

На правах рукописи

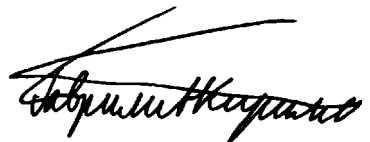
Гаврилин Кирилл Владимирович

**МЕТОДЫ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ
ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ
СЕПТИЦЕМИИ (АЭРОМОНОЗА) КАРПА {*CYPRINUS CARPIOL*}**

03.00.10. "Ихтиология"
03.00.07. "Микробиология"

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Москва -2004

Работа выполнена в ФГУП "Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства"

Научный руководитель — кандидат биологических наук,
Юхименко Людмила Николаевна.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор, Умаров Марат Мутагарович.

кандидат биологических наук,
Бекина Елена Николаевна.

Ведущая организация Межведомственная ихтиологическая комиссия

Защита диссертации состоится "24" апреля 2004 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д. 307.003.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте пресноводного рыбного хозяйства (ВНИИПРХ) по адресу: 141821. Московская обл., Дмитровский р-н, пос. Рыбное.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП "ВНИИПРХ"

Автореферат разослан "26" марта 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Подоскина ТА

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Для прудовых хозяйств центральных и южных регионов Российской Федерации, выращивающих товарного карпа по интенсивной технологии, наиболее актуальной является проблема бактериальной геморрагической септицемии (аэромоноза) рыб, обусловленной грамотрицательными условно-патогенными бактериями, среди которых лидирующее место занимают подвижные аэромонады.

В 1999 г. неблагополучными по аэромонозу рыб признаны 39 пунктов. К началу 2003 г. - 37 (Яременко, Мачнев, 2000; Яременко, Селиверстов, 2003).

Традиционным, прочно вошедшим в практику рыбоводства методом борьбы с болезнями рыб бактериальной этиологии является их химиотерапия. Но в настоящее время применение антибиотиков и антибактериальных препаратов сильно ограничено из-за формирования среди бактериальных патогенов антибиотикорезистентных штаммов, возникновения под действием подавляющего большинства применяемых химиопрепаратов иммуносупрессии у рыб, разрушения механизмов регуляции численности популяций водных микроорганизмов.

Немаловажным является и загрязнение медикаментами конечной пищевой продукции, что значительно ограничивает возможности ее реализации. В условиях растущего насыщения потребительского рынка продукцией аквакультуры наиболее конкурентноспособной окажется экологически чистая, выращенная без применения антибиотиков рыба,

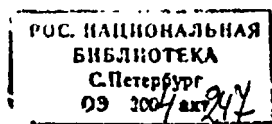
В данной ситуации иммунопрофилактика бактериальной геморрагической септицемии рыб становится весьма актуальной с точки зрения обеспечения здоровья рыб в условиях их искусственного выращивания и возможности дальнейшего развития интенсивного прудового рыбоводства

Цель работы. Разработать методы специфической и неспецифической иммунопрофилактики бактериальной геморрагической септицемии (аэромоноза) карпа [*Cyprinus carpio* L].

Задачи исследований:

1. Изучить эффективность применения пробиотика - субалина на основе *Bacillus subtilis* штамма 2335 для профилактики и терапии бактериальной геморрагической септицемии карпа в условиях интенсивного прудового рыбоводства.

2. Испытать в экспериментальных условиях бактерии из музейного штамма *Aeromonas sobria* 77-18. Исследовать протективный эффект, оказываемый вакцинацией, при искусственном заражении гомологичным и гетерологичными штаммами



вирулентных подвижных аэромонад. Проследить динамику развития иммунного ответа карпов на вакцинацию.

3. Провести испытания протективного действия и иммуногенного эффекта, оказываемого бактерином, в опытно-производственных условиях.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. Исследовано влияние пробиотика субалина на динамическое равновесие в системе паразит-хозяин в условиях водной экосистемы интенсивно эксплуатируемого рыбоводного пруда. Подтверждена способность препарата, первоначально созданного для теплокровных животных, оказывать профилактический и терапевтический эффект при воздействии на пойкилотермный организм, повышать иммунитет рыб.

Впервые разработана и успешно испытана вакцина для рыб, предназначенная для профилактики бактериальной геморрагической септицемии (аэромоназа) путем групповой обработки рыб. Показана принципиальная возможность создания вакцин против подвижных аэромонад.

Практическая значимость работы. Применение в прудовом рыбоводстве высокоэффективных при борьбе с бактериальной геморрагической септициемией препаратов - пробиотика субалина и бактериона из *A sobria* 77-18 позволит избежать потерь, связанных с данным заболеванием, культивируемых гидробионтов за счет повышения способности организма рыб противостоять бактериальному прессингу из окружающей водной среды. Оба препарата являются альтернативой химиотерапевтическим мероприятиям. Их применение позволит избежать загрязнения окружающей среды и получать высококачественную, экологически чистую и конкурентоспособную пищевую продукцию.

На защиту выносятся совокупность новых научных результатов и положений. Применение пробиотика субалина на основе *Bac. subtilis* штамма 2335 и бактериона из *A sobria* штамма 77-18 могут служить методами профилактики бактериальной геморрагической септицемии (аэромоназа) карпа в условиях интенсивного прудового карповодства.

Автор принимал личное участие в проведении теоретических и экспериментальных исследований, результаты которых представлены в диссертации. Материалы по первичным экспериментальным испытаниям пробиотика и вакцины любезно предоставлены моим научным руководителем Л.Н. Юхименко. Все микробиологические исследования проведены совместно со ст.н.с, лаборатории ихтиопатологии ФГУП "ВНИИПРХ" К.Б.Н. Л.Н. Юхименко и н.с. той же лаборатории, к.б.н. Л.И. Бычковой. Значительную помощь в сборе первичного материала в опытно-

производственных условиях оказали трудовые коллективы ОАО "Бисеровский рыбокомбинат" и экспериментально-производственного отдела ФГУП "ВНИИПРХ* "Якоть".

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на Международной научно-практической конференции "Аквакультура начала XXI века: истоки, состояние, стратегия развития", 3-6 сентября 2002 г. (пос. Рыбное, ФГУП "ВНИИПРХ"); Всероссийской научно-практической конференции "Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов", 16-18 июля 2003 г. (пос. Борок, Институт биологии внутренних вод РАН); Памятных научных чтений к 85-летию проф. ВА Мусселиус-Богоявленской (1918-2003), 1-2 октября 2003 г. (пос. Рыбное, ФГУП "ВНИИПРХ"); а также на методических, ученых советах и коллоквиумах лаборатории ихтиопатологии ФГУП "ВНИИПРХ".

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, включая 41 таблицу. Содержит следующие разделы: введение; основную часть, заключение и список использованных источников. Основная часть включает в себя следующие подразделы: аналитический обзор, выбор направления исследований, теоретические и экспериментальные исследования, обобщение, оценка результатов исследования и основные выводы. Список использованных источников включает 171 работу, из которых 76 - на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

Бактериальная геморрагическая септицемия (аэромоназ) рыб и методы ее профилактики

Обзор посвящен проблеме бактериального заболевания рыб, вызываемого комплексом условно-патогенных грамнегативных бактерий, среди которых доминируют подвижные аэромонады. Эта проблема имеет наибольшее значение для прудовых хозяйств, выращивающих карпа по интенсивной технологии. Для характеристики этого неспецифического полиэтиологического бактериоза рядом отечественных и зарубежных авторов предложено использовать термин - бактериальная геморрагическая септицемия (БГС) рыб (Amlacher, 1972; Bullock et al., 1972; Austin, Austin, 1993; Юхименко, Койдан, 1997). Это не противоречит литературным источникам, где при помощи понятия аэромоназ характеризуют специфическую септицемию рыб и указывают возбудителя - определённый вид подвижного представителя р. *Aeromonas*.

В работе рассмотрены причины возникновения болезни, как совокупности нарастания численности и вирулентности грамотрицательных факультативных патогенов в благоприятной для их существования эвтрофированной водной среде рыбоводного пруда, с одной стороны, и наличия плотной популяции восприимчивых хозяев, у которых антибактериальная резистентность снижена воздействием различных стрессоров, с другой.

К основным группам микроорганизмов, за последние годы наиболее часто регистрирующимся в качестве этиологических агентов БГС, относятся некоторые представители родов *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Adnetobacter*, сем. *Enterobacteriaceae* (Воупаратпалин, 1989; Жезмер и др., 1991; Юхименко и др., 2001; Юхименко и др., 2002). Указаны пути поступления данных групп микроорганизмов в экосистему рыбоводного пруда, описаны складывающиеся в водном микробиоценозе конкурентные взаимоотношения и приведены данные по опасности этих бактерий для здоровья человека.

Во второй части обзора литературы рассматриваются существующие на данный момент методы борьбы с БГС рыб. В ряде публикаций авторы подчеркивают, что часто эпизоотическое неблагополучие по бактериозам рыб в отечественной аквакультуре связано с нарушениями в биотехнологии культивирования гидробионтов (Юхименко и др., 1996; Юхименко, Койдан, 1997; Гаврилин и др., 2002). Основным из таких нарушений является пренебрежение или проведение в недостаточном объеме мероприятий, призванных оптимизировать зооигиенические параметры водной среды, где выращивается рыба.

Рассмотрены материалы, касающиеся вопросов химиотерапии бактериозов рыб в аквакультуре. Большинство отечественных авторов говорят о необходимости применения значительного количества антибиотиков и антибактериальных препаратов при выращивании рыбы (Панасенко, 1990; Афанасьев, 1996; Бабенко, Аганесян, 1997; Скурат и др., 1997; Чугалинская, 1997). В зарубежных публикациях, наоборот, подчеркивается наблюдаемое в последние десятилетия снижение эффективности химиотерапии за счет роста количества антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, условно-патогенных не только для рыб, но и для человека, и указывается на необходимость получения в аквакультуре высококачественной экологически чистой пищевой продукции (Schlotfeldt et al., 1972; Brown, 1989; Me Millan, 1991; Me Pherson, 1991; Lewin, 1992; Dixon, 1994).

Выходом из данной ситуации является развитие иммунопрофилактических мероприятий в аквакультуре. В связи с этим приведены данные по недавним достижениям в области применения в аквакультуре вакцин и пробиотиков. Отдельно рассмотрен мировой опыт по разработке вакцин для рыб против подвижных аэромонад.

В литературных источниках представлен значительный теоретический материал по этому вопросу и показана принципиальная возможность создания вакцин против подвижных убиквитарных аэромонад (Shen, 1990; Гусева, Галаш, 1997; Юхименко и др., 1997).

2. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Все работы проведены в лаборатории ихтиопатологии ФГУП "Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства" с 1999 по 2003 г.г. Иммуногенные и протективные свойства бактерина исследовали в аквариальных и опытно-производственных условиях - на прудах экспериментально-производственного отдела ФГУП "ВНИИПРХ" "Якоть". Дополнительное испытание в производственных условиях проведено на тепловодном садковом хозяйстве "Нептун" НТЦ "Селекцентр" (Тверская область).

Испытания профилактического и терапевтического эффекта применения комбикорма, содержащего пробиотик субалин (ОАО "Днепрофарм"), проведены в Черепецком садковом хозяйстве Тульской области и на базе прудовых хозяйств: ОАО "Бисеровский рыбокомбинат" и в Лотошинском рыбхозе, расположенных в Московской области. Объектом исследования служили разновозрастные карпы, вода рыбо-водных прудов и пробы лечебного комбикорма с субалином.

При сборе данных, необходимых для оценки эпизоотической ситуации на водоеме, был использован комплекс взаимосвязанных методов, включающий в себя клинический осмотр рыбы, ее патолого-анатомическое вскрытие, исследование микробиоценоза рыбы и среды ее выращивания - прудовой воды, оценку ряда иммунологических показателей культивируемого гидробионта.

Первичный посев материала проводили на плотные пластинчатые среды: Эндо и эритроит-агар. В дальнейшем изолированные колонии переносили на дифференциально-диагностическую среду - агар Клигlera. Подвижные аэромонады дополнительно идентифицировали согласно со схемой, разработанной в лаборатории ихтиопатологии ФГУП "ВНИИПРХ" (Юхименко и др., 2001). Представителей сем. *Enterobacteriaceae* типировали до рода, в некоторых случаях до вида при помощи "Определителя бактерий Берджи" (1997) и сокращённой таблицы биохимической дифференциальной диагностики (Кауфман, 1959). Идентификацию редко встречающихся микроорганизмов осуществляли до рода по "Определителю бактерий Берджи".

Вирулентность выделенных штаммов аэромонад оценивали по дезоксирибонуклеазной активности (Сборник..., 1998) на ДНК-азном агаре (Difco laboratories,

USA). Результаты, получаемые этим методом, в значительной степени коррелируют с данными биопроб на белых мышах (Хомяков и др., 2003).

Для контроля за активностью субалина в корме использовали метод прямого посева гранул комбикорма на поверхность эритроит-агара с канамицином. С целью определения приживаемости *Vac. subtilis* в кишечнике рыб соскоб с поверхности слизистой оболочки кишечника засеивали на эритроит-агар с канамицином. По завершении инкубации учитывали рост характерных колоний.

При приготовлении вакцины бактериальную массу *A. sobria* штамма 77-18 смысливали с поверхности эритроит-агара изотоническим раствором хлорида натрия. Полученную суспензию центрифугировали, а осадок ресуспендировали. В окончательную суспензию клеток добавляли 0,1-0,2% формалина и выдерживали 24 часа при 37°C, после контроля ее стерильности определяли оптическую плотность и, исходя из этого, рассчитывали количество необходимое для создания в емкости для вакцинации рыб рабочей концентрации бактерина - 10^9 кл/мл.

С целью исследования клеточного звена иммунитета рыб использовали реакцию завершеного фагоцитоза, специфического гуморального иммунитета - реакцию микроагглютинации. Бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК) демонстрировала суммарное действие гуморальных защитных факторов крови карпов. Определение БАСК проводили фотоколориметрическим методом, при исследовании уровня активности завершеного фагоцитоза - метод определения концентрации жизнеспособных микроорганизмов путем их высева на среду Эндо.

Защитный эффект тестируемых препаратов (бактерина и субалина) определяли по индексу защиты (Amend, 1981). Статистическую обработку данных, полученных при учете результатов реакции микроагглютинации, проводили по А Пьяцца (1981). Для статистической оценки данных активности фагоцитоза (реакция завершеного фагоцитоза) использовали методику И.Ашмарина с соавторами (1962). Достоверность различий средних величин определяли с помощью t-критерия Стьюдента, при уровнях значимости 95 и 99%. При обработке статистических материалов использовали компьютерную программу Microsoft EXEL - 97.

В процессе исследований клиническому осмотру подвергнуто 5300 экз. разновозрастных карпов. Проведен микробиологический анализ 2166 проб материала, взятого от 1013 разновозрастных карпов, 153 проб прудовой воды и 51 пробы лечебного гранулированного комбикорма с субалином. У 216 экз. рыб исследована приживаемость *Vac. subtilis* в кишечнике. Выделено и исследовано 1309 штаммов микроорганизмов, относящихся к 8 родам. В ходе иммунологических исследований поставлено 1304 реакции микроагглютинации с различными антигенами, у 212 экз. карпов определена БАСК и у 222 экз. - уровень завершеного фагоцитоза.

2.2. Исследования эффективности применения пробиотика- субалина для профилактики бактериальной геморрагической септицемии карпа

2.2.1. Проверка протективного эффекта субалина в экспериментальных условиях проведена на сеголетках карпа средней массой 24 г. Рыб контрольной группы кормили гранулированным комбикормом РГМ 8М. Опытная фуппа получала тот же комбикорм, но содержащий субалин в количестве не менее 10^5 спор в граммe (по контрольному исследованию корма).

Установлено, что темп роста массы тела рыб в опытной группе составил 89,6% от первоначального, в то время как в контрольной - 45,8%. Для субалина получен 100% индекс защиты от экспериментального аэромоноза.

2.22 Производственные испытания протективного действия субалина. В Черепецком хозяйстве опытному кормлению с пробиотиком подвергли товарных карпов, содержавшихся в одном из садков. Рыбы были дважды отсортированы по клиническим признакам, т.е. в 100% случаев имели ярко выраженные поражения. Комбикорм, содержащий субалин в количестве не менее 10^5 спор в г (по результатам контрольного исследования корма), давали двумя курсами, по 3 дня каждый с перерывом в 4 дня. Контролем служил соседний садок, где карпы получали стандартный рацион.

За время наблюдения (21 день) в опытной группе погибло 8 особей, в контрольной - 20. Индекс защиты примененного препарата составил 60%.

2.23. Исследование иммуностимулирующего действия субалина. Для более полной характеристики биологического действия субалина в 2000 г. нами было предпринято изучение его влияния на уровень специфического иммунитета рыб, которое могло быть достигнуто за счёт нормализации всех физиологических процессов, протекающих в организме рыбы. Для этого нами был изучен уровень специфических антител сыворотки крови карпов.

Исследованы рыбы различных групп, получавших и не получавших субалин, выращиваемых при различных плотностях посадки в пруду.

На Центральном участке ОАО "Бисеровский рыбокомбинат" сыворотки отбирали у 4-х групп рыб:

1-2 - из пруда №3, где рыба получала корм с субалином - мелкие (250-300 г) и крупные (500-600 г).

3 - из пруда № 1А, где средняя масса рыбы составляла 450 г, и она так же получала корм с субалином, но содержалась при более высоких плотностях посадки.

4 - из так называемого "министерского" пруда, где содержалась крупная (до 1 кг) рыба для спортивного рыболовства, не получавшая субалин.

Группы 5 и 6 - двухлетки карпа, чешуйчатые и зеркальные, из единственного пруда Образцовского участка ОАО "Бисеровский рыбокомбинат", получавшие субалин.

В рыбхозе "Лотошинский" исследовали одноразмерных сеголетков, которые в группе 7 получали комбикорм с субалином, а в группе 8 - стандартный рацион.

Результаты исследований приведены в табл. 1.

Таблица 1

Уровень антителообразования у разновозрастных карпов, содержащихся в различных условиях и получавших стандартную диету или кормившихся с добавкой субалина

№№ групп	Кол-во, шт.	Приживаемость субалина в кишечнике	Используемый антиген	log ₂ обратного титра антител
1	9	+	<i>A. sobria</i> 77-18	3,3 ± 2,4
2	9	+	<i>A. sobria</i> 77-18	8,0 ± 1,3
3	7	+	<i>A. sobria</i> 77-18	4,0 ± 1,4
4	9	-	<i>A. sobria</i> 77-18	5,1 ± 2,5
5	8	+	<i>A. hydrophila</i> 144-6п	9,9 ± 0,9
6	12	+	<i>A. hydrophila</i> 144-6п	9,2 ± 0,6
7	8	+	<i>A. hydrophila</i> 144-6п	6,8 ± 1,2
8	10	-	<i>A. hydrophila</i> 144-6п	6,1 ± 0,7

По завершению исследований было установлено положительное влияние пробиотика на уровень антителообразования, которое играет важную роль в защите организма рыбы от бактериальных патогенов. Статистически достоверные различия между средними титрами специфических антител установлены между одноразмерными рыбами Центрального участка ОАО "Бисеровский рыбокомбинат", кормившимися стандартным рационом и с добавкой субалина (группы 2 и 4) $P < 0,01$. У более мелких или находящихся в более неблагоприятных условиях (повышенные плотности посадки), но получавших субалин рыб также обнаружены циркулирующие антитела в достаточно высоких титрах

Различий между уровнями антителообразования в группах разнопородных карпов с Образцовского участка не обнаружено.

При исследовании интенсивности антителообразования у сеголетков карпа в рыбхозе "Лотошинский" установлено, что средний титр циркулирующих агглютининов в группе рыб, получавших субалин, статистически достоверно больше ($P < 0,05$), чем в контроле, получавшем стандартный рацион.

2.2.4. Испытания субалина в условиях прудовых хозяйств в 2001 г. В ОАО "Бисеровский рыбокомбинат" кормом с препаратом кормились карпы товарных групп, а в Лотошинском рыбхозе - сеголетки. Рыбхоз "Лотошинский" считается не-

благополучным по аэромоназу с 1989 г., но, благодаря комплексу проводимых ветеринарно-санитарных мероприятий, заболеваний товарных рыб в острой форме не наблюдали с 1995 г. Основной проблемой хозяйства являлась выживаемость сеголетков в летний период. При обследовании рыб выявляли патологические изменения во внутренних органах и контаминацию подвижными аэромонадами. Для исследования влияния субалина на выживаемость сеголетков карпа в прудах №12 и 13 с 30.07. по 4.08. был проведен курс кормления с субалином. Пруд №14 оставлен в качестве контроля. Условия выращивания сеголетков были одинаковыми как в опытных, так и в контрольном водоемах. Исследования использовавшейся партии комбикорма с субалином показали его удовлетворительное качество и высокую активность содержащегося в нем препарата.

В опытных прудах за время наблюдения общее микробное число (ОМЧ) воды колебалось от 5360 до 38400 колониеобразующих единиц в одном мл воды (КОЕ/мл). Микробиоценоз был представлен *Adnetobacter calcoaceticus*, *Moraxella sp.*, *A. sobria*, бактериями группы кишечной палочки (БГКП) и *Proteus sp.*. До кормления у 100% сеголетков наблюдались значительные патологические отклонения во внутренних органах (рыхлая гиперемированная печень, гипертрофированные почки). От 70 до 90% рыб имели внутренние органы, обсемененные БГКП и подвижными аэромонадами. После 6-ти дневного курса кормления с субалином в 100% случаев произошла нормализация состояния внутренних органов. В 70% случаев внутренние органы сеголетков не содержали бактериальной флоры.

В контрольном пруду ОМЧ воды было в среднем ниже, чем в опытных и колебалось от 7600 до 7980 КОЕ/мл, а ее микробиоценоз был представлен БГКП, *Proteus*, и *A sobria*. Все исследованные сеголетки имели выраженные патологические изменения во внутренних органах, которые у 78% были контаминированы комплексами подвижных аэромонад. К концу сезона количество рыб со стерильными внутренними органами снизилось еще на 8%, и в них продолжали наблюдаться патологические изменения.

Полученные результаты продемонстрировали высокую эффективность применения испытываемого пробиотика для деконтаминации и нормализации состояния внутренних органов сеголетков. Необходимо отметить, что препарат оказывал выраженное положительное действие даже при крайне высоком уровне бактериального прессинга в условиях выростного пруда №13 (от $2,4 \times 10^4$ до $3,8 \times 10^4$ КОЕ/мл при наличии в микробиоценозе БГКП, *Proteus sp.*).

На базе ОАО "Бисеровский рыбокомбинат" в 2001 г. препарат применялся в одном из нагульных прудов Центрального участка (1А) с трёхлетками карпа и Образцовском участке, где выращивался посадочный материал для трёхлетнего оборота.

В пруду 1А, где с субалином кормились трехлетки карпа, удалось добиться положительных результатов. После 2-х курсов кормления с субалином (по пять дней с промежутком 19 дней) у всех обследованных рыб исчезли клинические признаки и патологические изменения во внутренних органах (ранее наблюдаемые у 44% обследованных рыб). В 2,8 раза снизилось количество рыб, в посевах паренхиматозных органов которых обнаруживали рост бактериальной микрофлоры. Исследования лечебного комбикорма с субалином показали его хорошее качество. Получен положительный результат в 87% проб на приживаемость *Bac. subtilis* в кишечнике карпов.

На Образцовском участке ОАО "Бисеровского рыбокомбината", где содержались двухлетки после 2-х 5-ти дневных курсов кормления (перерыв 21 день) у 40% карпов сохранились клинические признаки. В 100% проб на приживаемость субалина в кишечнике получен отрицательный результат, а активность препарата в комбикорме была пониженной. Проведено дополнительное кормление рыб с пробиотиком (5 дней комбикормом другой партии). На этот раз в 80% проб обнаружена приживаемость пробиотика в кишечнике рыб. У всех карпов отмечено исчезновение клинических признаков и отсутствие контаминации внутренних органов.

Исследования, проведенные в Бисеровском и Лотошинском рыбхозах, показали эффективность применения субалина для улучшения иммуно-физиологического состояния рыбы и снижения уровня контаминации ее внутренних органов бактериальной флорой. В 2001 г. были получены результаты, которые вместе с исследованиями, проведенными в 1999 и 2000 гг., позволяют рекомендовать субалин как средство неспецифической иммунопрофилактики БГС рыб для прудовых карповодческих хозяйств.

2.3. Исследование протективного действия и иммуногенного эффекта бактериина из *A sobriallAb*

2.3.1. Испытания бактериина в экспериментальных условиях. Серия экспериментов, проведенных на годовиках и двухгодовиках карпа массой 35-38 г и 120-150 г соответственно, позволила установить концентрацию бактериина, дающую наибольший иммуногенный эффект при обработке рыб методом прямой иммерсии, как 10^9 микробных клеток в 1 мл рабочего раствора, и минимальную длительность обработки - 10-15 мин. Все дальнейшие работы с вакциной проводились исходя из этих параметров. В аквариальных условиях было проведено развернутое изучение протективного и иммуногенного эффекта бактериина. При проведении эксперимента имитировались условия весенней вакцинации двухгодовиков карпа средней массой 248,5 г, выращиваемых при трехлетнем обороте. Рыбы получали полноценный гранулированный комбикорм рецепта АК - 50 ФС. По завершении 10-дневного адапта-

ционного периода после посадки рыб в аквариальную при температуре 12°C был исследован исходный уровень иммунологических показателей (ИИП). При той же температуре проведена вакцинация 3-х опытных групп (в 3-х отдельных емкостях). После обработки карпов вакциной температура воды во всех емкостях в течение пяти дней была повышена до 20°C. Через 9 дней после вакцинации были взяты пробы крови у карпов 3-х вакцинированных (О) и 3-х контрольных (К) групп. Данные, полученные по завершении исследований, приведены в табл. 2.

Таблица 2

Иммунологические показатели карпов до вакцинации (ИИП), опытных (О) и контрольных (К) групп после вакцинации

Группа рыб	Температура воды, °С	Уровень завершеного фагоцитоза, %	БАСК, %	log ₂ обратного титра антител		
				<i>A. sobria</i> 77-18	<i>A. sobria</i> 70-23п	<i>A. sobria</i> 70-24п
ИИП	12	47,4 ± 2,2	31,1 ± 0,6	8,1 ± 0,7	6,9 ± 0,9	0,6 ± 0,1
О	20	86,2 ± 1,5	47,4 ± 0,9	11,9 ± 0,2	7,5 ± 1,5	3,2 ± 1,3
К	20	78,2 ± 2,2	43,0 ± 1,8	8,5 ± 0,8	6,8 ± 1,0	0,43 ± 0,2

Анализ изложенных в табл. 2 данных показывает, что различия между средними по группам О и К, уровнем завершеного фагоцитоза, БАСК и титрами антител к *A. sobria* 77-18, *A. sobria* 70-24п статистически достоверны ($P < 0,01$), а различия средних титров антител, специфичных к *A. sobria* 70-23п, достоверны с более низкой степенью вероятности ($P < 0,05$). Возрастание некоторых показателей в группе К по сравнению с начальным уровнем (ИИП) объясняется повышением температуры на 8°C. Следует отметить, что наиболее выраженный подъём претерпевают низкоспецифичные факторы защиты (БАСК и фагоцитоз), зависящие, в первую очередь, от физиологического состояния организма рыбы, в то время как различия по интенсивности продукции агглютининов не выходят за рамки статистической ошибки.

По окончании восстановительного периода после взятия крови (14 дней) произведено заражение рыб внутримышечной инъекцией смывом суточных агаровых культур подвижных аэромонад - *A. sobria* 77-18 (гомологичный штамм) и *A. sobria* 70-23п, *A. sobria* 70-24п (гетерологичные штаммы).

Гибель рыбы началась в контрольной группе через 3 дня после заражения штаммом *A. sobria* 77-18. У карпов наблюдали кровоизлияния в белковую оболочку глаз, гиперемии вокруг анального отверстия, припухлости в месте введения бактериальной суспензии. При патолого-анатомическом вскрытии в брюшной полости отмечали наличие кровянистого экссудата и отёк паренхиматозных органов. Позднее начали регистрировать локальное ерошение чешуи и обширное гнойное расплавление тканей в месте инъекции. Подобная клиническая картина была практически у всех

карпов контрольных групп и более чем у половины опытных. При вскрытии погибших рыб отмечали гипотрофию и гиперемию печени и почек, наличие выраженного спячного процесса. Через 24 дня гибель рыб в опытных группах прекратилась и началось активное заживление поражений, развившихся в месте инъекции. Гибель рыб в контрольных группах продолжалась ещё 11 дней. У последних погибших экземпляров был выраженный геморрагический синдром, сопровождавшийся образованием язв.

У выживших в опытных группах карпов регенерация мышечной и покровных тканей в месте инъекции шла заметно быстрее по сравнению с контрольными. Данные по гибели двухгодовалых карпа от экспериментального аэромоноза и вычисленные на их основании индексы защиты (ИЗ), характеризующие протективный эффект бактериина, приведены в табл. 3.

Таблица 3

Индексы защиты испытуемого бактериина, полученные при экспериментальном аэромонозе

Группа рыб	Заражающий штамм	Заражено, экз.	Погибло, экз.	ИЗ
O ₁	<i>A. sobria</i>	10	2	50%
K ₁	70-23п	10	4	
O ₂	<i>A. sobria</i>	10	4	60%
K ₂	77-18	10	10	
O ₃	<i>A. sobria</i>	10	2	67%
K ₃	70-24п	10	6	

Обнаружен протективный эффект как при заражении гомологичным, так и гетерологичными штаммами. Следует учитывать, что индексы защиты получены при максимально жёстком способе заражения - внутримышечном введении высоковирулентных аэромонад. Для заключительных иммунологических исследований выбраны группы, подвергнутые заражению *A. sobria* 70-23п, так как там выжило большее количество рыб. Полученные результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Некоторые иммунологические параметры опытной и контрольной групп рыб, выживших после экспериментального аэромоноза

Группа рыб	Уровень завершенного фагоцитоза, %	БАСК, %	log ₂ обратного титра антител		
			<i>A. sobria</i> 77-18	<i>A. sobria</i> 70-23п	<i>A. sobria</i> 70-24п
O ₁	73,2 ± 2,6	78,0 ± 0,3	18,5 ± 0,5	13,1 ± 1,4	5,6 ± 0,5
K ₁	39,4 ± 4,1	24,0 ± 1,8	4,3 ± 1,9	11,6 ± 0,2	4,0 ± 0,3

Анализ полученных данных указывает на то, что в опытной группе средние значения всех исследованных показателей достоверно выше, чем в контрольной ($P < 0,01$). При сравнении результатов, полученных до и после заражения, установили, что у вакцинированных карпов после перенесенного экспериментального аэромоноза произошло сильное повышение уровня БАСК (на 165%), которое можно объяснить появлением специфических ко всем трем использованным антигенам антител в высоких титрах (до 1:262144) и незначительное (на 18%) снижение уровня завершено фагоцитоза. В контрольной группе наблюдается сильное снижение всех неспецифических иммунных показателей (почти в 2 раза). Значительное увеличение претерпевает только интенсивность синтеза антител, специфических к заражающему штамму (*A sobria* 70-23п). Данная ситуация может объясняться тяжело перенесенным заболеванием, сильно истощившим ресурсы организма, необходимые для продукции иммунных факторов, и возникшими физиологическими дисфункциями. В то же время антитела, продуцированные во время борьбы с инфекцией, сохранились в высоких титрах, что положительно характеризует иммуногенные свойства бактериина.

2.3.3. Испытания бактериина в условиях интенсивного прудового рыбоводства. Параллельно с экспериментальными исследованиями испытания иммуногенных и протективных свойств вакцины вели в опытно-производственных условиях, на интенсивно эксплуатируемых нагульных прудах малой площади (0,5-0,61 га). Вакцинацию проводили в транспортировочных емкостях при перевозке рыб в нагульные или зимовальные пруды, что практически сводило на нет дополнительные трудовые затраты на обработку рыбы бактерином. Длительность контакта рыб с вакциной по техническим причинам могла варьировать в пределах от 15 до 25 мин.

При зарыблении двух экспериментальных нагульных прудов №4 и 5 было отобрано 210 экз. карпов, вакцинированных весной 2002 г. Все рыбы были без клинических признаков, средней массой 850 г. Из этой выборки 10 экз. подвергнуты иммунологическим, патолого-анатомическим и микробиологическим исследованиям, а остальные - ревакцинированы, помечены и по 100 экз. рассажены в экспериментальные пруды (группа Р). Затем нами было отобрано 810 экз. равноразмерных карпов того же возраста, ранее выращиваемых на ЭПО "Якать". Для дальнейших исследований оставлено 10 экз., из оставшихся рыб 200 карпов вакцинированы, помечены и размещены по 100 экз. в пруды №4 и 5 (группа В). Для доведения плотности посадки рыбы до нормативной в эти же пруды поровну были рассажены оставшиеся 600 экз. двухгодовиков (группа К). Вакцинация рыбы была проведена при температуре воды 13°C. Данные, полученные при исследовании рыб до вакцинации, представлены в табл. 5 и 6.

Таблица 5

Патолого-анатомическая картина, уровень обсемененности паренхиматозных органов и характеристика микробиоценоза ранее вакцинированных и интактных карпов весной 2003 г.

Группа рыб	Патолого-анатомическая картина	Уровень контаминации	Выделенная микрофлора, ДНК-азная активность аэромонад, мм
Вакцинированные	У 100% рыб - печень и почки рыхлые, незначительно гиперемированные. Слизистая кишечника рыхлая	У 100% рыб - роста нет	-
Интактные	У 100% рыб - выраженный спаечный процесс в брюшной полости. Печень и почки рыхлые, гиперемированные. Слизистая кишечника рыхлая с очаговыми кровоизлияниями	30% - роста нет, 50% - единичн., 10% - умерен., 10% - сливной	32% - <i>A. sobria</i> (0-2,5), 38% - <i>A. sp.2</i> (1-1,5), 14% <i>A. caviae</i> (0,5-2), 6% - <i>A. sp. 8</i> (3), 5% - <i>A. sp. 7</i> (2), 5% - <i>A. schubertii</i> (0,5)

Таблица 6

Характеристика напряженности специфического иммунитета ранее вакцинированных и интактных карпов весной 2003 г.

Группа рыб	\log_2 обратного титра антител	
	<i>A. sobria</i> 77-18	<i>A. sobria</i> 55-15п
Вакцинированные	$8,0 \pm 0,4$	$6,0 \pm 1,4$
Интактные	$3,6 \pm 0,4$	$3,3 \pm 1,9$

Различия между средними показателями по группам статистически достоверны ($P < 0,01$) для обоих антигенов. Положительное влияние бактериина на синтез антител продолжает сказываться даже по прошествии года.

На протяжении всего летнего периода бактериальная обсемененность воды в обоих прудах находилась в пределах 220 - 960 КОЕ/мл. Повышение ОМЧ воды до 1240 КОЕ/мл в пруду №5 и до 3740 КОЕ/мл в пруду №4, наблюдаемое в конце рыбоводного сезона, объясняется накоплением в водоёмах органики. В микробиоценозах в течение всего вегетационного периода доминировали подвижные аэромонады и бактерии группы кишечной палочки. Гибели рыб в опытных прудах или появления клинических признаков не наблюдали.

Заключительные исследования были проведены во второй половине октября. Зимовальный пруд, куда в конце сентября были пересажены трёхлетки из прудов №4 и 5, был частично обловлен. Методом случайной выборки из каждой группы

(Р, В, К) было отобрано по 20 экз. Вся отобранная рыба была без клинических признаков и значительных патологических изменений во внутренних органах. При микробиологическом исследовании контрольной рыбы обнаружено, что у 80% карпов паренхиматозные органы (печень и почки) были обсеменены единичными аэромонадами, в то время как в вакцинированной и ревакцинированной группах роста микрофлоры в посевах внутренних органов рыб не выявлено. Результаты, полученные при проведении исследования некоторых иммунологических показателей карпов вышеперечисленных групп, представлены в табл. 7.

Таблица 7

Характеристика иммунологических показателей карпов ревакцинированной (Р), вакцинированной (В) и контрольной (К) групп 22.10.03 г.

Группа рыб	Уровень завершеного фагоцитоза, %	БАК, %	log ₂ обратного титра антител	
			A. sobria 77-18	A. sobria 55-15п
К	44,9 ± 5,8	26,6 ± 1,3	6,8 ± 0,3	5,8 ± 0,6
В	65,0 ± 4,6	50,5 ± 0,5	11,2 ± 0,6	7,4 ± 0,6
Р	73,6 ± 4,0	55,5 ± 0,7	11,8 ± 0,2	7,6 ± 0,6

Различия между средними по группам иммунологическими показателями статистически достоверны (P < 0,01). Исключение составляют титры агглютинирующих антител в ревакцинированной и вакцинированной группах, различия между которыми несущественны. По сравнению с весенним уровнем титры антител значительно возросли во всех группах, что объясняется высоким иммуно-физиологическим статусом рыб после летнего нагула. Выявлено существенное положительное влияние ревакцинации на напряженность антибактериального иммунитета рыб, что позволяет рекомендовать ее для двухлеток при трехлетнем обороте.

2.3.3. Испытания бактерии в условиях тепловодного садкового хозяйства проходили на садковом рыбоводном участке «Нептун» НТЦ «Селекцентр». По предварительным данным, в хозяйстве во время второго года выращивания товарного карпа регулярно регистрировали язвенные поражения более, чем у 20% особей.

Работы в хозяйстве начаты с формирования двух групп по 500 экз. равноразмерных годовиков карпа без клинических признаков, одна из которых подверглась вакцинации при температуре 15°C, а другая осталась в качестве контроля.

При вскрытии годовиков, проведенном до вакцинации у всех обследованных рыб наблюдали патологические изменения внутренних органов. Из паренхиматозных органов всех рыб выделены единичные аэромонады. Двухгодовики с изъязвлениями на поверхности тела имели гипотрофированную рыхлую печень с массивными жировыми прослойками, в почках наблюдали застойную гиперемию, а их ткань имела рых-

люю консистенцию. Тем не менее, рост бактериальной флоры в посевах взятого от них материала не обнаружен, т.е. язвообразование не сопровождалось септическим процессом.

В начале июля было отмечено язвообразование у рыб как в опытной, так и в контрольной группах. В середине июля был произведен осмотр всех карпов из групп В и К. У 13,4% рыб опытной группы отмечены язвенные поражения на поверхности тела и изредка - на жаберных крышках, не сопровождавшиеся проявлением каких-либо других болезненных симптомов. В контрольной группе карпов с аналогичной клинической картиной было 19,4 %. Гибель рыб ни в одной группе за время наблюдения не отмечена.

Патолого-анатомическое вскрытие 10 экз. рыб из каждой группы установило сходные патологические изменения во внутренних органах у всех 20-ти рыб. Печень была бледная, с массивными жировыми прожилками, гипотрофированная. Почки увеличенные, а их ткань рыхлая, селезёнка увеличена. Микробиологические характеристики карпов групп В и К представлены в табл. 8, основные параметры микробиоценоза воды - в табл. 9.

Таблица 8

Характеристика микробиоценоза карпов вакцинированной (В) и контрольной (К) групп

Группа рыб	Уровень контаминации	Микробиоценоз и ДНК-азная активность аэромонад (мм)
В	9 экз. – роста нет, 1 экз. – единичн. рост	A. sp.2 (2 – 5)
К	7 экз. – роста нет, 2 экз. – единичн. рост, 1 экз. – умерен. рост	80% A. sp.2 (2 - 3), 20% A. schubertii (4)

Таблица 9

Характеристика микробиоценоза воды водоёма–охладителя и садковой линии рыбоводного участка "Нептун" 15.07.03 г.

Место отбора проб	ОМЧ в КОЕ/мл	Микробиоценоз и ДНК-азная активность аэромонад (мм)
Водоём-охладитель	360	60% - A. schubertii (3), 20% - A. sobria (2), 20% - Acinet. calcoaceticus
Садок 21 (с опытной рыбой)	400	60% - A. sobria (1 - 5), 20% - A.sp. 2 (3,5), 20% - БГКП
Садок 9 (с контрольной рыбой)	780	80% - Acinet. calcoaceticus, 20% - A.sp. 3 (1)

Анализ данных, полученных в ходе проведённых исследований, позволил однозначно отклонить предположение об эпизоотическом неблагополучии хозяйства по БГС. О небактериальной этиологии язвенного синдрома у рыб однозначно говорили результаты микробиологических исследований, а клиническая картина была нехарактерной для септицемии, вызванной грамнегативными бактериями, в то время как патолого-анатомическая картина могла свидетельствовать о наличии токсического фона в воде.

Окончательный учёт результатов опыта произведен во второй половине сентября. При осмотре 20 экз. карпов опытной группы клинических признаков не обнаружено, в то время как 3 рыбы из 20-ти, взятых из контроля, имели незначительные изъязвления на поверхности тела и у 6-ти наблюдалась гиперемия брюшка. Средняя масса рыб в опытной группе составляла 1540 г, а в контрольной - 1305 г. При вскрытии карпов, из опытной и контрольной групп, помимо больших количеств полостного жира и гипотрофии печени, значительных патологических отклонений во внутренних органах не обнаружено.

Из паренхиматозных органов карпов опытной группы у 20% выделены единичные аэромонады, ацинетобактеры и представители сем. *Enterobacteriaceae*. В контрольной группе контаминированными оказались внутренние органы 40% обследованных рыб. От них выделялись единичные аэромонады и неферментирующие щелочеобразователи. При проведении иммунологических исследований выявлено, что средние показатели в группе вакцинированных карпов были достоверно выше ($P < 0,01$) аналогичных показателей в контрольной группе (табл. 10).

Таблица 10

Иммунологические показатели двухлеток карпа групп В и К
рыбоводного участка "Нептун"

Группа рыб	Уровень завершённого фагоцитоза, %	БАСК, %	\log_2 обратного титра антител	
			<i>A. sobria</i> 77-18 (гомологичный)	<i>A. sobria</i> 48-12гч (гетерологичный)
В	30,2 ± 3,2	62,6 ± 1,6	10,8 ± 0,2	7,6 ± 0,2
К	16,3 ± 3,5	очень низкая	8,4 ± 0,6	6,2 ± 0,6

Более высокая напряженность неспецифического иммунитета, сформировавшаяся под действием вакцины, обеспечила большую резистентность организма рыб к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды и, как следствие, меньший процент поражённых особей. Различия в средней массе рыб опытной и контрольной групп составили 235 г.

2.4. Обобщение и оценка результатов исследования

Для компенсации воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды при выращивании рыбы все более широкое применение находят пробиотики. Нами для неспецифической иммунопрофилактики БГС карпа в условиях интенсивного прудового рыбоводства использовался субалин.

Испытания препарата, проведенные в экспериментальных условиях, выявили его способность оказывать пробиотический эффект на пойкилотермных животных. При кормлении рыб с субалином установлены более высокие темпы их роста - на 43,8% выше, чем в контроле. Получен индекс защиты - 100% при экспериментальном аэромонозе. Причем следует отметить, что инфекционный процесс у карпов, получавших пробиотик, протекал доброкачественно, болезнь не переходила в хроническую форму и не вызывала гибели рыбы.

Испытания препарата в опытно-производственных условиях проходили на фоне высокого уровня бактериального прессинга на выращиваемую рыбу. Внутренние органы большинства карпов были контаминированы условно-патогенными микроорганизмами; зачастую имеющая место инфекция была клинически выражена. Кормление рыб с субалином во всех случаях в течение ближайшего времени приводило к исчезновению клинических признаков и нормализации состояния внутренних органов.

Необходимо отметить, что в ряде случаев применение пробиотика не позволило добиться полной деконтаминации внутренних органов 100% рыб. Анализ фактического материала показывает, что этот эффект мало зависит от параметров микробиоценоза прудовой воды, определяющих уровень бактериального прессинга, а в первую очередь связан с колонизационной активностью действующего начала препарата - жизнеспособными спорами *Bac. subtilis*. Необходимо отметить, что сохранение микрофлоры во внутренних органах у значительного количества обследованных рыб сопровождается большим процентом отрицательных проб на приживаемость субалина в кишечнике. Пробиотический эффект субалина может быть сильно снижен сокращением сроков профилактического кормления карпов, недостаточным количеством препарата в корме или его неравномерным распределением, неудовлетворительным качеством комбикорма.

Улучшение физиологического состояния при кормлении рыб с субалином подтверждают данные иммунологических исследований. В группах разновозрастных карпов, проходивших в течение рыбоводного сезона несколько курсов профилактического кормления, наблюдали усиление, по сравнению с контрольными группами, продукции специфических антител.

Нами проведены испытания бактериина, приготовленного из цельных формализованных клеток штамма *A sobria* 77-18 - облигатного патогена рыб, выделенного при естественной вспышке аэромоноза. При экспериментальном заражении карпов вирулентными подвижными аэромонадами показано, что вакцина защищает как от гомологичного, так и от гетерологичных штаммов. В группах вакцинированных рыб наблюдали качественно иное: доброкачественное течение инфекции. Болезнь не переходила в хроническую форму, зараженные рыбы быстрее выздоравливали, у них интенсивнее шли процессы регенерации поврежденных тканей.

Следует отметить различия в биологических свойствах факультативно и облигатно патогенных аэромонад. Штаммы *A sobria* 70-23п и *A sobria* 70-24п, выделенные от карпов без клинических признаков, несмотря на индуцированную вирулентность, не вызвали гибели 100% рыб в контрольных группах, в то время как все невакцинированные карпы, зараженные *A sobria* 77-18, погибли.

Таким образом, можно говорить о высоком уровне протективного эффекта, оказываемого бактерином. При менее жестком способе заражения и меньшей заражающей дозе, возможно получение еще более высоких индексов защиты. Их различия, учитывая малочисленность опытных и контрольных групп, не могут быть признаны существенными.

Динамика иммунного ответа, наблюдаемая в опыте, соответствовала изложенным в литературе данным. На 9-й день после вакцинации в опытных группах рыб наблюдали резкое возрастание всех исследованных иммунологических показателей. Увеличение БАСК и уровня заверченного фагоцитоза в контрольных группах объясняется повышением температуры воды. У выздоравливающих рыб отмечено появление специфических к заражающему штамму антител в очень высоких титрах.

Показано, что обработка рыб бактерином при 12°C, с последующим повышением температуры воды позволяет вакцине оказывать достаточное иммуногенное и протективное действие. Это определяет возможность весенней вакцинации рыб при пересадке в нагульные пруды, до активации водной условно-патогенной микрофлоры.

В хозяйстве, где проходили опытно-производственные испытания бактериина, не регистрировалась клинически выраженная БГС среди культивируемых рыб, в связи с чем оценка протективного эффекта вакцинации по внешним проявлениям болезни невозможна. Поэтому мы использовали не менее информативный в этом плане показатель - уровень контаминации паренхиматозных органов (печени и почки) карпов грамотрицательной микрофлорой и обуславливающий ее уровень бактериального прессинга. При средних значениях ОМЧ воды наблюдается обсемененность внутренних органов интактных рыб, в то время как внутренняя среда организма вакцинированных рыб остается стерильной. В случае очень высокого уровня бактери-

ального прессинга, сопровождающегося наличием дополнительных стрессорирующих факторов, различия по данному параметру могут становиться несущественными. Но патогены, внедрившиеся в организм вакцинированных рыб, в большинстве случаев не повреждают органы и ткани макроорганизма, несмотря на то, что обладают значительной вирулентностью. Микрофлора, контаминирующая органы интактных карпов, значительно менее вирулентна и вызывает латентную инфекцию, сопровождающуюся патологическими изменениями во внутренних органах.

Установлено положительное влияние ревакцинации на некоторые иммунологические показатели карпов (БАСК, фагоцитоз), на основании которого вакцину можно рекомендовать для обработки двухгодовиков карпов перед третьим сезоном выращивания.

Результаты, полученные в ходе испытания вакцины на рыбоводном участке «Нептун» НТЦ "Селекцентр", указывают на ее способность оказывать протективный эффект при язвенном синдроме небактериальной этиологии. Это может быть объяснено возрастанием под действием вакцины уровня БАСК и фагоцитоза, а также системным характером всех защитно-приспособительных реакций организма. Вакцинированная рыба имеет более высокие барьерные функции поверхностей тела и затрачивает значительно меньшее количество энергетических и пластических ресурсов на инактивацию, деструкцию и элиминацию внедрившихся патогенов. Находящиеся в лучшем физиологическом состоянии рыбы активнее сопротивляются любым неблагоприятным воздействиям. В вакцинированной группе на 31% меньше количество рыб с язвенными поражениями и на 235 г больше средняя масса тела карпов.

Обобщая полученный в ходе экспериментальных и опытно-производственных испытаний бактерина из *A sobria* 77-18 материал, можно говорить о получении эффективной вакцины против убиквитарных подвижных аэромонад с иммерсионным способом введения, пригодной для промышленного изготовления и использования в хозяйствах различного типа.

Предложенные иммунопрофилактические мероприятия способны эффективно контролировать эпизоотическую ситуацию по БГС (аэромоназа) карпа и вносить значительный вклад в обеспечение нормального протекания интенсифицированного рыбоводного процесса.

ВЫВОДЫ

1. Испытания пробиотика субалина в аквариальных условиях позволили установить индекс защиты карпов от экспериментального аэромоназа - 100%. Также выявлено положительное влияние препарата на увеличение темпов роста. В условиях тепло-

водного садкового (рыбхоз "Черепецкий") и прудового (ОАО "Бисеровский рыбокомбинат") карповых хозяйств показана высокая эффективность субалина при терапии клинически выраженной БГС.

2. Установлено, что под действием субалина усиливается продукция циркулирующих антител. Иммуностимулирующее действие препарата показано на карпах товарных групп в ОАО "Бисеровский рыбокомбинат" и на сеголетках в рыбхозе "Лотошинский".

3. Кормление рыб с субалином дает выраженный и стабильный эффект деконтаминации внутренних органов рыб, независимо от уровня бактериального прессинга окружающей водной среды.

4. Использование субалина на ОАО «Бисеровский рыбокомбинат» позволило эффективно контролировать эпизоотическую ситуацию по БГС карпа, несмотря на высокую интенсификацию рыбоводного процесса и полностью отказаться от применения антибиотиков и антибактериальных препаратов. Достоверные результаты, положительно характеризующие пробиотический препарат позволяют рекомендовать субалин на основе *Bac. subtilis* 2335 (регистр. № ВКПМ В-4759) для профилактики БГС рыб в условиях интенсивного прудового рыбоводства.

5. При экспериментальном испытании бактерина из *A sobria* штамма 77-18 получены высокие индексы защиты при внутримышечном заражении карпов гомологичным и гетерологичными штаммами вирулентных подвижных аэромонад.

6. Установлено, что пониженные температуры воды (не менее 12°C) не оказывают отрицательного влияния на эффективность вакцинации и формирование карпом приобретенного иммунитета, что определяет возможность весенней вакцинации рыб.

7. Испытания бактерина в опытно-производственных условиях выявили его высокие иммуногенные и протективные свойства.

8. Установлено положительное влияние вакцины на прирост массы тела товарных карпов в условиях хозяйства неблагополучного по язвенному синдрому небактериальной этиологии (рыбоводный участок "Нептун"). На основании публикаций ряда отечественных исследователей этот факт объяснен тем, что вакцинированная рыба способна затрачивать больше пластических и энергетических ресурсов, получаемых с кормом, на продукционный рост, не тратя их на элиминацию внедрившихся патогенов.

9. Методика проведения вакцинации, используемая нами, увязывает ее с биотехнологическими рыбоводными мероприятиями и практически сводит на нет трудовые затраты на дополнительную обработку рыбы.

10. Данные, положительно характеризующие протективный и иммуногенный эффект, оказываемый вакциной, позволяют рекомендовать препарат для специфической иммунопрофилактики БГС рыб.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Бычкова Л.И., Гаврилин К.В., Сулова И.А. Разработка бактериина для групповой вакцинации рыб против аэромоназа // Мат-лы докл. науч.-практ. конф. "Проблемы и перспективы развития аквакультуры в России". - Адлер.: Здравствуйте, 2001. - С. 181.

2. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Головин П.П., Головина НА, Бычкова Л.И., Гаврилин К.В., Сулова ИА Протективное действие субалина против болезней культивируемых рыб // Мат-лы докл. науч.-практ. конф. "Проблемы и перспективы развития аквакультуры в России". - Адлер.: Здравствуйте, 2001. - С. 282-283.

3. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Бычкова Л.И., Гаврилин К.В. Этиологическая структура аэромонад и эпизоотическая ситуация в рыбоводных хозяйствах // Рыбн. хоз.-во. Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре. Аналит. и реф. информ. М.: ВНИЭРХ. - 2001. - Вып. 4. - С. 1-9.

4. Гаврилин К.В. Опыт борьбы с бактериальной геморрагической септициемией (БГС) в условиях декоративной аквариумистики // Мат-лы Межд. науч.-практ. конф. молодых ученых "Проблемы аквакультуры и функционирования водных экосистем". - Киев, 2002. - С. 147-149.

5. Гаврилин К.В., Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И. Влияние факторов окружающей среды на микробиоценоз рыбоводных прудов // Мат-лы Межд. науч.-практ. конф. "Аквакультура начала XXI века: истоки, состояние, стратегия развития". - М.: ВНИРО, 2002. - С. 282-285.

6. Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И., Гаврилин К.В. Испытания лечебного комбикорма с субалином в рыбхозах Московской области // Рыбн. хоз.-во. Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре. Аналит. и реф. информ. М.: ВНИЭРХ. - 2002. - Вып. 2. - С. 18-27.

7. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Бычкова Л.И., Гаврилин К.В. Этиологическая структура аэромонад и её влияние на развитие эпизоотического процесса // Мат-лы Межд. науч.-практ. конф. "Аквакультура начала XXI века: истоки, состояние, стратегия развития". - М.: ВНИРО, 2002. - С. 240-244.

8. Гаврилин К.В., Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И. Специфическая иммунопрофилактика аэромонадной инфекции карпа (*Cyprinus carpio L*) // Тез. докл. Всерос. науч.-

практ. конф. "Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов". - М.: Россельхозакадемия, 2003. - С. 24-25.

9. Хомяков Ю.Н., Хомякова Т.И., Борзенкова Т.К. Борзенков В.Н., Гаврилин К.В., Юхименко Л.Н., Северин СЕ. Исследование вирулентности штаммов *A hydrophila*, полученных из разных природных источников // Междунар. конгресс "Ликвидация и элиминация инфекционных болезней - прогресс и проблемы". - С.-Петербург.: Ин-т Пастера, 2003. - С. 120.

10. Юхименко Л.Н., Гаврилин КВ., Бычкова Л.И. Химиотерапия бактериальных болезней рыб, достоинства и недостатки // Сб. тез. Всерос. науч.-практ. конф. "Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов". - М.: Россельхозакадемия, 2003. - С. 142-143.

Отпечатано в Полиграф-агентстве «Литера». Подп. к печати 22.03.04г. Объем 1,5 д.л. Тираж 100 экз.
Печать листовок, брошюр, авторефератов, буклетов: (095) 198-70-53, e-mail: litra@crosna.net

42 - 6158