

ВЛИЯНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО СТРЕССА НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАРПА (CYPRINUS CARPIO)

*Крылова Т.Г., ORCID iD 0000-0001-6239-0612, **Сафронов Д.И., ORCID iD 0000-0002-0803-9239
***Крылов Г.С., ORCID iD 0000-0002-7744-6495, *Докучаев П.В. ORCID iD 0000-0002-0152-2172

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования (ФГБОУ ВО) «Ижевская государственная сельскохозяйственная академия», г. Ижевск, Российская Федерация

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования (ФГБОУ ВО) «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

***Государственное унитарное предприятие Удмуртской Республики «Рыбхоз «Пихтовка», Удмуртская Республика, Воткинский район, село Пихтовка, Российская Федерация

*Изучены гематологические показатели двухлетков карпа (Cyprinus carpio) при воздействии комбинированного стресса. Установлены количественные и качественные отклонения состава крови в опытной группе по сравнению с контрольной. У двухлетков карпа на фоне стрессовых факторов были выявлены нейтрофилия, моноцитоз и лимфоцитопения, а также повышенное содержание молодых форм эритроцитов. **Ключевые слова:** карп, стресс, гематологические показатели, эритроциты, нейтрофилы, гетерофилы, лимфоциты.*

EFFECT OF COMBINED STRESS ON HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF CARP (CYPRINUS CARPIO)

*Krylova T.G., **Safronov D.I., ***Krylov G.S., *Dokuchaev P.V.

*Izhevsk State Agricultural Academy, Izhevsk, Russian Federation

**Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine, Saint Petersburg, Russian Federation

***State Unitary Enterprise of the Udmurt Republic "Pikhtovka" Fishery, Udmurt Republic, Воткинск district, Pikhtovka village, Russian Federation

*The hematological parameters of the two-year-old carp (Cyprinus carpio) under combined stressed were studied. The quantitative and qualitative deviations in the blood composition were found in the experimental group against the control group. Neutrophilia, monocytosis and lymphocytopenia were identified in the two-year-old carp as well as an increased number of young forms of erythrocytes against the background of stress factors; **Keywords:** carp, stress, hematological parameters, erythrocytes, neutrophils, heterophiles, lymphocytes.*

Введение. В настоящее время аквакультура – это быстроразвивающаяся, многоцелевая отрасль, направленная на укрепление продовольственной безопасности страны. Важная роль в решении данного вопроса принадлежит интенсивному прудовому рыбоводству, методы которого позволяют увеличить продуктивность водоемов. Но зачастую интенсификация производства приводит к острым и хроническим стрессам гидробионтов, оказывающим негативное влияние на их физиологические процессы: скорость роста, воспроизводимость, состояние иммунной системы и обмена веществ. Особенно этот фактор приобретает приоритетное значение при возникновении паразитарных и инфекционных заболеваний [2].

Стресс обусловленная реакция рыб сложна и включает в себя серию поведенческих, физиологических ответов, являющихся компенсаторными и/или адаптивными. В связи с этим, базовые знания гематологии представляют собой ценное руководство по оценке состояния, обитающих в воде организмов и широко используются как индикатор стресса. Однако эффект стресса варьирует в зависимости от вида рыб, продолжительности и масштабов стрессора. Изучение влияния стресса на физиологические показатели, а также его идентификация по-прежнему остается актуальной темой [4, 5].

В отечественной и зарубежной литературе подробно изучено воздействие различных видов стресса на промысловых и диких рыб. Большая часть работ посвящена исследованиям биохимических показателей крови: изменениям концентрации кортизола, глюкозы, печеночных ферментов [6, 7]. В ряде статей представлено влияние стресса на некоторые гематологические параметры (общее число лейкоцитов и эритроцитов) [6, 8, 9]. Но подробного описания изменений показателей крови, включая лейкоцитарную формулу и морфологию клеток, в литературных источниках не опубликовано.

Целью данной работы явилось изучение влияния острого комбинированного стресса на гематологические показатели карпа (*Cyprinus carpio*).

Материалы и методы исследований. Исследование проводили на базе полносистемного прудового хозяйства ГУП УР «Рыбхоз «Пихтовка» Воткинского района Удмуртской Республики в летний период 2021 г. Методом случайной выборки отобрали 80 двухлетков карпа из выростного пруда № 3, которые были разделены на 2 группы по 40 особей: 1 группа – контрольная (не подвергалась

стрессу и оставалась в пруду), 2 группа – опытная (испытала комбинированный стресс: перевозка на автотранспортном средстве в течение 1,5 ч в емкости с водой при уплотненной посадке). Был проведен клинический осмотр рыбы с полным паразитологическим исследованием согласно общепринятым методикам. Ни одну из групп не подвергали анестезии перед забором крови [1].

От каждой особи отбирали кровь в объеме 2 мл путем пункции сердца в пробирки Vacutainer® с литий гепарином и доставляли в лабораторию для клинического и биохимического исследования. Из отобранной крови готовили тонкие мазки, которые окрашивали по Романовскому-Гимза. Подсчет общего количества эритроцитов проводили в счетной камере с сеткой Горяева согласно общепринятой методике [3]. Подсчет общего количества лейкоцитов, а также выведение лейкоцитарной формулы, производили в мазке крови. Для измерения гематокрита использовали гематокритные капилляры. Концентрацию гемоглобина определяли спектрофотометрическим методом на аппарате HumaLyzer Primus. Эритроцитарные индексы были рассчитаны по стандартным формулам. Препараты изучали на микроскопе МИКМЕД – 5, фото были сделаны на камеру с разрешением 15 мпикс.

Полученные данные подвергали статистической обработке. Статистическую значимость различий между группами в показателях абсолютного содержания лейкоцитов, эритроцитов в периферической крови, а также размерно-весовые характеристики оценивали с применением критерия Тьюки. Значения $p < 0,05$ были признаны статистически значимыми, и все данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

Результаты исследований. Все исследуемые объекты были клинически здоровы. Плотность посадки двухлетков в пруду составляла 3500 шт./га. Средние значения размерно-весовых характеристик карпа (длина тела, высота тела, масса) среди исследуемых групп существенно не различались (таблица 1).

Таблица 1 – Размерно-весовые характеристики двухлетков карпа

Группа	Масса тела, г	Длина туловища, мм	Высота тела, мм
1 группа (контроль)	720,81 \pm 66,53	282,03 \pm 9,63	99,03 \pm 3,35
2 группа (опыт)	750,00 \pm 19,91	313,10 \pm 2,62*	104,12 \pm 1,31

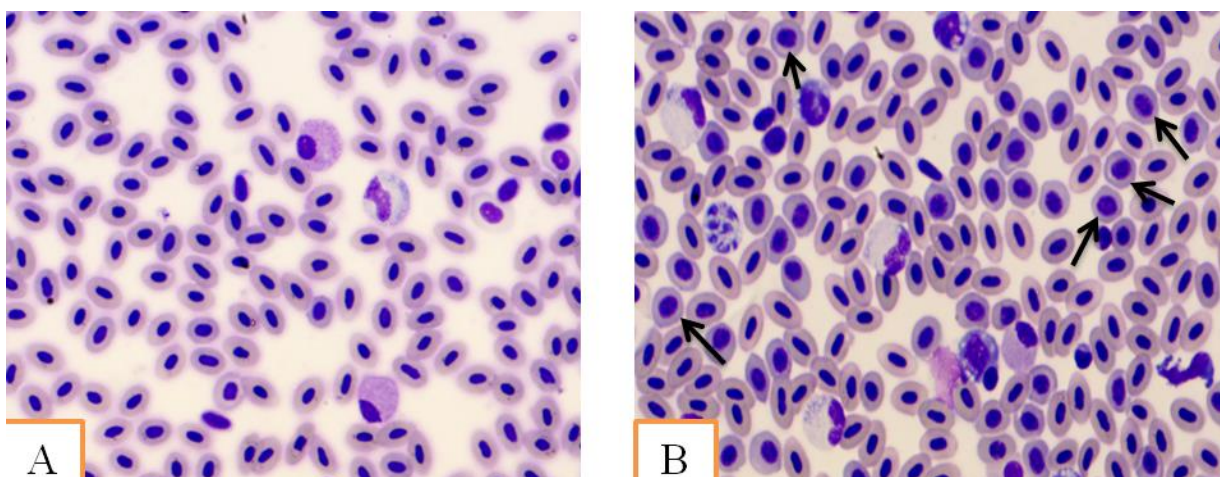
Примечание: * - по критерию Тьюки значения достоверно отличаются от животных группы № 1 ($p < 0,05$).

В таблице 2 представлены результаты клинического анализа крови двухлетков карпа в условиях стресса (2 группа) и без него (1 группа). Можно отметить, что общее количество эритроцитов в обеих группах существенно не изменялось. Но у рыб, подвергшихся стрессу, в мазках крови обнаруживалось высокое содержание молодых, незрелых форм эритроцитов – полихроматофильных нормоцитов (рисунок 1).

Таблица 2 – Гематологические показатели двухлетков карпа

Группа	RBC $\times 10^6/\mu\text{l}$	WBC $\times 10^3/\mu\text{l}$	HCT, %	Hb, г/л	MCV, фл	MCH, пг	MCHC, г/дл
1 группа (контроль)	1,45 \pm 0,10	35,90 \pm 3,05	36,51 \pm 2,13	112,41 \pm 6,53	20,61 \pm 10,67	64,96 \pm 33,51	31,43 \pm 0,15
2 группа (опыт)	1,43 \pm 0,09	26,12 \pm 1,91*	30,02 \pm 1,42*	94,23 \pm 4,81*	25,51 \pm 7,47*	78,61 \pm 23,55*	30,79 \pm 1,68*

Примечание: * - по критерию Тьюки значения достоверно отличаются от животных группы № 1 ($p < 0,05$).



А – 1 группа (контроль), В – 2 группа (опыт): полихроматофильный нормоцит (стрелки) (окраска по Романовскому-Гимза, ув. 400х)

Рисунок 1 – Мазки крови двухлетков карпа

Наряду с качественными изменениями красных клеток крови концентрация гематокрита и гемоглобина уменьшалась в опытной группе. Значения среднего объема эритроцитов (МСV) и среднего содержания гемоглобина (МСН) увеличивались, а средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах (МСНС) уменьшалась. Данные отклонения в опытной группе связываем с появлением значительного количества полихроматофильных нормоцитов в периферической крови, которые имеют больший объем клетки и пониженное содержание гемоглобина по сравнению со зрелыми эритроцитами. Выход этих клеток в большом количестве происходит при сокращении гладких мышц и эластических волокон капсулы селезенки на фоне стресса.

Также в опытной группе общее количество лейкоцитов достоверно уменьшилось по сравнению с контролем. В норме у большинства рыб лимфоцитарный профиль крови. Такая же тенденция отмечалась в контрольной группе, где наряду с лимфоцитами встречались единичные гранулоциты (нейтрофилы, гетерофилы) и моноциты (таблица 3).

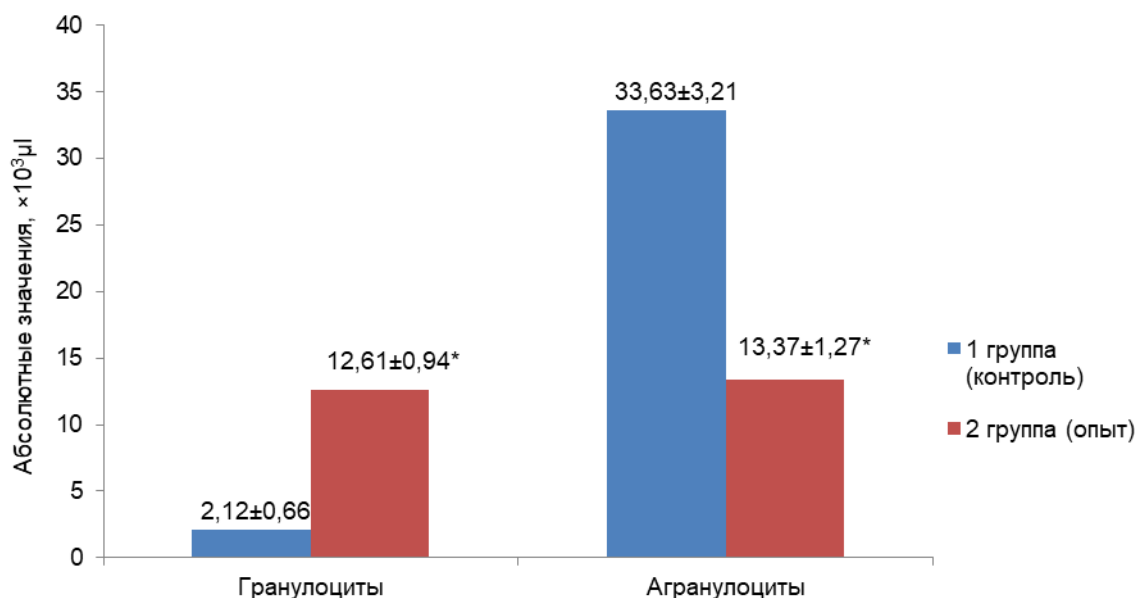
Таблица 3 – Лейкоцитарная формула двухлетков карпа

Группа	Нейтрофилы		Гетерофилы		Моноциты		Лимфоциты	
	%	$\times 10^3 \mu\text{l}$	%	$\times 10^3 \mu\text{l}$	%	$\times 10^3 \mu\text{l}$	%	$\times 10^3 \mu\text{l}$
1 группа (контроль)	6,42	1,71 \pm 0,4	1,63	0,44 \pm 0,11	2,62	0,81 \pm 0,25	91,32	32,81 \pm 3,19
2 группа (опыт)	39,11	10,12 \pm 0,82*	9,91	2,53 \pm 0,31*	15,65	4,12 \pm 0,55*	35,35	9,33 \pm 1,07*

Примечание. * - по критерию Тьюки значения достоверно отличаются от животных группы № 1 ($p < 0,05$).

В опытной группе все оцениваемые клетки иммунной системы имели выраженные отклонения по сравнению с контролем. На фоне стресса возникла нейтрофилия, лимфоцитопения. Абсолютное количество моноцитов также было повышено по сравнению с контрольной группой.

Нейтрофилия возникала за счет абсолютного увеличения количества нейтрофилов и гетерофилов. Суммарное значение гранулоцитов во 2 группе стало выше в 6 раз, агранулоциты уменьшились в 2,5 раза, по сравнению с 1 группой (рисунок 2).



Примечание. * - по критерию Тьюки значения достоверно отличаются от животных группы № 1 ($p < 0,05$)

Рисунок 2 – Количество гранулоцитов и агранулоцитов двухлетков карпа

Появление лимфоцитопении и нейтрофилии мы связываем со вторичными последствиями в период стресса у рыб. Высвобождающиеся кортизол и катехоламины оказывают иммуносупрессивное действие на лимфоциты. Гранулоциты, моноциты могут увеличиваться в качестве меры предосторожности или в ответ на стрессовые стимулы. Кроме того, в некоторых источниках литературы сообщалось о том, что при воздействии катехоламина увеличивается частота сердечных сокращений и артериальное давление, высвобождая большее количество лейкоцитов в кровоток во время стресса.

Остальные измеренные гематологические показатели существенно не отличались.

Заключение. Гематологические показатели могут служить индикатором состояния организма рыб, поскольку кровь чувствительно реагирует на различные изменения окружающей среды. В опытной группе на фоне комбинированного стресса возникает нейтрофилия, моноцитоз, лимфоцитопения. Также в периферической крови в большом количестве появляются полихроматофильные нормоциты.

Conclusion. Hematological parameters can serve as an indicator of the state of fish organism, since the blood reacts sensitively to various changes in the environment. In the experimental group, neutrophilia, monocytosis, lymphocytopenia occurs against the background of combined stress. Also, polychromatophilic normocytes appear in large numbers in the peripheral blood.

Список литературы. 1. Грищенко, Л. И. *Болезни рыб и основы рыбоводства* / Л. И. Грищенко, М. Ш. Акбаев, Г. В. Васильков. – М.: Колос, 1999. – 456 с. 2. *Влияние паразитозов на процесс выращивания карпа по ресурсосберегающей технологии в первой зоне прудового рыбоводства* / Т. Г. Крылова [и др.] // *Современные проблемы науки и образования*. – 2016. – № 1. – С. 60–67. 3. Пищенко, Е. В. *Гематология пресноводной рыбы: учебное пособие* / Е. В. Пищенко. – Новосибирск: изд-во НГАУ, 2002. – 48 с. 4. *Hematological and clinical chemistry changes induced by acute stress during handling and capture of catfish (Ictalurus punctatus)* / G. Aguirre-Guzman [et al] // *Revista MVZ Cordoba*. – 2016. – № 21. – P. 5345–5354. 5. Küçükgül, A. *Acute stress response in common carp (Cyprinus carpio Linnaeus, 1758) of some stressing factors* / A. Küçükgül, A. Şahan // *Journal of Fisheries Sciences*. – 2008. – № 2. – P. 623–631. Doi: 10.3153/jfscm.2008026. 6. Refaey, M. M. *Transport Stress Changes Blood Biochemistry, Antioxidant Defense System, and Hepatic HSPs mRNA Expressions of Channel Catfish Ictalurus punctatus* / M. M. Refaey, D. Li // *Frontiers in Physiology*. – 2018. – № 9. – P. 1–11. Doi: 10.3389/fphys.2018.01628. 7. Sadoul, B. *Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes* / B. Sadoul, B. Geffroy // *Fish Biology*. – 2019. – 94. – P. 540–555. Doi: 10.1111/jfb.13904. 8. *The effect of transport on biochemical and haematological indices of common carp (Cyprinus carpio L.)* / R. Dobšikova [et al] // *Czech Journal of Animal Science*. – 2009. – № 54. – P. 510–518. 9. *The influence of acute handling stress on some blood parameters in cultured sea bream (Sparus aurata Linnaeus, 1758)* / F. Fazio [et al] // *Italian Journal of Food Safety*. – 2015. – № 4. – P. 4–6. Doi: 10.4081/ijfs.2015.4174.

References. 1. Grishchenko, L. I. *Bolezni ryb i osnovy rybovodstva* / L. I. Grishchenko, M. SH. Akbaev, G. V. Vasil'kov. – M.: Kolos, 1999. – 456 s. 2. *Vliyanie parazitozov na process vyrashchivaniya karpa po resursosberegayushchej*

*tehnologii v prvoj zone prudovogo rybovodstva / T. G. Krylova [i dr.] // Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. – 2016. – № 1. – S. 60–67. 3. Pishchenko, E. V. Gematologiya presnovodnoj ryby: uchebnoe posobie / E. V. Pishchenko. – Novosibirsk: izd-vo NGAU, 2002. – 48 s. 4. Hematological and clinical chemistry changes induced by acute stress during handling and capture of catfish (*Ictalurus punctatus*) / G. Aguirre-Guzman, V. Carvajal-de-la-Fuente, M. Neri-Coronado, [et al] // Revista MVZ Cordoba. – 2016. – № 21. – P. 5345–5354. 5. Küçükgül, A. Acute stress response in common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) of some stressing factors / A. Küçükgül, A. Şahan // Journal of Fisheries Sciences. – 2008. – № 2. – P. 623–631. Doi: 10.3153/jfscom.2008026. 6. Refaey, M. M. Transport Stress Changes Blood Biochemistry, Antioxidant Defense System, and Hepatic HSPs mRNA Expressions of Channel Catfish *Ictalurus punctatus* / M. M. Refaey, D. Li // Frontiers in Physiology. – 2018. – № 9. – P. 1–11. Doi: 10.3389/fphys.2018.01628. 7. Sadoul, B. Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes / B. Sadoul, B. Geffroy // Fish Biology. – 2019. – 94. – P. 540–555. Doi: 10.1111/jfb.13904. 8. The effect of transport on biochemical and haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.) / R. Dobšikova, Z. Svobodova, J. Blahova [et al] // Czech Journal of Animal Science. – 2009. – № 54. – P. 510–518. 9. The influence of acute handling stress on some blood parameters in cultured sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) / F. Fazio, V. Ferrantelli, G. Fortino [et al] // Italian Journal of Food Safety. – 2015. – № 4. – P. 4–6. Doi:10.4081/ijfs.2015.4174.*

Поступила в редакцию 03.11.2021.

DOI 10.52368/2078-0109-2021-57-4-82-86

УДК 57:579.64:636.084

ПРИМЕНЕНИЕ ЛАКТУЛОЗЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДСТВА ПРОБИОТИЧЕСКИХ КОРМОВЫХ ДОБАВОК

Явников Н.В. ORCID iD 0000-0002-6900-331X

ФГБОУ ВО «Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина», пос. Майский, Белгородская область, Российская Федерация

Одним из способов коррекции дисбиозов является применение препаратов на основе пробиотических штаммов микроорганизмов, а также пребиотиков. Целью работы было повышение эффективности совместного культивирования лакто- и бифидобактерий для разработки новых пробиотических кормовых добавок. Для этого был отработан состав питательной среды с различным уровнем лактулозы и определено оптимальное соотношение пробиотических штаммов при их совместном культивировании. Для создания бактериального консорциума, по результатам предыдущих исследований, нами отобраны штаммы *Bifidobacterium adolescentis* 17-11 β и штамм *Lactobacillus plantarum* 8 β как наиболее активные пробиотические культуры. Бифидобактерии культивировали в среде Блаурока (pH 6,5 \pm 0,1) при температуре 38,0 \pm 0,5 $^{\circ}$ C. Лактобактерии растворяли в питательной среде MRS-1 (pH 6,5 \pm 0,1) и восстанавливали при температуре 37,0 \pm 0,5 $^{\circ}$ C в течение 24 часов. Затем проводили два последовательных пассажа на средах MRS-2 (pH 6,3 \pm 0,1) и MRS-4 (pH 6,3 \pm 0,1). Совместное культивирование лактобактерий и бифидобактерий проводили в казеиново-дрожжевой среде. Исследования показали, что добавление лактулозы в питательную среду в количестве 1,0% и 1,5% позитивно сказывается на культуральных показателях пробиотических культур. При совместном культивировании лактобактерий *L. plantarum* 8 β и бифидобактерий *B. adolescentis* 17-11 β наибольший биологический бактериальный консорциум проявляется при соотношении лакто-и бифидобактерий 1:2. В результате проведенных исследований установлено, что культивирование данных штаммов в условиях *in vitro*, с добавлением в качестве пребиотического компонента 1,5% лактулозы, позволяет получить наибольшие показатели роста и уровень накопления бактериальной массы. **Ключевые слова:** бифидобактерии, лактобактерии, концентрация, колониеобразующие единицы, температура, pH.

USE OF LACTULOSE FOR INCREASE IN THE EFFICIENCY OF PRODUCTION OF PROBIOTIC FEED ADDITIVES

Yavnikov N.V.

Belgorod State Agricultural University named after V. Gorin, Mayskiy village, Belgorod region, Russian Federation

One of the ways to correct dysbiosis is the use of preparations based on probiotic strains of microorganisms as well as prebiotics. The aim was to increase the effectiveness of joint cultivation of lacto and bifidobacteria for the development of new probiotic feed additives. For this purpose, the composition of a nutrient medium with different levels of lactulose was designed, and the optimal ratio of probiotic strains was determined for joint cultivation. To create a bacterial consortium, on the basis of previous investigation, the strain of *Bifidobacterium adolescentis* 17-11 β and the strain of *Lactobacillus plantarum* 8 β were selected as the most active probiotic cultures. Bifidobacteria were cultivated in the Blaurock medium (pH 6.5 \pm 0.1) at a temperature of 38.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C. Lactobacteria were dissolved in a nutrient medium MRS-1 (pH 6.5 \pm 0.1) having been recovered at a temperature of 37.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C for 24 hours. Then two successive passages followed, on the MRS-2 media (pH 6.3 \pm 0.1) and MRS-4 (pH 6.3 \pm 0.1). The joint cultivation of lactobacteria and bifidobacteria was performed in the casein-yeast medium. Studies have shown that the addition of lactulose to a nutrient in the amount of 1.0% and 1.5% has a positive effect on the cultural traits of probiotic cultures. In the joint cultivation of lactobacteria *L. plantarum* 8 β and bifidobacteria *B. adolescentis* 17-11 β , the largest biological bacterial consortium manifests at a ratio of lacto-bifidobacterium 1:2. As a result of the conducted research, it has been found that the