78	54,36±1,41**	53,61±1,55
СОЭ, мм/ч	3,25±0,29	3,04±0,26	2,30±0,30**	2,70±0,31
Гематокрит, %	27,9±1,26	27,2±1,19	27,7±1,49	26,7±1,40
Эритроциты, 10 ⁶ мкл	0,79±0,03	0,84±0,02	0,87±0,04	0,81±0,03
СГЭ, пг	62,4±1,90	64,2±1,49	62,5±1,53	66,2±1,52

Примечание: различия достоверны при * P≤0,05; ** P≤0,01

Результаты исследования показали, что уровень гемоглобина в крови рыб из опытных групп, получавших пробиотический препарат, был выше, чем у рыб контрольной группы, и колебался в пределах 53,61-54,36 г/л. При анализе СОЭ установлено, что во всех вариантах выращивания была выявлена тенденция ее снижения к концу экспериментальных работ. Необходимо отметить, что данный показатель не превышал нормативные значения, что может свидетельствовать об отсутствии воспалительных процессов и физиологических изменений в организме выращиваемых рыб.

Анализ показателей гематокрита, эритроцитов и СГЭ у рыб опытных групп показал, что влияние пробиотического препарата на данные параметры не было ярко выраженным в сравнении с контрольной группой. Так, уровень гематокрита в контроле составил 27,9%, в то время как в опытных группах наблюдались незначительные колебания от 26,7 до 27,7%, что может указывать на отсутствие значительных изменений в общей кислородной емкости крови под воздействием пробиотика. В опытных группах было зафиксировано небольшое увеличение количества эритроцитов, свидетельствующее об улучшении кроветворения. Показатель СГЭ также несколько повысился в опытных группах, что указывает на незначительные изменения в объеме эритроцитов.

Для более детальной оценки физиологического статуса осетровых рыб был проведен анализ содержания общего белка, триглицеридов, холестерина и глюкозы в сыворотке крови годовиков стерляди (таблица 54). Данные показатели являются важными индикаторами общего обмена веществ и могут отразить как физиологическое состояние организма, так и эффективность применяемых кормовых добавок.

Таблица 54 – Биохимические показатели крови стерляди при применении пробиотика (n=20)

Показатель	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
до начала исследования				
Общий белок, г/л	17,19±0,63	13,59±0,34***	14,67±0,39**	15,47±0,31*
Триглицериды, ммоль/л	4,15±0,11	5,13±0,13***	5,79±0,28***	4,98±0,14***
Глюкоза, ммоль/л	5,26±0,14	5,64±0,22	4,48±0,13***	5,31±0,20
Холестерин, ммоль/л	2,69±0,13	3,14±0,33	2,64±0,15	2,96±0,41
СРБ, мг/л	< 6	< 6	< 6	< 6
в конце исследования				
Общий белок, г/л	19,39±0,76	22,24±1,04**	23,35±0,80***	23,17±0,65***
Триглицериды, ммоль/л	5,98±0,30	4,84±0,37*	4,78±0,30**	4,15±0,31***
Глюкоза, ммоль/л	3,62±0,37	3,79±0,39	3,51±0,37	4,46±0,35
Холестерин, ммоль/л	1,8±0,18	2,49±0,14**	1,08±0,13**	1,23±0,19*
СРБ, мг/л	< 6	< 6	< 6	< 6

Примечание: различия достоверны при * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Уровень общего белка в сыворотке крови рыб, выращенных с использованием пробиотического препарата, достоверно увеличился от начала эксперимента к его окончанию. Так, максимальное его значение наблюдалось во второй опытной группе и составило 23,35 г/л ($P \leq 0,001$), что может быть связано с обменом веществ и определено интенсивностью питания. Следует отметить, что уровень триглицеридов в крови рыб опытных групп оказался значительно ниже,

чем в контроле. Наибольшее снижение наблюдалось в третьей опытной группе (4,15 ммоль/л), что может свидетельствовать о положительном влиянии пробиотического препарата на липидный обмен. Кроме того, снижение уровня триглицеридов может быть связано с улучшением метаболизма жиров и их переработки, что способствует улучшению общего состояния выращиваемых рыб и повышению их адаптивных способностей. Концентрация глюкозы в крови годовиков стерляди показала некоторую вариативность в разных группах. Так, в контрольном варианте данный показатель составил 3,62 ммоль/л, а в опытных группах наблюдались небольшие колебания от 3,51 до 4,46 ммоль/л. Это может свидетельствовать о повышении энергетических процессов и улучшении обмена углеводов в организме выращиваемых рыб, что является результатом применения пробиотика и, возможно, более активного обмена веществ. Исследования СРБ на протяжении всего наблюдения в контрольных и опытных группах показало отрицательный результат (<6 мг/л), что указывает на отсутствие воспалительных процессов и патогенов в организме рыб.

Таким образом, применение пробиотического препарата оказывает положительное влияние на обмен веществ осетровых рыб, улучшая белковый обмен, снижая уровень триглицеридов и поддерживая концентрацию холестерина в пределах физиологической нормы.

Одним из информативных показателей физиологического состояния рыб является лейкоцитарная формула крови. Соотношение лейкоцитов в лейкоцитарной формуле крови отражает не только их клеточный иммунитет, но и является характеристикой физиологического состояния организма рыб. Анализ лейкоцитарной формулы крови стерляди представлен в таблице 55, на рисунке 51.

Таблица 55 – Лейкограмма крови стерляди, % (n=10)

Показатели	Группа			
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2	Опытная 3
Лимфоциты	74,87±1,91	76,45±2,48	78,15±1,57	75,84±1,60
Моноциты	4,15±0,30	3,44±0,19	2,69±0,15***	3,75±0,19
Сегментоядерные нейтрофилы	14,23±0,33	14,63±0,36	14,44±0,48	15,22±0,33*
Палочкоядерные нейтрофилы	4,45±0,22	3,35±0,33**	2,85±0,21***	3,08±0,29***
Эозинофилы	2,30±0,23	2,13±0,17	1,87±0,19	2,11±0,20

Примечание: различия достоверны при *P≤0,05; ** - P≤0,01; *** P≤0,001

Обнаружено, что белая кровь носила ярко выраженный лимфоидный характер. Так, количество лимфоцитов варьировало в пределах 74,87-78,15%. Уровень моноцитов снизился в опытных группах, однако во второй опытной группе (2,69%) снижение оказалось статистически значимым ($P \leq 0,001$), что может указывать на улучшение иммунной функции, так как моноциты играют важную роль в воспалительных реакциях и иммунном ответе. Также было зафиксировано снижение уровня палочкоядерных нейтрофилов, указывающее на уменьшение активации воспалительных процессов и улучшение общего состояния выращиваемых рыб. В целом, полученные результаты показывают, что пробиотический препарат способствует улучшению иммунного статуса осетровых рыб, снижая воспаление и стабилизируя иммунный ответ.

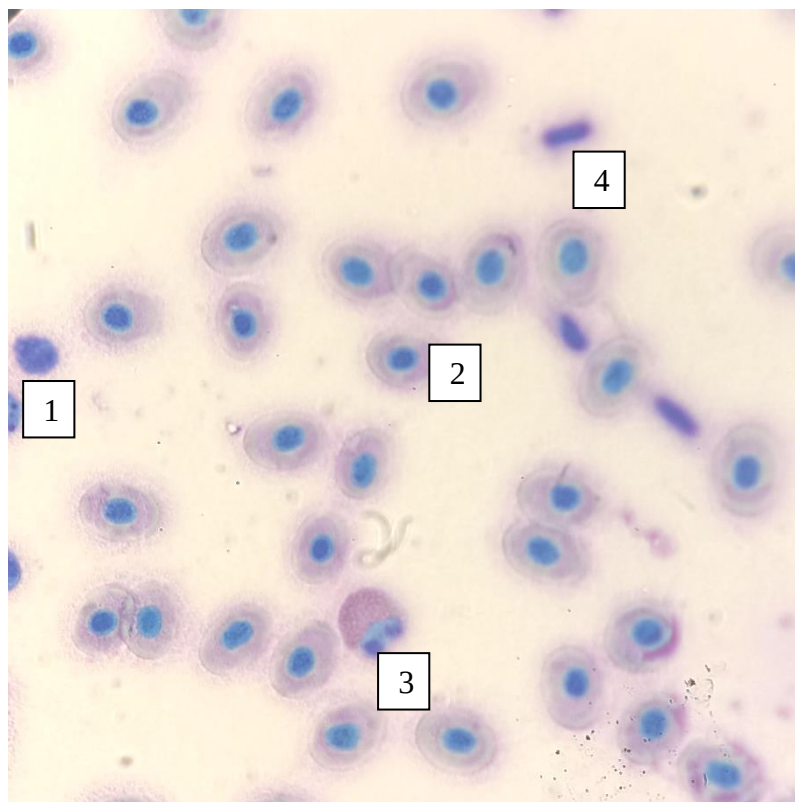


Рисунок 51 – Мазок крови стерляди:

1 – лимфоцит; 2 – эритроцит; 3 – эозинофил; 4 – тромбоцит. Окраска азур-эозином по Романовскому-Гимзе. Увеличение 1000

Анализ индекса сдвига лейкоцитов показал его снижение во всех опытных группах по сравнению с контрольной, что свидетельствует о снижении напряженности иммунного ответа и возможном улучшении состояния иммунной системы годовиков стерляди (таблица 56). Наименьшее значение ИСЛ было зафиксировано во второй опытной и составило $0,24 \pm 0,02$. В первой и третьей опытных группах также отмечалось снижение данного показателя по сравнению с контролем, однако оно было менее выражено.

Таблица 56 – Влияние пробиотика на ИСЛ в крови стерляди (n=10)

Группа	Индекс сдвига лейкоцитов
Контрольная	$0,27 \pm 0,01$
Опытная 1	$0,25 \pm 0,01$
Опытная 2	$0,24 \pm 0,02$
Опытная 3	$0,26 \pm 0,01$

Примечание: различия достоверны при ** $P \leq 0,01$

Учитывая полученные результаты, следует подчеркнуть, что сорбированные пробиотические препараты оказывают выраженное положительное влияние на состояние иммунной системы осетровых рыб. Их применение в аквакультуре способствует укреплению иммунной защиты организма, повышает устойчивость к неблагоприятным факторам внешней среды и одновременно способствует повышению интенсивности роста, что делает данные технологии перспективными и экологически безопасными.

3.5.3 Влияние сорбированного на активированном угле пробиотика на функционирование иммунной системы русско-ленского осетра

Пробиотические препараты оказывают благотворное влияние, как на системный иммунитет, так и на иммунитет слизистых оболочек. Многие исследования *in vitro*, проведенные на животных, успешно продемонстрировали, что целостность кишечной микробиоты может влиять на регуляцию работы кишечника и, в конечном счете, на гомеостаз. Кроме того, было показано, что пробиотики оказывают прямое влияние на развитие и регуляцию врожденного и приобретенного иммунитета, а также конкурентное исключение антигенов (Bienenstock et al., 2013). Иммуномодуляция пробиотиками была широко исследована и были представлены доказательства их влияния как на приобретенный, так и на врожденный иммунный ответ, выраженный повышенной секрецией IgA, индукцией фагоцитоза, усилением Т-клеточных реакций, включая усиление Т-хелперных клеток 1-го типа и ослабление Т-хелперных клеток 2-го типа (Плотникова, Захарова, 2020). Обнаружено, что бактерии-пробиотики усиливают и активируют регуляцию дендритных клеток, а также Т-клеток в сочетании с увеличением уровня цитокина TGF- β и интерлейкина 10 (Bienenstock et al., 2013).

3.5.3.1 Исследование влияния иммуотропных свойств сорбированного пробиотического препарата на показатели неспецифического гуморального иммунитета русско-ленского осетра

Устойчивость рыб к различным инфекционным агентам определяется деятельностью многих систем и органов, в частности образуемых ими гуморальных факторов врожденного и приобретенного иммунитета.

Известно, что важным элементом барьерной функции организма являются слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта, защищающие рыб от патогенных микроорганизмов, поступающих в пищеварительный тракт с контаминированными кормами и водой (Журавлева и др., 2013).

Многие научные исследования отмечают, что применение пробиотических препаратов в аквакультуре способствует усилению иммунной активности рыб, в частности стимулируют иммунную систему, нормализуют ее функционирование на разных уровнях: как местный иммунитет слизистых, так и системный (гуморальный и клеточный) иммунитет.

Для проведения иммунологических исследований в аквакультуре важную роль играет определение бактерицидной активности сыворотки крови. В настоящее время в аквакультуре БАСК применяется для оценки последствий влияния токсических и паразитарных агентов на естественную резистентность и иммунный статус рыб (Суворова, Силкина, 2019).

В ходе экспериментальных работ установлено, что применение сорбированного на активированном угле пробиотического препарата способствовало изменению уровня БАСК в период выращивания (рисунок 52, таблица 57). Так, перед началом экспериментальных работ уровень БАСК двухлеток русско-ленского осетра составил 48%. На 14-е сутки экспериментального выращивания во всех опытных вариантах данный показатель повысился и максимально составлял 51%. В конце исследования наблюдалась тенденция снижения данного показателя во всех группах, однако опытные варианты были выше контрольного. Максимальное значение БАСК в конце

опытных работ было характерно для второй опытной группы, получавшей пробиотик в дозировке 6 г/кг (42%). Необходимо отметить, что количество иммунодефицитных особей на протяжении всего экспериментального исследования составляло 0%.

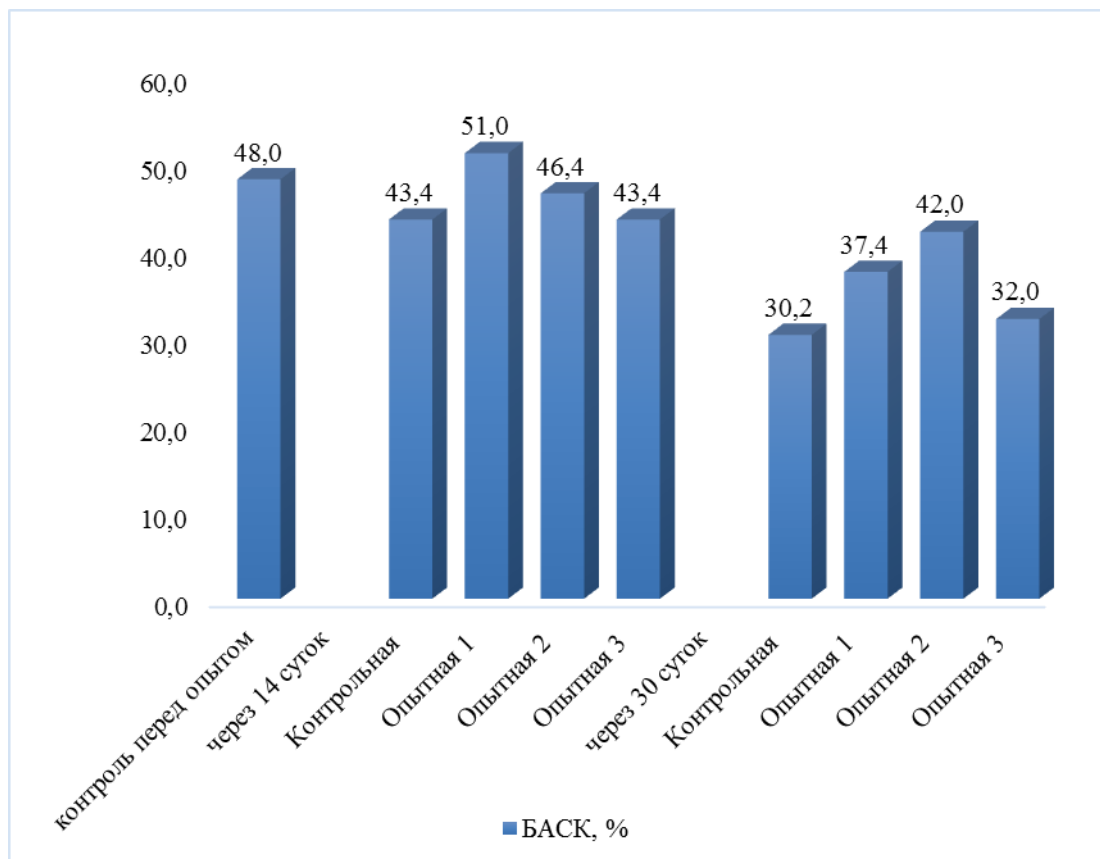


Рисунок 52 – Уровень БАСК русско-ленского осетра, %

Известно, что неспецифические иммунные комплексы – комплексы антиген-антитело и связанные с ними компоненты комплемента, образующиеся в результате взаимодействия с низкомолекулярными чужеродными соединениями (гаптенами, растворимыми антигенами и аутоантигенами). Они играют важную роль в процессах регуляции иммунных реакций, элиминации ксенобиотиков из организма и поддержании иммунологического и биохимического гомеостаза. Клетки крови с помощью компонентов комплемента связывают растворимые ИК и доставляют к макрофагам иммунокомпетентных органов, тем самым обеспечивая клиренс крови от ИК. При насыщении организма чужеродными телами, происходит избыточное образование ИК вследствие супрессии клиринговой функции клеток фагоцитарной системы (Логинов и др., 1999; Койхо

и др., 2008). Нарушение этого механизма наблюдается при инфекционных, инвазионных, токсических и аутоиммунных болезнях.

Таблица 57 – Факторы гуморальной неспецифической защиты русско-ленского осетра (n=10)

Группа	БАСК, %	ИМД особи, %	СРБ, мг/л	ИК, ус. ед	Лизоцим, мкг/мл
контроль перед опытом *	48,0±0,83	0	<6	5,6±0,94	0,30±0,12
через 14 суток					
Контрольная ^а	43,4±1,05	0	<6	7,4±0,13	5,36±0,39
Опытная 1 ^б	51,0±0,70* ^а	0	<6	4,3±0,75 ^а	2,10±0,10
Опытная 2 ^в	46,4±10,93	0	<6	2,2±0,31* ^{аб}	10,76±0,63
Опытная 3 ^г	43,4±0,88 ^б	0	<6	3,7±0,69 ^а	9,70±0,88
через 30 суток					
Контрольная ^а	30,2±0,80*	0	<6	5,7±0,35	14,48±0,87*
Опытная 1 ^б	37,4±0,20* ^а	0	<6	7,3±0,71	15,70±0,57*
Опытная 2 ^в	42,0±0,41* ^{аб}	0	<6	6,0±0,41	19,06±0,05
Опытная 3 ^г	32,0±0,68* ^в	0	<6	4,4±0,83 ^б	15,08±0,03*

Примечание: * - достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при P≤0,05

Уровень ИК до начала формирования опытных групп составлял 5,6±0,94, на 14-е сутки выращивания данный показатель повысился в контроле до 7,4±0,13, а в опытных вариантах достоверно снизился до 2,2±0,31. Однако в конце эксперимента во всех вариантах опыта уровень ИК повысился, не превышал 7,3±0,71, что может быть связано с тем, что механизм действия пробиотического препарата заключался в колонизации кишечника рыб полезными микроорганизмами, которые за счет комплексного положительного влияния, повышали напряженность противинфекционного иммунитета. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии супрессии иммунологических реакций

в организме рыб, получавших пробиотик, стабильности условий содержания рыб и отсутствии факторов способных значительно влиять на учитываемые показатели.

Не менее важным показателем, отражающим уровень неспецифического гуморального иммунитета рыб, является С-реактивный белок. СРБ – белок острой фазы, наиболее чувствительного лабораторного маркера инфекции, воспаления и тканевого повреждения (Назаров, 2010). Его уровень повышается при воспалительных процессах в организме. Данный показатель обеспечивает связь между врожденной и адаптивной иммунной системами (Назаров, 2010), способен распознавать микробы и способствовать их поглощению фагоцитами (Bottazzi et al., 2010; Микряков и др., 2021; Суворова и др., 2023). Исследования СРБ во все сроки наблюдения в контрольных и опытных группах показало отрицательный результат (<6 мг/л), что указывает на отсутствие воспалительных процессов и патогенных антигенов в организме рыб.

Лизоцим представляет собой важнейший фактор гуморального иммунитета, участвующий в нейтрализации кокковой флоры, растворяя муреиновый слой клеточной стенки, а также принимает активное участие в общей регуляции иммунного ответа (Лапирова, 2011). Так, только в присутствии лизоцима иммунные комплексы способны активировать систему комплемента и подключать ее к антимикробной защите. Содержание данного фермента в организме рыб зависит от физиологического состояния организма, от видовых особенностей и факторов внешней среды (Микряков, 2001). Предполагается, что лизоцим играет роль в поддержании гомеостаза в период адаптации к резким изменениям среды и, таким образом, может служить ранним биомаркером, свидетельствующим о нарушении защитных механизмов (Лапирова, 2011). В период исследований повышение концентрации лизоцима было обнаружено во всех опытных группах, получавших пробиотический препарат на 14-е сутки эксперимента. На 30-е сутки самый высокий уровень содержания фермента наблюдался во второй опытной группе и составил $19,06 \pm 0,05$ мкг/мл. Однако стоит отметить, что изменения в концентрации лизоцима имели постепенный

характер и находились в пределах физиологической нормы, что свидетельствует об отсутствии отрицательных сдвигов в работе иммунной системы и отсутствии истощения ресурсов гуморальной защиты.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что под влиянием пробиотика на основе штаммов молочнокислых микроорганизмов р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, сорбированного на активированном угле, активируется функция структур, ответственных за синтез врожденных факторов естественного иммунитета осетровых рыб. Данный вывод подтверждают также результаты изучения образования ИК в крови русско-ленского осетра: в присутствии пробиотического препарата снижается содержание иммунных комплексов, т.е. наблюдается нормализация баланса в системе клеточного и гуморального иммунитета.

3.5.3.2 Влияние сорбированного пробиотического препарата на показатели клеточного иммунитета русско-ленского осетра

В формировании клеточного иммунитета рыб принимают активное участие лейкоциты, поэтому проведенные исследования были направлены на оценку таких показателей крови, как лейкоцитарная формула, фагоцитарная активность нейтрофилов, индекс сдвига лейкоцитов, индекс обилия лейкоцитов.

Основные виды лейкоцитов у рыб представлены лимфоцитами, моноцитами, нейтрофилами и эозинофилами. В составе белой крови рыб лимфоциты являются наиболее многочисленной группой лейкоцитов. В лейкоцитарной формуле рыб лимфоциты, в среднем составляют 70-95% от общего числа клеток белой крови. В то время как, содержание нейтрофилов может изменяться в среднем от 3 до 6%, моноцитов – от 1,5 до 3% (Анохина и др., 2012; Zhandalgarova et al., 2024).

Проведенный анализ лейкоцитарной формулы периферической крови русско-ленского осетра показал, что достоверное изменение в составе лейкоцитов происходят через 14 суток после начала эксперимента (таблица 58).

Установлено, что применение пробиотического препарата повышало долю лимфоцитов во всех опытных группах до 76,33%. Через 14 суток выращивания во всех опытных группах было отмечено статистически значимое увеличение доли сегментоядерных нейтрофилов, снижение числа эозинофилов и бластных форм клеток. Применение пробиотического препарата в дозировке 6 г/кг (опытная 2) способствовало снижению доли эозинофилов на 30-е сутки исследования, что говорит о благоприятном действии пробиотического препарата в составе комбикормов. Известно, что эозинофилы являются клетками иммунной системы рыб, обладают фагоцитарной активностью и участвуют в замедлении аллергических реакций.

Кроме того, в данный период было отмечено снижение доли моноцитов – активных фагоцитов крови, поглощающих продукты распада клеток и тканей, принимающих участие в регуляции иммуно- и гранулопоэза. Вероятно, это обусловлено тем, что применение пробиотика снижает также и уровень бактериального загрязнения среды установки замкнутого водоснабжения, поэтому потребность организма в клетках этой группы имеет тенденцию к снижению.

Из проведенных исследований следует, что на введение пробиотического препарата русско-ленский осетр реагировал изменением соотношения между отдельными типами лейкоцитов. Однако полученные результаты находились в пределах референсных значений, что указывает на повышение клеточного иммунитета и отсутствие патологических и воспалительных процессов в организме русско-ленского осетра.

Таблица 58 – Лейкоцитарная формула крови русско-ленского осетра, % (n=10)

Группа	Периферическая кровь					
	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы		Эозинофилы	Бластные формы
			ПЯ	СЯ		
контроль перед опытом *	68,68±0,88	2,33±0,06	9,33±0,03	7,00±0,17	8,00±0,54	4,66±0,33
через 14 суток						
Контрольная ^а	64,33±0,84	1,33±0,03	5,66±0,06*	21,33±0,20	6,66±0,32	0,69±0,06*
Опытная 1 ^б	68,33±0,76	2,00±0,05	7,00±0,52	16,00±0,30*	6,00±0,52	0,66±0,03*
Опытная 2 ^в	67,00±0,60	1,00±0,07	9,00±0,21	16,00±0,15*	5,00±0,15	2,00±0,02* ^б
Опытная 3 ^г	69,00±0,51	1,66±0,03	7,66±0,88	12,33±0,20*	8,00±0,73	1,33±0,06*
через 30 суток						
Контрольная ^а	69,00±1,52*	2,33±0,06	6,00±0,07*	9,33±0,72	7,34±0,35	6,00±0,07*
Опытная 1 ^б	75,00±2,00 ^а	1,67±0,23	5,33±0,66*	14,00±0,51	3,00±0,51	1,00±0,04*
Опытная 2 ^в	76,33±0,52	1,66±0,03	5,33±0,26*	13,33±0,45	2,00±0,33	1,35±0,03*
Опытная 3 ^г	73,00±1,05	1,68±0,08	6,33±0,85	15,66±0,36	2,33±0,07* ^в	1,00±0,03*

Примечание: * - достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при P≤0,05.

Надежным критерием оценки физиолого-иммунологического состояния рыб являются отклонения в соотношении различных форм лейкоцитов (Крылов, 1974; Балабанова, Микряков, 2002), в частности индекс сдвига лейкоцитов. Повышение относительного содержания незрелых нейтрофильных клеток в периферической крови называется сдвигом влево, а снижение доли палочкоядерных нейтрофилов в присутствии гиперсегментированных ядер определяется как сдвиг вправо (Пахмутов, Ульянова, 1984; Житенева и др., 1997). Изменение ИСЛ в ту или иную сторону от условной нормы является признаком заболевания или усиленного негативного пресса со стороны окружающей среды, а высокая частота встречаемости таких особей является признаком неблагополучия популяции в целом.

В результате проведенного эксперимента, с применением различных норм ввода пробиотического препарата были получены данные, свидетельствующие о его благоприятном влиянии на иммунитет русско-ленского осетра. Анализ индекса сдвига лейкоцитов показал, что в крови рыб опытных групп, получавших пробиотик, данный показатель снижался практически во все сроки наблюдения по сравнению с контролем, однако наиболее эффективным оказалась дозировка 6 г/кг (опытная 2) (таблица 59). В данной группе показатель снизился до $0,28 \pm 0,02$ и находился в пределах физиологической нормы.

Таблица 59 – Индикаторы клеточного звена врожденного иммунитета русско-ленского осетра (n=10)

Группа	Индекс сдвига лейкоцитов	Индекс обилия, ед./п.зр.	СЦК, ед.
1	2	3	4
контроль перед опытом *	$0,44 \pm 0,01$	$101,40 \pm 2,28$	$1,09 \pm 0,04$
через 14 суток			
Контрольная ^a	$0,52 \pm 0,09$	$42,10 \pm 1,43^*$	$1,00 \pm 0,35$
Опытная 1 ^б	$0,42 \pm 0,03$	$62,76 \pm 21,32$	$1,52 \pm 0,11^*$
Опытная 2 ^в	$0,47 \pm 0,07$	$45,23 \pm 17,67^*$	$1,54 \pm 0,13^*$

Продолжение таблицы 59

1	2	3	4
Опытная 3 ^Г	0,42±0,06	55,96±9,47*	1,56±0,12*
через 30 суток			
Контрольная ^А	0,40±0,03*	57,30±1,40*	1,05±0,45
Опытная 1 ^Б	0,30±0,03 ^А	83,53±21,52	1,53±0,10*
Опытная 2 ^В	0,28±0,02	100,23±15,93	1,55±0,12*
Опытная 3 ^Г	0,34±0,26	85,70±9,50 ^А	1,56±0,11*

Примечание: * - достоверно относительно контроля перед опытом, ^{А-Г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при $P \leq 0,05$.

Средний цитохимический коэффициент лизосомального катионного белка в фагоцитах является показателем биоцидности циркулирующих жидкостей гидробионтов и позволяет судить о состоянии их клеточного иммунитета. Цитохимический индекс показывает фагоцитарную активность нейтрофилов (Zhandalgarova et al., 2024). Установлено, что показатель СЦК достоверно увеличился во всех опытных группах по сравнению с контрольными данными, что указывает на положительное влияние исследуемого пробиотического препарата на фагоцитарную активность нейтрофилов.

Таким образом, индекс сдвига лейкоцитов, применяемый для выявления отклонений в гематологических показателях, во всех исследованных группах русско-ленского осетра находился в пределах нормы для осетровых рыб. Его изменения согласовывались с увеличением индекса обилия лейкоцитов и нарастанием СЦК, что можно объяснить увеличением доли указанного типа клеток, отмеченным при исследовании лейкограмм периферической крови и возможной незначительной активацией лейкопоза.

3.5.3.3 Влияние пробиотика-энтеросорбента на антибактериальные свойства русско-ленского осетра

При исследовании уровня бактериальной обсемененности внутренних тканей и органов русско-ленского осетра были обнаружены отличия, как в разные сроки отбора проб, так и между различными группами рыб, а также тканями и органами (таблица 60). В сыворотке крови в период всего исследования во всех опытных группах не было зафиксировано колоний бактерий, исключение составила контрольная группа на 30-е сутки выращивания ($3,00 \pm 0,67$). На 14-е сутки наблюдения у рыб контрольной группы и практически у всех опытных особей отсутствовала бактериальная обсемененность во внутренних органах. В конце исследования у всех рыб опытных групп были обнаружены колонии бактерий в почках, печени и кишечнике.

Таблица 60 – Влияние пробиотика на энтеросорбенте на бактериальную обсемененность внутренних тканей и органов

Группа	Количество колоний бактерий в тканях и органах, шт.			
	кровь	почка	печень	кишечник
контроль перед опытом *	0 ± 0	$33,60 \pm 1,99$	0 ± 0	$1,60 \pm 0,81$
через 14 суток				
Контрольная ^a	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Опытная 1 ^б	0 ± 0	$0,60 \pm 0,40$	0 ± 0	$0,60 \pm 0,40$
Опытная 2 ^в	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Опытная 3 ^г	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
через 30 суток				
Контрольная ^a	$3,00 \pm 0,67$	$3,00 \pm 0,14$	$6,20 \pm 0,58^*$	$11,40 \pm 0,17^*$
Опытная 1 ^б	0 ± 0	$6,00 \pm 1,44$	$4,40 \pm 1,72^*$	$5,20 \pm 2,08$
Опытная 2 ^в	0 ± 0	$0,40 \pm 0,24^б$	$3,60 \pm 0,81^* а$	$4,00 \pm 1,30$
Опытная 3 ^г	0 ± 0	$3,60 \pm 0,50^в$	$7,60 \pm 3,58$	$3,00 \pm 1,76^а$

Примечание: * - достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при $P \leq 0,05$.

В печени и почках рыб опытных групп количество колоний бактерий незначительно превышало контрольные значения. В кишечнике микробная контаминация увеличилась во всех группах по сравнению с первоначальными данными, полученными перед началом опыта. Однако в опытных группах данный показатель был ниже, чем в контроле, что, вероятно, связано с подавляющим действием пробиотического препарата на патогенную микрофлору пищеварительного тракта.

3.5.3.4 Оценка влияния пробиотического препарата на перекисное окисление липидов тканей и органов русско-ленского осетра

В организме поддерживается определенный баланс окислительно-восстановительных реакций, и смещение соотношения между уровнем перекисного окисления липидов и активностью антиоксидантной системы рассматривается как чувствительный показатель воздействия стрессовых факторов на обменные процессы и общее состояние рыб. Малоновый диальдегид (МДА) является одним из ключевых конечных продуктов перекисного окисления липидов и образуется при свободно-радикальном окислении полиненасыщенных жирных кислот мембранных фосфолипидов активными формами кислорода (супероксидным и гидроксильным радикалами, синглетным кислородом, пероксидами и др.). Накопление избыточного количества этих радикалов приводит к истощению сульфгидрильных антиоксидантов и структурным изменениям липидного слоя мембран, что отрицательно отражается на функционировании клеток, скорости роста и нормальном развитии организма (Журавлев, Пантюшенко, 1989; Владимиров и др., 1991; Барабой и др., 1992; Fiho, 1996; Кольтовер, 2000; Winston, 1991; Зенков и др., 2001; Меньщикова и др., 2008; Гордеев и др., 2022).

Исследование уровня МДА в печени, почках и селезенке русско-ленского осетра показало отличия показателя между разными органами и изменения по срокам отбора проб (таблица 61).

Таблица 61 – Перекисное окисление липидов в иммунокомпетентных органах русско-ленского осетра

Группа	Уровень МДА, нмоль/г		
	печень	почка	селезенка
контроль перед опытом *	41,65±1,32	6,98±0,09	5,69±0,07
через 14 суток			
Контрольная ^а	43,82±1,09	6,16±0,17	3,56±0,49
Опытная 1 ^б	54,08±0,94	5,07±0,35	4,26±0,76
Опытная 2 ^в	21,72±0,90 ^б	4,56±0,20 ^а	3,99±0,59
Опытная 3 ^г	40,47±0,25	8,09±0,64 ^{абв}	3,84±0,37
через 30 суток			
Контрольная ^а	39,41±0,83	7,94±0,33	6,08±0,77
Опытная 1 ^б	31,94±0,32	9,50±0,74	6,20±0,54
Опытная 2 ^в	41,41±0,29 ^{аб}	10,67±0,11	7,51±0,45
Опытная 3 ^г	52,33±0,84	6,95±0,58 ^в	8,50±0,31 ^{аб}

Примечание: * - достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при $P \leq 0,05$.

Для рыб второй и третьей опытных групп были характерны изменения уровня МДА в сравнении с контролем. В печени и почках рыб второй опытной группы (6 г/кг) на 14-е сутки выращивания уровень МДА был значительно ниже, а 30-е сутки – выше контрольных значений. У рыб третьей опытной группы (8 г/кг) достоверно значимые отличия от других групп были зафиксированы в почках и селезенке. Более высокий уровень ПОЛ в печени, почках и селезенке опытных рыб, вероятно, связан с воздействием компонентов пробиотического препарата.

Полученные данные по влиянию пробиотического препарата на уровень АЗ указывают на отсутствие существенных изменений между опытными и контрольными группами (таблица 62).

Таблица 62 – Уровень антиокислительной защиты в иммунокомпетентных органах русско-ленского осетра

Группа	Показатель КОС, л/(мл*мин)		
	печень	почка	селезенка
контроль перед опытом *	5,49±0,04	4,25±0,05	3,31±0,05
через 14 суток			
Контрольная ^а	4,86±0,07	2,56±0,02	2,34±0,03
Опытная 1 ^б	6,07±0,05	2,22±0,03	1,87±0,67
Опытная 2 ^в	3,57±0,02	3,93±0,08	2,94±0,16
Опытная 3 ^г	2,56±0,08 ^а	3,04±0,11	5,06±0,02
через 30 суток			
Контрольная ^а	6,83±0,07	3,15±0,06*	4,40±0,01
Опытная 1 ^б	2,40±0,02	2,84±0,04	2,51±0,02
Опытная 2 ^в	6,25±0,08	2,55±0,05	4,63±0,16
Опытная 3 ^г	4,70±0,06	2,36±0,06*	3,36±0,21

Примечание: * - достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при $P \leq 0,05$.

Анализ уровня антиокислительной защиты в печени, почках и селезенке русско-ленского осетра показал, что введение пробиотика оказывало дозозависимое и органоспецифичное влияние. Через 14 суток наибольшая активность КОС в печени была отмечена при использовании дозировки препарата дозе 5 г/кг (опытная 1), тогда как дозировка 9 г/кг (опытная 3) вызывала ее резкое снижение. В почках и селезенке в данный период наблюдалось общее снижение антиокислительной активности во всех опытных группах. Через 30 суток выраженное повышение КОС было зафиксировано в печени и селезенке второй опытной группы.

Таким образом, наибольшую эффективность с точки зрения поддержки антиокислительной системы показала вторая опытная группа (7 г/кг), в которой отмечалось повышение или сохранение уровня каталазы, особенно в печени и селезенке.

Аналогичное отсутствие отрицательного воздействия пробиотика зафиксировано при исследовании содержания ОЛ в тканях печени, почек и селезенки осетровых рыб (таблица 63). Стоит отметить незначительное снижение количества ОЛ под влиянием пробиотического препарата в селезенке и в печени на 30-е сутки исследования по сравнению с контролем.

Таблица 63 – Уровень общих липидов в иммунокомпетентных органах русско-ленского осетра

Группа	Уровень ОЛ, мг%	
	печень	почка
контроль перед опытом	10100,00±341,42	10830,00±320,00
через 14 суток		
Контрольная	10245,00±238,46	10150,00±240,00
Опытная 1	10745,00±136,52	9250,00±190,00
Опытная 2	11836,84±224,27	9460,00±175,00
Опытная 3	10750,40±204,25	9750,00±160,00
через 30 суток		
Контрольная	10940,00±283,07	10520,00±295,00
Опытная 1	9970,00±103,54	9410,00±175,00
Опытная 2	9815,00±91,74	9770,00±190,00
Опытная 3	9520,50±73,54	9920,00±230,00

Анализ содержания общих липидов в печени и почках русско-ленского осетра показал, что применение пробиотика влияло на липидный обмен в иммунокомпетентных органах. Через 14 суток во всех опытных группах наблюдалось повышение уровня липидов в печени по сравнению с контролем, особенно выраженное во второй опытной группе (11836,84 мг%), что может свидетельствовать об активизации липидного синтеза. В почках, напротив, уровень ОЛ снизился, наиболее существенно – в первой опытной группе (9250,00 мг%). Через 30 суток уровень общих липидов в печени во всех опытных группах оказался ниже контрольного, что может указывать на нормализацию или

активацию липидного метаболизма. В почках тенденция к снижению сохранялась, но отличия между группами были менее выражены.

3.5.4 Влияние пробиотика, сорбированного на активированном угле, на иммунный статус сибирского осетра

Уровень иммунореактивности рыб обусловлен не только видовыми особенностями, но и условиями среды, в которой они находятся. Интенсивное развитие аквакультуры привело к тому, что рыбы постоянно подвергаются различным стрессовым воздействиям, связанным с высокой плотностью посадки, транспортировкой, кормлением, возникновением неблагоприятных условий содержания (температурный и кислородный режимы, некачественные корма, ухудшение гидрохимических показателей), что, несомненно, приводит к резкому снижению иммунного статуса объектов выращивания (Валедская, 2005).

В целом нормальное функционирование иммунной системы обеспечивается слаженностью работы различных интегральных показателей, в связи, с чем снижение напряженности одних звеньев сопровождается компенсаторным усилением функционирования других (Валедская, 2005). Кроме того, в функционировании иммунной системы рыб ведущая роль отводится морфофизиологическим особенностям организма, в частности, кожным и слизистым барьерам, фагоцитозу, поглотительной и барьерной функциям ретикуло-эндотелиальной системы, гуморальным факторам врожденного и приобретенного иммунитета (Лукьяненко, 1989).

3.5.4.1 Влияние пробиотика-энтеросорбента на факторы гуморальной неспецифической иммунной защиты сибирского осетра

По результатам проведенных исследований было установлено, что применение пробиотика, сорбированного на активированном угле, оказало

влияние на гуморальные факторы иммунитета сибирского осетра, включая уровень БАСК, концентрацию лизоцима, титр антител и т.д. (таблица 64).

Таблица 64 – Гуморальные факторы иммунной системы сибирского осетра (n=10)

Группа	БАСК, %	ИМД особи, %	СРБ, мг/л	ИК, ус. ед	Лизоцим, мкг/мл
контроль перед опытом*	65,28±2,92	0	<6	6,58±0,87	7,20±1,52
через 14 суток					
Контрольная ^а	53,42±2,84*	0	<6	6,00±0,72	6,50±2,60
Опытная 1 ^б	47,90±8,23	0	<6	4,12±0,50*	5,20±1,30
Опытная 2 ^в	58,16±0,48*	0	<6	2,48±0,31* ^{аб}	10,25±3,05
Опытная 3 ^г	51,58±2,56* ^в	0	<6	2,30±0,40* ^{аб}	7,50±2,37
через 30 суток					
Контрольная ^а	32,40±2,46*	0	<6	1,90±0,38*	16,15±3,35*
Опытная 1 ^б	34,66±5,09*	0	<6	3,16±0,64*	17,10±3,58*
Опытная 2 ^в	35,44±1,04*	0	<6	2,46±0,45*	17,82±3,30
Опытная 3 ^г	41,70±1,32* ^{ав}	0	<6	2,74±0,50*	18,64±4,35*

Примечание: * – достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при P≤0,05

Обнаружено, что в контрольной группе на 14-е сутки наблюдалось снижение уровня БАСК с 65,28% до 53,42%, что свидетельствует о снижении иммунной активности у рыб. В то время как в опытных группах данный показатель оставался выше, чем в контроле, в частности у рыб, получавших пробиотик в дозировке 6 г/кг (опытная 2), где БАСК достигла 58,16%, что подтверждает стимулирующий эффект пробиотического препарата. Через 30 суток во всех вариантах выращивания, включая контроль, наблюдалось снижение БАСК. Однако в контрольной группе уровень данного показателя снизился максимально до 32,40%. В третьей опытной группе снижение уровня БАСК было менее выраженное, что может свидетельствовать о поддержании иммунной активности в результате применения пробиотического препарата.

Анализ уровня ИК показал, что в контрольной группе данный показатель снижался с $6,58 \pm 0,87$ до $6,00 \pm 0,72$ через 14 суток, что указывает на некоторое снижение иммунной нагрузки. В опытных группах применение пробиотического препарата способствовало более выраженному и статистически значимому ($P \leq 0,05$) снижению уровня ИК, особенно в третьей опытной группе ($2,30 \pm 0,40$). Через 30 суток в контрольной группе ИК значительно снизились до $1,90 \pm 0,38$, в то время как в опытных группах уровень ИК оставался выше: $3,16 \pm 0,64$ (опытная 1), $2,46 \pm 0,45$ (опытная 2), $2,74 \pm 0,50$ (опытная 3).

Концентрация лизоцима в контрольной группе снизилась с $7,20$ мкг/мл до $6,50$ мкг/мл на 14-е сутки выращивания. В опытных группах повышение уровня лизоцима было более выраженным, особенно во второй группе ($10,25$ мкг/мл), что свидетельствует о стимулирующем эффекте дозировки 6 г/кг на врожденную иммунную защиту сибирского осетра. Через 30 суток уровень лизоцима в контрольной группе значительно увеличился до $16,15$ мкг/мл, что может быть компенсаторной реакцией на снижение иммунной активности. Однако в опытных группах данный показатель был значительно выше и достиг $18,64$ мкг/мл, что подтверждает усиление защиты у рыб, получавших пробиотики.

Исследования СРБ во все сроки наблюдения у большинства рыб в контрольных и опытных группах показало отрицательный результат, что указывает на отсутствие воспалительных процессов и патогенных антигенов в организме выращиваемых рыб. Исследуемый пробиотический препарат не инициировали воспалительную реакцию в организме сибирского осетра.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что использование пробиотического препарата способствовало поддержанию гуморального иммунитета сибирского осетра.

3.5.4.2 Оценка влияния сорбированного пробиотического препарата на показатели клеточного иммунитета сибирского осетра

Анализ периферической крови сибирского осетра позволил выявить динамику изменений в различных популяциях клеток под влиянием пробиотического препарата (таблица 65). Установлено, что перед началом исследований показатели крови находились в пределах физиологической нормы. Однако уже через 14 суток в контроле наблюдалось максимальное снижение уровня лимфоцитов до 47,60%, тогда как в опытных вариантах данный показатель демонстрировал умеренный рост. Известно, что лимфоцитам принадлежит ведущая роль во всех реакциях приобретенного иммунитета, поскольку они распознают конкретный возбудитель внутри и вне клеток, в тканевой жидкости или в крови. В-лимфоциты противодействуют внеклеточным возбудителям и влиянию их продуктов, образуя антитела, молекулы которых способны специфически распознавать определенные молекулы-мишени-антигены. Т-лимфоциты обладают широким спектром активностей: участвуют в регуляции дифференцировки В-лимфоцитов и образования антител, взаимодействуют с фагоцитами, распознают и разрушают клетки, инфицированные вирусами (Ройт и др., 2000).

Также отмечалось увеличение доли палочкоядерных нейтрофилов в контрольной группе, что может указывать на активацию воспалительных реакций. В опытных группах этот показатель оставался ниже, особенно при использовании более высокой дозировки пробиотического препарата (опытная 3), что свидетельствует о ее модулирующем влиянии на иммунную систему осетровых рыб.

Таблица 65 – Лейкоцитарная формула крови сибирского осетра, % (n=10)

Группа	Периферическая кровь					
	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы		Эозинофилы	Бластные формы
			ПЯ	СЯ		
контроль перед опытом*	58,00±11,75	3,25±0,25	11,00±3,10	23,75±8,96	1,75±0,62	2,25±0,47
через 14 суток						
Контрольная ^а	47,60±1,91	2,20±0,37	20,80±0,86*	22,00±1,41	5,40±0,87*	2,00±0,31
Опытная 1 ^б	55,40±1,46 ^а	3,40±0,50	18,00±1,09	17,00±0,63 ^а	4,60±1,50	1,60±0,60
Опытная 2 ^в	54,40±2,42	2,00±0,3* ^б	16,00±0,44 ^а	22,00±1,97 ^б	3,80±1,01	1,80±0,37
Опытная 3 ^г	59,00±3,20 ^а	2,20±0,37	12,20±1,24 ^{абв}	18,80±2,92	5,80±1,11*	2,00±0,31
через 30 суток						
Контрольная ^а	60,40±3,41	2,20±0,20*	14,00±0,89	17,20±3,66	4,80±1,35	1,40±0,24
Опытная 1 ^б	55,20±1,59	1,60±0,24*	17,40±0,50 ^а	18,00±1,76	6,20±1,42*	1,60±0,40
Опытная 2 ^в	54,40±1,86	1,20±0,20* ^а	18,80±0,48* ^а	22,00±2,54	2,00±0,44 ^б	1,60±0,24
Опытная 3 ^г	51,60±0,40 ^а	1,40±0,24* ^а	14,40±0,67 ^{бв}	27,00±0,94 ^{аб}	3,80±0,80	1,80±0,37

Примечание: * – достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при P≤0,05

Через 30 суток в лейкограмме рыб опытных групп наблюдалось снижение уровня лимфоцитов при одновременном уменьшении доли моноцитов до 1,20%, что может указывать на снижение и воспалительной нагрузки и стабилизации иммунных процессов в организме осетровых рыб. Это может быть связано с адаптацией сибирского осетра к условиям выращивания и возможным иммуностимулирующим эффектом пробиотического препарата, способствующего нормализации функционирования иммунной системы. Анализ бластных форм лейкоцитов показал их небольшое снижение во всех группах к концу экспериментальных работ, что свидетельствует о стабилизации процессов кроветворения.

В целом, применение сорбированного пробиотического препарата способствовало модулированию клеточного состава крови, снижению воспалительных реакций и поддержанию иммунной активности. Обнаружено, что наиболее выраженные изменения наблюдались в группах с применением пробиотика в дозировках 6 и 8 г/кг комбикорма, что указывает на возможное дозозависимое влияние препарата.

Исследование влияния пробиотического препарата на иммунные показатели рыб показало его воздействие индексы сдвига и обилия лейкоцитов, фагоцитарную активность нейтрофилов (таблица 66).

Таблица 66 – Показатели иммунологической реактивности крови сибирского осетра (n=10)

Группа	Индекс сдвига лейкоцитов	Индекс обилия, ед./п.зр.	СЦК, ед.
1	2	3	4
контроль перед опытом*	0,80±0,30	41,90±8,68	1,12±0,04
через 14 суток			
Контрольная ^a	1,01±0,07	52,44±3,66	1,10±0,35
Опытная 1 ^б	0,70±0,03 ^a	46,42±5,19	1,54±0,12*
Опытная 2 ^в	0,78±0,08	45,90±5,12	1,56±0,14*

Продолжение таблицы 66

1	2	3	4
Опытная 3 ^Г	0,65±0,08 ^а	40,96±3,93	1,59±0,13*
через 30 суток			
Контрольная ^а	0,61±0,08	50,24±4,09	1,15±0,35
Опытная 1 ^б	0,76±0,05	43,36±2,39	1,56±0,12*
Опытная 2 ^в	0,80±0,06	44,82±0,99	1,58±0,14*
Опытная 3 ^Г	0,88±0,01 ^а	43,06±6,08	1,60±0,15*

Примечание: * – достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-Г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при $P \leq 0,05$

Обнаружено, что через 14 суток выращивания ИСЛ в контрольной группе составил 1,01, что выше значения до начала исследования (0,80), а ИО увеличился до 52,44, свидетельствуя о повышенной активности лейкоцитарного звена иммунитета. В опытных группах индекс сдвига лейкоцитов оставался ниже, особенно в третьей опытной группе (8 г/кг), но все же превышал физиологическую норму (0,25-0,40). Индекс обилия лейкоцитов в данных группах варьировал в пределах 40,96-46,42, и был ниже контроля, что может свидетельствовать о меньшей нагрузке на иммунную систему рыб. В то же время фагоцитарная активность нейтрофилов значительно повысилась во всех опытных группах (до 1,59), что говорит о стимуляции неспецифической защиты. Необходимо отметить, что в конце исследования СЦК в опытных группах оставался повышенным, подтверждая положительное влияние пробиотического препарата на иммунный статус выращиваемых рыб.

Таким образом, применение пробиотика, сорбированного на активированном угле, способствовало снижению нагрузки на лейкоцитарную систему при одновременном усилении неспецифической защиты организма, что проявилось в увеличении фагоцитарной активности нейтрофилов.

3.5.4.3 Влияние сорбированного пробиотика на антибактериальные свойства сибирского осетра

Исследование влияния пробиотического препарата на бактериальную обсемененность внутренних органов и тканей сибирского осетра показало его разнонаправленное воздействие в зависимости от дозировки препарата и сроков выращивания (таблица 67).

Таблица 67 – Микробная контаминация внутренних тканей и органов сибирского осетра

Группа	Количество колоний бактерий в тканях и органах, шт.			
	кровь	почка	печень	кишечник
контроль перед опытом*	19,40±7,92	2,00±1,04	1,40±0,60	1,40±0,67
через 14 суток				
Контрольная ^а	38,60±22,46	38,40±21,83	39,20±22,04	34,80±18,75
Опытная 1 ^б	37,00±35,02	19,40±16,20	23,00±18,81	31,00±19,55
Опытная 2 ^в	0±0*	0,20±0,20	3,00±2,28	2,40±1,20
Опытная 3 ^г	56,20±26,46	53,40±24,70	57,40±28,65	39,20±22,04
через 30 суток				
Контрольная ^а	198,60±47,92*	15,20±7,43	74,00±19,50*	225,20±71,75*
Опытная 1 ^б	41,20±11,31 ^а	26,20±19,32	27,00±10,96*	88,80±13,57*
Опытная 2 ^в	199,60±3,57* ^б	112,80±26,05* ^{аб}	107,00±36,01*	237,20±6,59* ^б
Опытная 3 ^г	395,80±4,07* ^{абв}	31,00±14,30 ^в	109,60±46,64*	327,20±8,53* ^{бв}

Примечание: * – достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при $P \leq 0,05$

В результате проведенных исследований установлено, что через 14 суток в контрольной группе наблюдалось значительное увеличение количества бактериальных колоний во всех исследуемых тканях и органах, что указывает на рост микробной нагрузки. Во второй опытной группе, получавшей пробиотический препарат в дозировке 6 г/кг, отмечалось уменьшение

бактериальной обсемененности в почках (0,20), печени (3,00), кишечнике (2,40) и полное отсутствие бактерий в крови сибирского осетра. В конце исследований в опытных группах было отмечено значительное повышение колоний бактерий, что может быть связано с воздействием пробиотического препарата. Вероятно, высокие дозировки пробиотика способствовали активному размножению пробиотических штаммов, что отразилось на общей бактериальной обсемененности тканей и органов сибирского осетра.

3.5.4.4 Исследование биохимических показателей иммунокомпетентных органов сибирского осетра при применении пробиотика

Установлено, что у рыб, получавших пробиотический препарат, значительные изменения от первоначальных и контрольных данных были зафиксированы в разные сроки наблюдения (таблица 68).

Таблица 68 – Уровень ПОЛ в иммунокомпетентных органах сибирского осетра

Группа	Уровень МДА, нмоль/г		
	печень	почка	селезенка
контроль перед опытом*	69,27±7,58	14,83±0,89	7,67±0,43
через 14 суток			
Контрольная ^а	89,07±4,69	20,12±1,24*	10,41±0,65*
Опытная 1 ^б	55,00±4,69 ^а	9,41±0,32* ^а	4,77±0,21* ^а
Опытная 2 ^в	51,24±10,49 ^а	9,85±1,00* ^а	5,44±0,60* ^а
Опытная 3 ^г	74,39±3,08 ^{аб}	13,15±1,27 ^{аб}	8,90±0,73 ^{бв}
через 30 суток			
Контрольная ^а	90,76±10,27	20,85±1,07*	13,01±1,41*
Опытная 1 ^б	76,07±4,40	18,91±1,37*	12,28±0,86*
Опытная 2 ^в	66,94±7,85	21,67±0,84*	10,89±0,93*
Опытная 3 ^г	76,13±2,04	19,94±1,63*	9,41±0,33* ^{аб}

Примечание: * – достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при $P \leq 0,05$

Установлено, что на 14-е сутки уровень МДА во всех органах рыб опытных групп был достоверно ниже контроля. При этом наиболее низкие показатели были зафиксированы у сибирского осетра, получавшего пробиотический препарат в дозировках 4 г/кг (опытная 1) и 6 г/кг (опытная 2). Кроме того, у рыб данных групп в почках и селезенке уровень ПОЛ был значимо ниже результатов, полученных перед началом эксперимента, что свидетельствует о снижении окислительного стресса. В конце эксперимента в опытных группах уровень МДА был ниже по сравнению с контролем, а в почках и селезенке достоверно превышал первоначальные показатели. Полученные результаты указывают, что пробиотический препарат способствовал снижению уровня перекисного окисления липидов, что может свидетельствовать о его антиоксидантных свойствах.

Полученные данные по влиянию пробиотика-энтеросорбента на уровень АЗ показали на отсутствие существенных изменений между первоначальными данными и разными группами выращивания (таблица 69).

Таблица 69 – Уровень АЗ в иммунокомпетентных органах сибирского осетра

Время отбора проб	Показатель КОС, л/(мл*мин)		
	печень	почка	селезенка
контроль перед опытом*	8,10±1,90	3,04±0,80	2,58±1,21
через 14 суток			
Контрольная ^а	10,37±1,10	2,70±1,09	5,94±0,53*
Опытная 1 ^б	7,19±1,03	5,01±0,54	2,63±0,20 ^а
Опытная 2 ^в	7,93±0,51	3,76±0,59	2,46±0,15 ^а
Опытная 3 ^г	5,10±0,93 ^{ав}	3,55±0,33	3,88±0,44 ^{абв}
через 30 суток			
Контрольная ^а	3,54±0,56	4,24±1,59	2,53±0,71
Опытная 1 ^б	5,30±0,13 ^а	4,64±0,93	3,52±0,67
Опытная 2 ^в	5,28±1,04	5,45±0,26*	3,91±0,39
Опытная 3 ^г	7,37±1,63	4,15±0,34 ^в	3,77±0,26

Примечание: * – достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при P≤0,05

Установлено, что достоверные различия были зафиксированы в печени и селезенке опытных групп на 14-е сутки выращивания. Низкий уровень КОС указывал на высокое содержание антиоксидантов в исследуемых органах сибирского осетра. Установлено, что исследуемый пробиотический препарат оказывал положительное влияния на антиоксидантную активность в иммунокомпетентных органах в течение первых 2 недель.

Таким образом, использование пробиотика оказывало влияние на активность АЗ в исследуемых органах, что может свидетельствовать о его роли в регулировании клеточного метаболизма и поддержании иммунной активности в организме сибирского осетра.

Применение исследуемого пробиотического препарата оказало влияние на уровень общих липидов в иммунокомпетентных органах сибирского осетра (таблица 70).

Таблица 70 – Уровень ОЛ в иммунокомпетентных органах сибирского осетра

Время отбора проб	Уровень ОЛ, мг%	
	печень	почка
контроль перед опытом*	10216,00±91,73	11140,00±85,30
через 14 суток		
Контрольная ^а	11272,00±131,24*	12060,00±240,60
Опытная 1 ^б	10044,00±81,33 ^а	11426,67±311,19
Опытная 2 ^в	10412,00±137,20 ^{аб}	11340,00±210,30
Опытная 3 ^г	10484,00±94,10 ^{аб}	-
через 30 суток		
Контрольная ^а	11280,00±226,89*	12525,00±251,57
Опытная 1 ^б	11128,00±189,58*	12106,67±196,75
Опытная 2 ^в	9924,00±107,21 ^{аб}	12190,00±90,50
Опытная 3 ^г	10728,00±135,14* ^в	11520,00±52,80

Примечание: * – достоверно относительно контроля перед опытом, ^{а-г} – достоверные отличия между группами рыб. Различия достоверны при $P \leq 0,05$

Через 14 суток после введения пробиотического препарата в контрольной группе наблюдалось повышение уровня ОЛ как в печени, так и в почках. В опытных группах данный показатель в печени был ниже, чем в контрольной группе, особенно в первой опытной группе (10044,00 мг%). В почках наибольшее снижение уровня ОЛ также было отмечено во второй опытной группе и составило 11340,00 мг%. Через 30 суток исследований уровень ОЛ в иммунокомпетентных органах рыб опытных групп был ниже контроля, что может свидетельствовать о влиянии препарата на липидный обмен.

Таким образом, установлено, что применение пробиотика оказывало положительное влияние на липидный обмен в органах сибирского осетра, приводя к снижению уровня ОЛ, что может быть связано с его эффектами на метаболизм и поддержание гомеостаза в организме выращиваемых рыб.

В заключении стоит отметить, что введение иммобилизованных форм пробиотических препаратов в рацион рыб способствует стимуляции неспецифического иммунитета, лечению и профилактике при инфекциях желудочно-кишечного тракта, возникающих из-за резкой смены состава рациона, нарушений режимов кормления, технологических стрессов, восстановлению микробиоценоза пищеварительного тракта после лечения антибиотиками, улучшению процессов пищеварения.

Результаты проведенных исследований показали, что иммобилизованные пробиотические препараты на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* оказывали значительное влияние на иммунный статус осетровых рыб, что подтверждает их эффективность в повышении естественной резистентности организма в условиях интенсивной аквакультуры. Установлено, что применение данных препаратов способствовало улучшению гуморального иммунитета осетровых рыб, выраженного повышением активности лизоцима и бактерицидной активности сыворотки крови, а также снижением уровня иммунных комплексов. Данные изменения свидетельствуют о стабилизации воспалительных процессов и усилении антимикробной активности, что представляет собой ключевые механизмы защиты организма рыб от

инфекционных агентов и стрессовых воздействий. Кроме того, было зафиксировано существенное улучшение клеточного иммунитета, подтвержденное увеличением фагоцитарной активности нейтрофилов, что указывает на повышение способности клеток иммунной системы осетровых рыб к эффективному захвату и уничтожению патогенных микроорганизмов, а также на укрепление неспецифической иммунной защиты.

Таким образом, результаты исследований демонстрируют, что использование сорбированных пробиотиков способствует значительному улучшению как гуморальных, так и клеточных механизмов иммунного ответа осетровых рыб. Это открывает перспективы для интеграции данных препаратов в практику интенсивной аквакультуры с целью повышения иммунной устойчивости рыб и оптимизации их функционального состояния в условиях современных методов индустриального выращивания.

3.6 Оценка эффективности новых рецептур комбикормов с сорбированными пробиотическими препаратами на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* при выращивании осетровых рыб

Организация рационального кормления рыб, основанная на применении высокоэффективных комбикормов, является одной из важнейших основ интенсивной аквакультуры, определяющей эффективность рыбоводного процесса в целом (Сорвачев, 1982; Васильева и др., 2006; Бурлаченко, 2008). Влияние состава кормов на рост и развитие рыб определяется, прежде всего, их видоспецифическими метаболическими особенностями, индивидуальными характеристиками обменных процессов, а также условиями среды и технологией выращивания. Для обеспечения оптимальной эффективности кормления необходимо учитывать не только количественное содержание незаменимых аминокислот и других питательных веществ, но и качественные показатели белков и пептидов, включая их структуру и молекулярную массу. Эффективность усвоения кормовых компонентов во многом зависит от их сочетания и взаимного

влияния в составе корма. Потребности рыб в питательных веществах формируются с учетом особенностей их естественного питания, включающего организмы пелагиали, придонные и донные компоненты биоценоза, а также водоросли (Скляр, Студенцова, 2001; Матишов и др., 2006; Пономарев и др., 2013).

В связи с этим разработка полноценных и сбалансированных комбикормов требует глубокого понимания спектра пищевых ресурсов конкретного вида в природных условиях, химического состава этих кормовых объектов и физиологически обусловленных требований рыб к основным элементам питания (Гамыгин и др., 1989; Пономарев и др., 2009).

При разработке полноценных и высокоэффективных комбикормов требуется грамотный подбор сухих ингредиентов, оценка их технологических и продукционных характеристик, а также оптимизация рецептуры с учетом физиологических потребностей осетровых рыб. При производстве кормов применяется широкий спектр компонентов растительного и животного происхождения, различных добавок и биологически активных веществ. Существующие исследования показывают, что расширение состава и повышение разнообразия используемых компонентов способствует увеличению питательной ценности и биологической эффективности кормов.

В современных условиях развития индустриальной аквакультуры особую значимость приобретают пробиотические препараты, применяемые для профилактики и терапии заболеваний рыб бактериальной и вирусной этиологии, а также для стабилизации и нормализации кишечной микрофлоры. Использование таких препаратов способствует снижению стрессовых реакций, возникающих при смене рационов и воздействии технологических факторов, повышает общую резистентность организма и стимулирует иммунные функции. Дополнительно отмечается улучшение переваримости и усвоения питательных веществ из комбикормов, что в конечном итоге оказывает положительное влияние на эффективность выращивания (Федорова и др., 2016; Жандалгарова, 2017).

Перспективным направлением повышения эффективности пробиотических препаратов является их сорбция на энтеросорбентах, обеспечивающая защиту микроорганизмов от неблагоприятного воздействия факторов внешней среды и желудочно-кишечного тракта, а также возможность их равномерного распределения в составе кормовой смеси. Использование сорбированных форм пробиотических препаратов при производстве комбикормов представляет интерес для аквакультуры в связи с необходимостью сохранения жизнеспособности микроорганизмов на этапах технологической обработки и хранения корма и обеспечения их поступления в желудочно-кишечный тракт рыб.

На основании изложенного были разработаны рецептуры продукционных комбикормов для осетровых рыб с включением пробиотических препаратов на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, сорбированных на энтеросорбентах. Разработанные рецептуры ориентированы на обеспечение потребностей осетровых рыб в основных питательных веществах и повышение функциональной ценности комбикормов за счет введения сорбированных пробиотических компонентов. Их применение создает предпосылки для улучшения использования питательных веществ корма, поддержания физиолого-иммунологического статуса, повышения продуктивности и эффективности выращивания осетровых рыб.

3.6.1 Исследование питательной ценности и качества разработанных комбикормов с добавлением сорбированных пробиотических препаратов

Питательная ценность комбикормов в аквакультуре играет важную роль в обеспечении роста, жизнестойкости и продуктивности рыб. Рацион, содержащий оптимальное соотношение белков, жиров, углеводов, витаминов и минеральных веществ, способствует повышению усвояемости корма, улучшению иммунитета и общего физиологического состояния выращиваемых рыб. Изучение питательной ценности комбикормов необходимо для разработки эффективных технологий кормления ценных объектов аквакультуры, соответствующих их потребностям

(Скляров, Студенцова, 2001; Пономарев и др., 2013). Это позволяет не только оптимизировать затраты на кормление, но и повысить экологическую безопасность аквакультуры.

Известно, что комбикорма для рыб должны соответствовать ГОСТ 10385-2014 «Комбикорма для рыб. Общие технические условия», что предполагает строгое соответствие установленным требованиям к составу, качеству и безопасности кормов. Корма для рыб должны быть изготовлены из качественного и безопасного сырья животного, растительного, микробиологического и минерального происхождения, а также содержать различные биологически активные вещества в определенных дозировках.

Таким образом, контроль качества комбикормов включает себя органолептические, физико-химические и микробиологические исследования, позволяющие обеспечить стабильность состава, питательной ценности и отсутствие вредных примесей, снижая тем самым риск возникновения заболеваний и повышая продуктивность выращиваемых рыб.

По результатам проведенных исследований установлено, что разработанные комбикорма для осетровых рыб соответствовали требованиям ГОСТ 10385-2014 «Комбикорма для рыб. Общие технические условия». Рецептуры комбикормов представлены в таблицах 71, 72.

Таблица 71 – Разработанная рецептура комбикорма для осетровых рыб с пробиотическим препаратом на энтеросорбенте СУМС-1

Компоненты, г/кг	Контроль	Разработанный комбикорм
1	2	3
Мука рыбная	390	390
Витазар	200	200
Глютен кукурузный	140	140
Шрот соевый	100	100
Жир рыбий	70	70

Продолжение таблицы 71

1	2	3
Дрожжи кормовые	50	43
Мука пшеничная	40	40
Премикс ВМП ПО-5	10	10
Пробиотик	-	7,0

Таблица 72 – Разработанная рецептура комбикорма для осетровых рыб с пробиотическим препаратом на активированном угле

Компоненты, г/кг	Контрольная	Разработанный комбикорм
Мука рыбная	390	390
Витазар	200	200
Глютен кукурузный	140	140
Шрот соевый	100	100
Жир рыбий	70	70
Дрожжи кормовые	50	44
Мука пшеничная	40	40
Премикс ВМП ПО-5	10	10
Пробиотик	-	6,0

По составу комбикорма соответствовали потребностям осетровых рыб в основных питательных веществах: масса сырого протеина – 42%, масса сырого жира – 10%, масса сырых углеводов – 20%, масса сырой клетчатки – 2%, масса сырой золы – 10%, влага – 10%, минеральные вещества – 9%, общая энергия – 15 МДж/кг.

Анализ основных физико-химических показателей разработанных комбикормов для осетровых рыб показал, что они соответствовали требованиям ГОСТ 10385-2014 и обеспечивали их качество и эффективность (таблица 73).

Таблица 73 – Физико-химические показатели комбикормов для осетровых рыб

Показатель	Разработанные комбикорма	Норматив
Крошимость, %	4,1	Не более 5,0
Водостойкость, мин	36	Не менее 30 мин
Скорость набухания, мин	5,5	-

Показатель крошимости составлял 4,1% и был ниже допустимого нормативного значения (не более 5,0%), что свидетельствует о прочности гранул и минимальных потерях корма при транспортировке и кормлении. Водостойкость гранул достигала 36 минут, что превышает нормативные значения, гарантируя сохранность структуры корма в воде, снижение потерь питательных веществ и предотвращение загрязнения водной среды. Скорость набухания комбикормов составляла 5,5 минут. Быстрое набухание способствовало доступности питательных веществ для выращиваемых рыб, но при этом гранулы сохраняли форму и не распадались слишком быстро. Таким образом, можно сделать вывод о том, что разработанные комбикорма обладали высокой физико-химической стабильностью, что делает их пригодными для эффективного использования в аквакультуре.

Анализ органолептических показателей разработанных комбикормов показал их соответствие требованиям ГОСТ 10385-2014, что подтверждает их качество и пригодность для кормления осетровых рыб (таблица 74).

Таблица 74 – Органолептические показатели разработанных комбикормов

Наименование характеристики	Разработанные комбикорма
Внешний вид	Гранулы цилиндрической формы матовой поверхностью без трещин, сколов и расслоений
Запах	Характерный для используемого сырья, без посторонних и затхлых примесей
Цвет	Темно-коричневый

По результатам проведенных исследований установлено, что применение разработанного комбикорма оказало положительное влияние на рыбоводно-биологические показатели бестера (таблица 75). За 30 суток выращивания абсолютный прирост увеличился на 16,9 г и составил 58,6 г, среднесуточный прирост – на 0,56 г, достигнув 1,95 г. Среднесуточная скорость роста повысилась на 0,21% и составила 0,79%.

Показатель	Контрольная	Разработанный комбикорм
1	2	3
Масса, г: начальная	221,7±1,78	220,7±2,32
конечная	263,4±2,12	279,3±2,51
Абсолютный прирост, г	41,7	58,6

Продолжение таблицы 75

1	2	3
Среднесуточный прирост, г	1,39	1,95
Среднесуточная скорость роста, %	0,58	0,79
Коэффициент упитанности по Фультону	0,53	0,57
Коэффициент массонакопления	0,04	0,05
Период выращивания, сут.	30	30

Таким образом, применение разработанного комбикорма способствовало повышению основных рыбоводно-биологических показателей бестера, что подтверждает эффективность рецептуры и целесообразность ее применения при выращивании осетровых рыб.

3.6.3 Оценка влияния разработанного комбикорма с сорбированным на активированном угле пробиотическим препаратом на продуктивность бестера

Результаты выращивания бестера свидетельствуют о положительном влиянии разработанного комбикорма на динамику массы и основные рыбоводно-биологические показатели (таблица 76). За 30 суток выращивания конечная масса рыб в группе, получавшей разработанный комбикорм, составила 280,2 г, что на 16,8 г выше контроля. Абсолютный прирост увеличился с 41,7 до 55,1 г, а среднесуточный прирост – с 1,39 до 1,84 г. Среднесуточная скорость роста при использовании разработанного комбикорма достигла 0,73%, превысив контрольный показатель на 0,15%. Коэффициент упитанности по Фультону составил 0,55, коэффициент массонакопления – 0,05.

Таким образом, применение разработанных комбикормов способствовало повышению интенсивности роста бестера, выраженной увеличением прироста массы, показателей упитанности и массонакопления. Полученные результаты подтверждают целесообразность использования разработанных рецептур в технологиях выращивания осетровых рыб и их перспективность для применения в аквакультуре.

Одним из ведущих направлений современной аквакультуры является исследование в области изучения бактериофагов, что связано с возрастающим интересом к их практическому применению с целью диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний рыб (Иванова и др., 2019).

Бактериофаги, также известные как «фаги», представляют собой вирус, избирательно поражающий бактериальные клетки. Они состоят из генома нуклеиновой кислоты, заключенного в оболочку кодируемых фагом капсидных

белков, которые защищают генетический материал и обеспечивают его доставку в следующую клетку-хозяина (Шлегель, 1987). Все бактериофаги обладают антигенными свойствами, т.е. способны вызывать развитие тех или иных видов иммунного ответа. После введения фагов в организм опытного животного в сыворотке крови можно обнаружить специфические антитела, способные взаимодействовать только с конкретными фагами. Препараты таких сывороток называют антифаговыми. После взаимодействия фага с антителами, содержащимися в антифаговой сыворотке, происходит инактивация фага – он теряет способность инфицировать и вызывать лизис чувствительных к нему микробов. Поскольку действие каждой антифаговой сыворотки строго специфично, то их можно успешно применять для идентификации и классификации фагов, а также очистки микробных культур от фагов. С помощью фаговых антисывороток удалось доказать, что белки оболочки фага отличаются от белков оболочки отростка, базальной пластинки и ее нитевидных образований, что говорит о сложности строения фаговой частицы (Иванова и др., 2019).

Вирулентность бактериофага обусловлена качеством его фермента – лизина, способствующего процессам переваривания и растворения тела бактерий, и обладающего высокой специфичностью. Например, лизин, вырабатываемый стафилококковым бактериофагом, может растворять только стафилококки и не может оказывать лизирующее действие на стрептококковые бактерии. Установлено, что в природе существует огромное количество различных бактериофагов, отличающихся друг от друга, как по степени своей вирулентности, так и по способности вырабатывать различный лизин, растворяющий тот или иной вид бактерий (Покровская и др., 1941).

Лизис бактерий является наиболее важным, но не единственным свойством бактериофагов. Они обладают также способностью наносить частичные повреждения бактериальной клетки или вызывать в ней глубокие изменения, обуславливая этим возникновение новых бактериальных форм – мутаций. Например, под влиянием бактериофага удается из патогенных и высоковирулентных микроорганизмов получить мутации авирулентные. В ряде

случаев под влиянием бактериофага изменяются и другие свойства патогенных бактерий: токсигенные стафилококки переходят в негемолитические и лишённые других токсинов (дермотоксина, лейкоцидина и др.). Способность бактериофагов изменять вирулентность, обезвреживать их и усиливать фагоцитоз, необходимо использовать в борьбе с различными инфекционными заболеваниями.

Бактериофаготерапия представляет собой альтернативный способ применения антибиотиков с целью инактивации патогенных бактерий в организме рыб без существенного воздействия на структуру его естественных бактериальных сообществ. Механизм их действия значительно отличается от механизма действия антибиотиков, поэтому они могут оказывать воздействие даже на патогенные штаммы с множественной лекарственной устойчивостью, что делает их очень удобными для использования в аквакультуре. Кроме того, ещё одним негативным фактором использования антибиотиков является то, что их остатки присутствуют в организме рыб даже после завершения терапии, в отличие от фагов, которые присутствуют только при наличии патогенных микроорганизмов.

Известно, что бактериофаги стимулируют иммунный ответ в организме, вызывая как специфические, так и неспецифические иммунные ответы. Врожденная иммунная система реагирует первой, производя фагоциты для удаления бактериофагов, а затем адаптивная иммунная система усиливает этот первый ответ лимфоцитами и антителами. Эти две системы действуют вместе, предотвращая прикрепление вирусов к бактериям, и иногда может наблюдаться снижение терапевтического эффекта или его отсутствие (Kaur et al., 2012). Тот факт, что лизаты бактериофагов обладают иммуномодулирующим действием и вызывают как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ исследовали Yun et al. (2019) при использовании лизата фага *Aeromonas hydrophila* для иммуностимуляции сазана. Было обнаружено, что рыбы, иммунизированные лизатом фага, имели более высокую выживаемость после заражения, чем рыбы, иммунизированные стандартной вакциной с

инактивированными бактериальными клетками. Также было установлено, что бактериофаги вызывают иммунный ответ, а, следовательно, устойчивость к бактериальной инфекции.

При использовании бактериофагов необходимо учитывать их специфичность, бактериальную устойчивость, безопасность, иммунный ответ организма-хозяина, состав, стабильность фаговых препаратов, а также их влияние на окружающую среду (Sharma et al., 2017; Kowalska et al., 2020).

В аквакультуре бактериофаги применяются для увеличения линейно-весового прироста (Kazimierczak et al., 2019), стабилизации физиологического состояния выращиваемых рыб, уничтожения патогенных микроорганизмов, нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта с целью формирования и поддержания в нем колонизационной резистентности. Данные препараты свободно проникают в ткани организма, оказывают иммуностимулирующее действие, не обладая иммуносупрессивным эффектом (Silva et al., 2014).

Бактериофаготерапия в аквакультуре все еще находится в научной стадии и требует дальнейшего изучения, однако, уже известно, что фаги можно использовать не только для лечения инфекционных заболеваний, но и для их профилактики (Letchumanan et al., 2016).

3.7.1 Оценка влияния пибактериофага на интенсивность роста стерляди

Основой успешного проведения фаготерапии является создание в организме достаточной «рабочей» концентрации бактериофага, необходимой для осуществления феномена бактериофагии. Известно, что в организме не происходит массового размножения бактериофага, как это наблюдается в опытах *in vitro*. Кроме того, сравнительно небольшое количество бактериофага, образуемого за счет лизированных бактерий, адсорбируется близлежащими тканями и не распространяется по всему организму (Полупанов и др., 1968).

В связи с этим возникает острая необходимость определения кратности

применения фаговых препаратов и их эффективной концентрации, что позволит с максимальным эффектом использовать способность бактериофага активно разрушать и видоизменять различные патогенные микроорганизмы.

В настоящее время в аквакультуре известно несколько способов использования бактериофагов: иммерсия, инъекция, обработка комбикорма и местное использование (Vinod et al., 2006; Imbeault et al., 2006; Karunasagar et al., 2007; Higuera et al., 2013; Lomeli-Ortega, 2014; Zhang et al., 2015; Laanto et al., 2015; Silva et al., 2016). Иммерсионный метод является наиболее распространенным при использовании фагов в качестве защитных средств от бактериальных инфекций. Однако его применение эффективно лишь тогда, когда заболевание носит только внешний характер или, когда фаги способны преодолеть естественные барьеры и достичь внутреннего очага инфекции.

Khairnar et al. (2013) описали успешное использование бактериофагов против устойчивых к антибиотикам штаммов *Pseudomonas aeruginosa* путем непосредственного их нанесения на инфицированный участок кожи сома. Также при многочисленных исследованиях сравнивались различные методы введения бактериофагов. Li et al. (2016) описали использование фагов для борьбы с *Vibrio cyclitrophicus* у молоди трепанга путем обработки корма, инъекции и погружения. Было установлено, что кормление было более эффективным, чем погружение, а наименее эффективным оказалась инъекция. Jun et al. (2017) сравнивали кормление и погружение в воду, и пришли к выводу, что дозировка бактериофага наиболее значима, чем способ его введения.

Некоторые данные показывают, что наименьшая применяемая доза является такой же эффективной, чем использование наиболее высоких дозировок. Wang et al. (2017) использовали небольшую концентрацию бактериофагов для погружения рыб, инфицированных *Vibrio harveyi*, так как более высокая дозировка была непрактичной и неэкономичной. Лечение применялось вскоре после заражения, и способствовало снижению смертности рыб на 70%. Rong et al. (2014) протестировали бактериофаг в процессе очистки от *Vibrio parahaemolyticus* устриц и достигли высоких результатов при самой низкой применяемой

концентрации фага. Zhang et al. (2015) показали, что действие бактериофагов при лечении морских огурцов носит дозозависимый характер, и установили, что чем меньше дозировка фагов, тем хуже протекает защита от *Vibrio alginolyticus*. Такой же эффект наблюдался в исследованиях Karunasagar et al. (2007), где результаты по снижению количества бактерий зависели от дозировки бактериофага.

В связи с этим были проведены опыты по определению наиболее эффективного метода применения пиобактериофага и его дозировки при выращивании осетровых рыб в условиях УЗВ. Для этого экспериментальные рыбы были разделены на две опытные группы и контрольную. В первой опытной группе рыб выращивали в воде с добавлением пиобактериофага в концентрации 1 мл на 100 л воды, во второй – с добавлением пиобактериофага в концентрации 1 мл на 100 л воды и обработкой препаратом комбикорма из расчета 10 мл на суточную норму кормления. Кратность введения пиобактериофага составила 1 раз в сутки в течение 30 дней.

Проведенные исследования показали, что наиболее высокие рыбоводно-биологические показатели стерляди наблюдались во второй опытной группе, в которой бактериофаг добавлялся в воду и обрабатывали им корма (таблица 77).

Таблица 77 – Рыбоводно-биологические показатели стерляди при применении пиобактериофага (n=20)

Показатель	Группа		
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2
Масса начальная, г	121,0±4,90	123,3±4,95	119,4±3,67
Масса конечная, г	141,4±4,22	153,1±3,11*	154,2±2,45**
Абсолютный прирост, г	20,4	29,8	34,8
Среднесуточный прирост, г	0,68	0,99	1,16
Среднесуточная скорость роста, %	0,52	0,72	0,85
Период выращивания, сут.	30	30	30

Примечание: различия достоверны при * - $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$

Величина абсолютного и среднесуточного приростов в данной группе составила 34,8 г и 1,16 г, соответственно, что выше, чем в первом опытном и контрольном вариантах. Показатель среднесуточной скорости роста был также выше у стерляди, выращенной при добавлении бактериофага в воду и обработке препаратом комбикорма, и составил 0,85%. В первой опытной группе данный показатель был ниже на 0,13%, а в контрольной на 0,33%. Коэффициент упитанности по Фультону во всех группах отличался незначительно и варьировал в пределах 0,31-0,35. Коэффициент массонакопления, характеризующий интенсивность роста, у рыб опытных групп составил 0,04, что в 1,3 раза выше, чем в контроле.

Таким образом, по данным рыбоводно-биологических показателей можно судить о положительном действии пиобактериофага на эффективность выращивания стерляди. Установлено, что добавление препарата в воду рыбоводных емкостей и обработка им комбикорма способствует получению более высоких показателей прироста.

3.7.2 Анализ влияния пиобактериофага на физиолого-биохимические и иммунологические показатели стерляди

Гематологические и биохимические показатели являются объективными индикаторами физиологического состояния организма и занимают важное место в биологических исследованиях. Незначительные колебания данных параметров могут отражать как нормальные функциональные изменения, так и развитие патологических состояний, что обуславливает широкое применение данных показателей в медицинских и ветеринарных исследованиях.

Для оценки физиологического статуса осетровых рыб был выполнен анализ основных гематологических и биохимических показателей стерляди (таблица 78).

Таблица 78 – Физиолого-биохимические показатели стерляди при применении пиобактериофага (n=20)

Показатели	Группа		
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2
до начала эксперимента			
Гемоглобин, г/л	59,7±2,11	57,7±1,57	59,4±1,39
Общий белок г/л	24,4±0,93	24,3±0,85	25,1±0,90
Холестерин, ммоль/л	2,7±0,12	2,8±0,11	2,5±0,23
В – липопротеиды, г/л	3,4±0,14	4,5±0,10***	4,1±0,16**
Глюкоза, ммоль/л	3,1±0,07	3,8±0,10	3,4±0,13
СОЭ, мм/ч	3,5±0,21	2,9±0,11**	3,2±0,16
в конце эксперимента			
Гемоглобин, г/л	63,4±1,50	72,7±1,60***	74,2±1,61***
Общий белок г/л	23,2±0,84	26,7±0,39***	28,4±0,67***
Холестерин, ммоль/л	2,9±0,09	2,5±0,13**	2,0±0,10***
В – липопротеиды, г/л	3,1±0,07	3,6±0,08	3,4±0,08**
Глюкоза, ммоль/л	2,9±0,06	2,4±0,10	2,3±0,10***
СОЭ, мм/ч	2,9±0,19	2,6±0,11	2,2±0,10**

Примечание: различия достоверны при ** - $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Для стерляди, выращенной с применением пиобактериофага поливалентного, к концу периода выращивания был отмечен значительный рост уровня гемоглобина, достигший 74,2 г/л, что на 14,6% превышало показатели контрольной группы. Одновременно использование данного препарата способствовало заметному повышению концентрации сывороточного белка в крови до 28,4 г/л, что отражает улучшение обменных процессов и служит индикатором повышенной физиологической активности организма. Повышенная обеспеченность стерляди сывороточными белками создает благоприятные условия для оптимизации обменных процессов, что в свою очередь гарантирует усиление неспецифической резистентности к неблагоприятным факторам среды. Белковые фракции сыворотки крови выполняют ключевую роль в поддержании

функционального состояния гуморального иммунитета, обеспечивая защиту организма за счет активации различных иммунных механизмов (Микряков и др., 2001). Это особенно важно в условиях индустриального выращивания, когда рыбы испытывают повышенный стресс из-за плотности посадки и воздействия внешних факторов.

Кроме того, одним из информативных биохимических показателей, отражающих физиологическое состояние организма, является уровень глюкозы. В проведенном исследовании у стерляди второй опытной группы наблюдалось снижение концентрации глюкозы в крови к концу эксперимента. Это свидетельствует о том, что применение фагового препарата не приводило к нарушению углеводного обмена, а наоборот, способствовало нормализации метаболических процессов. Стабильный и даже пониженный уровень глюкозы указывает на уменьшение стрессовой нагрузки и более эффективное использование энергии организмом, что дополнительно подтверждает положительное влияние пиобактериофага на физиологический статус рыб.

Состав периферической крови рыб лабилен в зависимости от условий среды обитания. Однако четко прослеживаются общие закономерности: в основном в белой крови преобладают лимфоциты. При наличии воспалительного процесса состав клеток периферической крови меняется вследствие миграции из кроветворных органов в периферическую кровь клеток моноцитоидной и лимфоидной линий кроветворения (Киташова, 2002; Журавлева и др., 2013).

Одним из информативных показателей иммунологического состояния рыб является лейкоцитарная формула крови. Соотношение лейкоцитов в лейкоцитарной формуле крови отражает не только их клеточный иммунитет, но и является характеристикой физиологического состояния организма рыб. Анализ лейкоцитарной формулы крови стерляди представлен в таблице 79.

Таблица 79 – Лейкоцитарная формула крови стерляди, % (числитель-начало исследования, знаменатель-конец исследования) (n=10)

Показатель	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2
Миелобласты	<u>1,54±0,45</u>	<u>1,42 ±0,41</u>	<u>1,43±0,23</u>
	1,28±0,36	1,48 ±0,32	1,35±0,41
Миелоциты	<u>0,96±0,23</u>	<u>1,17±0,12</u>	<u>1,15±0,32</u>
	1,03±0,17	0,65±0,11*	0,89±0,14
Метамиелоциты	<u>1,21±0,07</u>	<u>0,63±0,04***</u>	<u>0,75±0,02***</u>
	0,52±0,14	0,55±0,13	0,51±0,15
Палочкоядерные нейтрофилы	<u>4,73±0,25</u>	<u>5,11±0,32</u>	<u>5,24±0,35</u>
	5,84±0,34	5,34±0,17	5,61±0,23
Сегментоядерные нейтрофилы	<u>10,14±0,63</u>	<u>9,42±0,82</u>	<u>9,52±0,59</u>
	10,61±0,21	7,82±0,33***	7,59±0,42***
Эозинофилы	<u>0,42±0,05</u>	<u>0,69±0,25*</u>	<u>0,57±0,07**</u>
	0,35±0,11	0,23±0,17	0,24±0,13
Базофилы	<u>1,63±0,24</u>	<u>2,17±0,34</u>	<u>2,12±0,22</u>
	1,73±0,14	1,52±0,42	1,58±0,31
Моноциты	<u>0,63±0,93</u>	<u>1,23±0,36</u>	<u>1,14±0,54</u>
	1,22±0,18	1,37±0,14	1,42±0,11
Лимфоциты	<u>78,24±1,33</u>	<u>78, 19±1,41</u>	<u>77,54±1,31</u>
	78,42±1,12	81,05±1,33	82,52±1,24

Примечание: различия достоверны при * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

В ходе анализа лейкоцитарной формулы крови исследуемых рыб было выявлено изменение соотношения различных типов лейкоцитов (рисунок 53). У стерляди отмечался сдвиг в сторону увеличения лимфоцитов за счет снижения нейтрофилов и эозинофилов. В конце выращивания доля лимфоцитов возросла в опытных группах до 82,52%. Разница между содержанием лимфоцитов в вариантах опыта и контролем составляла от 0,63 до 2,1% и не была статистически достоверной. Данным клеткам принадлежит ведущая роль во всех реакциях

приобретенного иммунитета, поскольку они специфически распознают конкретный возбудитель вне зависимости от его месторасположения: внутри или вне клеток, в тканевой жидкости или в крови. Эти процессы основаны на неспецифических механизмах распознавания, позволяющих связывать самые разнообразные микробные продукты, и относятся к проявлениям врожденного иммунитета и образуют первую линию защиты против инфекции (Ройт, Бростофф, 2000).

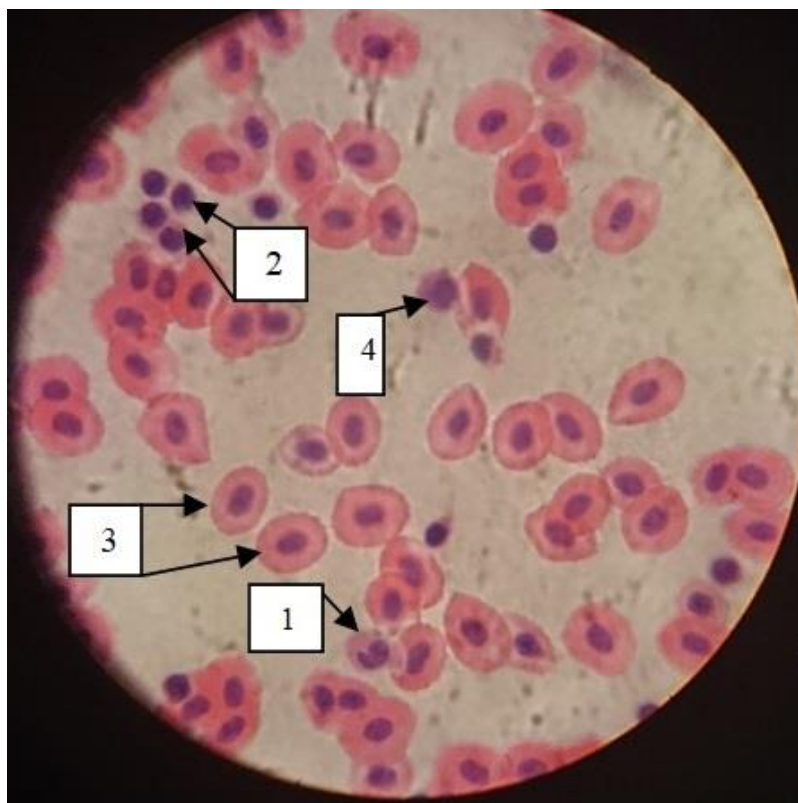


Рисунок 53 – Микроскопия мазка крови стерляди: 1 – нейтрофил;
2 – лимфоциты; 3 – эритроциты; 4 – эритробласт (увеличение 60х0,90)

Полиморфноядерные нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы) составляют вторую значительную группу фагоцитирующих клеток. Данные клетки мигрируют в ткани, отвечая на определенные стимулы, и относятся к короткоживущим клеткам, которые поглотив чужеродный материал, разрушают его и затем погибают. В изучаемом лейкоцитарном профиле крови стерляди обнаружено, что для рыб опытных групп в конце исследования было характерно снижение уровня сегментоядерный нейтрофилов с 9,42-9,52 до 7,59-7,82%. В контрольном варианте данный показатель незначительно повысился и составил

10,61%, что, вероятно, связано с активацией гранулопоеза. Количество моноцитов в контроле и обеих опытных группах находилось на одном уровне и не превышало 1,42% от общего объема просчитанных клеток. Низкий процент моноцитов в лейкоцитарной формуле свидетельствует о хорошем физиологическом состоянии выращиваемых рыб.

При анализе уровня СРБ установлено, что у рыб перед началом опыта во всех группах зафиксирован его слабopоложительный уровень (на уровне 6 мг/л) (таблица 80). Однако в конце выращивания только во второй опытной группе был отмечен отрицательный уровень данного показателя (менее 6 мг/л).

Таблица 80 – Уровень СРБ в крови стерляди, мг/л (n=10)

Время отбора проб	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2
до начала эксперимента	6	6	6
в конце эксперимента	6	6	<6

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования позволили сделать вывод о том, что применение бактериофагов оказывает положительное влияние на физиолого-биохимические и иммунологические показатели осетровых рыб. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о хорошем физиологическом состоянии исследуемых рыб и благоприятных условиях их выращивания.

3.7.3 Оценка влияния интести-бактериофага на интенсивность роста стерляди

Эффективность применения интести-бактериофага оценивали на основании экспериментального выращивания стерляди в течение 30 суток. Для этого выращиваемые рыбы были разделены на опытные группы и контроль аналогично предыдущему опыту. Установлено, что за период проведенных исследований рыбы второй опытной группы имели наиболее высокие рыбоводно-биологические показатели (таблица 81).

Таблица 81 – Рыбоводно-биологические показатели стерляди при применении интести-бактериофага (n=20)

Показатель	Группа		
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2
Масса начальная, г	156,2±2,11	157,4±3,25	154,3±1,90
Масса конечная, г	175,7±2,12	177,2±3,22	180,3±3,31
Абсолютный прирост, г	19,5	19,8	26,0
Среднесуточный прирост, г	0,65	0,66	0,87
Среднесуточная скорость роста, %	0,39	0,40	0,52
Коэффициент упитанности по Фультон	1,27	1,46	1,48
Коэффициент массонакопления	0,02	0,02	0,03
Выживаемость, %	100	100	100
Период выращивания, сут.	14	14	14

Величина абсолютного прироста во второй группе составила 26,0 г, что на 6,2 и 6,5 г выше, чем в первой опытной и контрольной группах, соответственно. Показатель среднесуточной скорости роста был также выше во второй опытной группе и составлял 0,52%. Коэффициент упитанности по Фультону, отражающий связь между средней массой тела и длиной рыбы, не отличался достоверно и варьировал в пределах 1,27-1,48. Наиболее высокое значение коэффициента массонакопления было характерно для рыб второй опытной группы (0,03), в то время как в остальных группах данный показатель не превышал 0,02.

Таким образом, по данным рыбоводно-биологических показателей, можно судить о положительном влиянии интести-бактериофага на интенсивность выращивания стерляди. Установлено, что добавление препарата в воду и обработка им комбикорма (вторая опытная группа) способствует получению более высоких показателей прироста.

3.7.4 Анализ влияния интести-бактериофага на физиолого-биохимические и иммунологические показатели стерляди

Оценку физиологического состояния рыб в экспериментальных условиях выращивания проводили по основным гематологическим и морфобиохимическим показателям крови, характеризующим метаболическую функцию крови и, в частности, динамику транспортируемых кровью белков и липидов. Исследование гематологических показателей крови стерляди в начале и после эксперимента не выявило отклонений от нормативных значений (Mastoi, 2012).

Важнейшим элементом реализации дыхательной функции является уровень гемоглобина. Анализируя данные, полученные после завершения экспериментальных работ, было установлено достоверное повышение уровня концентрации гемоглобина на 10,8 г/л у второй опытной группы по сравнению с контрольным вариантом, что может быть связано с более интенсивным обменом веществ. Содержание общего сывороточного белка в крови рыб второй опытной группы было выше контрольной на 12,7% и находилось в пределах референсных значений (рисунок 54).

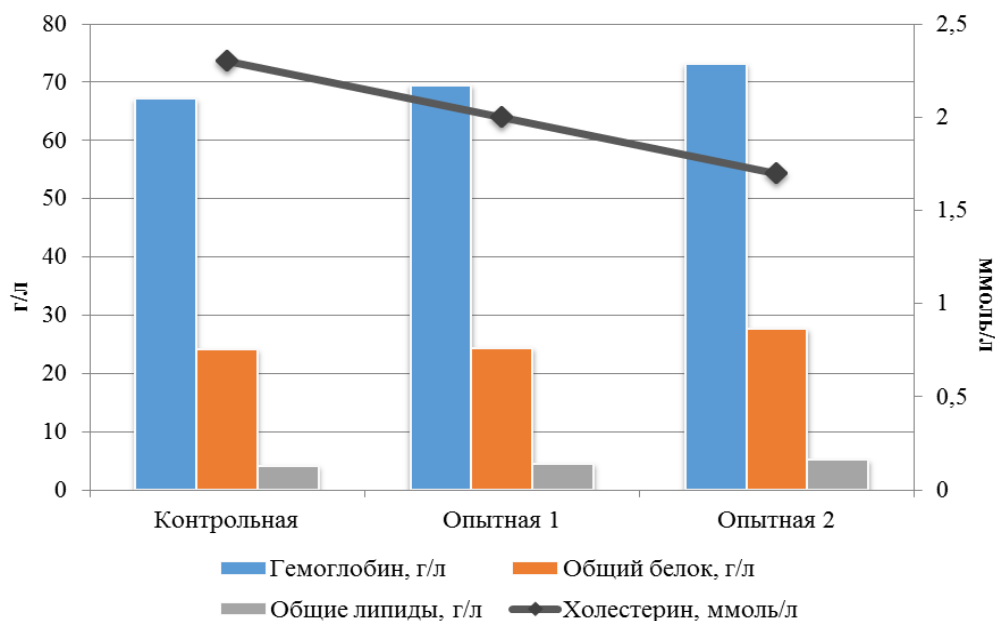


Рисунок 54 – Физиолого-биохимические показатели стерляди (n=20)

При анализе СОЭ установлено, что в двух опытных группах была выявлена тенденция к снижению показателя к концу экспериментальных работ (рисунок

55). Так, у рыб второй опытной группы скорость оседания эритроцитов снизилась с 3,25 до 2,5 мм/ч, в то время как в контрольном варианте данный показатель остался на прежнем уровне и составил 3,8 мм/ч.

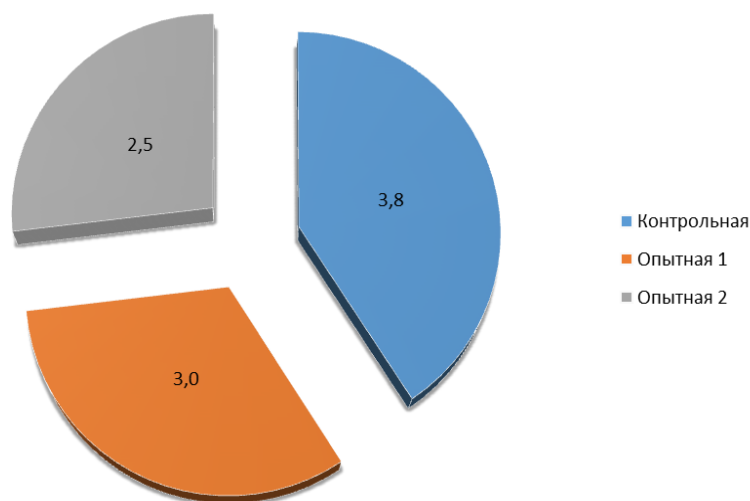


Рисунок 55 – Скорость оседания эритроцитов крови стерляди, мм/ч

Необходимо отметить, что во всех вариантах выращивания СОЭ не превышала нормативные показатели, что может свидетельствовать об отсутствии воспалительных процессов и физиологических изменений в организме выращиваемых рыб.

Лейкоцитарная формула крови представляет собой ключевой показатель, который не только демонстрирует состояние клеточного иммунитета у рыб, но и служит индикатором их общего физиологического состояния. Анализ лейкоцитарной формулы крови стерляди представлен в таблице 82, рисунке 56.

Таблица 82 – Лейкоцитарная формула крови стерляди при применении интести-бактериофага, % (n=10)

Показатель	Группа		
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2
1	2	3	4
Лимфоциты	77,8±1,41	78,2±1,22	78,8±0,39
Нейтрофилы сегментоядерные	7,5±0,12	7,0±0,81	10,0±0,34***

Продолжение таблицы 82

1	2	3	4
Нейтрофилы палочкоядерные	6,4±0,71	6,1±0,57*	4,1±0,25**
Моноциты	2,5±0,78	2,7±0,49	2,5±0,26
Базофилы	4,0±0,62	4,6±0,47	3,5±0,28
Эозинофилы	1,8±0,32	1,4±0,24	1,0±0,17*

Примечание: различия достоверны при * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Результаты исследования лейкоцитарного профиля крови стерляди показали, что в составе лейкоцитов преобладали лимфоциты. Известно, что бактериофаги оказывают положительное влияние на иммунный статус организма, стимулируя фагоцитоз и вызывая кратковременное повышение функциональной активности лимфоцитов (Kazimierczak, 2019). Количество лимфоцитов не отличалось достоверно и варьировало в пределах 77,8-78,8%. Отмечено, что у рыб второй опытной группы значительную часть лейкоцитов составляли сегментоядерные нейтрофилы (10±0,34%), а также наблюдался более низкий процент содержания палочкоядерных нейтрофилов (4,1±0,25%). В результате число сегментоядерных нейтрофилов во второй опытной группе было выше в 1,3 раза, в сравнении с контрольным вариантом, что, вероятно, указывает на активацию гранулопоэза в организме рыб в ответ на патологическое состояние организма, при котором нейтрофилы выделяют в кровь вещества, обладающие бактерицидными и антитоксическими свойствами. Количество моноцитов в контроле и обеих опытных группах находилось на одном уровне и не превышало 2,7% от общего объема просчитанных клеток.



Рисунок 56 – Микроскопия мазка крови стерляди:

1 – лимфоцит; 2 – эритроцит; 3 – базофил. Окраска азур-эозином по Романовскому-Гимзе. Увеличение 1000

Таким образом, по результатам проведенных исследований можно сделать вывод о том, что применение бактериофагов положительно сказывается на гематологических и морфобиохимических показателях крови осетровых рыб. Это проявляется в выраженном повышении концентрации гемоглобина и общего сывороточного белка, нормализации показателя СОЭ, а также в смещении лейкоцитарного профиля – увеличении доли лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов, что указывает на активацию иммунных процессов и улучшение общего иммунного статуса рыб.

3.8 Экономическая эффективность использования иммунобиологических препаратов микробного происхождения в составе комбикормов для осетровых рыб

Обоснованием эффективности применения иммунобиологических препаратов микробного происхождения при выращивании осетровых рыб может служить расчет экономических показателей.

Расчеты экономической эффективности применения в стартовых комбикормах пробиотических препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте, в дозировке 2 г/кг установили, что уровень рентабельности повысился на 9,68 и 6,45%, соответственно (таблица 83).

Таблица 83 – Экономическая эффективность использования стартовых комбикормов с пробиотиками

Показатель	Ед. измерения	Группа		
		Контрольная	Пробиотик	Синбиотик
Посажено на выращивание	тыс. шт.	100	100	100
Выживаемость	%	75	84	80
Выращено и реализовано	тыс. шт.	75	84	80
Кормовые затраты	ед.	1,0	0,8	0,8
Всего затрачено кормов	кг	217,5	228,48	198,4
Стоимость комбикормов	руб./кг	380	410	412
Затраты на комбикорма	тыс. руб.	82,65	93,68	81,74
Реализационная стоимость	руб./шт.	31	31	31
Общая сумма выручки от реализации	тыс. руб.	2325	2604	2480
Себестоимость	руб./шт.	29	26	27
Валовая прибыль	тыс. руб.	120	420	320
Валовая рентабельность	%	6,45	16,13	12,90

Таким образом, введение пробиотических препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* в состав стартовых комбикормов для осетровых рыб экономически оправдано, дает возможность повысить уровень рентабельности до 16,13% и способствует увеличению выручки от продажи посадочного материала.

На следующем этапе были проведены расчеты экономической эффективности применения данных пробиотических препаратов в продукционных комбикормах для молоди осетровых рыб в дозировках 3 и 2,5 г/кг, соответственно (таблицы 84, 85).

Таблица 84 – Экономическая эффективность использования продукционных комбикормов с пробиотиком при выращивании молоди русского осетра

Показатель	Ед. измерения	Группа	
		Контрольная	Опытная
Посажено на выращивание	тыс. шт.	10	10
Выживаемость	%	68	80
Выращено и реализовано	тыс. шт.	6,8	8,0
Кормовые затраты	ед.	1,1	0,9
Всего затрачено кормов	кг	184,01	203,04
Стоимость комбикормов	руб/кг	380	410
Затраты на комбикорма	тыс. руб.	69,9	83,25
Реализационная стоимость	руб/шт.	130	130
Общая сумма выручки от реализации	тыс. руб.	884	1040
Себестоимость	руб./шт.	128	120
Валовая прибыль	тыс. руб.	13,6	96,0
Валовая рентабельность	%	1,54	9,09

Таблица 85 – Экономическая эффективность использования продукционных комбикормов с синбиотиком при выращивании молоди русского осетра

Показатель	Ед. измерения	Группа	
		Контрольная	Опытная
1	2	3	4
Посажено на выращивание	тыс. шт.	10	10
Выживаемость	%	65	79
Выращено и реализовано	тыс. шт.	6,5	7,9
Кормовые затраты	ед.	1,2	1,0

Продолжение таблицы 85

1	2	3	4
Всего затрачено кормов	кг	153,66	167,48
Стоимость комбикормов	руб/кг	380	412
Затраты на комбикорма	тыс. руб.	58,39	69,00
Реализационная стоимость	руб/шт.	99	99
Общая сумма выручки от реализации	тыс. руб.	643,5	782,1
Себестоимость	руб./шт.	96	89
Валовая прибыль	тыс. руб.	19,5	79,0
Валовая рентабельность	%	3,03	10,10

По результатам расчета экономической эффективности выявлено, что использование в продукционных комбикормах для молоди осетровых рыб пробиотических препаратов снижает себестоимость продукции, повышая тем самым рентабельность до 10,10%.

Расчет экономической эффективности введения пробиотических препаратов на основе спорообразующих бактерий р. *Bacillus* в продукционные комбикорма при выращивании товарных осетровых рыб в дозировках: пробиотик – 5 г/кг, синбиотик – 4 г/кг, показал, что уровень рентабельности опытных вариантов был выше, чем в контроле и составил 38,82% (пробиотик) и 41,18% (синбиотик) (таблица 86).

Таблица 86 – Экономическая эффективность использования продукционных комбикормов с пробиотиками при выращивании осетровых рыб

Показатель	Ед. измерения	Группа		
		Контрольная	Пробиотик	Синбиотик
1	2	3	4	5
Посажено на выращивание	шт.	1000	1000	1000
Средняя масса	кг	1,4183	1,5431	1,5056

Продолжение таблицы 86

1	2	3	4	5
Кормовые затраты	ед.	1,5	1,3	1,3
Всего затрачено кормов	кг	2127,45	2006,03	1957,28
Стоимость комбикормов	руб./кг	320	400	384
Затраты на комбикорма	тыс. руб.	680,784	802,412	751,596
Реализационная	руб./шт.	850	850	850
Общая сумма выручки от реализации, руб.	руб.	850000	850000	850000
Себестоимость 1 кг рыбы	руб.	600	520	500
Прибыль	руб.	250000	330000	350000
Валовая рентабельность	%	29,41	38,82	41,18

С целью изучения экономической целесообразности применения сорбированных пробиотических препаратов на основе штаммов р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в составе комбикормов для осетровых рыб был произведен расчет уровня рентабельности, характеризующего чистую прибыль или убыток от вложений в установленном периоде (таблица 87).

Таблица 87 – Экономическая эффективность использования сорбированных пробиотиков при выращивании осетровых рыб

Показатель	Ед. измерения	Группа		
		Контрольная	Пробиотик на СУМС-1	Пробиотик на активированном угле
1	2	3	4	5
Посажено на выращивание	шт.	100	100	100

Продолжение таблицы 87

1	2	3	4	5
Средняя масса	кг	0,203	0,216	0,217
Кормовые затраты	ед.	1,2	1,0	1,0
Всего затрачено кормов	кг	24,36	21,6	21,7
Стоимость комбикормов	руб./кг	320	474	445
Затраты на комбикорма	тыс. руб.	7,80	10,24	9,66
Реализационная	руб/кг	1500	1500	1500
Общая сумма выручки от реализации, руб.	руб.	30450	32400	32550
Себестоимость 1 кг рыбы	руб.	800	650	620
Прибыль	руб.	14210	18360	19096
Валовая рентабельность	%	46,67	56,67	58,67

В опытных комбикормах дозировка пробиотических препаратов составляла: пробиотик на энтеросорбенте СУМС-1 – 7 г/кг, пробиотик на активированном угле – 6 г/кг. Данные, представленные в таблице 87, свидетельствуют об экономическом эффекте применения сорбированных пробиотиков, что выражено снижением себестоимости рыб в опытных вариантах и повышением уровня рентабельности на 10-12%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Интенсивное развитие индустриальной аквакультуры связано с непосредственным воздействием микробиоценоза водной среды на организм рыб. При нарушении гомеостаза среды обитания рыб в процессе их промышленного выращивания вирулентность бактерий повышается и формируется комплекс условно-патогенных микроорганизмов, приводящий к усилению напряженности иммунитета, ухудшению физиологического состояния, а также возникновению и развитию инфекционных заболеваний рыб. В связи с этим возникает острая необходимость применения в аквакультуре иммунобиологических препаратов микробного происхождения, в частности пробиотиков, синбиотиков и бактериофагов, способствующих профилактике и лечению заболеваний рыб бактериальной этиологии, нормализации микробиоты кишечника путем выведения из организма патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, токсинов и продуктов метаболизма. Такие препараты позволяют смягчать стрессы, вызываемые сменой комбикормов и технологическими воздействиями на организм рыб, служат для повышения естественной резистентности организма и напряженности иммунитета, позволяют увеличить усвояемость комбикормов.

Использование пробиотиков, синбиотиков и бактериофагов затрагивает широкий спектр проблем, основанных на коррекции иммунной, гормональной, ферментной систем рыб, а также на нормализации и восстановлении микрофлоры кишечника путем профилактики и лечения дисбактериозов. Главной предпосылкой развития дисбактериозов кишечника рыб является состояние иммунодефицита, обусловленное сочетанием эффекта эволюционных особенностей развития иммунного ответа в раннем постэмбриональном периоде и воздействия внешних иммунодепрессивных факторов (технологический стресс, антибиотикотерапия, чрезмерная нагрузка антигенами при вакцинациях, дефицит белков и витаминов и др.). Последствия иммунологической депрессии разнообразны, но, в первую очередь, они вызывают сдвиг регуляторной функции

макроорганизма, которая обеспечивает баланс между нормальной и условно-патогенной микрофлорой кишечника.

Одним из условий реализации эффективного иммунного ответа в отношении различных патогенных микроорганизмов является применение иммунобиологических препаратов микробного происхождения. Данные препараты не только стимулируют противoinфекционную защиту, но и обеспечивают сигналы толерантности к собственным и чужеродным антигенам, тем самым снижая вероятность развития аллергических реакций.

Проведенные научные исследования посвящены использованию иммунобиологических препаратов микробного происхождения в качестве способа повышения резистентности осетровых рыб при выращивании в установках с замкнутым циклом водообеспечения. В изученных нами источниках литературы отсутствует научное и практическое обоснование по использованию пробиотических и синбиотических препаратов нового поколения и бактериофагов в кормлении осетровых рыб при выращивании в промышленных условиях.

В настоящее время пробиотики определяются Всемирной организацией здравоохранения как живые микроорганизмы, которые при введении в адекватном количестве оказывают положительный эффект на здоровье организма-хозяина. Синбиотики представляют собой композиции, содержащие живые микроорганизмы и субстраты, селективно используемые кишечной микробиотой и способствующие ее поддержанию и нормализации. Применение данных препаратов способствует поддержанию функциональной активности желудочно-кишечного тракта, повышению колонизационной устойчивости и регуляции взаимодействия микробиоты с макроорганизмом.

Эффективность пробиотических и синбиотических препаратов зависит главным образом от технологии их производства. Современные исследования в области их разработки подразумевают: применение в определенных сочетаниях различных видов и штаммов микроорганизмов; форму выпуска, позволяющую длительное хранение при обычной температуре; сохранение своих свойств при добавлении их комбикорма и кормовые добавки. Известно, что под действием

желчи и желудочного сока происходит значительное снижение жизнеспособности микроорганизмов, что обуславливает необходимость разработки различных способов повышения их выживаемости за счет иммобилизации на пористых микроносителях и включения в состав препаратов компонентов питательной среды (Ушакова и др., 2010).

Разработка биотехнологий образования пробиотиками и синбиотиками биопленок на твердом носителе представляет собой новое направление получения препаратов высокой биологической эффективности. Получение пробиотиков и синбиотиков в виде биопленки способствует повышению жизнеспособности клеток в неблагоприятных условиях высушивания, грануляции, адаптации штаммов пробиотических микроорганизмов к условиям жизнедеятельности в кишечнике (Чижаева, Дудикова, 2017).

В проведенных исследованиях были использованы два вида препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* в виде биопленки, разработанные специалистами ООО «НТЦ БИО» совместно с Институтом проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН. Технология получения препаратов заключается в проведении твердофазного сбраживания фитосубстрата, способствующего образованию биопленки пробиотических микроорганизмов на твердом носителе, повышающем жизнеспособность бактерий и их активность в желудочно-кишечном тракте. Применение лекарственных трав и плодов в виде порошка сохраняет биологически активные вещества фитобиотиков, вступающие в синергические отношения с пробиотиком на сброженном свекловичном жоме. Предложенная фитокомпозиция – свекловичный жом (основной фитосубстрат), расторопша и эхинацея – соответствует мировой тенденции разработки нового поколения биологически активных препаратов для животных, птиц и рыб (Ушакова и др., 2009, 2010, 2012; Жандалгарова, 2017).

По результатам лабораторных исследований, проведенных в условиях Инновационного центра «Биоаквапарк – НТЦ аквакультуры» АГТУ, установлено, что кормление молоди русского осетра стартовыми комбикормами с

пробиотическим препаратом в дозировке 2 г/кг способствовало повышению рыбоводно-биологических показателей и выживаемости рыб. Так, у рыб, потреблявших указанную дозу препарата, наблюдалось увеличение линейно-весовых приростов (абсолютный прирост составил 2,3 г, среднесуточная скорость роста – 3,83%) и выживаемости (84%). Анализ физиолого-биохимических показателей крови молоди русского осетра позволил установить, что пробиотический препарат способствовал увеличению концентрации гемоглобина до 52,3 г/л и общего белка до 20,1 г/л, что свидетельствует о более интенсивном обмене веществ и улучшении общего физиологического состояния рыб, подтверждая эффективность применения пробиотического препарата. Кроме того, в конце экспериментальных исследований наблюдалось достоверное увеличение гематокрита, содержания эритроцитов, СГЭ.

Проведение научно-производственного опыта на базе Сергиевского осетрового завода показало, что применение пробиотика в виде биопленки в рационе молоди русского осетра способствовало увеличению темпов роста рыбы и ее выживаемости. Также установлено, что у рыб, получавших пробиотический препарат в дозировках от 2 до 4 г/кг, было отмечено достоверное повышение уровня общего белка и гемоглобина, а также снижение концентрации холестерина. Также у молоди русского осетра, получавшего пробиотический препарат, было отмечено улучшение морфологических показателей крови, что проявлялось увеличением доли лимфоцитов до 80,4%, снижением содержания моноцитов до 2,4% и эозинофилов до 1,6%. Анализ концентрации СРБ показал отсутствие отрицательного влияния препарата на функционирование иммунной системы рыб (<6 мг/л). Установлено, что наиболее оптимальной являлась дозировка 3 г/кг.

В дальнейших экспериментах была проанализирована эффективность введения в рацион осетровых рыб синбиотического препарата, содержащего в своем составе помимо пробиотической составляющей комплекс лекарственных трав – эхинацеи пурпурной и расторопши пятнистой. Данный препарат способствует деструкции клетчатки, белков, полисахаридов, нейтрализации

токсинов, подавлению патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, что обеспечивает улучшение обмена веществ, моторной и секреторной функции пищеварительной системы (Пат. 2412612С1).

Установлено, что применение синбиотического препарата в рационе молоди осетровых рыб способствовало улучшению физиолого-иммунологического состояния выращиваемых рыб. Так, при использовании дозировки 2 г/кг наблюдалось повышение уровня гемоглобина до 49,2 г/л, общего белка до 20,6 г/л, общих липидов до 4,5 г/л. При анализе лейкоцитарной формулы периферической крови установлено, что значительная часть клеток была представлена лимфоцитами (76,1-78,3%). Уровень палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов достигал 14,2%, а на эозинофилы и моноциты из числа всех лейкоцитов приходилось 1,3-1,9 и 2,6-3,5%, соответственно.

Экспериментальные работы, проведенные на базе Сергиевского осетрового завода, показали, что добавление синбиотика в продукционные комбикорма для осетровых рыб способствовало стабилизации физиологического и иммунологического состояния молоди русского осетра, что выражалось улучшением гематологических и биохимических показателей, лейкоцитарной формулы периферической крови и уровня СРБ. Проанализированные показатели крови позволили сделать вывод о высоком качестве и эффективности применения комбикормов в комплексе с синбиотическим препаратом. Наибольший положительный эффект на физиолого-иммунологическое состояние выращиваемых рыб оказал препарат в дозировке 2,5 г/кг.

Для оценки эффективности введения пробиотического и синбиотического препаратов нового поколения в рацион осетровых рыб при их товарном выращивании были проведены исследования на двухлетках русского осетра в условиях садкового комплекса КФХ Полякова Ю.С. Установлено, что оптимальными нормами ввода пробиотиков являлись: пробиотик – 5 г/кг, синбиотик – 4 г/кг. Были изучены основные гематологические и биохимические показатели, которые позволили получить достоверную информацию о способности рыб транспортировать кислород, об иммунном потенциале, уровне

стресса и заболеваемости рыб. Выявлено, что сыворотка крови рыб, выращенных с применением пробиотических препаратов, отличалась более высоким уровнем гемоглобина, общего белка и β -липопротеидов. Обнаружено, что в опытных группах наблюдалась тенденция к уменьшению содержания глюкозы в сыворотке крови русского осетра.

Таким образом, использование пробиотического и синбиотического препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте, способствовало увеличению защитных функций организма, касающихся клеточного иммунитета, а также снижению рисков возникновения заболеваний.

Микробиота кишечника играет важную роль в защите организма от патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и принимает активное участие в стимуляции иммунной системы. Одной из важных целей исследований микрофлоры желудочно-кишечного тракта рыб является создание научных основ для разработки эффективных стратегий манипулирования микробными сообществами желудочно-кишечного тракта для укрепления здоровья и повышения продуктивности.

Проведенные исследования позволили установить, что пробиотический и синбиотический препараты нового поколения на основе спорообразующих бактерий р. *Bacillus* оказали положительное влияние на обсемененность жабр и кишечника рыб молочнокислыми микроорганизмами. В результате проведенных экспериментальных работ в жабрах и кишечнике молоди русского осетра были выявлены грамположительные палочки и кокки, относящиеся к родам *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*. В жабрах и кишечнике рыб наблюдалось увеличение количества молочнокислых микроорганизмов при кормлении рыб с добавлением пробиотика и синбиотика, однако при прекращении кормления численность молочнокислых микроорганизмов снижалась. Установлено, что пробиотический препарат давал более стабильный результат в отличие от синбиотика.

Известно, что большинство компонентов комбикормов зачастую содержит контаминанты, представляющие собой комплекс чужеродных веществ, оказывающих отрицательное влияние на физиологическое состояние и продуктивность объектов выращивания (Шалгимбаева и др., 2016). В связи с этим был проведен анализ бактериальной обсемененности производственных комбикормов для осетровых рыб. Установлено, что все исследуемые дозировки пробиотического и синбиотического препаратов оказались эффективными и положительно отразились на микробиологических характеристиках кормов. В исследуемых образцах наблюдалось снижение микробной контаминации кормов до $4,5 \times 10^5$ КОЕ/г.

Оценка бактериальной обсемененности оборотной воды показала, что в опытных бассейнах наблюдалось снижение ОМЧ воды: в группе с синбиотиком с $3,1 \times 10^5$ до $8,5 \times 10^4$ КОЕ/мл, с пробиотиком – с $3,1 \times 10^5$ до $9,2 \times 10^4$ КОЕ/мл.

Одним из способов повышения устойчивости пробиотических препаратов является иммобилизация, которая осуществляется двумя основными способами: путем захвата микроорганизмов в пористые полимеры или микрокапсулы, или путем связывания с органической или неорганической подложкой (адсорбция) (Kutics et al., 1986). Адсорбция является наиболее простым методом иммобилизации микробных клеток, особенно тех, которые естественным образом прикрепляются к поверхности материалов (Boehm, 1994). Иммобилизация клеток путем прикрепления к носителю может быть осуществлена, как естественным путем, так и вызываться искусственно с помощью связывающих агентов на природных, органических и неорганических матрицах. Подходящий для прикрепления или адсорбции носитель должен обладать аффинностью к иммобилизуемой клетке. Наиболее популярным является использование угольных носителей в качестве создания структур для адсорбционной иммобилизации живых микроорганизмов. В настоящее время адсорбция на активированном угле является одним из методов совершенствования препаратов-пробиотиков. Примерами таких препаратов являются пробиотики-энтеросорбенты на основе штаммов р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, содержащие

штаммы лакто- и бифидобактерий, иммобилизованные на частицах активированного угля и энтеросорбенте СУМС-1.

Анализ эффективности применения пробиотика на энтеросорбенте СУМС-1 показал, что оптимальной оказалась дозировка 7 г/кг, при которой наблюдалось повышение интенсивности роста и физиолого-биохимических показателей крови осетровых рыб. Так, у бестера, получавшего пробиотический препарат, наблюдалась тенденция к повышению концентрации гемоглобина до 64,2 г/л и общего белка до 26,6 г/л. Кроме того, использование пробиотика способствовало снижению уровней холестерина и глюкозы в крови рыб. При анализе лейкоцитарной формулы крови бестера наблюдалось увеличение лимфоцитов до 76,65% за счет снижения нейтрофилов до 17,46% и эозинофилов до 2,25%. Количество моноцитов во всех группах не превышало 4,41% от общего объема просчитанных клеток.

При выращивании стерляди установлено, что оптимальной также являлась дозировка 7 г/кг, способствующая увеличению абсолютного прироста до 28,88 г, среднесуточного прироста до 0,96 г и среднесуточной скорости роста до 1,20%. Гематологический анализ подтвердил положительное влияние пробиотика на процессы кроветворения, выраженные повышением концентрации гемоглобина до 49,17 г/л, уровня гематокрита до 27,6% и количества эритроцитов до $0,84 \times 10^6$ /мкл. Биохимические показатели крови стерляди продемонстрировали положительные изменения: уровень общего белка повысился до 27,88 г/л, концентрации триглицеридов (3,54 ммоль/л), глюкозы (3,28 ммоль/л) и холестерина (1,96 ммоль/л) снизились до физиологически нормальных значений. Изменения в лейкоцитарной формуле крови отражали увеличение доли лимфоцитов до 76,23% и снижение уровня моноцитов до 3,79%.

Оценка влияния пробиотика, сорбированного на активированном угле, на эффективность выращивания бестера и стерляди показала, что наиболее эффективной оказалась дозировка пробиотика 6 г/кг. Так, у бестера, получавшего данную дозу препарата, абсолютный прирост составил 29,4 г, среднесуточный прирост – 0,98 г, среднесуточная скорость роста – 0,49%. Результаты

гематологического анализа показали, что концентрация гемоглобина и общего белка повысилась до 64,9 г/л и 23,6 г/л, соответственно, уровень холестерина снизился до 2,60 ммоль/л. Изученная лейкоцитарная формула крови позволила установить, что белая кровь носила ярко выраженный лимфоидный характер: количество лимфоцитов варьировало в пределах 70,68-76,73%, количество моноцитов не превышало 4,31%.

У стерляди, получавшей пробиотический препарат, наблюдался максимальный абсолютный прирост – 28,44 г, среднесуточный прирост – 0,95 г, среднесуточная скорость роста – 1,20%. Гематологический анализ показал достоверное повышение уровня гемоглобина до 54,36 г/л ($P \leq 0,01$), увеличение количества эритроцитов до $0,87 \times 10^6$ /мкл, а также повышение СГЭ до 66,2 пг. Уровень гематокрита колебался в пределах 26,7-27,7% и статистически значимо не различался. В биохимическом анализе крови стерляди было отмечено повышение уровня общего белка до 23,35 г/л, снижение концентрации триглицеридов до 4,15 ммоль/л и холестерина до 1,08 ммоль/л. Анализ лейкоцитарной формулы крови показал повышение уровня лимфоцитов до 78,15%, снижение моноцитов до 2,69% и палочкоядерных нейтрофилов до 2,85%.

Исследования по оценке иммобилизованных форм пробиотических препаратов на иммунный статус осетровых рыб были проведены на базе лаборатории иммунологии Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук и Научно-производственной фирмы «Касатка». В качестве объектов исследований были использованы русско-ленский осетр и сибирский осетр.

Воздействие пробиотика на энтеросорбенте СУМС-1 на иммунный статус русско-ленского осетра показало его иммуностимулирующее действие, активирующее иммунитет, поддерживающее антиоксидантный баланс и снижающее бактериальную нагрузку. Уровень БАСК составлял 48%, к 30-м суткам в контроле он снизился до 30,2%, в первой опытной группе (5 г/кг) оставался на уровне 50,2%. Введение пробиотика снизило уровень ИК до $2,96 \pm 0,22$ на 14-е сутки. К концу эксперимента ИК во второй опытной группе

снизились до $4,20 \pm 0,54$, что указывает на снижение антигенной нагрузки. Лимфоциты в крови увеличились до 78,50%, эозинофилы и бластные клетки снизились до 1,15 и 4,50%, соответственно. Уровень МДА в печени на 14-е сутки снизился во второй опытной группе, но к 30-м суткам повысился. В почках изменения были незначительны, в селезенке на 14-е сутки уровень ПОЛ был выше в опытных группах, но к концу различия нивелировались. Установлено, что пробиотик не вызвал значительных изменений в антиокислительной защите, но на 14-е сутки снижение КОС в селезенке сменилось повышением АЗ в печени на 30-е сутки при дозировках 5 и 7 г/кг.

У сибирского осетра пробиотик на энтеросорбенте СУМС-1 активировал врожденный иммунитет, усиливая метаболические процессы и снижая воспалительную активность. Уровень лизоцима повысился до 17,15 мкг/мл, БАСК достигла 62,66%. Уменьшение уровня ИК до $1,82 \pm 0,69$ указывало на снижение иммунной нагрузки. Наблюдалось увеличение доли лимфоцитов до 78,20%, снижение моноцитов до 1,40%, увеличение ФА до $1,58 \pm 0,15$. Уровни МДА в печени и почках снизились, что указывает на уменьшение окислительного стресса, а повышение КОС в печени и почках отражало компенсаторную активацию антиоксидантной защиты.

Исследование воздействия пробиотика, сорбированного на активированном угле, на иммунный статус русско-ленского осетра показало его иммуномодулирующее действие. Уровень БАСК до начала эксперимента составил 48%, на 14-е сутки увеличился до 51%, а к 30-м суткам снизился, оставаясь выше в опытных группах. Уровень ИК на 14-е сутки снизился до $2,20 \pm 0,31$ в опытных группах, в то время как в контроле повысился до $7,40 \pm 1,13$, и к концу эксперимента не превышал $7,30 \pm 0,71$. Уровень лизоцима в конце эксперимента увеличивался до 19,06 мкг/мл. Доля лимфоцитов в крови увеличилась до 82,5%, эозинофилов, бластных клеток и моноцитов снизилась до 0,66; 3,5; 4,15%, соответственно. Уровень МДА в печени и почках во второй опытной группе снижался на 14-е сутки, но повышался к 30-м суткам. Уровень АЗ

существенно не отличался между группами, а влияние на уровень ОЛ отсутствовало.

При исследовании влияния пробиотика, сорбированного на активированном угле, на иммунный гомеостаз сибирского осетра было установлено, что пробиотик повышал уровень лизоцима до 18,64 мкг/мл, БАСК до 58,16% и снижал уровень ИК, особенно в третьей опытной группе ($2,30 \pm 0,40$). В лейкоцитарной формуле крови сохранялось преобладание лимфоцитов и снижение доли нейтрофилов и моноцитов. ИСЛ и ИО были ниже контрольных значений, ФА достоверно повышалась до $1,60 \pm 0,15$. Уровень МДА в печени (66,94 нмоль/г) и почках (18,91 нмоль/г) опытных групп оставался ниже, чем в контроле. Одновременно повышение активности КОС в печени (7,37 л/(мл•мин)) и почках (5,45 л/(мл•мин)) отражало компенсаторную активацию антиоксидантной защиты в ответ на метаболическую активность, стимулируемую пробиотиком. Установлено, что наиболее эффективными дозировками являлись: пробиотик на энтеросорбенте СУМС-1 – 7 г/кг, пробиотик на активированном угле – 6 г/кг.

После определения оптимальных норм ввода пробиотических препаратов на основе штаммов р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, иммобилизованных на частицах активированного угля и энтеросорбенте СУМС-1, были разработаны рецептуры новых продукционных комбикормов для осетровых рыб. В их состав входили: рыбная мука, витазар, кукурузный глютен, соевый шрот, рыбий жир, кормовые дрожжи и другие компоненты, при этом содержание сырого протеина составляло 42%, сырого жира – 10%, сырых углеводов – 20%, сырой клетчатки – 2%, сырой золы – 10%, влаги – 10%, минеральных веществ – 9%, общей энергии – 15 МДж/кг. Разработанные комбикорма соответствовали требованиям ГОСТ 10385-2014, характеризовались низкой крошимостью (4,1%), высокой водостойкостью гранул (36 мин) и удовлетворительными органолептическими показателями, что свидетельствует об их качестве, питательной полноценности и пригодности для кормления осетровых рыб.

Оценку эффективности разработанных комбикормов проводили на основании результатов экспериментального кормления бестера. При использовании комбикорма с пробиотическим препаратом на энтеросорбенте СУМС-1 абсолютный прирост составил 58,6 г, среднесуточный прирост – 1,95 г, среднесуточная скорость роста – 0,79%, что выше показателей контроля соответственно на 16,9 г (40,5%), 0,56 г (40,3%) и 0,21% (36,2%). При использовании комбикорма с пробиотиком на активированном угле абсолютный прирост достиг 55,1 г, среднесуточный – 1,84 г, среднесуточная скорость роста – 0,73%, превышая контрольные значения соответственно на 13,4 г (32,1%), 0,45 г (32,4%) и 0,15% (25,9%). Полученные результаты подтверждают высокую эффективность разработанных комбикормов и целесообразность их применения при выращивании осетровых рыб.

В настоящее время серьезной проблемой аквакультуры является разработка устойчивых к противомикробным препаратам штаммов бактерий. Интенсивная аквакультура и, следовательно, массовое использование антибиотиков в последние десятилетия привели к низкой эффективности такого лечения и к накоплению этих терапевтических средств в окружающей среде, что привело к устойчивости патогенов. Бактериофаготерапия является одним из эффективных методов для решения данной проблемы. Механизм действия фагов отличается от механизма действия антибиотиков, поэтому они могут воздействовать даже на штаммы с множественной лекарственной устойчивостью, что делает их очень удобными для использования в терапии.

В рамках проведенных исследований были изучены два вида бактериофагов. Установлено, что добавление данных препаратов в воду рыбоводных емкостей из расчета 1 мл на 100 л воды и обработка ими комбикормов в дозировке 10 мл на суточную норму кормления способствовали увеличению интенсивности роста выращиваемых рыб и улучшению их физиологического состояния. Так, у стерляди, выращенной по данной технологии, наблюдалось увеличение абсолютного и среднесуточного приростов до 34,8 и 1,16 г, соответственно. Анализ физиологического состояния стерляди показал, что

исследуемые препараты способствовали достоверному увеличению концентрации гемоглобина и общего белка, снижению уровня холестерина и глюкозы в крови. Уровень СРБ в конце экспериментальной работы имел отрицательное значение (<6 мг/л).

Таким образом, по результатам проведенных исследований установлено, что применение иммунобиологических препаратов микробного происхождения в аквакультуре способствует увеличению интенсивности роста рыб, улучшению их физиолого-иммунологического состояния, что выражается повышением гематологических и биохимических показателей крови, увеличением активности неспецифических гуморальных и клеточных факторов иммунитета. Также препараты принимают активное участие в поддержании здоровья рыб за счет взаимодействия с микробиомом и способствуют стабилизации микробного равновесия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили сделать следующие выводы:

1. Применение пробиотика на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте, в составе стартовых комбикормов для молоди русского осетра в дозировке 2 г/кг обеспечивало повышение выживаемости до 84% и интенсивности роста на 15,0%, увеличение содержания гемоглобина на 29,1% ($P \leq 0,001$), общего белка – на 40,6% ($P \leq 0,001$), снижение уровня холестерина на 15,8%, увеличение доли сегментоядерных нейтрофилов на 28,6% ($P \leq 0,001$), снижение доли палочкоядерных нейтрофилов на 35,5% ($P \leq 0,001$) и эозинофилов на 33,3% ($P \leq 0,001$).

Применение пробиотика в составе продукционных комбикормов для молоди русского осетра в дозировке 3 г/кг способствовало повышению выживаемости до 82% и интенсивности роста на 31,3%, увеличению содержания гемоглобина на 3,3% и общего белка на 9,3%, снижению уровня холестерина на 9,1%, повышению содержания лимфоцитов на 4,4%, снижению доли моноцитов на 25,0% и эозинофилов на 23,8% ($P \leq 0,05$).

При товарном выращивании русского осетра использование пробиотика в составе продукционных комбикормов в дозировке 5 г/кг обеспечивало повышение интенсивности роста на 27,4%, увеличение содержания гемоглобина на 21,2% и общего белка на 27,5%, снижение уровня глюкозы на 16,0%.

2. Введение синбиотика на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте, в состав стартовых комбикормов для молоди русского осетра в дозировке 2 г/кг способствовало повышению выживаемости до 80% и интенсивности роста на 23,5%, увеличению концентрации гемоглобина на 18,0% ($P \leq 0,001$) и общего белка на 40,1% ($P \leq 0,001$), уменьшению содержания холестерина на 10,5% ($P \leq 0,001$), повышению доли сегментоядерных нейтрофилов на 26,0% ($P \leq 0,001$) при одновременном снижении количества палочкоядерных нейтрофилов на 26,7% ($P \leq 0,001$), моноцитов – на 25,7% ($P \leq 0,01$) и эозинофилов – на 31,6% ($P \leq 0,001$).

Использование синбиотика в продукционных комбикормах для молоди русского осетра в дозировке 2,5 г/кг обеспечивало повышение выживаемости до 79% и интенсивности роста на 16,5%, увеличение концентрации гемоглобина на 27,1% и общего белка на 14,9%, повышение содержания лимфоцитов на 7,4% ($P \leq 0,001$), а также уменьшение доли моноцитов на 35,9% ($P \leq 0,001$) и эозинофилов на 58,1% ($P \leq 0,001$).

При товарном выращивании русского осетра включение синбиотика в состав продукционных комбикормов в дозировке 4 г/кг обеспечивало увеличение интенсивности роста на 19,5%, повышение концентрации гемоглобина на 16,6% и общего белка на 23,4% при снижении содержания глюкозы на 12,0%.

3. Иммобилизованные формы пробиотического и синбиотического препаратов при выращивании молоди осетровых рыб способствовали увеличению количества молочнокислых микроорганизмов в жабрах (до $5,25 \times 10^7$ КОЕ/г) и кишечнике (до $8,57 \times 10^7$ КОЕ/г) русского осетра.

4. Применение иммобилизованных пробиотического и синбиотического препаратов способствовали увеличению содержания в комбикормах количества молочнокислых микроорганизмов р. *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, снижению микробной контаминации комбикормов до $3,2 \times 10^5$ КОЕ/г, общего микробного фона воды до $8,5 \times 10^4$ КОЕ/мл.

5. Введение пробиотического препарата на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, сорбированных на энтеросорбенте СУМС-1, в рацион бестера, стерляди, русско-ленского осетра и сибирского осетра в дозировке 7 г/кг обеспечивало увеличение темпов роста в 1,2-1,6 раз, повышение содержания гемоглобина до 64,2 г/л ($P \leq 0,01$), общего белка – до 27,9 г/л ($P \leq 0,001$), снижение концентрации холестерина до 1,96 ммоль/л и глюкозы – до 0,67 ммоль/л ($P \leq 0,001$); способствовало улучшению показателей гуморального иммунитета, что проявлялось повышением содержания лизоцима до 16,5 мкг/мл и снижением уровня ИК до 4,20 усл. ед., поддержанием уровня БАСК на высоком уровне.

6. Применение пробиотического препарата на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, сорбированных на активированном угле, в дозировке 6 г/кг при выращивании бестера, стерляди, русско-ленского осетра и сибирского осетра обеспечивало увеличение интенсивности роста осетровых рыб в 1,1-1,9 раз, повышение содержания гемоглобина до 64,9 г/л ($P \leq 0,001$), общего белка – до 23,6 г/л ($P \leq 0,001$), снижение концентрации холестерина до 1,08 ммоль/л ($P \leq 0,01$) и глюкозы – до 0,74 ммоль/л ($P \leq 0,001$); способствовало повышению содержания лизоцима до 19,06 мкг/мл, снижению уровня ИК до 2,46 усл. ед. и поддержанию БАСК на уровне 42,0%.

7. Разработанные рецептуры комбикормов с сорбированными пробиотическими препаратами на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* способствовали повышению продуктивности осетровых рыб. При использовании пробиотика на энтеросорбенте СУМС-1 абсолютный прирост составил 58,6 г, среднесуточный прирост – 1,95 г, среднесуточная скорость роста – 0,79%, при использовании пробиотика на активированном угле данные показатели составили: 55,1; 1,84 г и 0,73%, соответственно.

8. Добавление бактериофагов в оборотную воду в дозировке 1 мл/100 л воды и обработка препаратами комбикормов из расчета 10 мл/суточная норма кормления способствовали повышению абсолютного прироста в 1,3-1,7 раз, увеличению уровня гемоглобина до 74,2 г/л ($P \leq 0,001$), общего белка до 28,4 г/л ($P \leq 0,001$), снижению концентрации холестерина до 1,7 ммоль/л и глюкозы 2,3 ($P \leq 0,001$) ммоль/л, а также улучшению лейкограммы периферической крови стерляди.

9. Применение в стартовых комбикормах иммобилизованных пробиотического и синбиотического препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* повышает уровень рентабельности на 6,45-9,68% и увеличивает выручку от продажи посадочного материала; в продукционных комбикормах для молоди осетровых рыб снижает себестоимость рыбы и повышает уровень рентабельности на 7,07-7,55%; в продукционных комбикормах

при товарном выращивании осетровых рыб снижает себестоимость рыбы на 13,33-16,67%, повышает уровень рентабельности на 9,41-11,77%. Применение сорбированных пробиотических препаратов на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* способствует снижению себестоимости рыбы и повышению уровня рентабельности на 10,0-12,0%.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

1. С целью повышения интенсивности роста, физиологического и микробиологического состояний осетровых рыб целесообразно использовать пробиотический и синбиотический препараты на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте:

- в составе стартовых комбикормов для молоди русского осетра в дозировке 2 г/кг комбикорма;

- в составе продукционных комбикормов для молоди русского осетра: синбиотик – 2,5 г/кг, пробиотик – 3 г/кг комбикорма;

- в составе продукционных комбикормов для товарного выращивания русского осетра: синбиотик – 4 г/кг, пробиотик – 5 г/кг комбикорма.

2. С целью повышения темпов роста и физиолого-иммунологического статуса бестера, стерляди, русско-ленского осетра и сибирского осетра эффективно использовать сорбированные пробиотические препараты на основе штаммов бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в дозировках: пробиотик на активированном угле – 6 г/кг комбикорма; пробиотик на энтеросорбенте СУМС-1 – 7 г/кг.

3. С целью повышения рыбоводно-биологических и физиолого-биохимических показателей стерляди рекомендуется использовать бактериофаги в виде добавления препаратов в воду рыбоводных емкостей из расчета 1 мл на 100 л воды и обработки препаратами комбикормов – 10 мл на суточную норму кормления.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Проведенные исследования позволят раскрыть механизмы и факторы, лежащие в основе формирования приобретенного иммунитета рыб, а также закономерности регуляции их физиологического состояния. Продолжение изучения данного направления будет способствовать разработке способов управления процессами иммуногенеза и гемопоэза путем использования иммунобиологических препаратов микробного происхождения. Сформулированные положения могут послужить теоретической основой для разработки методик коррекции физиологического состояния и повышения иммунного статуса различных объектов аквакультуры.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АЗ – антиокислительная защита
- БАСК – бактерицидная активность сыворотки крови
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- ИК – иммунные комплексы
- ИМД – иммунодефицитные особи
- ИО – индекс обилия лейкоцитов
- ИСЛ – индекс сдвига лейкоцитов
- КОЕ – колониеобразующая единица
- КОС – константа ингибирования окисления субстрата
- МБП – мясо-пептонный бульон
- МДА – малоновый диальдегид
- МПА – мясопептонный агар
- НВЧ – наиболее вероятные числа
- ОМЧ – общее микробное число
- ОЛ – общие липиды
- ПА – питательный агар
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- СГЭ – среднее содержание гемоглобина в эритроците
- СОЭ – скорость оседания эритроцитов
- СРБ – С-реактивный белок
- СЦК – средний цитохимический коэффициент
- УЗВ – установка замкнутого водоснабжения
- ФА – фагоцитарная активность нейтрофилов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов, М. Г. Гематологический атлас / М. Г. Абрамов. – [2-е изд., перераб. и доп.]. – Москва: Медицина, 1985. – 344 с. – Текст : непосредственный.
2. Аминева, В. А. Физиология рыб: учебник / В. А. Аминева, А. А. Яржомбек. – Москва: Лёгкая и пищевая промышленность, 1984. – 200 с. – Текст : непосредственный.
3. Андреева, А. В. Применение в животноводстве пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus* / А. В. Андреева, О. Н. Николаева, Т. Н. Кузнецова. – Текст: непосредственный // Система ведения агропромышленного производства в Республике Башкортостан, РАСХН и др. ; под редакцией У. Г. Усманова и др. – Уфа: Гилем, 2012. – С. 518–521.
4. Андреева, Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Н. А. Кожемякин, А. А. Кишкун. – Текст : непосредственный // Лабораторное дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
5. Анохина, В. С. Характеристика крови и гистология половых желёз заводского и дикого гольца озёрного / В. С. Анохина, А. Н. Квасоварова, К. С. Щербак. – Текст : непосредственный // Вестник Мурманского государственного технического университета. – 2012. – Т. 15, № 4. – С. 691–700.
6. Антипов, В. А. Использование пробиотиков в животноводстве / В. А. Антипов. – Текст : непосредственный // Ветеринария. – 1991. – № 4. – С. 55–58.
7. Артюхова, С. А. Технология продуктов из гидробионтов / С. А. Артюхова, В. Д. Богданов, В. М. Дацун [и др.] ; под редакцией Т. М. Сафроновой, В. И. Шендерюка. – Москва: Колос, 2001. – 496 с. – Текст : непосредственный.
8. Баденко, Л. В. Эколого-физиологические основы повышения эффективности заводского разведения азовских осетровых / Л. В. Баденко, Н. Г. Дорошева, Г. Г. Корниенко, В. П. Чихачева. – Текст : непосредственный // Воспроизводство рыбных запасов Каспийского и Азовского морей: сборник научных трудов ВНИРО. – Москва, 1989. – С. 88–101.

9. Бакулина, Л. Ф. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus* и их использование в ветеринарии / Л. Ф. Бакулина, И. В. Тимофеев, Н. Г. Перминова [и др.]. – Текст : непосредственный // Биотехнология. – 2001. – № 2. – С. 48–56.

10. Балабанова, Л. В. Сравнительная характеристика действия нафталина и фенола на показатели белой крови карася *Carassius carassius* (L.) / Л. В. Балабанова, В. Р. Микряков. – Текст : непосредственный // Биология внутренних вод. – 2002. – № 2. – С. 100–102.

11. Барабой, В. А. Перекисное окисление и стресс / В. А. Барабой, И. И. Брехман, В. Г. Голотин, Ю. Б. Кудряшов ; ответственный редактор В. И. Чумаков. – Санкт-Петербург: Наука. Санкт-Петербургское отделение, 1992. – 148 с. – Текст : непосредственный.

12. Барановский, А. Ю. Дисбактериоз и дисбиоз кишечника / А. Ю. Барановский, Э. А. Кондрашина. – [2-е изд.]. – Санкт-Петербург: Питер, 2000. – 224 с. – Текст : непосредственный.

13. Барышков, Ю. А. Определение общего содержания липидов в сыворотке крови методом сульфо-фосфо-ванилиновой реакции / Ю. А. Барышков, Ю. Е. Вельтищев, З. Н. Фомина [и др.]. – Текст : непосредственный // Лабораторное дело. – 1996. – № 6. – С. 350–352.

14. Бахарева, А. А. Научно-обоснованные методы повышения продуктивности ремонтно-маточных стад осетровых рыб за счёт оптимизации технологии кормления и содержания в условиях рыбоводных хозяйств Волго-Каспийского бассейна : специальность 06.02.08 «Кормопроизводство, кормление сельскохозяйственных животных и технология кормов», 06.02.10 «Частная зоотехния, технология производства продуктов животноводства» : автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора сельскохозяйственных наук / Бахарева Анна Александровна ; Самарская государственная сельскохозяйственная академия. – Усть-Кинельский, 2016. – С. 89–106. – Текст : непосредственный.

15. Бекина Е. Н. Влияние изменения температуры содержания на физиолого-биохимические показатели молоди осетровых в условиях

индустриального выращивания / Е. Н. Бекина, Е. А. Мельченков, А. П. Воробьёв [и др.]. – Текст : непосредственный // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2021. – № 12(191). – С. 35–47.

16. Бовкун, Г. Ф. Профилактическое действие бифинома при желудочно-кишечных болезнях цыплят / Г. Ф. Бовкун, А. Н. Нигманов, В. Ф. Семенихина [и др.]. – Текст : непосредственный // Ветеринария. – 1998. – № 7. – С. 44–47.

17. Бойко, Е. Г. О выживании осетровой молоди разных весовых групп / Е. Г. Бойко, Е. В. Калинкина. – Текст : непосредственный // Рыбное хозяйство. – 1961. – № 4. – С. 18–22.

18. Бондаренко, В. М. Пробиотики, пребиотики, симбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов / В. М. Бондаренко, Н. М. Грачева. – Текст : непосредственный // Фарматека. – 2003. – № 7. – С. 56–63.

19. Борисов, Л. Б. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Л. Б. Борисов, Б. Н. Козьмин-Соколов, И. С. Фрейдлин, З. Ф. Федорова ; под редакцией Л. Б. Борисова. – [2-е изд., перераб. и доп.]. – Москва: Медицина, 1984. – 256 с. – Текст : непосредственный.

20. Борисова, М. Н. Субалин для рыб / М. Н. Борисова, Т. М. Новоскольцева, И. П. Иренков [и др.]. – Текст : непосредственный // Рыбоводство и рыболовство. – 2000. – № 2. – С. 21.

21. Бурлаченко, И. В. Бактериальная обсеменённость комбикормов и её влияние на молодь стерляди / И. В. Бурлаченко, К. Б. Аветисов, Л. Н. Юхименко, Л. И. Бычкова. – Текст : непосредственный // Труды ВНИРО. – 2002. – Т. 141. – С. 194–208.

22. Бурлаченко, И. В. Использование пробиотиков на ранних стадиях развития рыб и их влияние на микрофлору, рост и выживаемость личинок сибирского осетра (*Acipenser baerii*) / И. В. Бурлаченко, К. Б. Аветисов, И. В. Банщикова, Е. В. Малик. – Текст : непосредственный // Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития : материалы IV Международной научно-практической конференции (Астрахань). – Москва: ВНИРО, 2006. – С. 231 – 233.

23. Бурлаченко, И. В. Перспективные пробиотики для осетровых рыб / И. В. Бурлаченко, Н. В. Судакова, Е. И. Балакирев [и др.]. – Текст : непосредственный // Рыбное хозяйство. – 2006. – № 3. – С. 64–65.

24. Бурлаченко, И. В. Теоретические и прикладные аспекты повышения резистентности осетровых рыб в аквакультуре : специальность 03.00.10 «Ихтиология» : автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора биологических наук / Бурлаченко Ирина Виленовна ; Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии. – Москва, 2007. – 319 с. – Текст : непосредственный.

25. Бурлаченко, И. В. Актуальные вопросы безопасности комбикормов в аквакультуре рыб / И. В. Бурлаченко. – Москва: ВНИРО, 2008. – 183 с. – Текст : непосредственный.

26. Бурцева, Т. В. Экологические аспекты применения пробиотиков в ветеринарии / Т. В. Бурцева. – Текст : непосредственный // Аграрный вестник Урала. – 2013. – № 7 (113). – С. 15–17.

27. Бухарин, О. В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине / Бухарин О. В., Васильев Н. В. – Томский медицинский университет: Томск, 1974. – 209 с. – Текст : непосредственный.

28. Валедская, О. М. Состояние иммунитета волжских рыб и его динамика в различных условиях обитания : монография / О. М. Валедская ; Федеральное агентство по рыболовству, Федеральное государственное унитарное предприятие «Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства». – Астрахань: КаспНИРХ, 2005. – 110 с. – Текст : непосредственный.

29. Вараксина, В. В. Гематологические маркеры для оценки физиологического состояния муксуна / В. В. Вараксина. – Текст : непосредственный // Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Российской Арктики : материалы Всероссийской конференции ученых и специалистов, посвященной 160-летию Н.М. Книповича (Мурманск). – Мурманск: Полярный филиал ВНИИРХ, 2023. – С. 119–124.

30. Васильева, Л. М. Кормление осетровых рыб в индустриальной аквакультуре / Л. М. Васильева, С. В. Пономарев, Н. В. Судакова. – Астрахань: Биос : Волга, 2006. – 86 с. – Текст : непосредственный.

31. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы в живых системах / Ю. А. Владимиров, О. А. Азизова, А. И. Деев. – Текст : непосредственный // Итоги науки и техники. Серия: Биофизика. – 1991. – Т. 29. – С. 249.

32. Власенко, В. С. Сравнительная характеристика кислородзависимой и кислороднезависимой бактерицидных систем нейтрофилов при лейкозной инфекции / В. С. Власенко, Е. А. Вишневский. – Текст : непосредственный // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2020. – № 11. – С. 170–174.

33. Волков, И. В. Экспериментальное исследование физиологии крови рыб при действии на них неблагоприятных факторов внешней среды : специальность 03.00.00. «Биологические науки» : автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук / Волков Игорь Владимирович ; Петрозаводский государственный университет им. О. В. Куусинена. – Петрозаводск, 1971. – 232 с. – Текст : непосредственный.

34. Воробьев, А. А. Бактерии нормальной микрофлоры: Биологические свойства и защитные функции / А. А. Воробьев, Е. А. Лыкова. – Текст : непосредственный // Журнал микробиологии. – 1999. – № 6. – С. 102–105.

35. Гаврилин, К. В. Влияние факторов окружающей среды на микробиоценоз рыбоводных прудов / К. В. Гаврилин, Л. Н. Юхименко, Л. И. Бычкова. – Текст : непосредственный // Аквакультура начала XXI века: истоки, состояние, стратегия развития : материалы Международной научно-практической конференции. – Москва: ВНИРО, 2002. – С. 282–285.

36. Гамыгин, Е. А. Комбикорма для рыб: производство и методы кормления / Е. А. Гамыгин, В. Я. Лысенко, В. Я. Скляр, В. И. Турецкий. – Москва: Агропромиздат, 1989. – 168 с. – Текст : непосредственный.

37. Гераскин, П. П. Нарушение обмена веществ у русского осетра в современных условиях Волго-Каспия / П. П. Гераскин. – Текст :

непосредственный // Осетровое хозяйство водоёмов СССР : краткие тезисы научных докладов к предстоящему Всесоюзному совещанию (ноябрь, 1989 г.). – Астрахань: Волга, 1989. – С. 60–62.

38. Гераскин, П. П. Характеристика функционирования важных основных физиологических систем организма осетровых в условиях хронического токсикоза / П. П. Гераскин, Ю. В. Алтуфьев, Г. Ф. Металлов [и др.]. – Текст : непосредственный // Рыбохозяйственные исследования на Каспии: результаты НИР за 1997 г. – Астрахань: КаспНИРХ, 1998. – С. 14–32.

39. Гершанович, А. Д. Экология и физиология молоди осетровых рыб / А. Д. Гершанович, В. А. Пегасов, М. И. Шатуновский ; под редакцией М. И. Шатуновского. – Москва: Агропромиздат, 1987. – 214 с. – Текст : непосредственный.

40. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов : (СанПиН 2.3.2.1078-01) : утверждены : главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 06. 11. 2001 : введены в действие 01.07.2002. – Москва. – 74 с.

41. Гинцбург, А. Л. «Quorum sensing», или социальное поведение бактерий / А. Л. Гинцбург, Т. С. Ильина, Ю. М. Романова. – Текст : непосредственный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2003. – № 5. – С. 86–93.

42. Гительзон, И. И. О способе выражения гемоглобина в эритроците / И. И. Гительзон, И. А. Терсков. – Текст : непосредственный // Клиническая лабораторная диагностика. – 1956. – № 6. – С. 6–10.

43. Головина, Н. А. Гематология прудовых рыб / Н. А. Головина, И. Д. Тромбицкий ; ответственный редактор В. А. Мусселиус. – Кишинев: Штиинца, 1989. – 158 с. – Текст : непосредственный.

44. Головина, Н. А. Использование гематологических показателей для оценки физиологического состояния организма рыб / Н. А. Головина. – Текст : непосредственный // Аквакультура и здоровье рыб: материалы российско-американского симпозиума (12-19 июля 1998 г.). – Москва: ВНИИПРХ, 1998. – С. 137–138.

45. Голодец, Г. Г. Лабораторный практикум по физиологии рыб: учебное пособие по курсу физиологии животных для институтов рыбной промышленности / Г. Г. Голодец ; под редакцией профессора Н. В. Пучкова. – Москва: Пищепромиздат, 1955. – 92 с. – Текст : непосредственный.

46. Гольдфарб, Д. М. Бактериофагия / Д. М. Гольфарб ; под редакцией и с предисловием действительного члена АМ СССР профессора В. Д. Тимакова. – Москва: Медгиз, 1961. – 298 с. – Текст : непосредственный.

47. Гончаров, Г. Д. Лабораторная диагностика болезней рыб / Г. Д. Гончаров. – Москва: Колос, 1973. – 119 с. – Текст : непосредственный.

48. Гордеев И. И. Окислительные процессы и содержание иммунных комплексов в иммунокомпетентных органах гольцов бассейна Кроноцкого озера / И. И. Гордеев, Д. В. Микряков, Н. И. Силкина [и др.]. – Текст : непосредственный // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2022. – Т. 42. – № 1. – С. 102–107.

49. Гриневич, Ю. А. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных / Ю. А. Гриневич, А. Н. Алферов. – Текст : непосредственный // Лабораторное дело. – 1981. – № 8. – С. 493–496.

50. Грищенко, Л. И. Проблемы патологии и иммунитета при инфекционных болезнях рыб / Л. И. Грищенко, Н. И. Рудиков. – Текст : непосредственный // Итоги науки и техники. Серия: Ихтиология. – Т. 1. – 1985. – С. 190–211.

51. Грозеску, Ю. Н. Биологическая эффективность применения пробиотика Субтилис в составе стартовых комбикормов для осетровых рыб / Ю. Н. Грозеску, А. А. Бахарева, Е. А. Шульга. – Текст : непосредственный // Известия Самарского научного центра академии наук. – 2009. – Т. 11, № 1. – С. 42–45.

52. Грозеску, Ю. Н. Инновационные методы повышения эффективности кормления осетровых рыб на основе использования в рационах нетрадиционного кормового сырья и биологически активных препаратов : специальность 06.02.08 «Кормопроизводство, кормление сельскохозяйственных животных и технология кормов», диссертации на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук / Грозеску Юлия Николаевна ; Самарская

государственная сельскохозяйственная академия. – Усть-Кинельский, 2016. – 307 с. – Текст : непосредственный.

53. До Хыу Кует Компенсаторно-приспособительные реакции эритроцитов и лейкоцитов рыб на действие температурного фактора: специальность 03.03.01 «Физиология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / До Хыу Кует ; ФГБОУ ВО Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина. – Белгород, 2017. – 129 с. – Текст : непосредственный.

54. Ермоленко, Е. И. Иммуномодулирующее действие пробиотических бактерий при заболеваниях желудочно-кишечного тракта / Е. И. Ермоленко. – Текст : непосредственный // Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина. – 2014. – Т. 11, № 4. – С. 5–18.

55. Жандалгарова, А. Д. Влияние кормовой синбиотической добавки нового поколения «ПроСтор» на рыбоводно-биологические и гематологические показатели молоди русского осетра / А. Д. Жандалгарова, А. А. Бахарева, Ю. Н. Грозеску, А. И. Правдин. – Текст : непосредственный // Главный зоотехник. – 2017. – № 6. – С. 30–35.

56. Жандалгарова, А. Д. Выращивание молоди белуги (*Huso huso* Linnaeus, 1758) на комбикормах с добавлением пробиотического препарата «Ферм-КМ» / А. Д. Жандалгарова, А. А. Бахарева, Ю. Н. Грозеску, А. И. Правдин. – Текст : непосредственный // Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. – 2017. – № 6. – С. 43–48.

57. Жандалгарова, А. Д. Использование бактериальных препаратов «Ферм-КМ» и «Простор» в кормлении осетровых рыб : специальность 06.02.08 «Кормопроизводство, кормление сельскохозяйственных животных и технология кормов» : автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата сельскохозяйственных наук / Жандалгарова Аделя Джуманияшевна ; Самарская государственная сельскохозяйственная академия. – Усть-Кинельский, 2017. – 120 с. – Текст : непосредственный.

58. Жандалгарова, А. Д. Использование пробиотических препаратов с иммуномодулирующим действием в кормах для осетровых рыб при садковом выращивании / А. Д. Жандалгарова, А. В. Поляков, А. А. Бахарева, Ю. Н. Грозеску. – Текст : непосредственный // Известия Самарского научного центра РАН. – 2018. – Т. 20, № 2. – С. 107–111.

59. Жандалгарова, А. Д. Опыт применения пиобактериофага поливалентного очищенного (*Pyobacteriophagum polyvalentum purum*) в аквакультуре / А. Д. Жандалгарова, А. А. Бахарева, Ю. Н. Грозеску, А. Б. Ахмеджанова. – Текст : непосредственный // Рыбное хозяйство. – 2021. – № 4. – С. 76–80.

60. Жандалгарова, А. Д. Применение кормов с сорбирующими свойствами при выращивании объектов аквакультуры / А. Д. Жандалгарова, Ю. А. Сергина, А. А. Бахарева [и др.]. – Текст : непосредственный // Каспий в цифровую эпоху: сборник материалов Национальной научно-практической конференции с международным участием в рамках Международного научного форума «Каспий 2021: пути устойчивого развития». – Астрахань: Астраханский государственный университет, 2021. – С. 365–369.

61. Жандалгарова, А. Д. Оценка влияния пробиотического препарата на энтеросорбенте «Флорин форте» на физиолого-иммунологическое состояние бестера / А. Д. Жандалгарова, А. А. Бахарева, Ю. Н. Грозеску. – Текст : непосредственный // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2023. – Т. 2023, № 4. – С. 42–47.

62. Жандалгарова, А. Д. Влияние иммобилизованной формы пробиотического препарата «Экофлор» на показатели неспецифического гуморального иммунитета осетровых рыб / А. Д. Жандалгарова, Д. В. Микряков, Ю. А. Сергина [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2023. – № 2. – С. 77–84.

63. Жандалгарова, А. Д. Влияние пробиотического препарата на энтеросорбенте на изменение функциональной активности гуморальных факторов

неспецифического иммунитета русско-ленского осетра (*Acipenser gueldenstadtii* × *Acipenser baeri*) / А. Д. Жандалгарова, А. А. Бахарева, Ю. Н. Грозеску. – Текст : непосредственный // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2024. – № 10. – С. 711–720.

64. Житенева, Л. Д. Эколого-гематологические характеристики некоторых видов рыб: справочник / Л. Д. Житенева, О. А. Рудницкая, Т. И. Калюжная. – Ростов-на-Дону: АзНИИРХ, 1997. – 149 с. – Текст : непосредственный.

65. Житенева, Л. Д. Основы ихтиогематологии (в сравнительном аспекте) / Л. Д. Житенева, Э. В. Макарова, О. А. Рудницкая. – Ростов-на-Дону: Эверест, 2004. – 312 с. – Текст : непосредственный.

66. Журавлев, А. И. Свободнорадикальная биология / А. И. Журавлев, В. Т. Пантюшенко ; Московская ветеринарная академия им. К. И. Скрябина. – Москва: МВА, 1989. – 60 с. – Текст : непосредственный.

67. Журавлева, Н. Г. Биоэкологические аспекты защитных реакций рыб и беспозвоночных / Н. Г. Журавлева, Г. Г. Матишов, О. Оттесен, Е. Е. Минченков. – Мурман. гос. техн. ун-т. – Мурманск : Изд-во МГТУ, 2013. – 259 с. – Текст : непосредственный.

68. Заботкина, Е. А. Экологическая пластичность гематологических показателей пресноводных костистых рыб / Е. А. Заботкина, Т. Б. Лапирова, В. Е. Середняков, Т. А. Нестерова. – Текст : непосредственный // Труды ИБВВ им. И. Д. Папанина РАН. – 2015. – Вып. 72, №. 75. – С. 16–30.

69. Зайцева, Ю. А. Кишечный микробиоценоз радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) в условиях садкового хозяйства / Ю. А. Зайцева, Д. А. Доколин, И. В. Злобин. – Текст : непосредственный // Аграрный вестник Урала. – 2022. – № 12 – С. 42–53.

70. Зенков, Н. К. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты / Н. К. Зенков, В. З. Лапкин, Е. Б. Меньщикова. – Москва: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. – 343 с. – Текст : непосредственный.

71. Зуенко, В. А. Использование пробиотика на основе бактерий *Bacillus Subtillis* как резерв повышения продуктивности при выращивании рыбы в садковых хозяйствах / В. А. Зуенко. – Текст : непосредственный // Аграрная наука – сельскому хозяйству: сборник материалов XIV Международной научно-практической конференции. – Барнаул: Алтайский ГАУ, 2019. – Кн. 2. – С. 137–138.

72. Иванов, А. А. Физиология рыб: учебное пособие / А. А. Иванов. – Москва: Мир, 2003. – 284 с. – Текст : непосредственный.

73. Иванов, А. А. Физиология гидробионтов : учебное пособие / А. А. Иванов, Г. И. Пронина, Н. Ю. Корягина. — Санкт-Петербург : Лань, 2015. — 480 с. – Текст : непосредственный.

74. Иванова, И. А. Бактериофаги и иммунная система макроорганизма / И. А. Иванова, А. А. Труфанова, А. В. Филиппенко. – Текст : непосредственный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 6. – С. 79–85.

75. Иванова, Н. Т. Атлас клеток крови рыб: сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб / Н. Т. Иванова. – Москва: Лёгкая и пищевая промышленность, 1983. – 80 с. – Текст : непосредственный.

76. Каграманова, К. А. Сравнительная характеристика методов определения активности лизоцима / К. А. Каграманова, З. В. Ермольева. – Текст : непосредственный // Антибиотики. – 1966. – Т. 11, № 10. – С. 917–919.

77. Казюлин, А. Н. Эволюция терапии пробиотиками в клинике внутренних болезней / А. Н. Казюлин, А. Ю. Гончаренко, Е. Е. Павлеева, И. Е. Калягин. – Текст : непосредственный // РМЖ. – 2019. – Т. 27, № 12. – С. 89–96.

78. Калашников, Г. Н. Состав крови осетровых рыб в связи с обменом на разных стадиях полового цикла / Г. Н. Калашников. – Текст : непосредственный // Учёные записки Московского государственного университета. Серия: Гидробиология. – 1939. – Вып. 33. – С. 65–103.

79. Калюжин, О. В. Пробиотики как современные средства укрепления противоинфекционной иммунной защиты: миф или реальность / О. В. Калюжин. –

Текст : непосредственный // Русский медицинский журнал. – 2012. – Т. 20, № 28. – С. 1395–1401.

80. Киташова, А. А. Реакции врождённого и приобретённого иммунитета у рыб в естественных и экспериментальных условиях : специальность 03.00.10 «Ихтиология», 14.00.36 «Аллергология и иммунология» : автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук / Киташова Александра Анатольевна ; Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова. – Москва, 2002. – 186 с. – Текст : непосредственный.

81. Козинец, Г. И. Атлас клеток крови и костного мозга / Г. И. Козинец, Т. Г. Сарычева, Г. Д. Ашуров [и др.] ; под редакцией профессора Г. И. Козинца. – Москва: Триада-Х, 1998. – 160 с. – Текст : непосредственный.

82. Койхо, Р. Иммунология: учебное пособие / Р. Койхо, Д. Саншайн, Э. Бенджамини ; перевод с английского А. В. Камаева, А. Ю. Кузнецовой ; под ред. Н. Б. Серебряной. – Москва: Академия, 2008. – 368 с. – Текст : непосредственный.

83. Кольтовер, В. К. Свободнорадикальная теория старения: исторический очерк / В. К. Кольтовер. – Текст : непосредственный // Успехи геронтологии. – 2000. – № 4. – С. 33–40.

84. Кондратьева, И. А. Современные представления об иммунной системе рыб. Часть 1. Организация иммунной системы рыб / И. А. Кондратьева, А. А. Киташова, М. А. Ланге. – Текст : непосредственный // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2001. – Т. 16, № 4. – С. 11–20.

85. Коржуев, П. А. Гемоглобин. Сравнительная физиология и биохимия / П. А. Коржуев ; Академия наук СССР, Институт морфологии животных им. А. Н. Северцова. – Москва: Наука, 1964. – 288 с. – Текст : непосредственный.

86. Кочетков, Н. И. Современные подходы к исследованию эффективности пробиотиков в аквакультуре / Н. И. Кочетков, Д. Л. Никифоров-Никишин, А. А. Климук [и др.]. – Текст : непосредственный // Успехи современной биологии. – 2024. – Т. 144, № 5. – С. 550–584.

87. Кравцова, Л. З. Пробиотики как элемент технологии производства безопасной продукции животноводства и птицеводства / Л. З. Кравцова, Л. С.

Несиневич, Т. В. Олива [и др.]. – Текст : непосредственный // Актуальные проблемы сельскохозяйственной биотехнологии: материалы научно-практической конференции. – Воронеж, 2004. – С. 19–20.

88. Крылов, О. Н. Методические указания по гематологическому обследованию рыб в водной токсикологии / Министерство рыбного хозяйства РСФСР Государственного научно-исследовательского института озёрного и речного хозяйства. – Ленинград: ГосНИОРХ, 1974. – 40 с. – Текст : непосредственный.

89. Крысенко, А. В. Микробиологические аспекты пробиотических препаратов / А. В. Крысенко, Т. В. Скляр, А. И. Винников [и др.]. – Текст : непосредственный // Biosystems Diversity. – 2010. – Т. 2, № 18. – С. 19–24.

90. Куваева, И. Б. Обмен веществ организма и кишечная микрофлора / И. Б. Куваева. – Москва: Медицина, 1976. – С. 148–160. – Текст : непосредственный.

91. Кудрявцев, В. А. Аэробы рода *Bacillus* как источник продуцентов литических ферментов / В. А. Кудрявцев, Л. А. Сафронова, А. И. Осадчая. – Текст : непосредственный // Биотехнология. – 2004. – № 4. – С. 24–33.

92. Кулаков, Г. В. Субтилис – натуральный концентрированный пробиотик / Г. В. Кулаков. – Москва: Визави, 2003. – 48 с. – Текст : непосредственный.

93. Купинский, С. В. Радужная форель – предварительные параметры стандартной модели массонакопления / С. В. Купинский, С. А. Баранов, В. Ф. Резников – Текст : непосредственный // Индустриальное рыбоводство в замкнутых системах : сборник научных трудов ВНИИПРХ. – Москва: ВНИИПРХ, 1986. – Вып. 46. – С. 109–115.

94. Куровская, Л. Я. Морфофизиологические показатели некоторых видов осетровых рыб (*Acipenseridae*, *Acipenseriformes*) разного возраста, выращиваемых в аквакультуре / Л. Я. Куровская, В. Н. Лысенко, С. И. Ноборачек. – Текст : непосредственный // Рибогосподарська наука України. Фізіологія та біохімія. – 2015. – № 1. – С. 108–119.

95. Лабинская, А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований: учебник для фельдшеров-лаборантов отделений медицинских

училищ / А. С. Лабинская. – [4-е изд., перераб. и доп.]. – Москва: Медицина, 1978. – 392 с. – Текст : непосредственный.

96. Лакин, Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для биологических специальностей вузов / Г. Ф. Лакин. – [4-е изд., перераб. и доп.]. – Москва: Высшая школа, 1990. – 293 с. – Текст : непосредственный.

97. Ланге, М. А. Локализация кроветворной ткани у осетровых / М. А. Ланге, А. А. Говядинова, Н. Г. Хрущов. – Текст : непосредственный // Онтогенез. – 2000. – Т. 31, № 6. – С. 440–444.

98. Лапирова, Т. Б. Влияние перметрина на лейкоцитарную формулу молоди осетра / Т. Б. Лапирова – Текст : непосредственный // Токсикологический вестник. – 2009. – № 6(99). – С. 21–24.

99. Лапирова, Т. Б. Реакция иммунофизиологических показателей молоди сибирского осетра (*Acipenser baerii* Brandt) на действие перметрина / Т. Б. Лапирова. – Текст : непосредственный // Вестник Томского государственного университета. Серия: Биология. – 2011. – № 4(16). – С. 124–135.

100. Лебедева, И. А. Эффективность использования пробиотического препарата «Биоспорин» в престартовый период / И. А. Лебедева. – Текст : непосредственный // Аграрный вестник Урала. Серия: Агрономия. – 2007. – № 6. – С. 74–75.

101. Лебедева, И. А. Пробиотик Моноспорин – стимул для синтеза белка в клетках / И. А. Лебедева. – Текст : непосредственный // Птицеводство. – 2011. – № 9. – С. 44.

102. Литвина, Л. А. Коррекция микрофлоры кишечника как один из факторов поддержания гомеостаза / Л. А. Литвина, В. М. Стрижак. – Текст : непосредственный // Успехи современного естествознания. Серия: Медицинские науки. – 2003. – № 5. – С. 76–77.

103. Логинов, С. И. Иммунные комплексы у животных и человека: норма и патология / С. И. Логинов, П. Н. Смирнов, А. Н. Трунов ; Сибирское отделение РАН, ИЭВ Сибири и Дальнего Востока, НПЦ «Ветэкология». – Новосибирск: Сибирское отделение РАСХН, 1999. – 144 с. – Текст : непосредственный.

104. Луговская, С. А. Лабораторная гематология / С. А. Луговская, В. Т. Морозова, М. Е. Почтарь, В. В. Долгов. – Тверь: Триада, 2006. – С. 28–29. – Текст : непосредственный.

105. Лукьяненко, В. И. Иммунобиология рыб. Врождённый иммунитет / В. И. Лукьяненко. – [2-е изд., перераб. и доп.]. – Москва: Агропромиздат, 1989. – 270 с. – Текст : непосредственный.

106. Лысов, В. Ф. Основы физиологии и этологии животных: учебное пособие / В. Ф. Лысов, В. И. Максимов. – Москва: КолосС, 2004. – 248 с. – Текст : непосредственный.

107. Маленкина, К. А. Биологически активные кормовые добавки в аквакультуре (обзор) / К. А. Маленкина, А. Е. Аринжанов. – Текст : непосредственный // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2024. – № 1 (105). – С. 291–297.

108. Маловастый, К. С. Диагностика болезней и ветсанэкспертиза рыбы : учебно-методическое пособие / К. С. Маловастый. – Брянск.: Изд-во Брянской ГСХА, 2011. – 404 с. – Текст : непосредственный.

109. Матишов, Г. Г. Опыт выращивания осетровых рыб в условиях замкнутой системы водообеспечения для фермерских хозяйств / Г. Г. Матишов, Д. Г. Матишов, Е. Н. Пономарева [и др.] ; ответственный редактор Г. Г. Матишов. – Ростов-на-Дону : ЮНЦ РАН, 2006. – 72 с. – Текст : непосредственный.

110. Матишов, Г. Г. Комплексный подход к проблеме сохранения и воспроизводства осетровых рыб Каспийского моря : монография / Г. Г. Матишов, А. А. Кокоза, Г. Ф. Металлов, П. П. Гераскин ; гл. ред. Е. Н. Пономарева. – Ростов-на-Дону: ЮНЦ РАН, 2017. – 352 с. – Текст : непосредственный.

111. Меньщикова, Е. Б. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков, В. З. Лапкин [и др.] ; Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с. – Текст : непосредственный.

112. Металлов, Г. Ф. Физиолого-биохимические механизмы эколого-адаптационной пластичности осморегулирующей системы осетровых рыб :

монография / Г. Ф. Металлов, С. В. Пономарев, В. П. Аксёнов, П. П. Гераскин. – Астрахань: Астраханский государственный технический университет, 2010. – 191 с. – Текст : непосредственный.

113. Металлов, Г. Ф. Многолетний мониторинг физиологического состояния основных видов каспийских осетровых рыб / Г. Ф. Металлов, П. П. Гераскин, В. П. Аксёнов, О. А. Левина. – Текст : непосредственный // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2016. – № 1. – С. 88–97.

114. Микряков, В. Р. Клеточные основы иммунитета у рыб / В. Р. Микряков, Л. В. Балабанова. – Текст : непосредственный // Физиология и паразитология пресноводных животных: труды ИБВВ им. И. Д. Папанина АН СССР ; ответственный редактор Б. А. Флеров. – Ленинград: Наука, 1979. – Вып. 38 (41). – С. 57–64.

115. Микряков, В. Р. Закономерности функционирования иммунной системы пресноводных рыб / специальность : 03.00.10 «Ихтиология, 14.00.36 «Аллергология и иммунология : автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора биологических наук / Микряков Вениамин Романович ; Институт биологии внутренних вод АН СССР. – Борок, 1984. – 37 с. – Текст : непосредственный.

116. Микряков, В. Р. Закономерности формирования приобретённого иммунитета у рыб : монография / В. Р. Микряков ; ответственный редактор Б. И. Куперман. – Рыбинск: Рыбинский дом печати, 1991. – 154 с. – Текст : непосредственный.

117. Микряков, В. Р. Влияние солей некоторых тяжелых металлов на картину белой крови молоди ленского осетра *Acipenser baeri* Brandt / В. Р. Микряков, Т. Б. Лапинова. – Текст : непосредственный // Вопросы ихтиологии. – 1997. – Т. 37, № 4. – С. 538–542.

118. Микряков, В. Р. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды : монография / В. Р. Микряков, Л. В. Балабанова, Е. А. Заботкина, Т. Б. Латерова ; ответственный редактор В. Р. Микряков. – ИБВВ им. И. Д. Папанина, РАН, Школа-семинар эволюционной

иммунологии (Борок-90). – Москва: Наука, 2001. – 125 с. – Текст : непосредственный.

119. Микряков, Д. В. Влияние некоторых кортикостероидных гормонов на структуру и функцию иммунной системы рыб : специальность 03.00.10 «Ихтиология», 14.00.36 «Аллергология и иммунология» : автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук / Микряков Даниил Вениаминович ; Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН. – Москва, 2004. – 24 с. – Текст : непосредственный.

120. Микряков, Д. В. Некоторые показатели неспецифического иммунитета различных селекционных групп карпа в периоды годового цикла / Д. В. Микряков, Г. И. Пронина, Т. А. Суворова [и др.]. – Текст : непосредственный // Известия РАН. Серия биологическая. – 2021. – № 5. – С. 556–560.

121. Мирзоева, Л. М. Болезни рыб при индустриальном выращивании. Обзорная информация / Л. М. Мирзоева. – Текст : непосредственный // Рыбное хозяйство. Серия: Болезни гидробионтов в аквакультуре. – 2000. – Вып. 1. – С. 54–58.

122. Михайлов, А. А. Эффективность применения пробиотиков в аквакультуре (обзор) / А. А. Михайлов, И. В. Морузи, Е. В. Пищенко [и др.]. – Текст : непосредственный // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2024. – Т. 18, № 12(227). – С. 876–885.

123. Морозова, М. А. Микрофлора паренхиматозных органов у молодых карповых рыб в товарных рыбоводных хозяйствах / М. А. Морозова, М. А. Дьяченко, Н. А. Абросимова [и др.] – Текст : непосредственный // Комплексные исследования в рыбохозяйственной отрасли: материалы IV Международной научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – Владивосток, 2018. – С. 80–85.

124. Назаров, П. Г. Пентраксины в реакциях врождённого и приобретённого иммунитета, организации матрикса, фертильности / П. Г. Назаров. – Текст : непосредственный // Медицинский академический журнал. – 2010. – Т. 10, № 4. – С. 107–124.

125. Незавитин, А. Г. Проблемы сельскохозяйственной экологии : монография / А. Г. Незавитин, В. Л. Петухов, В. А. Власенко [и др.] ; под общей редакцией А. Г. Незавитина ; Министерство сельского хозяйства и продовольствия РФ, НГАУ. – Новосибирск: Наука, 2000. – С. 51–52.

126. Определитель бактерий Берджи: в 2 томах. Том 1: перевод с английского под ред. академика РАН Г. А. Заварзина / Р. Беркли, Э. Бок, Д. Бун [и др.] ; под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. – Москва: Мир, 1997. – 432 с. – Текст : непосредственный.

127. Определитель бактерий Берджи: в 2 томах. Том 2: перевод с английского под ред. академика РАН Г. А. Заварзина / Р. Беркли, Э. Бок, Д. Бун [и др.] ; под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. – Москва: Мир, 1997. – 368 с. – Текст : непосредственный.

128. Осипова, И. Г. Общие фармакопейные статьи на препараты пробиотики для государственной фармакопеи РФ XIII издания – первый опыт в мировой фармакопейной практике / И. Г. Осипова, В. Ф. Евлашкина, Д. С. Давыдов, Е. И. Саканян. – Текст : непосредственный // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. Серия: Медицинские науки. – 2016. – № 6(2). – С. 272–276.

129. Остроумова, И. Н. Биологические основы кормления рыб / И. Н. Остроумова. – Санкт-Петербург: ГосНИОРХ, 2001. – 372 с. – Текст : непосредственный.

130. Палатников, Г. М. Сравнительный анализ морфофункциональных характеристик рыб отряда хрящевых ганоидов (Chondrostei) / Г. М. Палатников. – Текст : непосредственный // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2022. – Т. 58, № 2. – С. 96–108.

131. Паршуков, А. Н. Микробиоценоз радужной форели в садковых хозяйствах Карелии : специальность 03.02.08 «Экология» : автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук / Паршуков Алексей Николаевич ; Институт биологии Карельского научного центра РАН. – Петрозаводск, 2011. – 182 с. – Текст : непосредственный.

132. Паршуков, А. Н. Микробиоценоз радужной форели в садковых хозяйствах Северной Карелии / А. Н. Паршуков, Н. А. Сидорова. – Текст : непосредственный // Учёные записки Петрозаводского Государственного Университета. Серия: Биологические науки. – 2014. – Т. 1, № 8. – С. 29–33.

133. Патент № 2412612С1 Российская Федерация МПК А23К1/65 (2006.01), С12Т1/20 (2006.01) Способ получения пробиотической кормовой добавки «Ферм-КМ» для сельскохозяйственных животных и птицы : № 2009148893/10 : заявл. 29.12.2009 : опубл. 27.02.2011 / В. Г. Правдин, Л. З. Кравцова, Н. А. Ушакова, Л. В. Разумова ; заявитель и патентообладатель ООО «Научно-технический центр биологических технологий в сельском хозяйстве». – 11 с. – Текст : непосредственный.

134. Патент № 2656386 Российская Федерация, МПК А23К50/80 (2016.01). Продукционный комбикорм для производителей осетровых рыб с добавлением пробиотика и биологически активных веществ : № 2017116295 : заявл. 10.05.2017 : опубл. 05.06.2018 / А. Д. Жандалгарова, А. А. Бахарева, Ю. Н. Грозеску [и др.] ; заявитель и патентообладатель АГТУ. – 7 с. – Текст : непосредственный.

135. Пахмутов, И. А. Оценка функциональной активности нейтрофилов крови животных / И. А. Пахмутов, М. С. Ульянова. – Текст : непосредственный // Ветеринария. – 1984. – № 3. – С. 68–69.

136. Петров, Р. В. Иммунология / Р. В. Петров. – [2-е изд., стер.]. – Москва: Медицина, 1987. – 416 с. – Текст : непосредственный.

137. Плотникова, Е. Ю. Иммуномодулирующие эффекты пробиотиков / Е. Ю. Плотникова, Ю. В. Захарова. – Текст : непосредственный // Медицинский Совет. – 2020. – № 15. – С. 135–144.

138. Поздеев, О. К. Медицинская микробиология: учебное пособие / О. К. Поздеев ; под редакцией В. И. Покровского. – [4-е изд., испр.]. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 768 с.

139. Покровская, М. П. Лечение ран бактериофагом / М. П. Покровская, Л. С. Каганова, М. А. Морозенко [и др.]. – Москва, Ленинград: Медгиз, 1941. – С. 54–55. – Текст : непосредственный.

140. Покровский, В. И. Рост и развитие популяции возбудителей в процессе заражения / В. И. Покровский, В. М. Бондаренко, В. П. Жалко-Титаренко. – Текст : непосредственный // Советская Медицина. – 1987. – № 4. – С. 29–38.

141. Полозюк, О. Н. Гематология: учебное пособие / О. Н. Полозюк, Т. М. Ушакова. – Персиановский: Донской ГАУ, 2019. – 159 с. – Текст : непосредственный.

142. Полупанов В. С. Практическое пособие по бактериофагии: учебное пособие / В. С. Полупанов, С. Б. Стефанов, И. М. Габрилович ; под общей редакцией кандидата медицинских наук И. М. Габриловича. – Минск: Вышэйшая школа, 1968. – 179 с. – Текст : непосредственный.

143. Пономарев, С. В. Осетроводство на интенсивной основе: учебник / С. В. Пономарев, Д. И. Иванов. – Москва: Колос, 2009. – 314 с. – Текст : непосредственный.

144. Пономарев, С. В. Индустриальное рыбоводство: учебник для студентов высших учебных заведений / С. В. Пономарев, Ю. Н. Грозеску, А. А. Бахарева. – [2-е изд., испр. и доп.]. – Санкт-Петербург: Лань, 2013. – 415 с. – Текст : непосредственный.

145. Попов, О. П. Особенности жирового обмена и количественная характеристика крови сазана, карпа и их гибридов / О. П. Попов. – Текст : непосредственный // Биохимическая генетика рыб: материалы первого Всесоюзного совещания (6–9 февраля 1973 г.). – Ленинград: Институт цитологии АН СССР, 1973. – С. 148–159.

146. Правдин, И. Ф. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных) / И. Ф. Правдин ; под редакцией профессора П. А. Дрягина, кандидата биологических наук В. В. Покровского. – [4-е изд., перераб. и доп.]. – Москва: Пищевая промышленность, 1966. – 376 с. – Текст : непосредственный.

147. Пучков, Н. В. Физиология рыб: учебное пособие для институтов рыбной промышленности / Н. В. Пучков. – Москва: Пищепромиздат, 1954. – 370 с. – Текст : непосредственный.

148. Раутенштейн, Я. И. Бактериофагия: общие сведения о явлении фаги и его значении в ряде производств / Я. И. Раутенштейн. – Москва: АН СССР, 1955. – 144 с. – Текст : непосредственный.

149. Ройт, А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл ; перевод с английского И. В. Кандрора и др. – Москва: Мир, 2000. – 592 с. – Текст : непосредственный.

150. Руденко, Р. А. Физиологическая характеристика прудового карпа при введении в рацион кормового пробиотика «Субтилис» / Р. А. Руденко, В. А. Каратунов. – Текст : непосредственный // Инновации и инвестиции. – 2020. – № 1. – С. 213–215.

151. Садовская, О. Д. Изменение лейкоцитарной формулы карпа при инвазии / О. Д. Садовская. – Текст : непосредственный // Работы по гельминтологии к 80-летию академика И. И. Скрябина ; ответственный редактор Н. П. Шихобалова. – Москва: Издательство АН СССР, 1967. – С. 320–321.

152. Саубенова, М. Г. Дрожжевые микроорганизмы как пробиотики и источник белка / М. Г. Саубенова, Е. А. Олейникова, А. Ж. Алыбаева [и др.]. – Текст : непосредственный // Микробиология және вирусология. – 2023. – № 3(42). – С. 6–25.

153. Сверчкова, Н. В. Пробиотические препараты для ветеринарии и кормопроизводства / Н. В. Сверчкова, Э. И. Коломиец. – Текст : непосредственный // Наука и инновации. – 2016. – № 5. – С. 38–39.

154. Семенов, В. Л. Метод определения антиокислительной активности биологического материала / В. Л. Семенов, А. М. Ярош. – Текст : непосредственный // Украинский биохимический журнал. – 1985. – Т. 57, № 3. – С. 50–52.

155. Сергина, Ю. А. Влияние пробиотика, иммобилизованного на энтеросорбенте, на интенсивность роста и физиологические показатели красной тиляпии (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*) / Ю. А. Сергина, А. Д. Жандалгарова, Ю. В. Сергеева [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2023. – № 1. – С. 64–71.

156. Серпунин, Г. Г. Гематологические показатели адаптации рыб : специальность 03.00.10 «Ихтиология» : автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора биологических наук / Серпунин Геннадий Георгиевич ; Калининградский государственный технический университет. – Калининград, 2002. – 49 с. – Текст : непосредственный.

157. Скляр, В. Я. Биологические основы рационального использования кормов в аквакультуре / В. Я. Скляр, Н. А. Студенцова. – Москва: ФГНУ «Росинформагротех», 2001. – 56 с. – Текст : непосредственный.

158. Скрыпник, И. Н. Современные спорообразующие пробиотики в клинической практике / И. Н. Скрыпник, А. С. Маслова. – Текст : непосредственный // Сучасна гастроентерологія. – 2009. – № 3(47). – С. 81–89.

159. Слабоспицкая, А. Т. Ферментативная активность бацилл, перспективных для включения в состав биопрепарата / А. Т. Слабоспицкая, С. С. Крымовская, С. Р. Резник. – Текст : непосредственный // Микробиологический журнал. – 1990. – Т. 52, № 2. – С. 9–14.

160. Смирнов, В. В. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ / В. В. Смирнов, С. Р. Резник, И. А. Василевская. – Киев: Наукова думка, 1982. – 274 с. – Текст : непосредственный.

161. Смирнова, О. В. Определение бактерицидной активности сыворотки методом нефелометрии / О. В. Смирнова, Т. А. Кузьмина. – Текст : непосредственный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1966. – № 4. – С. 8–11.

162. Соколов, В. В. Ветеринарно-санитарное состояние сырья, комбикормов, комбикормовых предприятий и разработка мероприятий по его улучшению : специальность 16.00.06 «Ветеринарная санитария, зоогигиена, экология и ветеринарно-санитарная экспертиза» : автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора ветеринарных наук / Соколов Виктор Васильевич ; Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарии, санитарии, гигиены и экологии РАСХН. – Москва, 2002. – 50 с. – Текст : непосредственный.

163. Сорвачев, К. Ф. Основы биохимии питания рыб (эколого-биохимические аспекты): учебное пособие / К. Ф. Сорвачев. – Москва: Лёгкая и пищевая промышленность, 1982. – 247 с. – Текст : непосредственный.

164. Сорокин, В. В. Нормальная микрофлора кишечника животных / В. В. Сорокин, М. А. Тимошко, А. В. Николаева. – Кишинев: Штиинца, 1973. – С. 3–68. – Текст : непосредственный.

165. Спотт, С. Содержание рыбы в замкнутых системах / С. Спотт ; пер. с англ. В. В. Лавровского. – Москва: Лёгкая и пищевая промышленность, 1983. – 192 с. – Текст : непосредственный.

166. Субботкина, Т. А. Содержание лизоцима в органах и сыворотке крови у различных видов рыб р. Волги / Субботкина Т. А., Субботкин М. Ф. – Текст : непосредственный // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2003. – Т. 39, № 5. – С. 430–437.

167. Субботкина, Т. А. Лизоцим сыворотки крови некоторых объектов аквакультуры (отряды Cypriniformes и Perciformes) Центрального Вьетнама / Т.А. Субботкина, М. Ф. Субботкин – Текст : непосредственный // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2012. – № 2. – С. 140–147.

168. Суворова, Т. А. Влияние антибактериального и пробиотического препаратов на специфический и неспецифический иммунитет и окислительные процессы в организме рыб / Т. А. Суворова, Н. И. Силкина. – Текст : непосредственный // Труды ИБВВ имени И. Д. Папанина РАН. – 2019. – Вып. 87 (90). – С. 62–70.

169. Суворова Т. А. Некоторые показатели неспецифического иммунитета леща Саратовского водохранилища / Т. А. Суворова, Д. В. Микряков, Г. И. Пронина [и др.]. – Текст : непосредственный // Труды Института биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН. – 2023. – Т. 104. – № 107. – С. 60–67.

170. Тараканов, Б. В. Новые биопрепараты для ветеринарии / Б. В. Тараканов, Т. А. Николичева. – Текст : непосредственный // Ветеринария. – 2000. – № 7. – С. 45–50.

171. Терентьева, Э. И. Атлас ультраструктуры клеток кроветворной ткани / Э. И. Терентьева, З. Г. Шишканова. – Москва: Медицина, 1972. – 136 с. – Текст : непосредственный.

172. Тец, В. В. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / В. В. Тец, Л. Б. Борисов, Б. Н. Козьмин-Соколов ; под редакцией В. В. Теца. – [2-е изд., перераб. и доп.]. — Москва: Медицина, 2002. – 352 с. – Текст : непосредственный.

173. Тимошко, М. А. Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных / М. А. Тимошко. – Кишинев: Штиинца, 1990. – 189 с. – Текст : непосредственный.

174. Усенко, Д. В. Пробиотики и пробиотические продукты: возможности и перспективы применения / Д. В. Усенко, А. В. Горелов. – Текст : непосредственный // Вопросы современной педиатрии. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 50–54.

175. Ушакова, Н. А. Анаэробная твердофазная ферментация растительных субстратов с использованием *Bacillus subtilis* / Н. А. Ушакова, Е. С. Бродский, А. А. Козлова, А. В. Нифатов. – Текст : непосредственный // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 1. – С. 70–77.

176. Ушакова, Н. А. Выделение соматостатинподобного пептида клетками *Bacillus subtilis* В-8130, кишечного симбионта дикой птицы *Tetrao urogallus*, и влияние бациллы на животный организм / Н. А. Ушакова, В. В. Вознесенская, А. А. Козлова [и др.]. – Текст : непосредственный // Доклады АН. – 2010. – Т. 434, № 2. – С. 282–285.

177. Ушакова, Н. А. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения / Н. А. Ушакова, Р. В. Некрасов, В. Г. Правдин [и др.]. – Текст : непосредственный // Фундаментальные исследования. Серия: Сельскохозяйственные науки. – 2010. – № 1. – С. 184–192.

178. Ушакова Н. А. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения / Н. А. Ушакова, Р. В. Некрасов, В. Г. Правдин [и др.]. –

Текст : непосредственный // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 1. – С. 184–192.

179. Ушакова, Н. А. Оценка эффективности синбиотического препарата «Простор» в рационе молоди осетровых рыб / Н. А. Ушакова, С. В. Пономарев, В. Г. Правдин [и др.]. – Текст : непосредственный // Фундаментальные исследования. Серия: Биологические науки. – 2013. – № 6, ч. 5. – С. 1174–1177.

180. Ушакова, Н. А. Высокоэффективные кормовые добавки для животных на основе биоплёнки *Bacillus subtilis* на фитоносителе / Н. А. Ушакова, В. Г. Правдин, Л. З. Кравцова. – Текст : непосредственный // Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных : материалы Международной научно-практической конференции (21 – 22 ноября 2019 г.). – Москва: Сельскохозяйственные технологии, 2019. – С. 244–252.

181. Федорова, О. В. Пробиотические препараты: характеристика, критерии, требования к ним / О. В. Федорова, З. С. Юнусова, М. Ю. Шурбина, Р. Т. Валеева. – Текст : непосредственный // Вестник Казанского технологического университета. Серия: Биологические науки. – 2016. – Т. 19, № 7. – С. 142–145.

182. Филиппович, Ю. Б. Практикум по общей биохимии: учебное пособие для студентов химических специальностей педагогических институтов / Ю. Б. Филиппович, Т. А. Егорова, Г. А. Севастьянова ; под общ. ред. Ю. Б. Филипповича. – Москва: Просвещение, 1975. – 318 с. – Текст : непосредственный.

183. Хорошилова, Н. В. Иммунотерапевтические аспекты применения пробиотиков в клинической практике / Н. В. Хорошилова. – Текст : непосредственный // Лечащий врач. – 2003. – № 2. – С. 71–73.

184. Чижаева, А. В. Научный обзор: теоретические и практические аспекты конструирования пробиотических препаратов / А. В. Чижаева, Г. Н. Дудикова. – Текст : непосредственный // Научное обозрение. Серия: Биологические науки. – 2017. – № 2. – С. 157–166.

185. Шалгимбаева, С. М. Изучение влияния продукционных кормов на микробиоценоз органов тилапии (*Tilapia*) в установках замкнутого

водообеспечения / С. М. Шалгимбаева, С. Ж. Асылбекова, А. К. Садвакасова [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Астраханского государственного университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2016. - № 3. – С. 94–99.

186. Шевелева, С. А. Пробиотики, пребиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса / С. А. Шевелева. – Текст : непосредственный // Вопросы питания. – 1999. – Т. 68, № 2. – С. 32–40.

187. Шендеров, Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание: в 3 томах. Том 1. Микрофлора человека и животных и её функции / Б. А. Шендеров. – Москва: Грантъ, 1998. – С. 38–39. – Текст : непосредственный.

188. Шендеров, Б. А. Функциональное питание и его роль в профилактике метаболического синдрома / Б. А. Шендеров. – Москва : ДеЛи Принт, 2008. – 319 с. – Текст : непосредственный.

189. Шивокене, Я. С. Симбионтное пищеварение у гидробионтов и насекомых: монография / Я. С. Шивокене ; Институт зоологии и паразитологии АН ЛитССР. – Вильнюс: Мокслас, 1989. – 223 с. – Текст : непосредственный.

190. Шлегель, Г. Г. Общая микробиология / Г. Г. Шлегель ; перевод с немецкого Л. В. Алексеевой, Г. А. Куреллы, Н. Ю. Несытовой ; под редакцией члена-корреспондента АН СССР Е. Н. Кондратьевой. – Москва: Мир, 1987. – 567 с. – Текст : непосредственный.

191. Шполянская, А. Ю. Воспаление плавательного пузыря у сеголетков и годовиков карпа / А. Ю. Шполянская. – Текст : непосредственный // Сборник докладов преподавателей сельскохозяйственных вузов РСФСР по прудовому рыбоводству. – Москва: Пищевая промышленность, 1964. – С. 111–115.

192. Шубич, М. Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего / М. Г. Шубич. – Текст : непосредственный // Цитология. – 1974. – Т. 16, № 10. – С. 1321–1322.

193. Шульга, Е. А. Пробиотик субтилис в комбикормах для стерляди / Е. А. Шульга – Текст : непосредственный // Состояние и перспективы развития фермерского рыбоводства аридной зоны : тезисы докладов Международной научной

конференции ; ответственный редактор академик Г. Г. Матишов. – Ростов-на-Дону: ЮНЦ РАН, 2006. – С. 155–167.

194. Щербина, М. А. Методические указания по физиологической оценке питательной ценности кормов для рыб / М. А. Щербина. – Москва: ВНИИПРХ, 1983. – 83 с. – Текст : непосредственный.

195. Юхименко, Л. Н. Аэромонады рыб / Л. Н. Юхименко, В. Ф. Викторова. – Текст : непосредственный // Сборник научных трудов ВНИИПРХ. – 1979. – Вып. 23. – С. 37–55.

196. Юхименко, Л. Н. Специфическая и неспецифическая профилактика бактериальной геморрагической септицемии (БГС) рыб / Л. Н. Юхименко, Г. С. Койдан, Н. В. Гусева, Н. А. Головина. – Текст : непосредственный // Проблемы развития рыбного хозяйства на внутренних водоёмах в условиях перехода к рыночным отношениям: материалы Международной научно-практической конференции. – Минск: Хата, 1998. – С. 332–336.

197. Юхименко, Л. Н. Биологические свойства аэромонад и их роль в патологии рыб / Л. Н. Юхименко, Г. С. Койдан, Л. И. Бычкова, Л. П. Смирнов. – Текст : непосредственный // Рыбное хозяйство. Серия: Болезни гидробионтов в аквакультуре. – 2001. – Вып. 1. – С. 1–10.

198. Юхименко, Л. Н. Испытания лечебного комбикорма с субалином в рыбхозах Московской области / Л. Н. Юхименко, Л. И. Бычкова, К. В. Гаврилин. – Текст : непосредственный // Рыбное хозяйство. Серия: Болезни гидробионтов в аквакультуре. – 2002. – Вып. 2. – С. 18–27.

199. Яхненко, В. М. Особенности состава и структуры клеток крови рыб пелагиали и прибрежья озера Байкал / В. М. Яхненко, И. В. Клименков. – Текст : непосредственный // Известия РАН. Серия биологическая. – 2009. – № 1. – С. 46–54.

200. Ainsworth, A. J. Differences in the phagocytosis of four bacteria by channel catfish neutrophils / A. J. Ainsworth, C. Dexiang. – Text // Developmental and Comparative Immunology. – 1990. – Vol. 14, no. 2. – Pp. 201–209.

201. Al-Dohail, M. A. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling / M. A. Al-Dohail, R. Hashim, M. Aliyu-Paiko. – Text // *Aquaculture Research*. – 2009. – Vol. 40. – Pp. 1642–1652.

202. Balcazar, J. L. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*) / J. L. Balcazar, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela [et al.]. – Text // *British Journal of Nutrition*. – 2007. – Vol. 97, no. 3. – Pp. 522–527.

203. Bhaskar, B. R. Use of haematological parameters as diagnostic tools in determining health of milkfish, *Chanos chanos* (Forsk.) in brackish water culture / B. R. Bhaskar, K. S. Rao. – Text // *Aquaculture and Fisheries Management*. – 1990. – Vol. 21. – Pp. 125–129.

204. Bienenstock, J. Fucosylated but not sialylated milk oligosaccharides diminish colon motor contractions / J. Bienenstock, R. H. Buck, H. Linke [et al.]. – Text // *PLOS One*. – 2013. – Vol. 8, no. 10. – Pp. 1–9.

205. Boehm, H. P. Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks and other carbons / H. P. Boehm. – Text // *Carbon*. – 1994. – Vol. 32, no. 5. – Pp. 759–769.

206. Borges, A. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*) / A. Borges, L. V. Scotti, D. R. Siqueira, [et al.]. – Text // *Fish Physiology and Biochemistry*. – 2004. – Vol. 30, no. 1. – Pp. 21–25.

207. Bottazzi, B. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm / B. Bottazzi, A. Doni, C. Garlanda, A. Mantovani. – Text // *Annual Review of Immunology*. – 2010. – Vol. 28. – Pp. 157–183.

208. Bowden, T. J. Development and function of the thymus in teleosts / T. J. Bowden, P. Cook, J. H. M. W. Rombout. – Text // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2005. – Vol. 19, no. 5. – Pp. 413–427.

209. Bradley, D. E. The morphology and physiology of bacteriophages as revealed by the electron microscope / D. E. Bradley. – Text // *Journal of the Royal Microscopical Society*. – 1965. – Vol. 84, no. 3. – Pp. 257–316.

210. Buddington, R. K. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet / R. K. Buddington, A. Krogdahl, A. M. Bakke-Mckellep. – Text // *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum.* – 1997. – Vol. 638. – Pp. 67–80.

211. Butterworth, A. E. Mechanisms of eosinophilmediated helminthotoxicity / A. E. Butterworth, M. A. Vadas, J. R. David. – Text // *The Eosinophil in Health and Disease* ; edited by A. A. F. Mahmoud, K. F. Austen, A. S. Simon. – London: Grune and Stratton, 1980. – Pp. 253–270.

212. Campoverde, C. Ontogeny and modulation after PAMPs stimulation of β -defensin, hepcidin, and piscidin antimicrobial peptides in meagre (*Argyrosomus regius*) / C. Campoverde, D. J. Milne, A. Estévez. – Text // *Fish and Shellfish Immunology.* – 2017. – Vol. 69. – Pp. 200–210.

213. Castell, J. D. Report of the EIFAC, IUNS and ICES Working Group on the standardization of the methodology in fish nutrition research : (Hamburg (Federal Republic of Germany, March 21–23) ; edited by J. D. Castell, K. Tiews, International Union of Nutritional Sciences, International Council for the Exploration of the sea, European Inland Fisheries Advisory Commission. – Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1979. – Vol. 36. – Pp. 1–24.

214. Celik, E. S. Blood chemistry (electrolytes, lipoprotein and enzymes) values of black scorpion fish (*Scorpaena porcus* Linneaus, 1758) in the Dardanelles, Turkey / E. S. Celik. – Text // *Journal of Biological Sciences.* – 2004. – Vol. 4. – Pp. 716–719.

215. Chang, C.-I. Identification of a novel cathelicidin gene in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* / C.-I. Chang, O. Pleguezuelos, Y.-A. Zhang [et al.]. – Text // *Infection and Immunity.* – 2005. – Vol. 73, no. 8. – Pp. 5053–5064.

216. Ciprandi, G. In vitro effects of *Bacillus subtilis* on the immune response / G. Ciprandi, A. Scordamaglia, D. Venuti [et al.] // *Chemioterapia.* – 1986. – Vol. 6, no. 6. – Pp. 404–407.

217. Cole, A. M. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder / A. M. Cole, P. Weis, G. Diamond. – Text // *Journal of Biological Chemistry.* – 1997. – Vol. 272, no. 18. – Pp. 12008–12013.

218. Cuesta, A. The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream / A. Cuesta, J. Meseguer, M. A. Esteban. – Text // *Molecular Immunology*. – 2008. – Vol. 45, no. 8. – Pp. 2333–2342.

219. Dabrowska, K. Phage therapy: What factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review / K. Dabrowska. – Text // *Medicinal Research Reviews*. – 2019. – Vol. 39, no. 5. – Pp. 2000 – 2025.

220. Dash, S. Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review / S. Dash, S. K. Das, J. Samal, H. N. Thatoi. – Text // *Iranian Journal of Veterinary Research*. – 2018. – Vol. 19, no. 2. – Pp. 72–81.

221. Doss, J. A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms / J. Doss, K. Culbertson, D. Hahn [et al.]. – Text // *Viruses*. – 2017. – Vol. 9, no. 3. – P. 50.

222. Elliott, S. N. Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats / S. N. Elliott, A. Buret, W. McKnight [et al.]. – Text // *American Journal of Physiology*. – 1998. – Vol. 275, no. 3. – Pp. 425–432.

223. Ellis, A. E. Non-specific defense mechanisms in fish and their role in disease processes / A. E. Ellis. – Text // *Developments in Biological Standardization*. – 1981. – Vol. 49. – Pp. 337–352.

224. Ellis, A. E. Stress and the modulation of defence mechanisms in fish / A. E. Ellis // *In Stress and Fish* ; edited by A. D. Pickering. – London: Academic Press, 1981. – Pp. 147–169. – Text.

225. Ellis, A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria / A. E. Ellis. – Text // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2001. – Vol. 25, is. 8–9. – Pp. 827–839.

226. Ezeasor, D. N. A cytochemical, light and electron microscopic study of the eosinophilic granule cells in the gut of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson / D. N. Ezeasor, W. M. Stokoe. – Text // *Journal of Fish Biology*. – 1980. – Vol. 17. – Pp. 619–634.

227. Fange, R. The lymphomyeloid (hemopoietic) system of the Atlantic nurse shark, *Ginglymostoma eirratum* / R. Fange, A. Mattisson. – Text // *Biological Bulletin*. – 1981. – Vol. 160, no. 2. – Pp. 240–249.

228. Fange, R. The fish spleen: structure and function / R. Fange, S. Nilsson. – Text // *Experientia*. – 1985. – Vol. 41, no. 2. – Pp. 152–158.

229. Fidanza, M. *Lactiplantibacillus plantarum* – nomad and ideal probiotic / M. Fidanza, P. Panigrahi, T. R. Kollmann. – Text // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – Pp. 1–13.

230. Fiho, W. D. Fish antioxidant defenses – a comparative approach / W. D. Fiho. – Text // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. – 1996. – Vol. 29, no. 12. – Pp. 1735–1742.

231. Fischbach, F. T. A manual of laboratory diagnostic tests / F. T. Fischbach, M. B. Dunning. – [7th ed.]. – Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004. – 1291 p. – Text.

232. Folch, J. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley. – Text // *Journal of Biological Chemistry*. – 1957. – Vol. 226, no. 1. – Pp. 497–509.

233. Fons, M. Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract / M. Fons, A. Gomez, T. Karjalainen. – Text // *Microbial Ecology in Health and Disease*. – 2000. – Vol. 12. – Pp. 240–246.

234. Fuller, R. Probiotics in man and animals / R. Fuller. – Text // *Journal of Applied Microbiology*. – 1989. – Vol. 66, no. 5. – Pp. 365–378.

235. Fuller, R. Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health / R. Fuller, G. R. Gibson. – Text // *Clinical Microbiology and Infection*. – 1998. – Vol. 4. – Pp. 477–480.

236. Fulton, T. Rate of growth of sea fish / T. Fulton. – Text // 20th Annual report of the fishery board for Scotland. – 1902. – Vol. 20 – Pp. 226–334.

237. Gallo, V. P. The chromaffin system of the beluga sturgeon *Huso huso* (Chondrostei): histological, immunohistochemical and ultrastructural study / V. P.

Gallo, F. Accordi, J. Ohlberger, A. Civinini. – Text // Italian Journal of Zoology. – 2004. – Vol. 71, no. 4. – Pp. 279–285.

238. Gatesoupe, F. J. The use of probiotics in aquaculture / F. J. Gatesoupe. – Text // Aquaculture. – 1999. – Vol. 180, is. 1–2. – Pp. 147–165.

239. Gorski, A. Phage therapy: what have we learned? / A. Gorski, R. Miedzybrodzki, M. Lobočka [et al.]. – Text // Viruses. – 2018. – Vol. 10, no. 6. – Pp. 288.

240. Gradil, A. M. Ontogeny of the immune system in Acipenserid juveniles / A. M. Gradil, G. M. Wright, D. W. Wadowska, M. D. Fast. – Text // Developmental and Comparative Immunology. – 2014. – Vol. 44, no. 2. – Pp. 303–314.

241. Gram L. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish / L. Gram, J. Melchiorson, B. Spanggaard [et al.]. – Text // Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – Vol. 65, no 3. – Pp. 969–973.

242. Guarner, F. Probiotics / F. Guarner, J. G. Schaafsma. – Text // International Journal of Food Microbiology. – 1998. – Vol. 39. – Pp. 237–238.

243. Gul, M. Z. Evaluation of *Abelmoschus moschatus* extracts for antioxidant, free radical scavenging, antimicrobial and antiproliferative activities using in vitro assays / M. Z. Gul, L. M. Bhakshu, F. Ahmad [et al.]. – Text // BMC Complementary and Alternative Medicine. – 2011. – Vol. 11, no. 64. – Pp. 1–12.

244. Guo, G. The efficacy of lactic acid bacteria usage in turbot *Scophthalmus maximus* on intestinal microbiota and expression of the immune related genes / G. Guo, C. Li, B. Xia. – Text // Fish and Shellfish Immunology. – 2020. – Vol. 100. – Pp. 90–97.

245. Hansen, J. Earth's energy imbalance: confirmation and implications / J. Hansen, L. Nazarenko, R. Ruedy [et al.]. – Text // Science. – 2005. – Vol. 308, no. 5727. – Pp. 1431–1435.

246. Havenaar, R. Probiotics: a general view. Volume 1. The lactic acid bacteria in health and disease / R. Havenaar, E. M. J. Huis in't Veld. – New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1992. – Pp. 151–170. – Text.

247. Higuera, G. Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* / G. Higuera, R. Bastías, G. Tsertsivadze [et al.]. – Text // *Aquaculture*. – 2013. – Vol. 392–395. – Pp. 128–133.

248. Hine, P. M. Observations on granulocyte peroxidase in New Zealand freshwater eels, *Anguilla* species / P. M. Hine, J. M. Wain, D. M. Dunlop. – Text // *Journal of Fish Biology*. – 1986. – Vol. 29. – Pp. 711–720.

249. Hirono, I. Two different types of hepcidins from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* / I. Hirono, J-Y. Hwang, Y. Ono [et al.]. – Text // *The FEBS Journal*. – 2005. – Vol. 272, no. 20. – Pp. 5257–5264.

250. Hoang Hoang, A. Selection of phages to control *Aeromonas hydrophila* – an infectious agent in striped catfish / A. Hoang Hoang, T. T. Xuan Tran, P. Le Nga, T. H. Dang Oanh. – Text // *Biocontrol Science*. – 2019. – Vol. 24, no. 1. – Pp. 23–28.

251. Imbeault, S. Using bacteriophages to prevent furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* in farmed brook trout / S. Imbeault, S. Parent, M. Lagacé [et al.]. – Text // *Journal of Aquatic Animal Health*. – 2006. – Vol. 18, no. 3. – Pp. 203–214.

252. Inami, M. Immunological differences in intestine and rectum of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) / M. Inami, A. J. Taverne-Thiele, M. B. Schørder [et al.]. – Text // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2009. – Vol. 26, no. 5. – Pp. 751–759.

253. Irianto, A. Probiotics in aquaculture / A. Irianto, B. Austin. – Text // *Journal of Fish Diseases*. – 2002. – Vol. 25, no. 11. – Pp. 633–642.

254. Irianto, A. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) / A. Irianto, B. Austin. – Text // *Journal of Fish Diseases*. – 2002. – Vol. 25, no. 6. – Pp. 333–342.

255. Irwin, M. J. Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity / M. J. Irwin, S. L. Kaattari. – Text // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 1986. – Vol. 12, no. 1–4. – Pp. 39–45.

256. Jassim, S. A. A. Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages «The living drugs» / S. A. A Jassim, R. G. Limoges. – Text // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2014. – Vol. 30, no. 8. – Pp. 2153–2170.

257. Joosten, P. H. M. Anal immunisation of carp and rainbow trout with different fractions of a *Vibrio anguillarum* bacterin / P. H. M. Joosten, W. J. Kruijer, J. H. W. M. Rombout. – Text // Fish and Shellfish Immunology. – 1996. – Vol. 6, no. 8. – Pp. 541–551.

258. Jun, J. W. Phage application for the protection from Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* / J. W. Jun, J. E. Han, S. S. Giri [et al.]. – Text // Indian Journal of Microbiology. – 2017. – Vol. 58, no. 1. – Pp. 114–117.

259. Jungersen, M. The science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (®) / M. Jungersen, A. Wind, E. Johansen [et al.]. – Text // Microorganisms. – 2014. – Vol. 2, no. 2. – Pp. 92–110.

260. Kalatzis, P. G. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages, ϕ St2 and ϕ Grn1; Phage therapy application for biological control of *Vibrio alginolyticus* in aquaculture live feeds / P. G. Kalatzis, R. Bastías, C. Kokkari, P. Katharios. – Text // PLOS One. – 2016. – Vol. 11, no. 3. – Pp. 1–18.

261. Kamiya, S. Analysis of purity of *Clostridium difficile* toxin A derived by affinity chromatography on immobilized bovine thyroglobulin / S. Kamiya, P. J. Reed, S. Borriello. – Text // FEMS Microbiology Letters. – 1988. – Vol. 56. – Pp. 331–336.

262. Kaur, T. Immunocompatibility of bacteriophages as nanomedicines / T. Kaur, N. Nafissi, O. Wasfi [et al.]. – Text // Journal of Nanotechnology. – 2012. – Vol. 2012. – Pp. 1–13.

263. Kazi, M. Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens / M. Kazi, U. S. Annapure. – Text // Journal of Food Science and Technology. – 2016. – Vol. 53, no. 3. – Pp. 1355–1362.

264. Kazimierczak, J. Complete genome sequences of *Aeromonas* and *Pseudomonas* phages as a supportive tool for development of antibacterial treatment in

aquaculture / J. Kazimierczak, E. A. Wojcik, J. Witaszewska [et al.]. – Text // *Virology Journal*. – 2019. – Vol. 16, no. 4. – Pp. 1–12.

265. Khairnar, K. Novel bacteriophage therapy for controlling metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* infection in catfish / K. Khairnar, M. P. Raut, M. P. Chandekar [et al.]. – Text // *BMC Veterinary Research*. – 2013. – Vol. 9, no. 264. – P. 1–9.

266. Kodama, T. Changes in inhibitory amino acid release linked to pontine-induced atonia: an in vivo microdialysis study / T. Kodama, Y.-Y. Lai, J. M. Siegel. – Text // *Journal of Neuroscience*. – 2003. – Vol. 23, no. 4. – Pp. 1548–1554.

267. Kowalska, J. D. Growing trend of fighting infections in aquaculture environment – opportunities and challenges of phage therapy / J. D. Kowalska, J. Kazimierczak, P. M. Sowińska [et al.]. – Text // *Antibiotics*. – 2020. – Vol. 9, no. 6. – P. 301.

268. Kumar, R. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham) following oral administration of *Bacillus subtilis* / R. Kumar, S. C. Mukherjee, R. Ranjan, S. K. Nayak. – Text // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2008. – Vol. 24, no. 2. – Pp. 168–172.

269. Kunkel, H. G. New hemoglobin in normal adult blood / H. G. Kunkel, G. Wallenius. – Text // *Science*. – 1955. – Vol. 122, no. 3136. – Pp. 288.

270. Kutics, K. Production of activated carbon from walnut shell: II. Pore structure investigations / K. Kutics, L. Kotsis, J. Argyelan, P. Szolcsanyi. – Text // *Hungarian Journal of Industrial Chemistry*. – 1986. – Vol. 14. – Pp. 353–362.

271. Laanto, E. The use of phage FCL-2 as an alternative to chemotherapy against columnaris disease in aquaculture / E. Laanto, J. K. H. Bamford, J. J. Ravantti, L.-R. Sundberg. – Text // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – Vol. 6. – Pp. 1–9.

272. Lee, Y. K. The coming of age of probiotics / Y. K. Lee, S. Salminen. – Text // *Trends in Food Science and Technology*. – 1995. – Vol. 6. – Pp. 241–245.

273. Lester, R. J. G. The eosinophilic cell of the White Sucker, *Catostomus commersoni* / R. J. G. Lester, B. A. Daniels. – Text // *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. – 1976. – Vol. 33. – Pp. 139–144.

274. Letchumanan, V. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* VP103 strain isolated from shrimp in Malaysia / V. Letchumanan, H.-L. Ser, K.-G. Chan, B.-H. Goh [et al.]. – Text // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7, no. 204. – Pp. 1–4.

275. Letchumanan, V. Insights into bacteriophage application in controlling vibrio species / V. Letchumanan, K.-G. Chan, P. Pusparajah [et al.]. – Text // *Frontiers in Microbiology* – 2016. – Vol. 7. – Pp. 1–15.

276. Li, Z. Efficiency of a bacteriophage in controlling vibrio infection in the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicas* / Z. Li, J. Zhang, X. Li [et al.]. – Text // *Aquaculture*. – 2016. – Vol. 451. – Pp. 345–352.

277. Li, W. Exploring the potential of lactic acid bacteria: a 30-year journey in probiotic research / W. Li, L. Y. Kwok, H. Zhang. – Text // *Precision Nutrition*. – 2024. – Vol. 3, Iss. 4.

278. Lomeli-Ortega, C. O. Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae / C. O. Lomeli-Ortega, S. F. Martínez-Díaz. – Text // *Aquaculture*. – 2014. – Vol. 434. – Pp. 208–211.

279. Ly-Chatain, M. H. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy / M. H. Ly-Chatain. – Text // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – Vol. 5, no. 51. – Pp. 1–7.

280. MacArthur, J. I. Phagocytosis in fish / J. I. MacArthur, T. C. Fletcher. – Text // *Proceedings of a conference on fish immunology sponsored by the Fisheries Society of the British Isles, held in Plymouth, England, between 11 and 13 July 1983, Fish Immunology* ; edited by M. J. Manning, M. F. Tatner. – London: Academic Press, 1985. – Pp. 29–46.

281. Maier, V. H. Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species / V. H. Maier, K. V. Dorn, B. K. Gudmundsdottir, G. H. Gudmundsson. – Text // *Molecular Immunology*. – 2008. – Vol. 45, no. 14. – Pp. 3723–3730.

282. Majewska, J. Oral application of T4 phage induces weak antibody production in the gut and in the blood / J. Majewska, W. Beta, D. Lecion [et al.]. – Text // *Viruses*. – 2015. – Vol. 7, no. 8. – Pp. 4783–4799.

283. Makesh, M. Systemic and mucosal immune response of rainbow trout to immunization with an attenuated *Flavobacterium psychrophilum* vaccine strain by different routes / M. Makesh, P. S. Sudheesh, K. D. Cain. – Text // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2015. – Vol. 44, no. 1. – Pp. 156–163.

284. Mastoi, A. M. Differences in haematological parameters in normal, infected and immune-primed fingerlings of Red Tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*) / A. M. Mastoi, M. Sukumaran, A. Mastoi [et al.]. – Text // *Biological Forum. An international journal*. – 2012. – Vol. 4, no. 1. – Pp. 90–97.

285. Meskhi, B. C. Alternative methods of disease prevention and treatment in aquaculture / B. C. Meskhi, D. A. Djedirov, D. V. Rudoy [и др.]. – Text // *SJLSA*. – 2025. – Vol. 17, no 6-2. – Pp. 698–715.

286. Moritomo, T. Chemiluminescence of neutrophils isolated from peripheral blood of eel / T. Moritomo, T. Iida, H. Wakabayashi. – Text // *Fish Pathology*. – 1988. – Vol. 23. – Pp. 49–53.

287. Murata, K. Crystallization and X-ray analysis of the salmon-egg lectin SEL24K / K. Murata, A. J. Fisher, J. L. Hedrick. – Text // *Acta Crystallographica. Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. – 2007. – Vol. 63, pt. 5. – Pp. 396–398.

288. Nayak, S. K. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham) / S. K. Nayak, P. Swain, S. C. Mukherjee. – Text // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2007. – Vol. 23, no. 4. – Pp. 892–896.

289. Nazarova, E. A. Specific features of the composition of leucocytes in the kidneys of some species of freshwater and marine bony fishes / E. A. Nazarova, E. A. Zabotkina. – Text // *Inland Water Biology*. – 2010. – Vol. 3, no. 2. – Pp. 187–192.

290. Nikapitiya, C. Isolation and characterization of multidrug resistance *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and its infecting novel phage ASP-1 from Goldfish (*Carassius auratus*) / C. Nikapitiya, S. H. S. Dananjaya, H. P. S. U. Chandrarathna [et al.]. – Text // *Indian Journal of Microbiology*. – 2019. – Vol. 59, no. 2. – Pp. 161–170.

291. Nikoskelainen, S. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*) / S. Nikoskelainen, A. C. Ouwehand, G. Bylund [et al.]. – Text // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2003. – Vol. 15, no. 5. – Pp. 443–452.

292. O'Neill, J. G. An in vitro study of polymorphonuclear phagocytosis and the effect of temperature / J. G. O'Neill. – Text // *Proceedings of a conference on fish immunology sponsored by the Fisheries Society of the British Isles, held in Plymouth, England, between 11 and 13 July 1983, Fish Immunology*; edited by M. J. Manning, M. F. Tatner. – London: Academic Press, 1985. – Pp. 47–55.

293. Panigrahi, A. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 / A. Panigrahi, V. Kiron, T. Kobayashi [et al.]. – Text // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2004. – Vol. 102, no. 4. – Pp. 379–388.

294. Parker, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story / R. B. Parker. – Text // *Animal nutrition and health*. – 1974. – Vol. 29. – Pp. 4–8.

295. Pauling, L. Sickle cell anemia, a molecular disease / L. Pauling, H. A. Itano, S. J. Singer, I. C. Wells. – Text // *Science*. – 1949. – Vol. 110, no. 2865. – Pp. 543–548.

296. Peatman, E. Physiology and immunology of mucosal barriers in catfish (*Ictalurus spp.*) / E. Peatman, M. D. Lange, H. Zhao, B. H. Beck. – Text // *Tissue Barriers*. – 2015. – Vol. 3, no. 4. – Pp. 1–15.

297. Perdiguero, P. Teleost IgD⁺ IgM[–] B-cells mount clonally expanded and mildly mutated intestinal IgD responses in the absence of lymphoid follicles / P. Perdiguero, A. Martín-Martín, O. Benedicenti [et al.]. – Text // *Cell Reports*. – 2019. – Vol. 29, no. 13. – Pp. 4223–4235.

298. Picchiatti, S. Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) / S. Picchiatti, F. R. Terribili, L. Mastrolia [et al.]. – Text // *Anatomy and Embryology*. – 1997. – Vol. 196, no. 6. – Pp. 457–463.

299. Picchiatti, S. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies /

S. Picchietti, M. Mazzini, A.R. Taddei [et al.]. – Text // Fish and Shellfish Immunology. – 2007. – Vol. 22, is. 1–2. – Pp. 57–67.

300. Picchietti, S. Compartmentalisation of T-cells expressing CD8 α and TCR β in developing thymus of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) / S. Picchietti, L. Guerra, L. Selleri [et al.]. – Text // Development and Comparative Immunology. – 2008. – Vol. 32, no. 2. – Pp. 92–99.

301. Picchietti, S. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). / S. Picchietti, A. M. Fausto, E. Randelli [et al.]. – Text // Fish and Shellfish Immunology. – 2009. – Vol. 26, no. 3. – Pp. 368–376.

302. Porubcan, R. S. Reduction in chemical oxygen demand and improvement in *Penaeus monodon* yield in ponds inoculated with aerobic *Bacillus* bacteria / R. S. Porubcan. – Text // Proceedings of the program and abstract of the 22nd annual conference and exposition of the World Aquaculture Society. – San Juan, Puerto-Rico, 1991. – Pp. 21–25.

303. Porubcan, R. S. Reduction of ammonia nitrogen and nitrite in tanks of *Penaeus monodon* using floating biofilters containing processed diatomaceous earth media pre-inoculated with nitrifying bacteria / R. S. Porubcan. – Text // Proceedings of the program and abstract of the 22nd annual conference and exposition of the World Aquaculture Society. – San Juan, Puerto-Rico, 1991. – Pp. 16–20.

304. Pradhan, S. C. Seasonal changes in hematological parameters of *Catla catla* (Hamilton 1822) / S. C. Pradhan, A. K. Patra, B. Sarkar, A. Pal. – Text // Comparative Clinical Pathology. – 2012. – Vol. 21, no. 6. – Pp. 1473–1481.

305. Prasad, G. Haematology and leucocyte enzyme cytochemistry of a threatened yellow catfish *Horabagrus brachysoma* (Gunther 1864) / G. Prasad, S. Charles. – Text // Fish Physiology and Biochemistry. – 2010. – Vol. 36, no. 3. – Pp. 435–443.

306. Rakers, S. Fish matters: the relevance of fish skin biology to investigative dermatology / S. Rakers, M. Gebert, S. Uppalapati [et al.]. – Text // Experimental Dermatology. – 2010. – Vol. 19, no. 4. – Pp. 313–324.

307. Rakers, S. Antimicrobial peptides (AMPs) from fish epidermis: perspectives for investigative dermatology / S. Rakers, L. Niklasson, D. Steinhagen, D. [et al.]. – Text // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2013. – Vol. 133, no. 5. – Pp. 1140–1149.

308. Rauta, P. R. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms / P. R. Rauta, B. Nayak, S. Das. – Text // *Immunology Letters*. – 2012. – Vol. 148, no. 1. – Pp. 23–33.

309. Rigo, A. BID and the-bisabolol-triggered cell death program: converging on mitochondria and lysosomes / A. Rigo, I. Ferrarini, E. Lorenzetto [et al.]. – Text // *Cell Death and Disease*. – 2019. – Vol. 10, no. 12. – Pp. 1–13.

310. Rombout, J. H. W. M. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical analysis / J. H. W. M. Rombout, A. J. Taverne-Thiele, M. I. Villena. – Text // *Development and Comparative Immunology*. – 1993. – Vol. 17, no. 1. – Pp. 55–66.

311. Rong, R. Reductions of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after bacteriophage application during depuration / R. Rong, H. Lin, J. Wang [et al.]. – Text // *Aquaculture*. – 2014. – Vol. 418. – Pp. 171–176.

312. Roubal, F. R. Blood and other possible inflammatory cells in the sparid *Acanthopagrus australis* (Günther) / F. R. Roubal. – Text // *Journal of Fish Biology*. – 1986. – Vol. 28. – Pp. 573–593.

313. Salinas, I. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). / I. Salinas, L. Abelli, F. Bertoni [et al.]. – Text // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2008. – Vol. 25, is. 1–2. – Pp. 114–123.

314. Salinas, I. Mucosal immunoglobulins and B-cells of Teleost fish / I. Salinas, Y.-A. Zhang, J. O. Sunyer. – Text // *Developmental and comparative immunology*. – 2011. – Vol. 35, no. 12. – Pp. 1346–1365.

315. Salkova, E. Immunohistochemical mapping of thymic microenvironment in sterlet (*Acipenser ruthenus*) / E. Salkova, M. Flajshans, C. Steinbach. – Text // *Veterinární Medicína*. – Vol. 65, no. 7. – Pp. 301–308.

316. Salkova, E. The first finding of Hassall's corpuscles in the thymi of cultured sturgeons / E. Salkova, M. Flajshans. – Text // *Veterinární Medicína*. – 2017. – Vol. 61, no. 8. – Pp. 464–466.

317. Satheeshkumar, P. Comparative investigation on haematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India / P. Satheeshkumar, G. Ananthan, D. Senthilkumar [et al.]. – Text // *Comparative Clinical Pathology*. – 2012. – Vol. 21, no. 3. – Pp. 275–281.

318. Schulz, P. Bacteriophage-based cocktail modulates selected immunological parameters and post-challenge survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / P. Schulz, J. Pajdak-Czaus, S. Robak [et al.]. – Text // *Journal of Fish Diseases*. – 2019. – Vol. 42, no. 8. – Pp. 1151–1160.

319. Schulz, P. Influence of bacteriophages cocktail on European eel (*Anguilla anguilla*) immunity and survival after experimental challenge / P. Schulz, S. Robak, J. Dastych, A. K. Siwicki. – Text // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2019. – Vol. 84. – Pp. 28–37.

320. Secombes, C. J. The innate and adaptive immune system of fish / C. J. Secombes, T. Wang. – Text // *Infectious disease in aquaculture: prevention and control* (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition) ; edited by B. Austin. – Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2012. – Pp. 3–68.

321. Sergina, Y. A. The effect of modern probiotic preparations on enterosorbents on the piscicultural and microbiological parameters of sturgeon fish / Y. A. Sergina, A. D. Zhandalgarova, A. A. Bakhareva [et al.]. – Text // *Sustainable Fisheries and Aquaculture: challenges and prospects for the blue bioeconomy: conference proceedings* ; edited by A. G. Arkhipov. – Springer, 2022. – Pp. 11–19.

322. Shah, S. L. Alterations in the immunological parameters of Tench (*Tinca tinca* L. 1758) after acute and chronic exposure to lethal and sublethal treatments with mercury, cadmium and lead / S. L. Shah, A. Altindag. – Text // *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. – 2005. – Vol. 29, no. 5. – Pp. 1163–1168.

323. Sharma, S. Bacteriophages and its applications: an overview / S. Sharma, S. Chatterjee, S. Datta [et al.]. – Text // *Folia Microbiologica*. – 2017. – Vol. 62. – Pp. 17–55.

324. Shike, H. Organization and expression analysis of the zebrafish hepcidin gene, an antimicrobial peptide gene conserved among vertebrates / H. Shike, C. Shimizu, X. Lauth, J. C. Burns. – Text // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2004. – Vol. 28, is. 7–8. – Pp. 747–754.

325. Silphaduang, U. Peptide antibiotics in mast cells of fish / U. Silphaduang, E. J. Noga. – Text // *Nature*. – 2001. – Vol. 414, no. 6861. – Pp. 268–269.

326. Silva, Y. J. Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture / Y. J. Silva, L. Costa, C. Pereira [et al.]. – Text // *Microbial Biotechnology*. – 2014. – Vol. 7, no. 5. – Pp. 401–413.

327. Silva, Y. J. Biological control of *Aeromonas salmonicida* infection in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with Phage AS-A / Y. J. Silva, C. Moreirinha, C. Pereira [et al.]. – Text // *Aquaculture*. – 2016. – Vol. 450. – Pp. 225–233.

328. Song, Z. Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuy* / Z. Song, T. Wu, L. Cai [et al.]. – Text // *Journal Zhejiang University. Science B: Biomedicine and Biotechnology*. – 2007. – Vol. 7, no. 7. – Pp. 596–602.

329. Stalin, N. Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India / N. Stalin, P. Srinivasan. – Text // *Veterinary Microbiology*. – 2017. – Vol. 207. – Pp. 83–96.

330. Sunyer, J. O. Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates / J. O. Sunyer, J. D. Lambris. – Text // *Immunological Reviews*. – 1998. – Vol. 166, no 1. – Pp. 39–57.

331. Suzuki, K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. / K. Suzuki. – Text // *Journal of Fish Biology*. – 1986. – Vol. 29. – Pp. 349–364.

332. Suzuki, Y. Dynamics of leucocytic inflammatory responses in carp / Y. Suzuki, T. Hibiya. – Text // Fish Pathology. – 1988. – Vol. 23. – Pp. 179–184.

333. Svobodova, Z. Leukocyte profiles of diploid and triploid tench *Tinca tinca* L / Z. Svobodova, M. Flajšhans, J. Kolářová [et al.]. – Text // Aquaculture. – 2001. – Vol. 198, is. 1–2. – Pp. 159–168.

334. Tanaka, R. The effect of the ingestion of fermented milk with *Lactobacillus casei* Shirota on the gastrointestinal microbial ecology in healthy volunteers / R. Tanaka. – Text // Gut flora and Health: Past, Present and Future: International Congress and Symposium ; edited by A. R. Leeds, I. R. Rowland. – London: Royal Society of Medicine Press Limited, 1997. – Series 219. – Pp. 37–45.

335. Trinder, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with on alternative oxygen receptor / P. Trinder. – Text // Annals of Clinical Biochemistry. – 1969. – Vol. 6, no. 1. – Pp. 24–33.

336. Tripathi, S. Effect of acute exposure of sodium arsenite (Na_3AsO_3) on some haematological parameters of *Clarias batrachus* (common Indian catfish) in vivo / S. Tripathi, D. B. Sahu, R. Kumar, A. Kumar. – Text // Indian Journal of Environmental Health. – 2003. – Vol. 45, no. 3. – Pp. 183–188.

337. Trust, T. J. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharingodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) / T. J. Trust, L. M. Bull, B. R Currie, J. T. Buckley. – Text // Journal of the Fisheries Board of Canada. – 1979. – Vol. 36, no. 10. – Pp. 1174–1179.

338. Umair, M. Probiotic-Based Bacteriocin: immunity supplementation against viruses. An updated review / M. Umair, S. Jabbar, L. Zhaoxin [et al.]. – Text // Frontiers in Microbiology. – 2022. – Vol. 13. – Pp. 1–13.

339. Uran, P. A. Soybean meal-induced uptake block in Atlantic salmon *Salmo salar* distal enterocytes / P. A. Uran, R. Aydin, J. W. Schrama [et al.]. – Text // Journal of Fish Biology. – 2008. – Vol. 73, no. 10. – Pp. 2571–2579.

340. Van der Marel, M. C. Carp mucus and its role in mucosal defense: thesis / M. C. Van der Marel. – The Netherlands: Wageningen University, 2012. – 189 p. – Text.

341. Van der Marel, M. Molecular cloning and expression of two β -defensin and two mucin genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and their up-regulation after β -glucan feeding / M. van der Marel, M. Adamek, S. F. Gonzalez [et al.]. – Text // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2012. – Vol. 32, no. 3. – Pp. 494–501.

342. Van Kampen, E. J. Standardization of hemoglobinometry II. The hemiglobincyanide method / E. J. Van Kampen, W. G. Zijlstra. – Text // *Clinica Chimica Acta*. – 1961. – Vol. 6, no. 4. – Pp. 538–544.

343. Van Kampen, E. J. Determination of hemoglobin and its derivatives / E. J. Van Kampen, W. G. Zijlstra. – Text // *Advances in Clinical Chemistry*. – 1966. – Vol. 8. – Pp. 141–187.

344. Van Muiswinkel, W. B. The immune system of fish / W. B. Van Muiswinkel, B. Van der wal Vervoorn-Van. – Text // *Fish Diseases and Disorders. Volume 1: protozoan and metazoan infections* ; edited by P. T. K. Woo. – The Netherlands: CAB International, 2006. – Pp. 678–701.

345. Varel, V. H. Activity of fiber-degrading microorganisms in the pig large intestine / V.H. Varel. – Text // *Journal of Animal Science*. – 1987. – Vol. 65, no. 2. – Pp. 488–496.

346. Vaseeharan, B. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon* / B. Vaseeharan, P. Ramasamy. – Text // *Letters in Applied Microbiology*. – 2003. – Vol. 36, no. 2. – Pp. 83–87.

347. Villarroel, F. Apolipoprotein A-I, an antimicrobial protein in *Oncorhynchus mykiss*: evaluation of its expression in primary defence barriers and plasma levels in sick and healthy fish / F. Villarroel, A. Bastías, Casado A. [et al.]. – Text // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2007. – Vol. 23, no. 1. – Pp. 197–209.

348. Vinod, M. G. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments / M. G. Vinod, M. M. Shivu, K. R. Umesha [et al.]. – Text // *Aquaculture*. – 2006. – Vol. 255, is. 1–4. – Pp. 117–124.

349. Wagner, T. Blood chemistry correlates of nutritional condition, tissue damage, and stress in migrating juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) /

T. Wagner, J. L. Congleton. – Text // *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*. – 2004. – Vol. 61, no. 7. – Pp. 1066–1107.

350. Wang, M. Q. Effects of enzyme supplementation on growth, intestinal content viscosity, and digestive enzyme activities in growing pigs fed rough rice-based diet / M. Q. Wang, Z. R. Xu, J. Y. Sun, B. G. Kim. – Text // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. – 2008. – Vol. 21, no. 2. – Pp. 270–276.

351. Wang, Y. Bacteriophage therapy for the control of *Vibrio harveyi* in greenlip abalone (*Haliotis laevis*) / Y. Wang, M. Barton, L. Elliott [et al.]. – Text // *Aquaculture*. – 2017. – Vol. 473. – Pp. 251–258.

352. Waterstrat, P. R. In vitro responses of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, neutrophils to *Edwardsiella ictaluri* / P. R. Waterstrat, A. J. Ainsworth, G. Capley. – Text // *Developmental and Comparative Immunology*. – 1991. – Vol. 15, is. 1–2. – Pp. 53–63.

353. Watkins, B. A. Effect of oral dosing of *Lactobacillus* strains on gut colonization and liver biotin in broiler chicks / B. A. Watkins, F. H. Kratzer. – Text // *Poultry Science Journal*. – 1983. – Vol. 62, no. 10. – Pp. 2088–2094.

354. Wedemeyer, G. A. Some potentials and limits of the leucocrit test as a fish health assessment method / G. A. Wedemeyer, R. W. Gould, W. T. Yasutake. – Text // *Journal of Fish Biology*. – 1983. – Vol. 23, no. 6. – Pp. 711–716.

355. Weichselbaum, T. E. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma / T. E. Weichselbaum. – Text // *American Journal of Clinical Pathology*. – 1946. – Vol. 16, no. 3. – Pp. 40–49.

356. Wilson, M. Tertiary Volcanism on the Galatia province, north-west Central Anatolia, Turkey / M. Wilson, A. Tankut, N. T. Güleç. – Text // *Lithos*. – 1997. – Vol. 42. – Pp. 105–122.

357. Winston, G. W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals / G. W. Winston. – Text // *Comparative biochemistry and Physiology C, Comparative pharmacology and toxicology*. – 1991. – Vol. 100, is. 1–2. – Pp. 173–176.

358. Witeska, M. Erythrocytes in teleost fishes: a review / M. Witeska. – Text // *Zoology and Ecology*. – 2013. – Vol. 23, no. 4. – Pp. 275–281.

359. Wostmann, B. S. Gesmfree and gnotobiotic animal model: background and applications / B. S. Wostmann. – Boca Raton: CRC Press, 1996. – P. 10. – Text.

360. Yun, S. Immunostimulation of *Cyprinus carpio* using phage lysate of *Aeromonas hydrophila* / S. Yun, J. W. Jun, S. S. Giri [et al.]. – Text // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2019. – Vol. 86, no.27. – Pp. 680–687.

361. Zarejabad, A. M. Effects of rearing temperature on hematological and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juvenile / A. M. Zarejabad, M. Sudagar, S., Pouralimotlagh, K. D. Bastami. – Text // *Comparative Clinical Pathology*. – 2010. – Vol. 19, no. 4. – Pp. 367–371.

362. Zhandalgarova A. Analysis of the effect of the sorbent probiotic drug “Florin Forte” on the cellular immunity of the Russian-Lena sturgeon / A. Zhandalgarova, Yu. Grozesku, V. Egorova [et al.]. – Text // *E3S Web of Conferences*. – 2024. Vol. 510. – P. 01034.

363. Zhang, H. Application of a phage in decontaminating *Vibrio parahaemolyticus* in oysters / H. Zhang, Z. Yang, Y. Zhou [et al.]. – Text // *International Journal of Food Microbiology*. – 2018. – Vol. 275. – Pp. 24–31.

364. Zhang, J. Effect of bacteriophages on *vibrio alginolyticus* infection in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka) / J. Zhang, Z. Cao, Z. Li [et al.]. – Text // *Journal of the World Aquaculture Society*. – 2015. – Vol. 46, no. 2. – Pp. 149–158.

365. Zhang, S. Z. Effects of feeding alfalfa hay on chewing, rumen pH, and milk fat concentration of dairy cows fed wheat dried distillers grains with solubles as a partial substitute for barley silage / S. Z. Zhang, G. B. Penner, M. Abdelqader, M. Oba. – Text // *Journal of Dairy Science*. – 2010. – Vol. 93, no. 7. – Pp. 3243–3252.

366. Zhang, Y.-A. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity / Y.-A. Zhang, I. Salinas, J. Li [et al.]. – Text // *Nature Immunology*. – 2010. – Vol. 11, no. 9. – Pp. 827–835.

367. Zou, J. Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish / J. Zou, C. Mercier, A. Koussounadis, C. Secombes. – Text // *Molecular Immunology*. – 2007. – Vol. 44, no. 4. – Pp. 638–647.

ПРИЛОЖЕНИЯ

1102

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2656386

**Продукционный комбикорм для производителей осетровых
рыб с добавлением пробиотика и биологически активных
веществ**

Патентообладатель: **Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования ФГБОУ
ВО "Астраханский государственный технический
университет" (RU)**

Авторы: **Жандалгарова Аделя Джуманияшевна (RU), Бахарева
Анна Александровна (RU), Грозеску Юлия Николаевна (RU),
Кравцова Любовь Захарьевна (RU), Правдин Игорь Валерьевич
(RU)**

Заявка № 2017116295

Приоритет изобретения 10 мая 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 05 июня 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 10 мая 2037 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2812045

ПРОДУКЦИОННЫЙ КОМБИКОРМ ДЛЯ
ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Астраханский государственный технический университет" (RU)*

Авторы: *Сергина Юлия Александровна (RU), Жандалгарова Аделя Джуманияшевна (RU)*

Заявка № 2023109786

Приоритет изобретения 18 апреля 2023 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 22 января 2024 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 18 апреля 2043 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат: 429b6a0fe3853164ba96f83b73b4aa7
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 10.05.2023 по 02.08.2024

Ю.С. Зубов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2827392

СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
ОСЕТРОВЫХ РЫБ К БАКТЕРИАЛЬНЫМ
ИНФЕКЦИЯМ

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Астраханский государственный технический университет", ФГБОУ ВО "АГТУ" (RU)*

Авторы: *Жандалгарова Аделя Джуманияшевна (RU), Чечкина Анастасия Андреевна (RU), Сергина Юлия Александровна (RU)*

Заявка № 2024106953

Приоритет изобретения 18 марта 2024 г.

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 25 сентября 2024 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 18 марта 2044 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ

Сертификат: 0692e7c1a6300b154f2401670a8a2026

Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**

Действителен с 10.07.2024 по 03.10.2025

Ю.С. Зубов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2837903

СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА
ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Астраханский государственный технический университет", ФГБОУ ВО "АГТУ" (RU)*

Авторы: *Жандалгарова Аделя Джуманияшевна (RU), Грозеску Юлия Николаевна (RU), Сергина Юлия Александровна (RU)*

Заявка № 2024138690

Приоритет изобретения 20 декабря 2024 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 07 апреля 2025 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 20 декабря 2044 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 0692e7c1a0b300b154f2401670a0cc2026
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 10.07.2024 по 03.10.2025

Ю.С. Зубов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2837905

СПОСОБ КОРРЕКЦИИ ИММУНИТЕТА ОСЕТРОВЫХ
РЫБ

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Астраханский государственный технический университет", ФГБОУ ВО "АГТУ" (RU)*

Авторы: *Жандалгарова Аделя Джуманияшевна (RU), Грозеску Юлия Николаевна (RU), Сергина Юлия Александровна (RU)*

Заявка № 2024138692

Приоритет изобретения 20 декабря 2024 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 07 апреля 2025 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 20 декабря 2044 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ

Сертификат 0692e7c1a0b300b154f2401670a0cc2026

Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**

Действителен с 10.07.2024 по 03.10.2025

Ю.С. Зубов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2025622462

**Динамика накопления микроэлементов в органах
осетровых рыб при введении в рацион
сбалансированных продукционных комбикормов с
пробиотическими препаратами**

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Астраханский государственный технический
университет» (RU)*

Авторы: *Сергина Юлия Александровна (RU), Жандалгарова
Аделя Джуманияшевна (RU)*



Заявка № 2025622101

Дата поступления 27 мая 2025 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных 04 июня 2025 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 0692e7c106300b154f24016708cc2026
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 10.07.2024 по 03.10.2025

Ю.С. Зубов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2025622612

**Лейкоцитарная формула периферической крови
сибирского осетра при использовании сорбированного
пробиотического препарата**

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Астраханский государственный технический
университет» (RU)*

Авторы: *Жандалгарова Аделя Джуманияшевна (RU), Микряков
Даниил Вениаминович (RU), Сергина Юлия Александровна
(RU)*



Заявка № 2025622100

Дата поступления 27 мая 2025 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных 18 июня 2025 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

документ подписан электронной подписью
Сертификат 0692e7c10b300b154f2401670bcca2026
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 10.07.2024 по 03.10.2025

Ю.С. Зубов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2851496

ПРОДУКЦИОННЫЙ КОМБИКОРМ ДЛЯ
ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Астраханский государственный технический университет" (ФГБОУ ВО "АГТУ") (RU)*

Авторы: *Сергина Юлия Александровна (RU), Жандалгарова Аделя Джуманияшевна (RU)*

Заявка № 2025113688

Приоритет изобретения 22 мая 2025 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 24 ноября 2025 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 22 мая 2045 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

документ подписан электронной подписью
Сертификат 00a570e9f7dad1653164b881be75f29506
Владимир **Зубов** Юрин Сергей
Действителен с 04.07.2025 по 28.11.2026

Ю.С. Зубов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2851508

ПРОДУКЦИОННЫЙ КОМБИКОРМ ДЛЯ
ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Астраханский государственный технический университет" (ФГБОУ ВО "АГТУ") (RU)*

Авторы: *Жандалгарова Аделя Джуманияшевна (RU),
Сергина Юлия Александровна (RU)*

Заявка № 2025115366

Приоритет изобретения 04 июня 2025 г.

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 24 ноября 2025 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 04 июня 2045 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

документ подписан электронной подписью

Сертификат 00a570e4f7a41905316b8818e75f29506

Владимир Зубов Юрии Сергеевич

Действителен с 04.07.2025 по 28.11.2026

Ю.С. Зубов



ПРОТОКОЛ

В результате полученных данных можно говорить о положительном действии данных пробиотических препаратов при добавлении их в производственные корма для осетровых рыб. Введение их в рецептуру корма дает увеличение прироста массы и упитанности рыб.

Председатель комиссии

 Ю.Н. Грозеску

Члены комиссии:

 А.А. Бахарева

 А.Д. Жандалгарова

 Ю.В. Федоровых



УТВЕРЖДАЮ

Глава КФХ Полякова Ю.С.,

Полякова Ю.С.

«15» НОЯБРЯ 2023 г.

АКТ

производственных испытаний продукционных комбикормов для осетровых рыб с добавлением пробиотических препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте

Комиссия в составе: председатель – д.с.-х.н., доц. Грозеску Ю.Н., члены комиссии: д.с.-х.н., доц. Бахарева А.А., к.с.-х.н., доц. Жандалгарова А.Д., к.с.-х.н., доц. Федоровых Ю.В. рассмотрела результаты производственных испытаний продукционных комбикормов для осетровых рыб с добавлением пробиотических препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте.

Исследования по определению эффективности использования пробиотиков нового поколения в составе продукционных комбикормов для осетровых рыб проводили в производственных условиях КФХ Полякова Ю.С. в течение 150 суток. В качестве объекта исследований выступили двухлетки русского осетра.

Выращивание осетровых рыб осуществлялось в садках размером 2х2 м, глубиной 1 м. Плотность посадки двухлеток русского осетра устанавливали в зависимости от массы выращиваемой рыбы. Норма ввода препаратов в комбикорм составила: синбиотик - 4 г/кг, пробиотик - 5 г/кг комбикорма.

На основании протокола рассмотрения результатов производственных испытаний комиссия считает, что продукционные комбикорма для осетровых рыб с добавлением пробиотических препаратов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованных на фитосорбенте могут быть рекомендованы для промышленного использования.

Председатель комиссии

Ю.Н. Грозеску

Члены комиссии:

А.А. Бахарева

А.Д. Жандалгарова

Ю.В. Федоровых

ПРОТОКОЛ

рассмотрения результатов производственных испытаний по оценке влияния производственных комбикормов с добавлением сорбированных пробиотических препаратов на основе штаммов р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* на иммунный статус осетровых рыб

№ 1

«05» декабря 2023 г.

Производственные испытания по оценке влияния производственных комбикормов с добавлением сорбированных пробиотических препаратов на основе штаммов р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* на иммунный статус осетровых рыб проводились в бассейновых условиях ООО Научно-производственной фирмы «Касатка» в течение 30 суток. В качестве объектов исследований использовали русско-ленского осетра. Нормы ввода пробиотических препаратов составили: пробиотик на энтеросорбенте СУМС-1 – 7 г/кг, пробиотик на активированном угле – 6 г/кг комбикорма.

Полученные результаты выращивания русско-ленского осетра подтвердили положительное влияние исследуемых комбикормов с пробиотическими препаратами на показатели неспецифического гуморального иммунитета рыб (табл. 1).

Таблица 1 – Влияние пробиотических препаратов на гуморальные факторы иммунитета

Показатель	Группа		
	Контроль	пробиотик на энтеросорбенте СУМС-1	пробиотик на активированном угле
БАСК, %	30,20±0,80	42,2±0,32	42,00±0,41
ИМД особи, %	0	0	0
СРБ, мг/л	<6	<6	<6
ИК, ус. ед	5,70±0,35	4,20±0,54	6,00±0,41
Лизоцим, мкг/мл	14,48±0,87	16,50±0,49	19,06±0,05

Председатель комиссии

Члены комиссии:



Д.В. Микряков



А.Д. Жандалгарова



Т.А. Суворова



С.В. Кузьмичева

п. Борок, 2023

УТВЕРЖДАЮ
 Директор ООО Научно-производственная
 фирма «Касатка»
 Новиков Д.А.
 «05» 12 2023 г.

АКТ

производственных испытаний по оценке влияния производственных комбикормов с добавлением сорбированных пробиотических препаратов на основе штаммов р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* на иммунный статус осетровых рыб

Комиссия в составе: председатель – Микряков Д.В. к.б.н., зав. лаб., в.н.с. ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН, члены комиссии: Жандалгарова А.Д. – к.с.-х.н., доц. ФГБОУ ВО АГТУ, Суворова Т.А. – н.с. ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН, Кузьмичева С.В. – н.с. ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН, составили настоящий акт о том, что в период с 1 по 30 ноября 2023 г. проведены производственные испытания производственных комбикормов для осетровых рыб с добавлением сорбированных пробиотических препаратов на основе штаммов р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*.

На основании протокола №1 от «05» декабря 2023 г. комиссия рекомендует к промышленному использованию производственные комбикорма для осетровых рыб с добавлением сорбированных пробиотических препаратов в дозировках: пробиотик на энтеросорбенте СУМС-1 – 7 г/кг, пробиотик на активированном угле – 6 г/кг комбикорма.

Председатель комиссии



Д.В. Микряков

Члены комиссии:



А.Д. Жандалгарова



Т.А. Суворова



С.В. Кузьмичева

п. Борок, 2023

УТВЕРЖДАЮ:

Проректор по научной работе и
инновациям ФГБОУ ВО «Астраханский
государственный технический
университет»

д.т.н., профессор Ю.А. Максименко



31 августа 2024 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. **Наименование предложения для внедрения:** внедрение монографии «Применение сорбированных пробиотических препаратов в кормлении осетровых рыб» в учебный процесс и профессионально-практическую деятельность предприятий рыбохозяйственного комплекса.

2. **Организация, адрес, исполнители:** ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет»; 414056, Астраханская область, г. Астрахань, ул. Татищева, стр. 16/1; Авторы: Жандалгарова А.Д., Бахарева А.А., Грозеску Ю.Н.

3. **Источник информации:** Диссертационная работа на соискание ученой степени доктора наук «Научно обоснованные приемы повышения физиолого-иммунологического статуса осетровых рыб в аквакультуре».

4. **Внедрено:** В образовательный процесс по направлениям подготовки 35.03.08, 35.04.07 «Водные биоресурсы и аквакультура» при разработке рабочих программ по дисциплинам «Корма и кормление рыб в аквакультуре», «Современные методы кормления рыб в индустриальных условиях», «Методы борьбы с болезнями рыб», что соответствует федеральным государственным образовательным стандартам по направлениям подготовки «Водные биоресурсы и аквакультура» (бакалавриат, магистратура), утвержденным Министерством образования и науки Российской Федерации, и профессиональному стандарту «Специалист по водным биоресурсам и аквакультуре» в рамках профессиональной компетенции ПК-1 Организация ведения технологического процесса разведения и выращивания водных биологических ресурсов.

5. **Период внедрения:** с 31.08.2024 г.

6. **Эффективность внедрения:** Использование монографии «Применение сорбированных пробиотических препаратов в кормлении осетровых рыб» в учебном процессе позволяет расширить представления обучающихся о современных подходах к кормлению рыб и кормопроизводству, а также сформировать практические компетенции в области использования пробиотических препаратов при производстве специализированных комбикормов. Это способствует повышению уровня профессиональной подготовки специалистов рыбохозяйственной отрасли и их компетентности в вопросах разработки и применения функциональных комбикормов для рыб.

Материалы рассмотрены на заседании учебно-методического совета, протокол №2 от 31 августа 2024 г.

Ответственный за внедрение:

Директор Института рыбного хозяйства,
биологии и природопользования
ФГБОУ ВО «Астраханский государственный
технический университет»,
к.б.н., доцент

В.И. Егорова

Почтовый адрес: ФГБОУ ВО «АГТУ», 414056, Астраханская область,
г. Астрахань, ул. Татищева, стр. 16/1, email: lekaego@mail.ru, тел.: 8 (8512) 614-225