

Научная статья

УДК 639.3.07

DOI: 10.26428/1606-9919-2022-202-172-186



**РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РАБОТ ПО ПОДАВЛЕНИЮ
РОСТА МИКРОМИЦЕТОВ СЕМ. SAPROLEGNIASEAE
НА ЯЙЦЕВЫХ ОБОЛОЧКАХ ЭМБРИОНОВ РУССКОГО ОСЕТРА
И БЕЛУГИ В ПЕРИОД ИНКУБАЦИИ**

В.В. Барина¹, А.А. Бахарева², М.Е. Перунова^{1*}

¹ Волжско-Каспийский филиал ВНИРО (КаспНИРХ),
414056, г. Астрахань, ул. Савушкина, 1;

² Астраханский государственный технический университет,
414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 16

Аннотация. Изложены результаты экспериментальных исследований по подавлению роста сапролегниевых микромицетов на яйцевых оболочках эмбрионов русского осетра и белуги в период инкубации. В ходе работы исследовали влияние нескольких химических веществ (хлорид натрия, пероксид водорода), лекарственного препарата «Йодинол», в том числе фиолетовый «К», ранее применяемый в рыбоводной практике и в настоящее время не разрешенный к применению, на показатели выживаемости, заражения, количества аномалий у эмбрионов. Анализ полученных результатов показал, что наиболее эффективными для подавления роста сапролегниевых микромицетов были 0,05 %-ный раствор пероксида водорода (экспозиция 10 мин) и 0,90 %-ный раствор хлорида натрия (экспозиция 3 мин). Данные растворы максимально ингибировали рост микромицетов, оказывая минимальное воздействие на эмбриональное и постэмбриональное развитие русского осетра и белуги.

Ключевые слова: сапролегниевые микромицеты, лекарственные средства, осетровые виды рыб, эмбрионы, выживаемость, заражение, аномалии, вылупление, предличинки.

Для цитирования: Барина В.В., Бахарева А.А., Перунова М.Е. Результаты экспериментальных работ по подавлению роста микромицетов сем. Saprolegniaceae на яйцевых оболочках эмбрионов русского осетра и белуги в период инкубации // Изв. ТИНРО. — 2022. — Т. 202, вып. 1. — С. 172–186. DOI: 10.26428/1606-9919-2022-202-172-186.

* Барина Виктория Владимировна, начальник центра аквакультуры, batina87@bk.ru;
Бахарева Анна Александровна, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, заведующая кафедрой, post@astu.org;
Перунова Маргарита Евгеньевна, магистр, ведущий специалист, kaspnirh@vniro.ru, ORCID 0000-0002-7769-0105.

© Барина В.В., Бахарева А.А., Перунова М.Е., 2022

Original article

Results of experimental studies on suppressing the growth of micromycetes (fam. Saprolegniaceae) on egg membranes of embryos of russian sturgeon and beluga in the incubation period

Victoria V. Barinova¹, Anna A. Bahareva², Margarita E. Perunova¹

¹ aquaculture center supervisor, Volga-Caspian branch of VNIRO (CaspNIRKh), 1, Savushkina St., Astrakhan, 414056, Russia, batina87@bk.ru; leading specialist, Volga-Caspian branch of VNIRO (CaspNIRKh), 1, Savushkina St., Astrakhan, 414056, Russia, kaspnirh@vniro.ru

² D.Agr., professor, head of department, Astrakhan State Technical University, 16, Tatishcheva St., Astrakhan, 414056, Russia, post@astu.org

Abstract. For successful development of aquaculture, fish farms have to be provided by effective means and methods to prevent and treat diseases of fish. Many drugs are limited for using in aquaculture, so the influence of each particular drug or chemical substance on the fish development should be investigated carefully. Effectiveness of chemical solutions for suppressing the growth of saprolegnium micromycetes on egg membranes and other tissues of sturgeon embryos during their incubation is evaluated. The experiment was conducted at the research and experimental base BIOS belonged to the Russian Res. Inst. of Fisheries and Oceanography, Volga-Caspian branch (CaspNIRKh) located in Astrakhan and included a series of observations on incubation of sturgeon eggs processed with solutions of some chemicals (Purple-K, sodium chloride, hydrogen peroxide) or drug (Iodinol). Two sturgeon species (russian sturgeon and beluga) were tested with measuring biological parameters of their embryos, as survival rate, contamination by saprolegnia micromycetes, number of abnormally developing embryos, and number of obtained prelarvae. The processing with 0.05 % solution of hydrogen peroxide (10 min. exposure) and with 0.90 % solution of sodium chloride (3 min. exposure) showed the best results: these solutions made the lowest negative effect on the embryos survival but reduced significantly infection of incubated eggs.

Keywords: saprolegnium micromycete, drug, sturgeon, embryo, survival, infection, abnormality, hatching, prolarva.

For citation: Barinova V.V., Bahareva A.A., Perunova M.E. Results of experimental studies on suppressing the growth of micromycetes (fam. Saprolegniaceae) on egg membranes of embryos of russian sturgeon and beluga in the incubation period, *Izv. Tikhookean. Nauchno-Issled. Inst. Rybn. Khoz. Okeanogr.*, 2022, vol. 202, no. 1, pp. 172–186. (In Russ.). DOI: 10.26428/1606-9919-2022-202-172-186.

Введение

Одним из факторов, влияющих на темпы развития современной аквакультуры, является обеспечение рыбоводных хозяйств эффективными средствами и методами профилактики и лечения заболеваний объектов выращивания, которые могут возникать на предприятиях в условиях высокой интенсификации производственных процессов. При этом требования к качеству продукции аквакультуры с каждым годом становятся все выше, что влечет за собой необходимость использования эффективных, экологически-безопасных и доступных средств, методов лечения и профилактики заболеваний.

В настоящее время существует проблема дефицита лекарственных препаратов, разрешенных к применению в отечественной аквакультуре, решение которой достигается комплексными исследовательскими работами, обосновывающими применение того или иного лекарственного средства.

Реализация технологий аквакультуры, как правило, сопровождается различными видами патологий рыб. В индустриальном рыбоводстве широко распространены алиментарные, бактериальные и микозные заболевания, реже — паразитарные. Одними из самых распространенных заболеваний являются сапролегниозы, вызываемые сапролегниевыми микромицетами, относящимися к царству Chromista (Stramenopila), отделу Oomycota, классу Oomycetes, порядку Saprolegniales, семейству Saprolegniaceae [Гарибова, Лекомцева, 2005]. Сапролегниозы вызывают виды разных родов, самые рас-

пространенные из которых — *Achlya* и *Saprolegnia*. Сапролегниевые микромицеты не выделяют токсины, они способны лизировать покровы, постепенно проникая в ткани хозяина и разрушая их. Некоторые исследователи считают, что смерть организма, пораженного сапролегниозом, происходит в результате нарушения водного баланса в связи с разрушением структуры тканей [Переведенцева, 2009].

В ходе производства продукции аквакультуры складываются благоприятные условия для развития сапролегниевых микромицетов. Высокие плотности посадки выращиваемых объектов, снижение концентрации кислорода, увеличение содержания биогенного азота вследствие увеличения количества погибающей икры или количества продуктов метаболизма рыб, постоянный хэндлинг создают предпосылки для развития микозной инфекции.

Таким образом, интенсификация производственных процессов в условиях замкнутого водоснабжения требует постоянного контроля за эпизоотической ситуацией на рыбоводных хозяйствах, а также разработки системы лечебно-профилактических мероприятий.

В настоящее время вопрос восстановления естественной Волжско-Каспийской популяции данных видов является актуальным и требует комплексного подхода к его решению, этот факт обусловил выбор объектов исследования. Кроме того, активному развитию товарного осетроводства препятствует отсутствие разрешенных для применения лекарственных средств профилактики и лечения сапролегниоза, при котором массовая гибель особей на ранних этапах эмбриогенеза является одной из основных экономических потерь предприятия.

Цель исследований заключалась в оценке эффективности применения растворов различных химических веществ для подавления роста сапролегниевых микромицетов на яйцевых оболочках и тканях эмбрионов осетровых видов рыб в процессе инкубации.

Материалы и методы

Экспериментальные работы по оценке степени влияния растворов химических веществ (фиолетовый «К», хлорид натрия, пероксид водорода) и лекарственного препарата «Йодинол» на развитие эмбрионов осетровых рыб проводили на базе научно-экспериментального комплекса аквакультуры «БИОС» Волжско-Каспийского филиала ВНИРО (КаспНИРХ) (НЭКА «БИОС»). Объектом исследований являлись оплодотворенные ооциты и развивающиеся эмбрионы русского осетра и белуги. Экспериментальные работы проводили в два этапа. На первом этапе инкубировали эмбрионов русского осетра, на втором — эмбрионов белуги.

Инкубация оплодотворенных ооцитов проводилась в инкубационных аппаратах типа «Осетр» в условиях замкнутого водоснабжения при средних значениях рН $8,5 \pm 0,1$ и температуре воды $15,7 \pm 0,9$ °С в течение семи суток. Обработку экспериментальными растворами осуществляли методом кратковременных лечебных ванн [Рахконен и др., 2012]. При инкубации эмбрионов русского осетра обработку осуществляли однократно на стадии нейруляции (21–22-я стадии развития) [Ларцева и др., 2017], так как заражение эмбрионов сапролегниевыми микромицетами регистрировали только с 21-й стадии развития. Во время инкубации белуги заражение отмечали так же, как и у русского осетра, на этапе нейруляции, но обработку во время эмбрионального развития проводили на более поздних стадиях, чем у русского осетра, до стадии биения сердечной трубки (до 29-й стадии развития) — на 21–22 и 27–28-й стадиях развития [Детлаф, Гинзбург, 1954; Ларцева и др., 2017], так как заражение эмбрионов белуги регистрировали до вылупления свободных эмбрионов.

Для оценки степени воздействия экспериментальных растворов на развитие эмбрионов использовали рыбоводно-биологические показатели: количество оплодотворенных ооцитов, количество выживших эмбрионов и вылупившихся предличинок, количество эмбрионов, зараженных микромицетами сем. *Saprolegniaceae*, подсчет

которых осуществляли стандартными методами*, заключающимися в выявлении количества оплодотворенных, выживших или зараженных эмбрионов в пробе из 300 икринок. Оплодотворение определяют на стадии 4 бластомеров — все икринки, которые на данной стадии имеют 4 клетки, считаются развивающимися. Выживаемость эмбрионов определяли на разных стадиях, в соответствии с типичностью эмбрионального развития для определенной стадии. При подсчете зараженных икринок в пробе подсчитывали икринки, пораженные сапролегниевыми микромицетами. Количество аномально развивающихся особей подсчитывали так же, как и вышеперечисленные показатели, при этом для каждой стадии развития регистрировали разные виды аномалии [Атлас нарушений..., 2004]. Показатели определяли с использованием микроскопа Биомед МС-1 Стерео. Количество вылупившихся предличинок определяли весовым методом*. Результаты подвергали статистической обработке с использованием программы Microsoft Excel.

В соответствии с биотехническими нормативами [http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_188208/2ff7a8c72de3994f30496a0ccbb1ddafdad518/] оплодотворяемость икры белуги должна быть не менее 80 %, русского осетра — 80 %, количество выживших эмбрионов белуги — 70 %, русского осетра — 70 %. Условно показатель выживаемости по окончании инкубации был принят для характеристики количества полученных предличинок белуги и стерляди на 36-й стадии развития. Показатель количества развивающихся эмбрионов необходим для выявления динамики их развития в ходе инкубации. Количество аномально развивающихся эмбрионов не нормируется, но в соответствии с данными Т.А. Детлаф и А.С. Гинзбург [1954] количество аномально развивающихся эмбрионов не должно превышать 14 % при использовании качественных половых продуктов. Показатель заражения инкубируемой икры сапролегниевыми микромицетами в период инкубации может достигать 100 % при использовании половых продуктов низкого качества, несоблюдении условий инкубации и т.д. Поэтому показатель заражения сравнивали между контрольными и опытными группами.

Определение эффективности препаратов для подавления роста сапролегниевых микромицетов проводили в экспериментальных группах в двукратной повторности. В контрольном варианте инкубировали ооциты без обработки лекарственными препаратами, в опытных вариантах ооциты обрабатывали растворами химических веществ с различной концентрацией (см. таблицу).

Для проведения исследований были использованы растворы химических веществ: фиолетовый «К», пероксид водорода, хлорид натрия и лекарственного препарата «Йодиол».

Фиолетовый «К» — это органический основной анилиновый краситель, лейкооснование [Вишторская и др., 2020]. Долгое время его использовали в аквакультуре для борьбы с сапролегниозами и бактериальными заболеваниями. Однако в настоящее время данное химическое вещество не разрешено к применению в рыбоводстве, в связи с тем, что была выявлена его способность аккумулироваться в организме рыб и проявлять канцерогенные свойства. В ходе эксперимента был использован раствор концентрацией 0,7 % с экспозицией 20 мин [Ларцева и др., 2017]. Данный раствор был взят для сравнения эффективности применения растворов пероксида водорода, хлорида натрия и «Йодиола» с эффективностью применения фиолетового «К».

Хлорид натрия — натриевая соль соляной кислоты. В быту называется поваренной солью [Большая советская энциклопедия, 1974]. В рыбоводстве применяют для снижения содержания биогенов в системах с установками замкнутого водоснабжения. Для обработки эмбрионов русского осетра и белуги использовали 0,9 %-ный раствор с экспозицией 3 мин, концентрация которого была выбрана по результатам предыдущих работ [Баринова и др., 2020а–в].

* Сборник инструкций и нормативно-методических указаний по промышленному разведению осетровых рыб в Каспийском и Азовском бассейнах. М.: ВНИРО, 1986. 271 с.

Схема экспериментальных работ
Scheme of experiment

№ этапа	Наименование вида	№ опытной группы	№ группы в соответствии с графиками	Химическое вещество	Концентрация растворов, %	Экспозиция, мин
I	Русский осетр (РО)	1	1	Контроль	0	0
		2				
		3	2	Фиолетовый «К»	0,70	20
		4				
		5	3	Хлорид натрия	0,90	3
		6				
		7	4	«Йодинок»	0,01	1
		8				
		9	5	Пероксид водорода	0,05	10
		10				
II	Белуга (БГ)	1	1	Контроль	0	0
		2		Контроль	0	0
		3	2	Фиолетовый «К»	0,70	20
		4				
		5	3	Хлорид натрия	0,90	3
		6				
		7	4	«Йодинок»	0,01	1
		8				
		9	5	Пероксид водорода	0,05	10
		10				

Пероксид водорода — представитель пероксидов. Являясь сильным окислителем, он обладает бактерицидными свойствами. В Европе используется для обработки икры форели [Рахконен и др., 2012]. Эмбрионы русского осетра и белуги обрабатывали 0,05 %-ным раствором с экспозицией 10 мин. В ходе экспериментальных работ, проведенных ранее, выяснилось, что снижение концентрации до 0,05 % с увеличением длительности воздействия данного раствора до 10 мин приводит к подавлению роста и развития сапролениевых микромицетов [Баринаова и др., 2020б].

«Йодинок» — препарат, в состав которого входит кристаллический йод и йодистый калий. Йодистый калий — более стабильное соединение, чем другие соединения йода (йодистый натрий, йодистый кальций) [Шалак, Гончарик, 2017]. При проведении эксперимента использовали 0,01 %-ный раствор с экспозицией 1 мин.

Растворы фиолетового «К», пероксида водорода, «Йодинок» готовили путем разбавления маточного раствора до необходимой концентрации, раствор хлорида натрия — путем растворения поваренной соли в воде. Поскольку экспериментальные работы проводили в производственных условиях, для приготовления растворов использовали ту же воду, что и для инкубации. При этом вода, поступающая в инкубационную стойку, проходила механическую, биологическую и ультрафиолетовую очистку.

Гистологический анализ развивающихся эмбрионов проводили в лаборатории молекулярной генетики и физиологии Волжско-Каспийского филиала ВНИРО (КаспНИРХ). Были отобраны пробы эмбрионов (по 10 эмбрионов в яцевых оболочках в одной пробе) после оплодотворения на разных стадиях развития.

Гистологические исследования проводили стандартными гистологическими методами [Ромейс, 1954] с фиксацией в жидкости Буэна и дальнейшей проводкой через серию спиртов возрастающей крепости и заливкой в парафин. При изготовлении гистологических препаратов использовали окраску гематоксилин-эозином и кислым фуксином с доокраской по Маллори. Просмотр препаратов велся под микроскопом

OLYMPUS BX40. Фотографии изготовили с помощью цифровой камеры-окуляра для микроскопа ДСМ500.

Результаты и их обсуждение

Одним из основных показателей, характеризующих степень влияния экспериментальных растворов на эмбриональное развитие, является выживаемость эмбрионов (рис. 1).

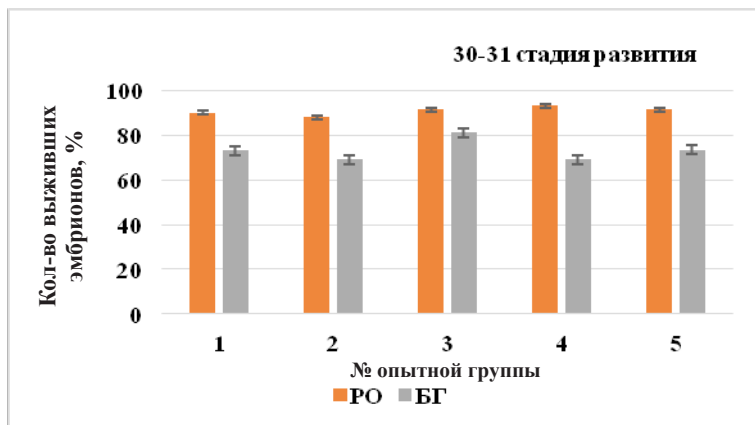


Рис. 1. Количество выживших эмбрионов русского осетра (PO) и белуги (БГ) в контрольной и опытных группах

Fig. 1. Number of survived embryos of russian sturgeon (PO) and beluga (БГ) in the control and experimental groups

В результате первого этапа эксперимента выживаемость эмбрионов русского осетра на 30–31-й стадиях развития после однократной обработки была выше нормативных значений развития [http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_188208/2ff7a8c72de3994f30496a0ccb1ddafdaddf518/] как в опытных, так и в контрольной группах. Максимальные значения показателя выживаемости регистрировали в вариантах опыта с применением раствора «Йодинола» (93,0), а также раствора хлорида натрия (92,5 ± 2,5) и пероксида водорода (91,5 ± 3,5). Минимальная выживаемость отмечена у эмбрионов, прошедших обработку раствором препарата фиолетового «К» (88,0).

При проведении второго этапа экспериментальных работ с эмбрионами белуги их выживаемость на 30–31-й стадиях развития была на уровне или выше нормативных значений развития (выживаемости) [http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_188208/2ff7a8c72de3994f30496a0ccb1ddafdaddf518/]. Максимальные значения выживаемости отмечены в опытных группах с применением хлорида натрия (81,0 ± 1,0) и пероксида водорода (73,5 ± 2,5). Значения показателя в этих группах были выше значения контрольной (73,0). Минимальное количество выживших эмбрионов регистрировали в опытных группах с использованием растворов фиолетового «К» (69,0) и «Йодинола» (69,0 ± 6,0).

В ходе эксперимента учитывали количество аномально развивающихся эмбрионов (рис. 2).

Учет количества аномально развивающихся эмбрионов русского осетра и белуги в контрольной и опытных группах проводили с целью определения возможного негативного действия экспериментальных растворов на развитие осетровых видов рыб. В результате проведенных исследований было установлено максимальное количество аномалий у эмбрионов русского осетра, подвергнувшихся обработке раствором фиолетового «К», — 2 %. В других вариантах опыта, т.е. при обработке ооцитов растворами хлорида натрия и пероксида водорода, этот показатель не превышал 1 % (рис. 2).

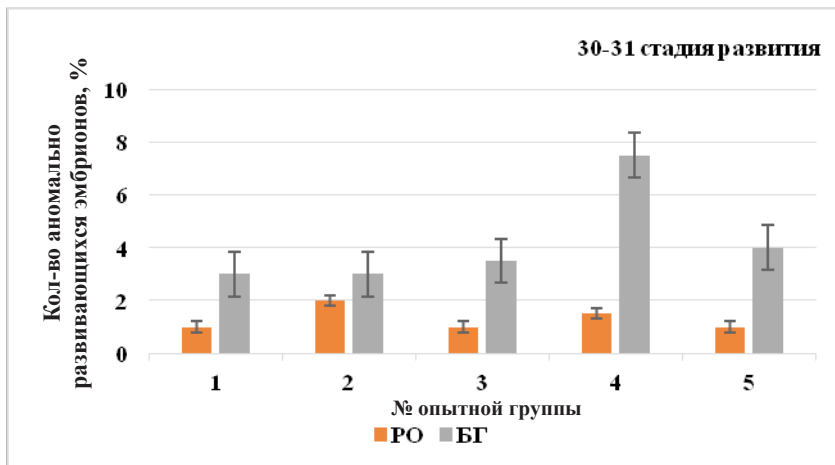


Рис. 2. Количество аномально развивающихся эмбрионов русского осетра (PO) и белуги (БГ) в контрольных и опытных группах

Fig. 2. Number of abnormally developing embryos of russian sturgeon (PO) and beluga (БГ) in the control and experimental groups

Анализ результатов исследований по оценке влияния препаратов фунгистатического действия на типичность развития эмбрионов белуги показал минимальную степень воздействия раствора фиолетового «К». Количество аномально развивающихся эмбрионов в этом варианте составило 3 %. Наибольшее воздействие на развитие зародышей белуги оказал раствор «Йодинола» — $7,5 \pm 1,5$ % особей с атипичным развитием. При обработке эмбрионов растворами хлорида натрия и пероксида водорода аномалии в развитии встречались соответственно у $3,5 \pm 0,5$ и $4,0 \pm 1,0$ % особей.

Следует отметить, что во всех опытных вариантах количество аномально развивающихся эмбрионов у белуги было выше, чем у русского осетра. Это объясняется меньшим коэффициентом генетического родства (от 1,8 до 2,5) самок и самцов русского осетра. Потомство белуги было получено от производителей, коэффициент генетического родства которых изменялся в пределах от 4,5 до 6,0. Данная проблема в настоящее время существует практически на каждом осетровом рыбноводном хозяйстве, осуществляющем свою деятельность за счет собственного маточного стада, без пополнения его особями из естественной популяции. Несомненно, это влияет на качество половых продуктов и, как следствие, может быть дополнительным фактором развития аномалий, гибели эмбрионов, приводящей к высокой зараженности сапролегниевыми микромицетами.

Основными видами аномалий эмбрионов русского осетра и белуги, которые регистрировали в пробах из контрольной и опытной групп при проведении экспериментальных работ, были формирование тела эмбриона при открытом бластопоре на стадии окончания гаструляции и начала нейруляции, искривление и укорочение тела эмбрионов, искривление хвостового отдела.

У русского осетра во всех вариантах опыта отмечено максимальное количество аномалий морфологического характера (искривление и укорочение тела эмбриона), которые в большей степени проявлялись у групп особей, обработанных растворами хлорида натрия, «Йодинола» и пероксида водорода (рис. 3). При этом общее количество аномалий в пробах данных опытных групп не превышало 1 % (см. рис. 2). Максимальное количество аномалий, связанных с формированием тела у эмбрионов русского осетра при открытом бластопоре, отмечено в экспериментальной группе с применением раствора хлорида натрия в качестве фунгистатического препарата.

У эмбрионов белуги во всех опытных группах отмечено максимальное количество аномалий, связанных с формированием тела у эмбрионов при открытом бластопоре,

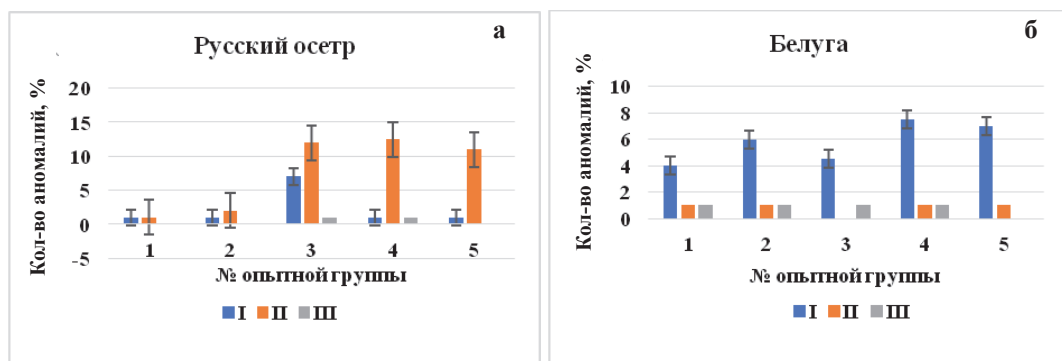


Рис. 3. Виды аномалий и их количество у эмбрионов русского осетра (а) и белуги (б) в соответствии с опытными группами: *I* — формирование тела эмбриона при открытом бластопоре; *II* — искривление и укорочение тела эмбрионов; *III* — искривление хвостового отдела

Fig. 3. Types of abnormalities and their number for embryos of russian sturgeon (а) and beluga (б), by experimental groups: *I* — embryo body with open blastopore; *II* — curved or shortened body of embryos; *III* — tail curvature

относительно значений контрольной группы (рис. 3). При этом наибольшее количество всех аномалий и, в частности, аномалий, связанной с закрытием бластопора, отмечали в опытной группе с использованием «Йодинола» (см. рис. 2).

Тем не менее частота встречаемости и разнообразие аномалий в опытных группах с эмбрионами русского осетра и белуги была выше, чем в контрольной, с преобладанием в экспериментах эмбрионов русского осетра.

В целом количество аномально развивающихся эмбрионов не превышало 14 % (рис. 3), что свидетельствует об удовлетворительном рыболовном качестве половых продуктов и незначительном влиянии окружающих факторов на эмбриональное развитие [Детлаф, Гинзбург, 1954].

Возможно, доминирование определенного вида аномалий связано не столько с обработкой эмбрионов растворами экспериментальных веществ (учитывая, что вещества, их концентрации и экспозиции были одинаковы и в опытах с русским осетром, и в опытах с белугой), сколько с видовой специфичностью и склонностью к развитию определенного отклонения в ходе эмбрионального развития.

Анализ результатов гистологических исследований икры белуги и русского осетра показал изменения в строении студенистой и желточной оболочках как в опыте, так и в контроле.

В контрольном варианте на 18-й стадии развития у некоторых эмбрионов белуги отмечено локальное разрушение студенистой оболочки, отслаивание оболочек от содержимого икринок, у эмбрионов русского осетра на 28–29-й стадиях развития регистрировали поперечные разрывы студенистой оболочки, а также неравномерное окрашивание (рис. 4).

В опытных группах с использованием 0,7 %-ного раствора фиолетового «К» у эмбрионов белуги отмечено отслаивание студенистой оболочки от желточных, у эмбрионов русского осетра регистрировали разрывы студенистой оболочки и ее неравномерное окрашивание (рис. 5). При использовании 0,9 %-ного раствора хлорида натрия отмечено локальное отслаивание оболочек от содержимого икринок, образование полостей в клеточной массе (рис. 6, а). У эмбрионов русского осетра регистрировали разрывы студенистой оболочки (рис. 6, б).

При обработке икры белуги 0,01 %-ным раствором «Йодинола» регистрировали отслаивание оболочек от содержимого икринок, расслаивание оболочек и их разрывы (рис. 7, а). У эмбрионов русского осетра, кроме отслаивания оболочек, отмечали неравномерное их окрашивание и отсутствие четких границ (рис. 7, б).

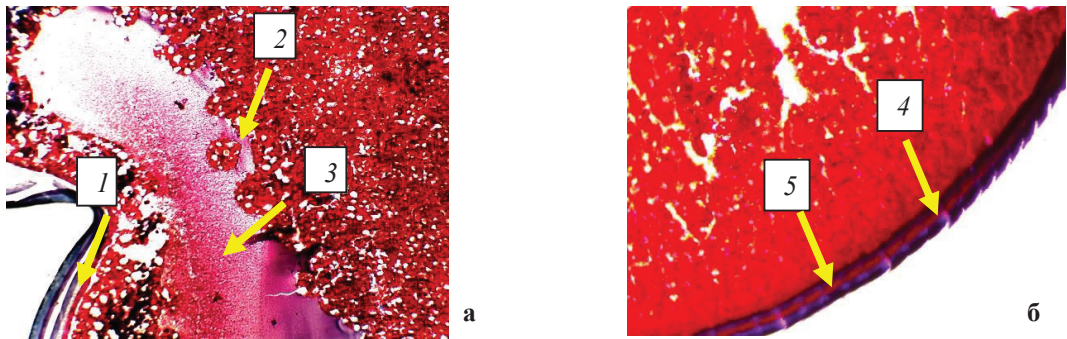


Рис. 4. Фрагменты оплодотворенных икринок белуги на 18–19-й стадиях развития (а) (ув. 10×10) и русского осетра на 28–29-й стадиях развития (б) (ув. 10×10) контрольной группы (окраска кислым фуксином с докраской по Маллори): 1 — расслаивание оболочек, отслаивание студенистой оболочки от содержимого икринок; 2 — зачаток хорды; 3 — целом; 4 — разрывы студенистой оболочки; 5 — неравномерное окрашивание оболочек

Fig. 4. Parts of inseminated eggs of beluga on the 18–19th stage of development (а) and eggs of russian sturgeon in the control group (Mallory staining) on the 28–29th stage of development (б): 1 — membranes delamination, gelatinous membrane separation; 2 — notochord at the bud stage; 3 — coelom; 4 — ruptures of gelatinous membrane; 5 — uneven coloration of membranes. Magnification 10×10

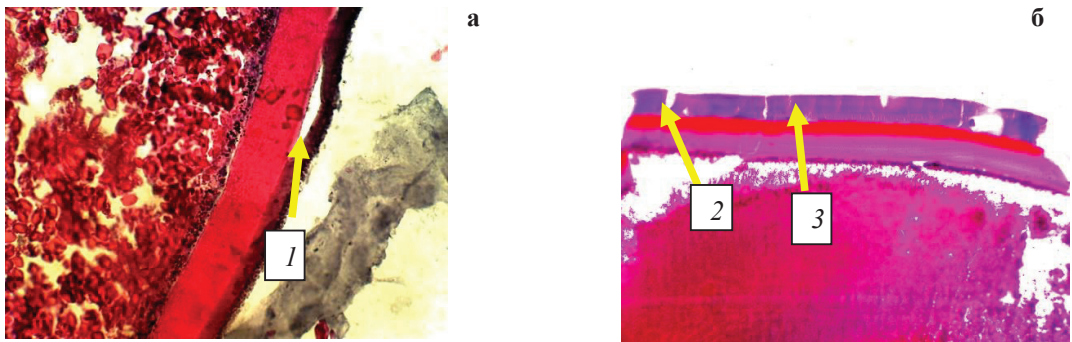


Рис. 5. Фрагменты оплодотворенных икринок белуги на 18–19-й стадиях развития (а) (ув. 22×40) и русского осетра на 28–29-й стадиях развития (б) (ув. 10×10), обработанных 0,7 %-ным раствором фиолетового «К» (окраска кислым фуксином с докраской по Маллори): 1 — отслаивание оболочек от содержимого икринок; 2 — разрывы в студенистой оболочке; 3 — неравномерно окрашенная студенистая оболочка

Fig. 5. Parts of inseminated eggs of beluga on the 18–19th stage of development (а, magn. 22×40) and eggs of russian sturgeon treated with Purple-K 0.7 % (Mallory staining) on the 28–29th stage of development (б, magn. 10×10): 1 — membrane separation from the egg content; 2 — ruptures in gelatinous membrane; 3 — uneven coloration of gelatinous membrane

Раствор пероксида водорода концентрацией 0,05 % также негативно воздействовал на состояние оболочек эмбрионов белуги, что выражалось в их отслаивании (рис. 8, а). У эмбрионов русского осетра регистрировали отслаивание желточной оболочки от содержимого икринок, неравномерную окраску и поперечные разрывы оболочек (рис. 8, б). Аналогичные патологии наблюдались в контрольном варианте.

Основным показателем эффективности применения растворов химических веществ является количество зараженных эмбрионов до и после обработок (рис. 9).

Низкий уровень зараженности эмбрионов наблюдали у русского осетра. Максимальное количество зараженных особей отмечено в контрольном варианте и при обработке раствором фиолетового «К» — 1 %. Единичные случаи заражения обнаруживались в остальных вариантах, где обработку ооцитов проводили растворами

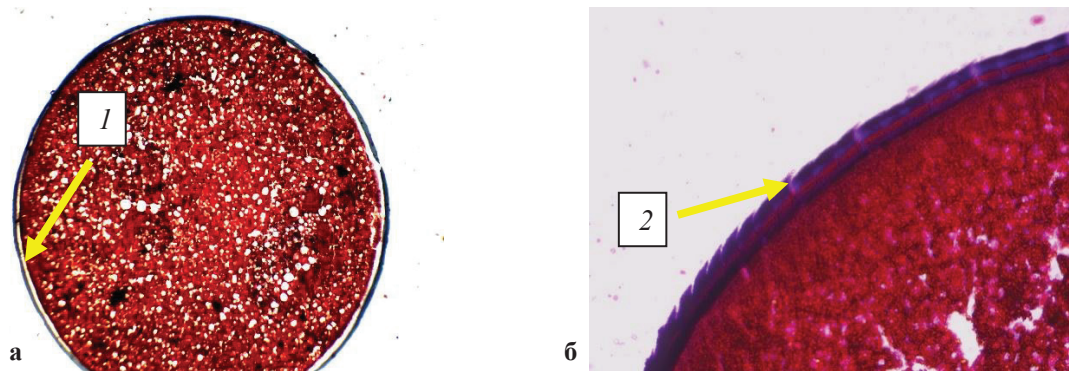


Рис. 6. Фрагменты оплодотворенных икринок белуги на 18–19-й стадиях развития (а) (ув. 4×10) и русского осетра на 28–29-й стадиях развития (б) (ув. 10×10), обработанных 0,9 %-ным раствором хлорида натрия (окраска кислым фуксином с докраской по Маллори): 1 — отслаивание оболочки от содержимого икринок; 2 — разрывы студенистой оболочки

Fig. 6. Parts of inseminated eggs of beluga on the 18–19th stage of development (а, magn. 4×10) and eggs of russian sturgeon treated with sodium chloride 0.9 % (Mallory staining) on the 28–29th stage of development (б, magn. 10×10): 1 — membrane separation from the egg content; 2 — ruptures of gelatinous membrane

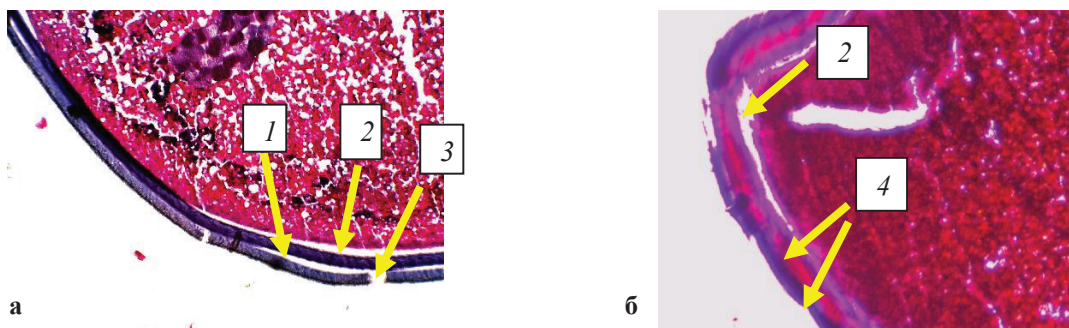


Рис. 7. Фрагменты оплодотворенных икринок белуги на 18–19-й стадиях развития (а) (ув. 10×10) и русского осетра на 28–29-й стадиях развития (б) (ув. 10×10), обработанных 0,01 %-ным раствором «Йодинола» (окраска кислым фуксином с докраской по Маллори): 1 — расслаивание оболочек; 2 — отслаивание оболочек от содержимого икринок; 3 — разрывы в оболочках; 4 — оболочки неравномерно окрашены, не имеют четких границ

Fig. 7. Parts of inseminated eggs of beluga on the 18–19th stage of development (а, magn. 10×10) and eggs of russian sturgeon treated with Iodinol 0.01 % (Mallory staining) on the 28–29th stage of development (б, magn. 10×10): 1 — membranes delamination; 2 — membrane separation from the egg content; 3 — ruptures in membranes; 4 — uneven coloration of membranes, absence of the clear contours

«Йодинола», хлорида натрия и пероксида водорода. Вероятнее всего, низкое заражение эмбрионов связано с хорошим качеством половых продуктов и высокой жизнестойкостью потомства.

В отличие от осетра, заражение эмбрионов белуги было достаточно интенсивным. Так, максимальное заражение сапролегнией наблюдали у группы особей, обработанных растворами фиолетового «К» — 15 % и «Йодинола» — 12 ± 5 %. Значение заражения икры в опытной группе с применением раствора хлорида натрия составило $9,5 \pm 4,5$ %, что выше показателей заражения в контрольной группе, но ниже, чем в двух первых. Максимальный эффект наблюдали при обработке ооцитов пероксидом водорода. Процент заражения в этом варианте оказался самым низким — $5,5 \pm 3,5$ %, что свидетельствует о негативном воздействии данного раствора на сапролегниевые микромицеты или создании неблагоприятных условий для их развития. Действие растворов высоких

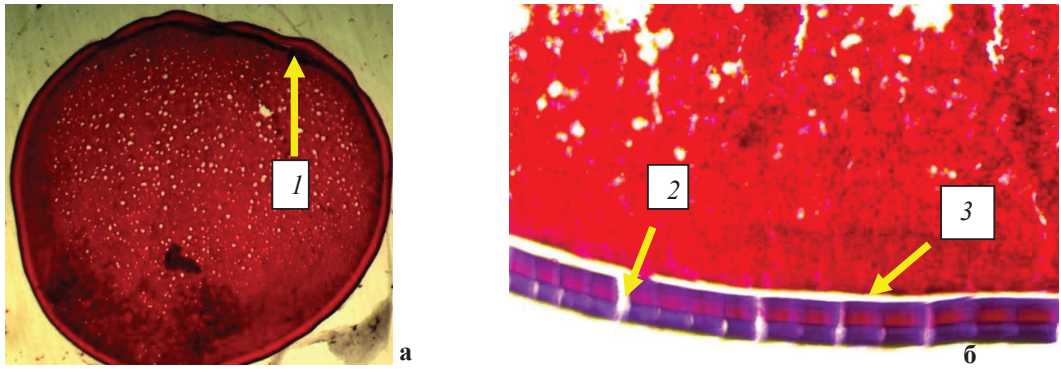


Рис. 8. Фрагменты оплодотворенных икринок белуги на 18–19-й стадиях развития (а) (ув. 4×10) и русского осетра на 28–29-й стадиях развития (б) (ув. 10×10), обработанных 0,05 %-ным раствором пероксида водорода (окраска кислым фуксином с докраской по Маллори): 1 — отслаивание оболочки от содержимого икринки; 2 — разрывы студенистой и желточных оболочек; 3 — отслаивание 2-й желточной оболочки от содержимого икринки

Fig. 8. Parts of inseminated eggs of beluga on the 18–19th stage of development (а, magn. 4×10) and eggs of russian sturgeon treated with hydrogen peroxide 0.05 % (Mallory staining) on the 28–29th stage of development (б, magn. 10×10): 1 — membrane separation from the egg content; 2 — ruptures of gelatinous and vitelline membranes; 3 — separation of the 2nd vitelline membrane from the egg content

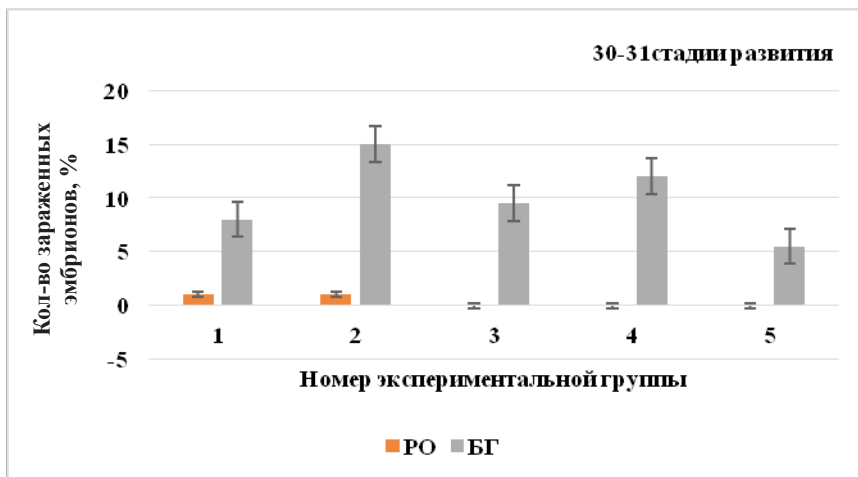


Рис. 9. Количество зараженных эмбрионов русского осетра (PO) и белуги (БГ) в контрольной и опытных группах

Fig. 9. Number of infected embryos of russian sturgeon (PO) and beluga (БГ) in the control and experimental groups

концентраций не приводит к положительному результату, а способствует снижению выживаемости и повышению уровня заражения [Володина и др., 2019; Баринаова и др., 2020б]. Обработка развивающихся эмбрионов растворами химических веществ низкой концентрации, не способных оказать губительного действия на эмбрионы, при более длительной экспозиции позволяет снизить уровень заражения и повысить выход свободных эмбрионов после инкубации.

Раствор хлорида натрия, несмотря на низкую эффективность относительно сапролегниевых микромицетов, приводит к увеличению количества выживших эмбрионов.

Количество полученных предличинок является важным показателем с точки зрения оценки экономической эффективности полученных результатов. Количество полученных свободных эмбрионов представлено на рис. 10.

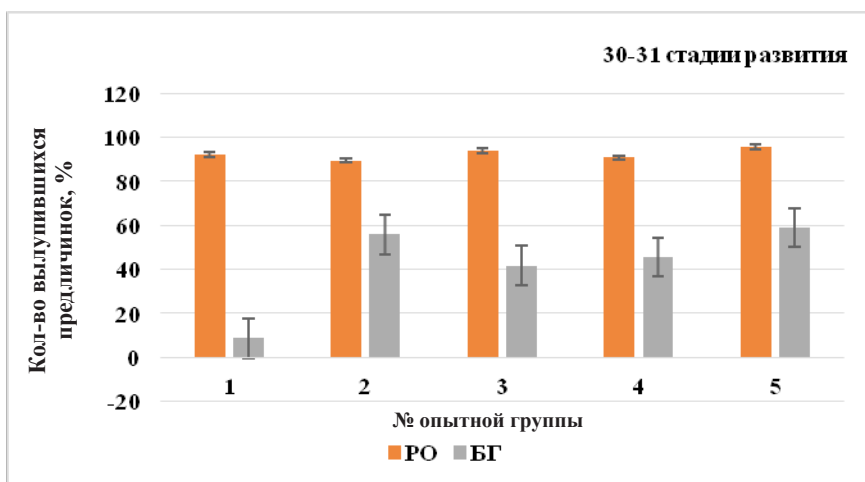


Рис. 10. Количество полученных предличинок русского осетра (РО) и белуги (БГ) в контрольной и опытных группах

Fig. 10. Number of obtained prelarvae of russian sturgeon (РО) and beluga (БГ) in the control and experimental groups

В результате инкубации эмбрионов русского осетра количество полученных предличинок было практически одинаковым во всех опытных группах и составило чуть менее 100 %, что свидетельствует о хорошем рыбоводном качестве икры и отсутствии негативного влияния применяемых растворов.

Выход свободных эмбрионов белуги после инкубации был значительно ниже, чем русского осетра. При этом контрольные варианты отличались от опытных низкими показателями выхода предличинок белуги, что подтверждает необходимость проведения лечебно-профилактических обработок инкубируемых эмбрионов в яцевых оболочках от сапролегниозов в период инкубации, начиная со стадии нейруляции.

Заключение

Количество выживших эмбрионов русского осетра было приблизительно одинаковым во всех экспериментальных группах. Выживаемость эмбрионов белуги в разных группах различалась. Так, в опытных группах с применением 0,70 %-ного раствора фиолетового «К» и 0,01 %-ного раствора лекарственного препарата «Йодинол» выживаемость эмбрионов была ниже, чем в контрольной. В опытной группе с использованием 0,90 %-ного раствора хлорида натрия значение показателя выживаемости эмбрионов было выше, чем в контроле, а в группе с 0,05 %-ным раствором пероксида водорода практически равно значениям контрольной группы.

Количество аномалий больше в опытных группах, чем в контрольной. При этом у белуги регистрировали большее количество аномалий, чем у русского осетра, но их число не превышало 14 %, что свидетельствует о хорошем качестве половых продуктов. Гистологический анализ показал, что и у эмбрионов русского осетра, и у эмбрионов белуги отмечены изменения в оболочках как в опытных, так и в контрольной группах.

Заражение сапролегниевыми микромицетами эмбрионов русского осетра было единичным. У белуги регистрировали максимальное заражение в опытных группах с использованием 0,70 %-ного раствора фиолетового «К», 0,90 %-ного раствора хлорида натрия и 0,01 %-ного раствора «Йодианола» относительно значений показателя заражения в контрольной группе. Минимальное заражение эмбрионов белуги отмечено при применении 0,05 %-ного раствора пероксида водорода.

Количество полученных предличинок русского осетра приближалось к 100 % во всех экспериментальных группах. Количество свободных эмбрионов белуги, получен-

ных в опытных группах, было намного выше, чем в контроле. При этом максимальное количество предличинок было получено в опытных группах с использованием 0,90 %-ного раствора хлорида натрия и 0,05 %-ного раствора пероксида водорода

На основании полученных результатов можно сделать выводы, что в период инкубации икры русского осетра хорошего качества использование обработок химическими веществами для подавления роста сапролегниевых микромицетов необязательно вследствие низкого заражения инкубируемой икры. Достаточно осуществлять ежедневный сбор зараженной икры.

В период инкубации икры белуги регистрировали высокий уровень заражения икры сапролегниевыми микромицетами, в связи с этим подавление их активного роста и развития возможно с использованием 0,05 %-ного раствора пероксида водорода (экспозиция 10 мин) и 0,90 %-ного раствора хлорида натрия (экспозиция 3 мин). При использовании 0,05 %-ного раствора пероксида водорода отмечено снижение заражения икры при минимальном негативном воздействии на эмбриональное развитие белуги. Заражение икры после обработки 0,9 %-ным раствором хлорида натрия оставалось на уровне значений заражения контрольной группы, однако данный раствор оказывал минимальное действие на эмбриональное развитие, и количество полученных предличинок было больше, чем в контрольной группе.

Благодарности (ACKNOWLEDGEMENTS)

Авторы благодарны коллективу научно-экспериментального комплекса аквакультуры «БИОС» Волжско-Каспийского филиала ВНИРО (КаспНИРХ) за помощь в организации проведения экспериментальных работ на базе комплекса.

Авторы признательны сотрудникам лаборатории молекулярной генетики и физиологии Волжско-Каспийского филиала ВНИРО (КаспНИРХ) за предоставление оборудования и помощь в проведении гистологических исследований, а также ведущему специалисту лаборатории ихтиопатологии В.В. Проскуриной и заведующей лабораторией Е.А. Ворониной за полезные рекомендации и помощь в анализе полученного материала.

Authors thank the staff of the research and experimental base BIOS for their assistance in organizing experimental works at the base, are grateful to the staff of Lab. Molecular Genetics and Physiology of the Volga-Caspian branch of VNIRO (CaspNIRKh) for using their equipment and their assistance in histological studies and personally to V.V. Proskurina, leading specialist, and E.A. Voronina, head of laboratory, from Lab. Ichthyopathology of the same institute for their help in analysis of the material and the manuscript preparing.

Финансирование работы (FUNDING)

Результаты настоящего исследования были получены в рамках выполнения государственного задания «Проведение прикладных научных исследований» (раздел 3 государственного задания ВНИРО № 076-00007-22ПР).

The study is made within implementation of the state assignment for VNIRO «Carrying out of the applied scientific research» (№ 076-00007-22PR, section 3).

Соблюдение этических стандартов (COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS)

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

All applicable international, national and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed.

The authors have no conflicts of interest to declare.

Информация о вкладе авторов (AUTHOR CONTRIBUTIONS)

В.В. Баринаева придумала, разработала схему проведения экспериментальных работ и в дальнейшем непосредственно участвовала в их проведении, проводила определение рыбоводно-биологических показателей, обрабатывала материал, писала основной текст статьи, анализировала полученные результаты.

М.Е. Перунова занималась гистологическими исследованиями отобранного материала, участвовала в обработке данных, написании текста статьи, обсуждении результатов.

А.А. Бахарева внесла существенный вклад в анализ собранных данных, их интерпретацию, осуществила критический пересмотр статьи на предмет важного интеллектуального содержания.

V.V. Barinova — design and development of the experiment — and its implementation, biological analyses, data processing and analyzing, writing the main text; M.E. Perunova — histological studies, data processing, discussing the results, co-writing the text; A.A. Bahareva — significant contribution to analysis of the collected data and their interpretation, critical revision of the manuscript for enhancing its scientific content.

Список литературы

Атлас нарушений в гаметогенезе и строении молоди осетровых / Н.В. Акимова, В.Б. Горюнова Е.В. Микодина и др. — М. : ВНИРО, 2004. — 120 с.

Баринаева В.В., Баталова Р.Р., Золотовская О.В. Результаты экспериментальных работ по оценке влияния растворов хлорида натрия на эмбриональное развитие белуги в процессе инкубации // Современное состояние и развитие аквакультуры: экологическое и ихтиопатологическое состояние водоемов и объектов разведения, технологии выращивания : мат-лы Междунар. конф. — Новосибирск : Золотой колос, 2020а. — С. 62–66.

Баринаева В.В., Бахарева А.А., Баталова Р.Р. Определение степени воздействия растворов химических веществ разной концентрации на рост и развитие культуры микромицетов сем. Saprolegniaceae «in vitro» // Вестн. АГТУ. Сер.: Рыб. хоз-во. — 2020б. — № 4. — С. 121–130. DOI: 10.24143/2073-5529-2020-4-121-130.

Баринаева В.В., Бахарева А.А., Бедрицкая И.Н., Баталова Р.Р. Предварительные результаты экспериментальных исследований по подавлению роста микромицетов сем. Saprolegniaceae растворами пероксида водорода и хлорида натрия при инкубации икры белуги // Мат-лы 3-й Междунар. науч.-практ. конф. — Астрахань : АГТУ. — 2020в. — С. 13–19.

Большая советская энциклопедия (БСЭ) / гл. ред. А.М. Прохоров. — 3-е изд. — М. : Сов. энциклопедия, 1974. — Т. 17. — 616 с.

Вишторская А.А., Романова Н.Н., Головин П.П. О сроках выведения трифенилметановых красителей после обработки рыб // Рыб. хоз-во. — 2020. — Вып. 3. — С. 94–100. DOI: 10.37663/0131-6184-2020-3-94-100.

Володина В.В., Баринаева В.В., Менькова А.В. и др. Поиск эффективных средств против сапролегниоза икры осетровых рыб // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. — 2019. — № 3(43). — С. 53–63. DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10039.

Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н. Основы микологии: морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов : учеб. пособие. — М. : Тов-во науч. изд. КМК, 2005. — 221 с.

Детлаф Т.А., Гинзбург А.С. Зародышевое развитие осетровых рыб (севрюги, осетра и белуги) в связи с вопросами их разведения : моногр. — М. : АН СССР, 1954. — 228 с.

Ларцева Л.В., Обухова О.В., Алтуфьев Ю.В. Сапролегниоз икры ценных видов рыб при искусственном разведении в дельте р. Волги : моногр. — Астрахань : Издатель: Сорокин Роман Васильевич, 2017. — 98 с.

Переведенцева Л.Г. Микология: грибы и грибоподобные организмы : учеб. пособие. — Пермь : Перм. гос. ун-т, 2009. — 199 с.

Рахконен Р., Веннерстрем П., Ринтамяки П., Каннел Р. Здоровая рыба. Профилактика, диагностика и лечение болезней Финляндии : моногр. : пер. с нем. — 2-е изд., перераб и доп. — Хельсинки : НИИ охотничьего и рыбного хозяйства, 2012. — 180 с.

Ромейс Б. Микроскопическая техника : моногр. — М. : Изд-во иностр. лит., 1954. — 710 с.

Шалак М.В., Гончарик Ю.М. Влияние препарата на биохимические показатели крови линя (tinca tinca) // Животноводство и ветеринарная медицина. — 2017. — Вып. 3(26). — С. 18–22.

References

- Akimova, N.V., Goryunova, V.B., Mikodina, Ye.V., Nikol'skaya, M.P., Ruban, G.I., Sokolova, S.A., Shagayeva, V.G., and Shatunovskiy, M.I.**, *Atlas narusheniy v gametogeneze i stroyenii molodi osetrovyykh* (Atlas of disorders in gametogenesis and structure of sturgeon juveniles), Moscow: VNIRO, 2004.
- Barinova, V.V., Batalova, R.R., and Zolotovskaya, O.V.**, The results of the experimental evaluation of the effect of sodium chloride on the embryonic development of the beluga in the process of incubation, in *Mater. Mezhdunar. conf. "Sovremennoye sostoyaniye i razvitiye akvakul'tury: ekologicheskoye i ikhtiopatologicheskoye sostoyaniye vodoyemov i ob'yektov razvedeniya, tekhnologii vyrashchivaniya"* (Proc. Int. Conf. "Current state and development of aquaculture: ecological and ichthyopathological state of reservoirs and breeding objects, cultivation technologies"), Novosibirsk: Zolotoy kolos, 2020, pp. 62–66.
- Barinova, V.V., Bakhareva, A.A., and Batalova, R.R.**, Determining impact of solutions with different concentration of chemicals on growth and development of micromycetes Saprolegniaceae in vitro, *Vestnik Astrakh. Gos. Tekh. Univ., Ser. Ryb. khoz-vo*, 2020, no 4, pp. 121–130. doi 10.24143/2073-5529-2020-4-121-130
- Barinova, V.V., Bakhareva, A.A., Bedritskaya, I.N., and Batalova, R.R.**, Preliminary results of experimental research on suppressing the growth of micromycetes of sem. Saprolegniaceae solutions of hydrogen peroxide and sodium chloride at the incubation of white caviar, in *Mater. 3-y Mezhdunar. nauchno-prakt. conf. (Proc. 3rd Int. Sci. Pract. Conf.)*, Astrakhan: Astrakhan. Gos. Tekh. Univ., 2020, pp. 13–19.
- Bol'shaya sovetskaya entsiklopediya** (Great Soviet Encyclopedia), Prokhorov, A.M., vol. 17, Moscow: Sovetskaya Entsiklopediya, 3rd ed., 1974.
- Vishtorskaya, A.A., Romanova, N.N., and Golovin, P.P.**, On the periods of triphenylmethane dyes removal after fish processing, *Rybn. Khoz.*, 2019, no. 3, pp. 94–100. doi 10.37663/0131-6184-2020-3-94-100
- Volodina, V.V., Barinova, V.V., Men'kova, A.V., Saketova, K.S., Gnucheva, V.I., Yakovleva, E.P., and Lushnikova, A.A.**, The search of effective agents against Saprolegniosis of Sturgeon eggs, *Aktual'nyye voprosy veterinarnoy biologii*, 2019, no. 3(43), pp. 53–63. doi 10.24411/2074-5036-2019-10039
- Garibova, L.V. and Lekomtseva, S.N.**, *Osnovy mikologii: morfologiya i sistema gribov i gribopodobnykh organizmov* (Fundamentals of mycology: morphology and systematics of fungi and mushroom-like organisms), Moscow: KMK, 2005.
- Detlaf, T.A. and Ginzburg, A.S.**, *Zarodyshevoye razvitiye osetrovyykh ryb (sevryugi, osetra i belugi) v svyazi s voprosami ikh issledovaniya* (Embryonic development of sturgeons (stellate sturgeon, sturgeon and beluga) in connection with the issues of their research), Moscow: Akad. Nauk SSSR, 1954.
- Lartseva, L.V., Obukhova, O.V., and Altuf'yev, Yu.V.**, *Saprolegniosis ikry tsennykh vidov ryb pri iskusstvennom razvedenii v del'te r. Volgi* (Saprolegniosis of eggs of valuable fish species during artificial breeding in the delta of the river Volga), Astrakhan: Izdatel': Sorokin Roman Vasil'yevich, 2017.
- Perevedentseva, L.G.**, *Mikologiya: griby i gribopodobnyye organizmy* (Mycology: fungi and mushroom-like organisms), Perm': Permskiy Gos. Univ., 2009.
- Rakhkonen, R., Vennerstrem, P., Rintamyaki, P., and Kannel, R.**, *Zdorovaya ryba. Profilaktika, diagnostika i lecheniye bolezney Finlyandii* (Healthy fish. Prevention, diagnosis and treatment of diseases in Finland), 2nd ed., Khel'sinki : NII okhotnich'yego i rybnogo khozyaystva, 2012.
- Romeys, B.**, *Mikroskopicheskaya tekhnika* (Microscopic technique), Moscow: Izd-vo inostr. Lit., 1954.
- Shalak, M.V. and Goncharik, Yu.M.**, Vliyaniye preparata na biokhimicheskiye pokazateli krovi linya (tinca tinca), *Zhivotnovodstvo i veterinarnaya meditsina*, 2017, no. 3(26), pp. 18–22.
- Sbornik instruktsiy i normativno-metodicheskikh ukazaniy po promyshlennomu razvedeniyu osetrovyykh ryb v Kaspyskom i Azovskom basseynakh* (Collection of instructions and normative and methodological guidelines for the industrial breeding of sturgeon in the Caspian and Azov basins), Moscow: VNIRO, 1986.

Поступила в редакцию 30.11.2021 г.

После доработки 3.02.2022 г.

Принята к публикации 25.02.2022 г.

The article was submitted 30.11.2021; approved after reviewing 3.02.2022; accepted for publication 25.02.2022