

**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ  
«НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР НАЦИОНАЛЬНОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ ПО ЖИВОТНОВОДСТВУ»**

**УДК 639.303.45**

**ШУМСКИЙ  
КОНСТАНТИН ЛЕОНАРДОВИЧ**

**ОЦЕНКА, СОХРАНЕНИЕ КАЧЕСТВА И ПОВЫШЕНИЕ  
ОПЛОДОТВОРЯЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СПЕРМЫ  
ОСЕТРОВЫХ РЫБ ПРИ ИСКУССТВЕННОМ ОПЛОДОТВОРЕНИИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание  
ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук  
по специальности 06.04.01 – рыбное хозяйство и аквакультура

**Жодино, 2021**

Работа выполнена в Учреждении образования «Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия»

**Научный  
руководитель:**

**Барулин Николай Валерьевич** - кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, заведующий кафедрой ихтиологии и рыбоводства УО «Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия».

**Официальные  
оппоненты:**

**Козлова Тамара Васильевна** – доктор сельскохозяйственных наук, доцент, профессор кафедры микробиологии и эпизоотологии УО «Гродненский государственный аграрный университет»;

**Астренков Андрей Валерьевич** – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры промышленного рыбоводства и переработки рыбной продукции УО «Полесский государственный университет».

**Оппонирующая  
организация:**

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»

Защита состоится «25» июня 2021 г. в «10.00» часов на заседании совета по защите диссертаций Д 01.49.01 при РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» по адресу: 222163, Республика Беларусь, Минская область, г. Жодино, ул. Фрунзе, 11, тел.: (01775) 6-74-66, факс: (01775) 6-87-83, e-mail: belniig@tut.by

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству».

Автореферат разослан «24» мая 2021 г.

Ученый секретарь совета  
по защите диссертаций

А.А. Музыка

## ВВЕДЕНИЕ

Государственной программой развития аграрного бизнеса на 2016–2020 годы было предусмотрено значительное увеличение объемов выращивания товарной рыбы, в том числе и за счет увеличения доли ценных видов рыб, выращивание которых является одним из направлений повышения экономической эффективности аквакультуры. Успешная разработка технологий выращивания таких объектов аквакультуры, как различные виды осетровых и их гибриды, канальный и клариевый сомы, тилапии и др. позволит повысить эффективность работы промышленных рыбоводных хозяйств (Т.В. Козлова, 2014).

Критическое снижение численности осетровых рыб в естественных условиях приобрело общемировую проблему. Одним из способов решения этой проблемы является аквакультура.

В настоящее время репродуктивная функция осетровых рыб, особенно в промышленных условиях, снижается. В этой связи технология искусственного воспроизводства осетровых нуждается в постоянном совершенствовании. Успех оплодотворения высоко зависит от подвижности сперматозоидов, поэтому стимулирование этого параметра будет способствовать совершенствованию методов искусственного оплодотворения. Современные методы компьютерной диагностики качества спермы позволяют проводить точные исследования.

В технологии искусственного воспроизводства осетровых рыб важным моментом является период хранения спермы, поскольку этого требуют различные технологические ситуации (задержка созревания самок, необходимость транспортировки и др.). Известным способом хранения спермы является ее криоконсервация. Однако криоконсервация может значительно снизить качество сперматозоидов. По этой причине перспективным является разработка методов повышения периода краткосрочного хранения спермы осетровых рыб.

Изучение методов оценки, сохранения качества и повышения оплодотворяющей способности спермы является актуальным направлением исследований в области практической аквакультуры.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Связь работы с крупными научными программами, темами.** Тема диссертационной работы соответствовала приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 годы (Постановление Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 № 190): пункт 00009 – «Агропромышленный комплекс и продовольственная безопасность», является частью научных исследований кафедры ихтиологии и рыбоводства УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия» и выполнялась в рамках фи-

нансирования Республиканского централизованного инновационного фонда (номер проекта 375; 2015 г.) – «Разработка рыбоводно-технологической документации формирования ремонтно-маточных стад для икорного осетроводства с применением инновационных методов» (номер госрегистрации 20160330);

За актуальность и значимость полученных результатов соискатель был отмечен дипломом победителя конкурса «Лучший молодежный инновационный проект» УО БГСХА (2017 г.).

**Цель и задачи исследований.** Цель диссертационной работы заключалась в разработке методов оценки, сохранения качества и повышения оплодотворяющей способности спермы осетровых рыб при искусственном оплодотворении.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

- определить оптимальные референтные значения подвижности сперматозоидов для метода компьютерного автоматического анализа спермы (CASA), в племенной оценке самцов-производителей осетровых рыб в искусственном оплодотворении при содержании в установках замкнутого водоснабжения;

- выявить влияние на качественные показатели спермы осетровых рыб различных кислородных и температурных режимов в период краткосрочного хранения;

- определить влияние консервирующих веществ на период краткосрочного хранения спермы осетровых рыб;

- установить оптимальные технологические параметры краткосрочного хранения спермы осетровых рыб, сохраняющие оплодотворяющую способность сперматозоидов продолжительный период;

- разработать методический прием повышения оплодотворения икры, выживаемости эмбрионов, предличинок, личинок осетровых рыб за счет деактивации аномальных и слабо подвижных сперматозоидов при искусственном оплодотворении.

Объектом исследований являлись сперма сибирского осетра, русского осетра, стерляди, гибридов бестер и РО×ЛО, оплодотворенная икра (эмбрионы), предличинки, личинки, мальки, сыворотка крови.

Предмет исследований – изменение параметров подвижности сперматозоидов осетровых в условиях краткосрочного хранения при различных условиях внешней среды.

#### **Научная новизна.**

1. Впервые в практике аквакультуры определены оптимальные референтные значения подвижности сперматозоидов для метода компьютерного автоматического анализа спермы (CASA) при искусственном оплодотворении, в племенной оценке самцов-производителей осетровых рыб культивируемых в индустриальных рыбоводных хозяйствах.

2. Разработаны новые технологические параметры краткосрочного хране-

ния спермы осетровых рыб, включающие разбавление (1:10), добавление консервантов (борная кислота (500 мг/л) или винная кислота (125 мг/л), оксигенацию и охлаждение (до 5 °С), сохраняющие оплодотворяющую способность сперматозоидов до 20 суток.

3. Впервые в практике аквакультуры разработан методический прием повышения оплодотворения икры, выживаемости эмбрионов, предличинок, личинок осетровых рыб за счет деактивации аномальных и слабоподвижных сперматозоидов при искусственном оплодотворении.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Новые референтные значения оценки подвижности сперматозоидов осетровых рыб (сибирский и русский осетры, гибриды бестер и РО×ЛО, стерлядь), включающие нормативные значения криволинейной скорости, прямолинейной скорости, скорости вдоль усредненной траектории, среднего угла смещения, отличающиеся делением на классы (А, В, С, D) и соотношением классов, что позволяет их использовать в технологии искусственного оплодотворения в методике компьютерного автоматического анализа спермы (CASA).

2. Новый методический прием качественной оценки спермы осетровых рыб в период ее краткосрочного хранения, отличающийся углубленным изучением морфологических, биохимических и динамических параметров, что позволяет выявлять увеличение доли агглютинации стадий А3, В2, С2, D1, Е2, индекса тератозооспермии до 0,21 пунктов, индекса дефективности сперматозоиды до 0,71 пунктов, антиоксидантной активности, снижение криволинейной скорости до 54,10 %, подвижности до 58,78 %.

3. Новые технологические параметры сохранения качества спермы осетровых рыб, включающие разбавление (1:10), добавление консервантов (борная кислота (500 мг/л) или винная кислота (125 мг/л), оксигенацию и охлаждение (до 5 °С), что позволяет повысить период использования спермы в технологии искусственного оплодотворения, отличающиеся сохранением оплодотворяющей способности сперматозоидов до 20 суток.

4. Новый методический прием повышения оплодотворяющей способности спермы осетровых рыб, заключающийся в деактивации аномальных и слабоподвижных сперматозоидов при искусственном оплодотворении, за счет регулирования концентрации осеменяющего раствора и интервала между активацией сперматозоидов и моментом искусственного оплодотворения, отличающийся повышением оплодотворения икры (на 8–12 %), что обеспечивает выживаемость эмбрионов (на 7–9 %), предличинок (на 8–10 %), личинок (на 11–15 %) рыб и позволяет получить более высокий экономический эффект.

**Личный вклад соискателя ученой степени.** Диссертационная работа выполнена лично автором и является результатом законченных научных исследований по рыбоводно-биологическому обоснованию новых и усовершенствованных

ванных методов оценки, сохранения качества и повышения оплодотворяющей способности спермы осетровых рыб при искусственном оплодотворении. Личный вклад автора состоял в организации и проведении опытов, регистрации и сборе всех результатов исследований, их биометрической обработке, анализе и публикации полученных результатов. Научным руководителем Барулиным Н.В. была обоснована цель и задачи диссертационных исследований, разработана методика исследований и оказывалось содействие при проведении биохимических исследований.

Вклад автора в публикации [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11] заключался в организации и проведении опытов, регистрации и сборе всех результатов исследований, их биометрической обработке, анализе и подготовке проекта рукописи. Вклад автора в публикацию [10] заключался в предоставлении результатов собственных исследований, как составной части публикации. Вклад соавтора Барулина Н.В. в публикации [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11] заключался в обсуждении полученных результатов и в редактировании проекта рукописи публикации. Вклад соавтора В. А. Герасимчика в публикацию [8] заключался в обсуждении полученных результатов. Вклад соавтора Усова М.М. в публикации [6] заключался в обсуждении полученных результатов и в редактировании проекта рукописи публикации. Вклад соавтора Барулина Н.В. в публикацию [10] заключался в обобщении результатов исследований. Вклад других соавторов в публикацию [10] заключался в предоставлении или обсуждении своей части исследований как составной части публикации.

**Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов.** Основные результаты исследований были доложены и обсуждены на Международной научно-практической конференции «Аквакультура осетровых: современные тенденции и перспективы» (Херсон, 2016), VI Международной научной конференции молодых ученых Сети центров аквакультуры стран Центральной и Восточной Европы (Горки, 2017); Юбилейной международной научно-практической конференции, посвященной 60-летию РУП «Институт рыбного хозяйства» (Минск, 2018), заседании научно-технического совета УО БГСХА по зоотехнии и ветеринарной медицине (Горки, 2020).

**Опубликование результатов диссертации.** По результатам диссертационной работы опубликовано 11 научных работ общим объемом 26,61 авторского листа (13,22 авторского листа принадлежит автору). Из них: 1 монография объемом 10,23 авторского листа (8,18 авторского листа принадлежит автору); 7 статей в научных изданиях, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, общим объемом 3,15 авторского листа (2,76 авторского листа принадлежит автору); 1 – в материалах конференций общим объемом 0,2 авторского листа (0,17 авторского листа принадлежит автору); рекомендации «Рекоменда-

ции по воспроизводству осетровых рыб в рыбоводных индустриальных комплексах с применением инновационных методов» и «Рекомендации по регулированию качества спермы осетровых рыб в технологии искусственного размножения».

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, основной части из трех глав (аналитический обзор литературы, материал и методика исследований, результаты исследований), заключения, библиографического списка и приложений. Полный объем диссертации составляет 150 страниц. В состав работы включено 20 таблиц, 76 рисунков и 7 приложений общим объемом 78 страниц. Библиографический список, общим объемом 21 страница, включает 266 наименований литературы, в том числе 223 на английском языке и 11 публикаций соискателя.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

**Аналитический обзор литературы.** В аналитическом обзоре литературы представлен литературный обзор по теме диссертации, отражено современное состояние мировой аквакультуры осетровых, отражены особенности искусственного воспроизводства осетровых рыб, описаны особенности биологии спермы и оценки ее качественных показателей. Проанализированы экспериментальные сведения о подвижности и энергетике сперматозоидов и влияющих на это факторов. Отражены основные способы хранения спермопродукции.

**Материал и методика исследований.** Экспериментальные исследования по теме диссертационной работы выполнялись на базе кафедры ихтиологии и рыбоводства и рыбоводных хозяйств, работающих по технологии замкнутого водоснабжения: фермерское хозяйство «Василек» (Минская область), рыбоводный индустриальный комплекс УО БГСХА (с 2017 г. – рыбоводный индустриальный комплекс ОАО «Форелевое хозяйство «Лохва» (Могилевская область)), ООО «Фирма «Ремона» (г. Могилев), а также в прудовых хозяйствах ОАО «Рыбхоз Волма» (Минская область) и ОАО «Опытный рыбхоз «Селец» (Брестская область). Лабораторные исследования выполнялись в лабораториях кафедры ихтиологии и рыбоводства УО БГСХА. Исследования проводились в период 2014–2019 гг. согласно схеме исследований (рисунок 1).

В качестве объекта исследований была выбрана сперма самцов 5 видов и гибридов осетровых рыб, таких как сибирский осетр ленской популяции (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869), русский осетр (*A. gueldenstaedtii*, Brandt, 1833), стерлядь (*A. ruthenus*, Linnaeus, 1758), гибрид бестер (*Huso huso* × *A. ruthenus*), гибрид РО×ЛО (*A. gueldenstaedtii* × *A. baerii*). Объем получаемой пробы спермы составлял в среднем 100 см<sup>3</sup>. Выделение сыворотки из пробы для разбавления спермы до необходимой концентрации проводили методом центрифугирования

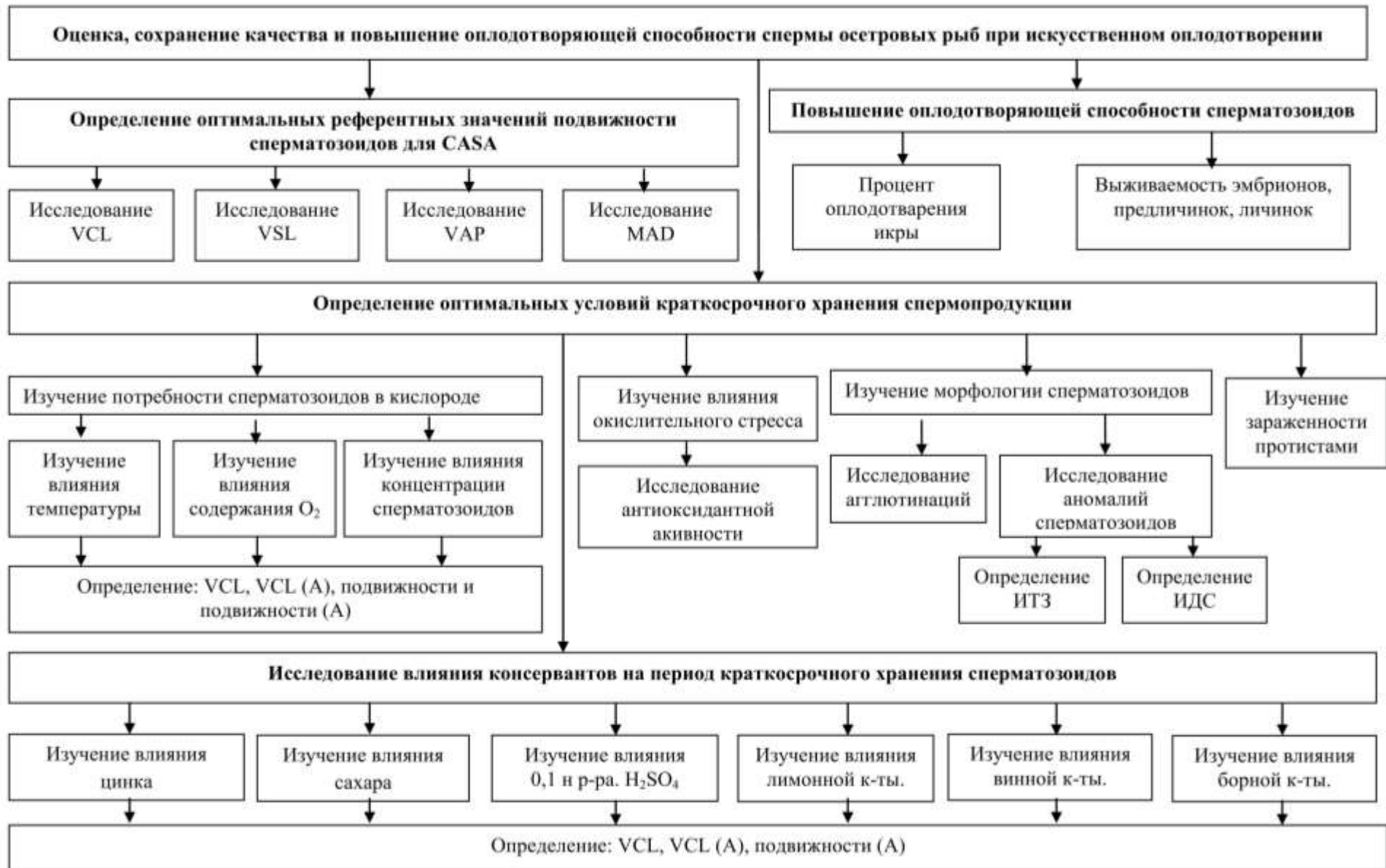


Рисунок 1. – Общая схема исследований



(2 мин при 800 об/мин, затем 10 минут при 3500 об/мин).

Для исследования подвижности сперматозоидов использовалась система CASA, состоящая из тринокулярного электронного микроскопа (ММС-KZ-900) с камерой для микроскопии (ММС-31C12-M) и персонального компьютера с автоматизированным программным обеспечением ММС Сперм с последующим анализом данных в программе ImageJ. Для анализа подвижности использовались одноразовые счетные стекла Leja с четырьмя камерами глубиной 10 микрон (точность  $\pm 5\%$ ) и объемом около 1 мкл.

В процессе краткосрочного хранения было изучено морфологическое строение сперматозоидов. Для изучения морфологии осуществлялось окрашивание сперматозоидов по методу Diff-Quick. Были рассчитаны индекс тератозооспермии (отношение суммарного числа дефектов к числу сперматозоидов с дефектами) и индекс дефектности сперматозоидов (отношение суммарного числа дефектов к числу подсчитанных сперматозоидов).

В ходе проведения опытов была исследована антиоксидантная активность спермоплазмы. Для количественного определения антиоксидантной активности использовался набор реагентов «ОксиСтат». В ходе данного исследования в качестве консервантов и антиоксидантов с целью увеличения срока хранения спермопродукции использовались следующие химические вещества: этиловый спирт ( $C_2H_5OH$ ), сахароза ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), борная кислота ( $H_3BO_3$ ), лимонная кислота (винная кислота (ульфат цинка ( $ZnSO_4$ ), серная кислота (0,1 Н раствор) ( $H_2SO_4$ )).

Для проведения исследований по применению антиоксидантов были сформированы контрольная группа, в которой сперма разбавлялась в сыворотке без добавления консерванта, и опытные группы, в которых сперма разбавлялась в сыворотке с добавлением консервантов в различных концентрациях.

При исследовании влияния борной кислоты на качественные и количественные показатели спермы были сформированы опытные группы, в которых сперма разбавлялась в сыворотке с добавлением кислоты в концентрациях – 125, 250, 500, 1000 мг/л, цинка (в форме сульфат цинка) в концентрациях – 125, 250, 500, 1000 мг/л, винной кислоты в концентрациях – 125, 250, 500, 1000 мг/л, спирта (технический этанол) в концентрациях – 1, 2, 3, 4, 5 %, сахара в концентрациях – 125, 250, 500 мг/л,  $H_2SO_4$  (0,1 Н) в концентрациях – 10, 50, 100 мг/л, лимонной кислоты в концентрациях – 125, 250, 500 мг/л. Затем сперма помещалась в пробирки типа Eppendorf для хранения в холодильнике. Тестирование оплодотворяющей способности спермы проводилось в чашках Петри.

Для статистической обработки результатов использовали программную среду R, включая пакеты R Commander, MASS, ggplot2, mgcv, drc, corrplot и др. Статистическую достоверность различий оценивали по тесту Тьюки при условии соблюдения нормальности распределения данных (тест Шапиро–Уилка) и

однородности групповых дисперсий (тест Ливина). При несоблюдении указанных условий использовали непараметрический тест Ньюмена–Кейлса.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**Результаты определения оптимальных референтных значений подвижности сперматозоидов осетровых рыб для метода компьютерного автоматического анализа спермы (CASA).** Была собрана сперма и проанализирована подвижность сперматозоидов от 5 видов и гибридов осетровых рыб, таких как русский осетр, сибирский осетр, стерлядь, гибрид бестер, гибрид РО×ЛО. Суммарное количество проб составило 200 шт. При определении референтных (нормативных) значений учитывались результаты самцов, у которых результаты оплодотворяющей способности равнялись или превышали установленные нормативные значения.

В первом этапе классификации сперматозоидов на классы, как это принято при оценке сперматозоидов человека, использовалась визуальная оценка диаграммы одномерного рассеяния. При оценке скорости вдоль криволинейной (реальной) траектории (VCL), была выделена группа сперматозоидов с наиболее высокой скоростью, которая была отнесена к классу А. Была также выделена еще одна небольшая группа, занимающая промежуточное значение по данному показателю подвижности, отнесенная к классу В. Сперматозоиды, которые на диаграмме одномерного рассеяния занимали нижнее положение, но все-таки имели, пусть и минимальную, подвижность, были отнесены к классу С. Неподвижные сперматозоиды можно отнести к классу D. Однако следует отметить, что в свежей сперме таких сперматозоидов практически не наблюдалось. Также классового разделения сперматозоидов удалось достичь по таким показателям как скорость вдоль прямолинейной траектории (VSL), скорость вдоль усредненной траектории (VAP) и по среднему углу смещения (MAD).

Кроме статистического анализа уже названных показателей подвижности, производители оценивались по концентрации сперматозоидов, долевого соотношению сперматозоидов всех классов, а также долевым суммам классов А и В согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения.

На основании проведенных исследований предлагаются референтные значения при племенной оценке самцов-производителей осетровых рыб, используемых в искусственном оплодотворении для исследованных видов и гибридных форм осетровых рыб. Определение пороговых классовых значений по каждому показателю осуществлялось на основании расчета среднего значения минимальных пороговых классовых значений по каждой пробе рыб, принимавших участие в наших исследованиях с округлением до 0,1 (десятых) значений.

**Результаты качественной оценки спермы осетровых рыб в период**

**хранения по морфологическим, биохимическим и динамическим показателям в зависимости от концентрации сперматозоидов, кислородного и температурного режимов.** С целью изучения изменений качественных параметров спермы осетровых рыб в период краткосрочного хранения, были рассмотрены морфологические, биохимические и динамические показатели в зависимости от концентрации сперматозоидов, кислородного и температурного режимов на примере сибирского осетра ленской популяции.

Как показали исследования, при хранении сперматозоидов при температуре 20 градусов (условия комнатной температуры) в течение суток происходило почти 10-кратное снижение подвижности сперматозоидов, тогда как при хранении спермы в холодильнике происходило плавное снижение подвижности, при этом прогнозируемо лучшим условием хранения являлась более низкая температура (5 °С), что соответствовало нижней полке бытового холодильника.

В результате проведённых исследований нами было установлено, что концентрация спермы осетровых также способна оказывать влияние на качественные и количественные показатели сперматозоидов в период краткосрочного хранения. Использование разбавления обеспечивает поддержание нормальной концентрации ионов и осмотического давления на изоосмотическом уровне, который предотвращает активацию спермы, обеспечивает защиту спермы от осмотического повреждения и загрязнителей и поддерживает необходимый уровень АТФ, требуемый для биения жгутиков. Исследованиями установлено, что разбавление спермы осетровых рыб способно увеличить общий срок краткосрочного хранения без использования криоконсервации в 4 раза (до 4 суток). При этом наиболее оптимальная концентрация разбавления составила 1:10.

В процессе хранения происходит интенсивное расхождение кислорода сперматозоидами. Как показали исследования, условия, способствующие насыщению спермы кислородом, также оказывают влияние на качественные и количественные показатели подвижности в процессе хранения. При хранении спермы в контейнерах, заполненных полностью спермой (под крышку), продолжительность хранения спермы составила 5 суток. При хранении спермы в контейнерах, заполненных спермой на половину (т.е. имелась воздушная подушка, занимающая 50 % объема контейнера) (под крышку), продолжительность хранения спермы составила 6 суток. При хранении спермы в контейнерах, заполненных спермой на 10 % (т.е. имелась воздушная подушка, занимающая 90 % объема контейнера) (под крышку), продолжительность хранения спермы составила 8 суток. Максимальные показатели в хранении были продемонстрированы при хранении спермы в пакетах, дополнительно заправленных чистым кислородом. Продолжительность хранения спермы составила 12 суток.

В процессе краткосрочного хранения было изучено морфологическое строение сперматозоидов. В процессе хранения спермы наблюдалось резкое

увеличение индекса дефектности сперматозоидов, что свидетельствовало об увеличении числа аномалий в строении сперматозоидов. Незначительный, но все-таки рост индекса тератозооспермии свидетельствовал об увеличении численности сперматозоидов, одновременно имеющих 2 и более различных типов аномалий.

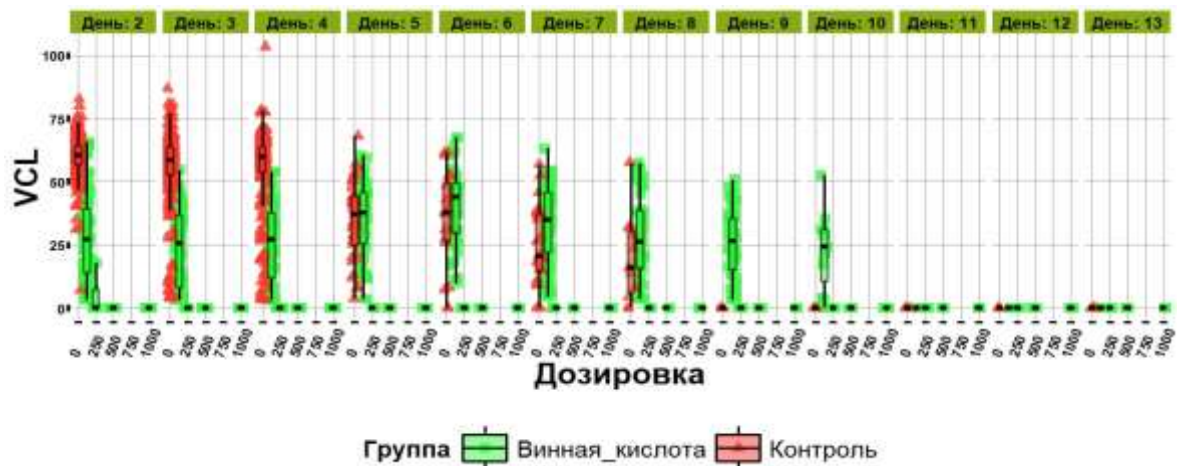
В процессе хранения наблюдалась агглютинация (или склеивание) сперматозоидов. При определении типов и стадий агглютинации использовалась медицинская классификация. При этом было выявлено несколько типов и стадий агглютинации: А2, А3, В1, С1, С2, D1, Е2. Было установлено, что в процессе краткосрочного хранения среднее количество агглютинаций в поле зрения микроскопа возрастало с 1 (на 2 день хранения) до 5,6 (к 8 дню хранения). Было замечено, что в процессе хранения количество типов и тяжесть стадий возрастает.

**Влияние консервирующих веществ на период краткосрочного хранения спермы осетровых рыб.** Окислительный стресс, при котором происходит образование активных форм кислорода, губительно действует на сперматозоиды. В процессе хранения происходит увеличение антиоксидантной активности спермоплазмы, что косвенно свидетельствует об увеличении образования активных форм кислорода, кроме того, активные формы кислорода могут образовываться в ответ на принудительную оксигенацию. Таким образом, одним из путей решения этой проблемы рекомендуется использование антиоксидантов.

Важным фактором также является наличие и дальнейший рост гетеротрофных протистов, которые повреждают целостность сперматозоидов. Для решения этой проблемы нами рекомендуется использование консервантов и антибактериальных веществ. На основании вышеизложенного нами были выбраны вещества, которые, по нашему мнению, могли оказать эффект на увеличение периода краткосрочного хранения спермы: цинк (в форме сульфата цинка), этанол, сахароза,  $H_2SO_4$  (0,1 Н), лимонная, винная и борная кислоты.

В результате проведенных исследований нами было установлено, что цинк, этиловый спирт, сахароза,  $H_2SO_4$  (0,1 Н) и лимонная кислота оказывают отрицательное действие на качественные и количественные показатели сперматозоидов сибирского осетра в течение краткосрочного хранения. Однако следует отметить, что хорошие результаты при краткосрочном хранении спермы были продемонстрированы при использовании винной кислоты. При использовании винной кислоты сперматозоиды, разведенные в концентрации 1:10, при хранении в холодильнике в контейнерах заполненными на 10 % оставались активными в среднем до 10-го дня (рисунок 2).

На 10-й день хранения в контрольной группе подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В опытной группе с концентрацией винной кислоты 125 мг/л значения VCL составили  $22,71 \pm 4,77$  мкм/с.



**Рисунок 2. – Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов сибирского осетра под влиянием винной кислоты в период краткосрочного хранения**

Лучшие результаты при краткосрочном хранении спермы были продемонстрированы при использовании борной кислоты: сперматозоиды, разведенные в концентрации 1:10, при хранении в холодильнике в контейнерах, заполненных на 10 %, оставались активными в среднем до 13-го дня (таблица 1).

**Таблица 1. Влияние борной кислоты на параметры подвижности сперматозоидов сибирского осетра в период краткосрочного хранения в условиях *in vitro***

Группа	VCL, мкм/с	VCL (A), мкм/с	Подвижность, %	Доля сперматозоидов (A), %
	<i>Mean ± SE</i>	<i>Mean ± SE</i>	<i>Mean ± SE</i>	<i>Mean ± SE</i>
<b>2-й день</b>				
Контрольная	59,90 ± 0,52	60,13 ± 0,47	98,44 ± 1,15	99,71 ± 0,29
Опытная 125	61,76 ± 0,78	62,63 ± 0,65	97,52 ± 1,05	98,14 ± 1,41
Опытная 250	58,39 ± 0,67	59,42 ± 0,49	97,37 ± 0,11	97,80 ± 1,52
Опытная 500	57,11 ± 0,62***	57,55 ± 0,54***	96,65 ± 1,11	99,14 ± 0,44
Опытная 1000	50,12 ± 0,90***	51,81 ± 0,65***	90,77 ± 3,50	96,70 ± 1,66
<b>13-й день</b>				
Контрольная	00,00 ± 00,00	–	00,00 ± 00,00	00,00 ± 00,00
Опытная 125	00,00 ± 00,00	–	00,00 ± 00,00	00,00 ± 00,00
Опытная 250	00,00 ± 00,00	–	00,00 ± 00,00	00,00 ± 00,00
Опытная 500	27,29 ± 3,59*	39,08 ± 5,49*	15,10 ± 7,59*	29,49 ± 15,12*
Опытная 1000	23,69 ± 4,35*	30,88 ± 10,58*	11,04 ± 5,73*	20,00 ± 11,55*

Примечание: \*P ≤ 0,05; \*\* P ≤ 0,01; \*\*\* P ≤ 0,001.

На 13-й день хранения в контрольной и опытных группах с концентрацией борной кислоты 125 и 250 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах значения VCL составили: 27,29 ± 3,59 мкм/с (P ≤ 0,05) – 500 мг/л, 23,69 ± 4,35 мкм/с (P ≤ 0,05) – 1000 мг/л.

На 13-й день хранения в контрольной и опытных группах с концентрацией

борной кислоты 125 и 250 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах значения VCL (A) составили:  $39,08 \pm 5,49$  мкм/с ( $P \leq 0,05$ ) – 500 мг/л,  $30,88 \pm 10,58$  мкм/с ( $P \leq 0,05$ ) – 1000 мг/л.

Под влиянием оптимальной дозировки борной кислоты (500 мг/л) происходило увеличение антиоксидантной активности сыворотки спермы осетровых рыб в условиях краткосрочного хранения, что позволяло спермоплазме более эффективно бороться с ростом активных форм кислорода.

Кроме данного эффекта, увеличение периода краткосрочного хранения спермы под влиянием борной кислоты можно объяснить ее относительно негативным действием на гетеротрофных протистов.

Под влиянием борной кислоты в процессе хранения наблюдались более низкие значения индекса тератозооспермии и индекса дефективности сперматозоидов. Это свидетельствовало о том, что борная кислота не оказывала негативного эффекта на морфологические аномалии сперматозоидов.

**Установление оптимальных технологических параметров краткосрочного хранения спермы осетровых рыб.** На основании проведенных исследований были рекомендованы следующие оптимальные технологические параметры для краткосрочного хранения спермы осетровых рыб:

1. Разбавление сперматозоидов в собственной спермоплазме в концентрации (1:10). Спермоплазму необходимо получать методом центрифугирования части спермы.

2. После получения спермоплазмы и перед добавлением в нее сперматозоидов рекомендуется осуществлять добавлении консервантов (борная кислота (500 мг/л) или винная кислота (125 мг/л).

3. Для увеличения периода хранения рекомендуется применять принудительную оксигенацию спермы в кислородном пакете в соотношении  $\geq 1:10$ .

4. Хранение в охлажденном состоянии (5 °С). Основные технологический этапы подготовки и хранения спермы визуальны представлены на рисунке 3.

Была осуществлена технологическая проверка данных рекомендуемых параметров. Были сформированы две группы. Контрольная группа, сперматозоиды которой были разбавлены в собственной спермоплазме в концентрации 1:10, помещены в кислородный пакет в соотношении объемов 1:10, заправлены кислородным пакетом и помещены в холодильник при температуре 5 °С. Опытная группа, сперматозоиды которой были разбавлены в собственной спермоплазме в концентрации 1:10, помещены в кислородный пакет в соотношении объемов 1:10, заправлены кислородным пакетом и помещены в холодильник при температуре 5 °С. Предварительно в спермоплазму была добавлена борная кислота в концентрации 500 мг/л. Всего было заправлено по 25 кислородных пакетов для каждой группы для осуществления ежедневного контроля за параметрами выживаемости.

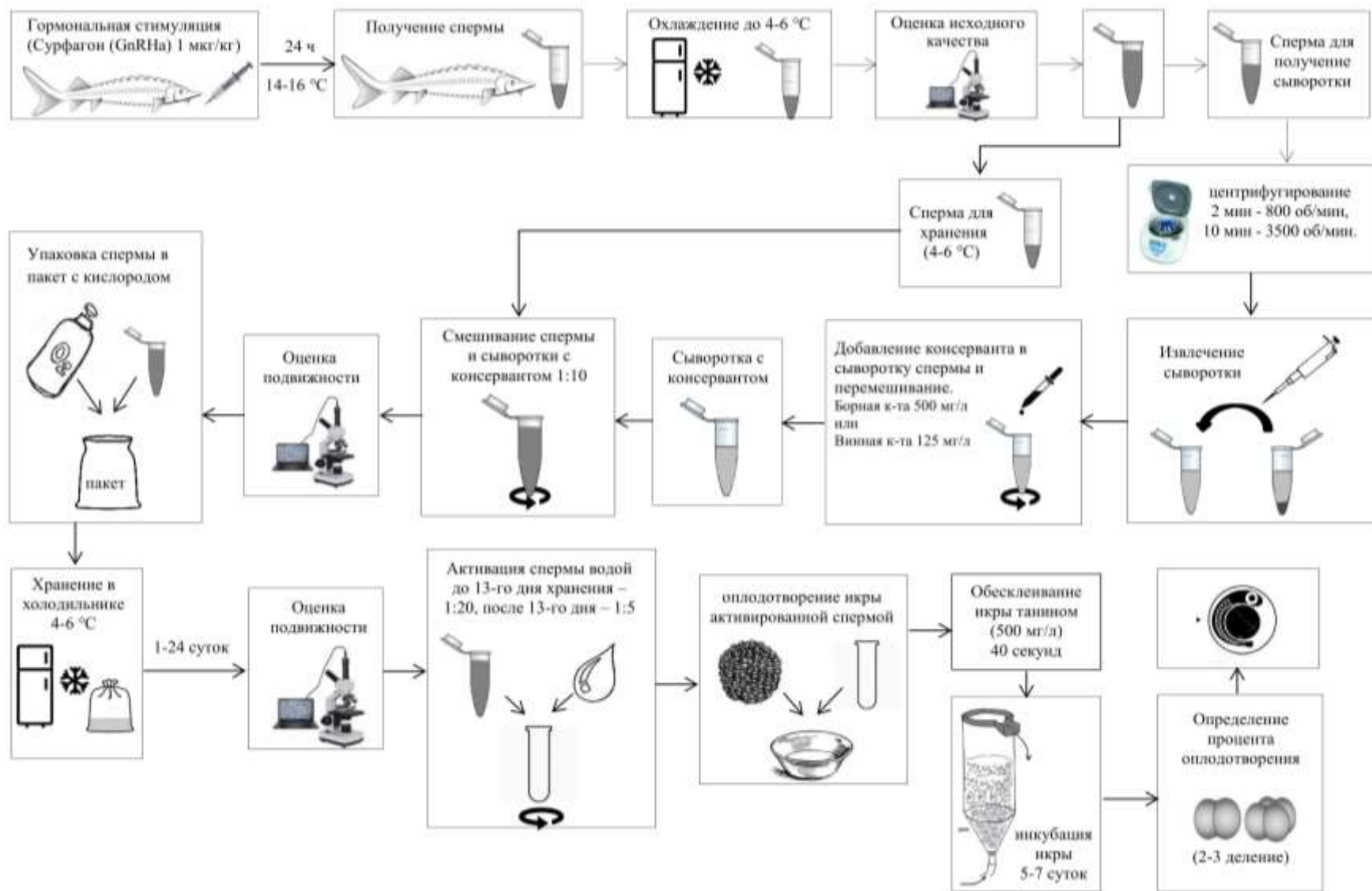


Рисунок 3. – Технологические этапы краткосрочного хранения спермы осетровых рыб

Как показали исследования, продолжительность хранения в контрольной группе составила 11 суток, тогда как в опытной группе период, при котором сперматозоиды сохраняли подвижность, составил 24 суток.

Было осуществлено тестирование оплодотворяющей способности спермы сибирского осетра после 20-суточного хранения, при использовании снижения концентрации сперматозоидов до 1:10, в условиях хранения в кислородном пакете в соотношении объемов 1:10, хранения в холодильнике при температуре 5 °С, с добавлением в спермоплазму борной кислоты в концентрации 500 мг/л. Перед осеменением было осуществлено тестирование сперматозоидов на подвижность, в ходе которого было установлено, что подвижность составляла около 20 %. Т.е. подвижность была снижена относительно первого дня в 4 раза. Следовательно, было применено разбавление спермы активирующим раствором перед осеменением в соотношении 1:5.

Тестирование было осуществлено в чашках Петри, в которые была помещена икра, оплодотворенная спермой после 20-суточного хранения (опытная группа), и икра, оплодотворенная свежей спермой (контрольная группа). Инкубация осуществлялась при температуре 16 °С в термостате с ежедневной 2-х разовой подменой воды в течение суток.

В ходе тестирования регистрировали процент оплодотворения (на стадии 2–3 деления дробления), выживаемость (процент выхода от икры) свободных эмбрионов, выживаемость (процент выхода) предличинок перед переходом на активное питание, выживаемость (процент выхода) личинок после перехода на активное питание.

Результаты тестирования оплодотворяющей способности спермы осетровых рыб после краткосрочного хранения в течение 20 суток показали, что сперма, хранившаяся в течение 20 суток, сохранила свою оплодотворяющую способность. Выживаемость эмбрионов и личинок на всех контрольных стадиях была ниже, чем в контрольной группе, где икра оплодотворялась свежей спермой, но выше, чем в группе, икру которой оплодотворяли спермой после криоконсервации.

**Результаты разработки методического приема повышения оплодотворения икры, выживаемости эмбрионов, предличинок, личинок осетровых рыб.** В ходе проведенных исследований нами был также разработан методический прием повышения оплодотворения икры, выживаемости эмбрионов, предличинок, личинок осетровых рыб при использовании свежей спермы.

Перед оплодотворением икры, сперма была активирована активирующим раствором, однако концентрация разбавления была снижена в 4 раза, относительно рекомендуемого стандартного разбавления 1:200. Через 4 минуты после активации, когда произошел массовый отсев менее жизнеспособных сперматозоидов, было осуществлено оплодотворение икры.



Данный метод позволил повысить процент оплодотворения и выживаемость на первых ключевых стадиях эмбрионального развития.

**Экономический эффект результатов исследований.** Экономический эффект от использования результатов составил 1 320 рублей на 100 тыс. штук оплодотворенной икры (в ценах на 22.01.2018 г.).

Экономический эффект от производственной проверки составил 858,00 рублей. Экономический эффект при пересчете на 100 000 экз. личинок стерляди составил 780,00 рублей (в ценах на 13.03.2020 г.).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Теоретически обоснован и разработан комплекс технологических и методических приемов оценки, сохранения качества и повышения оплодотворяющей способности спермы осетровых рыб при искусственном оплодотворении, включающий определение новых референтных значений оценки подвижности сперматозоидов для использования в методике компьютерного автоматического анализа спермы (CASA), методический прием качественной оценки спермы в период краткосрочного хранения, технологические параметры сохранения качества спермы, в период краткосрочного хранения, методический прием повышения оплодотворяющей способности спермы [1, 4, 10].

2. Определены новые референтные значения оценки подвижности сперматозоидов осетровых рыб (сибирский и русский осетры, гибриды бестер и РО×ЛО, стерлядь), включающие нормативные значения криволинейной скорости, прямолинейной скорости и скорости вдоль усредненной траектории для сперматозоидов класса А  $\geq 50,00$  мкм/с, для класса В  $< 50,00$  мкм/с, среднего угла смещения для класса А  $\leq 20,00$ , для класса В  $> 20,00$ , отличающиеся делением на классы (А, В, С, D) и соотношением классов, что позволяет использовать их в методике компьютерного автоматического анализа спермы (CASA) технологии искусственного оплодотворения [1].

3. Разработан новый методический прием качественной оценки спермы осетровых рыб в период краткосрочного хранения, отличающийся углубленным изучением морфологических, биохимических и динамических параметров. В период краткосрочного хранения спермы осетровых рыб происходит увеличение доли агглютинации стадий А3, В2, С2, D1, Е2 до 37,2; 12,42; 13,66; 11,18; 25,47 % ( $P < 0,05$ ), соответственно, индекса тератозооспермии на 0,21 пункта ( $P < 0,05$ ), индекса дефективности сперматозоидов на 0,71 пункта ( $P < 0,05$ ), антиоксидантной активности в 4,4 раза ( $P < 0,05$ ), численности гетеротрофных протистов, а также снижении криволинейной скорости сперматозоидов на 54,10 % ( $P < 0,05$ ), подвижности сперматозоидов на 58,78 % ( $P < 0,05$ ) [1, 2, 3,

11].

4. Установлены вещества, обладающие консервирующим эффектом, способные оказывать положительное влияние на период краткосрочного хранения спермы осетровых рыб без использования криоконсервации. Отличительной особенностью процесса является снижение морфологических, биохимических и динамических показателей: роста гетеротрофных протистов на 5 суток ( $P < 0,05$ ), индекса тератозооспермии на 0,15 п. ( $P < 0,05$ ), снижение индекса дефективности сперматозоидов на 0,6 п. ( $P < 0,05$ ), сохраняя все параметры подвижности сперматозоидов на достаточном для оплодотворения уровне. Среди исследуемых консервантов отрицательный и нейтральный эффект на период краткосрочного хранения спермы оказали цинк, сахар, лимонная кислота и серная кислота (0,1 Н). Лучшие результаты показали борная (500 мг/л) и винные кислоты (125 мг/л), увеличивая общий срок краткосрочного хранения без использования криоконсервации до 13 и 10 суток соответственно [1, 5, 6, 7, 8, 9].

5. Разработаны новые технологические параметры краткосрочного хранения спермы осетровых рыб, включающие разбавление (1:10), добавление консервантов (борная кислота (500 мг/л) или винная кислота (125 мг/л), оксигенацию и охлаждение (до 5 °С), сохраняющие подвижность и оплодотворяющую способность сперматозоидов до 20 суток ( $P < 0,05$ ), обеспечивая оплодотворение икры 62 %, выживаемость свободных эмбрионов 67 %, выживаемость предличинок перед переходом на активное питание 82 %, выживаемость личинок после перехода на активное питание 72 % [1, 5, 9].

6. Разработан методический прием повышения оплодотворения икры на 8–12 % ( $P < 0,05$ ), выживаемости эмбрионов на 7–9 % ( $P < 0,05$ ), предличинок на 8–10 % ( $P < 0,05$ ), личинок на 11–15 % ( $P < 0,05$ ) осетровых рыб на основе деактивации аномальных и слабоподвижных сперматозоидов при экстракорпоральном оплодотворении за счет регулирования концентрации оплодотворяющего раствора и интервала между активацией сперматозоидов и моментом искусственного оплодотворения. Экономический эффект от использования результатов составил 780 рублей на 100 тыс. экз. личинок осетровых рыб [1] (в ценах на 13.03.2020 г.).

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

При оценке методом CASA племенных самцов производителей осетровых рыб (ленский и русский осетры, гибриды бестер и РО×ЛО, стерлядь) в установках замкнутого водоснабжения при применении искусственного оплодотворения использовать предложенные научно обоснованные референтные значения подвижности, деления на классы и соотношения классов.

Рекомендуется в целях краткосрочного хранения использовать разбавление сперматозоидов в собственной спермоплазме в концентрации (1:10) с добавле-

нием консервантов (борная кислота (500 мг/л) или винная кислота (125 мг/л)) и дальнейшим хранением в кислородных пакетах в соотношении 1:10 при температуре 5 °С. Активацию сперматозоидов необходимо осуществлять путем добавления свежей воды или активизирующего раствора в соотношении 1:20 до 13-го дня и в соотношении 1:5 после 13-го дня хранения.

С целью деактивации аномальных и слабоподвижных сперматозоидов при искусственном оплодотворении рекомендуется осуществлять оплодотворение икры через 4 минуты после их активации оплодотворяющим раствором в соотношении 1:50.

Основные практические предложения изложены в следующих нормативных материалах:

«Рекомендации по воспроизводству осетровых рыб в рыбоводных индустриальных комплексах с применением инновационных методов» (рассмотрены и утверждены на заседании секции животноводства Научно-технического совета Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, протокол № 1 от 09.01.2017 г.).

«Рекомендации по регулированию качества спермы осетровых рыб в технологии искусственного размножения» (рекомендовано Научно-техническим советом УО БГСХА, протокол № 8 от 19.11.2019 г.).

### **Социальный эффект результатов исследований**

Результаты исследований внедрены в образовательный процесс по специальности 1-74 03 03 «Промышленное рыбоводство» в рамках дисциплин «Искусственное воспроизводство рыб» и «Аквакультура ценных видов рыб и ресурсосберегающие технологии» (акт о внедрении научно-исследовательской разработки в образовательный процесс от 09.03.2017 г.).

## **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ**

### **Монографии**

1. Барулин, Н. В. Регулирование качества спермопродукции осетровых рыб в технологии воспроизводства объектов аквакультуры / Н. В. Барулин, К. Л. Шумский. – Горки, УО БГСХА, 2019. – 175 с.

### **Статьи, включенные в перечень научных изданий ВАК**

#### **для опубликования результатов диссертационных исследований**

2. Барулин, Н. В. Влияние различной концентрации разбавления спермы сибирского осетра на качественные и количественные показатели сперматозоидов в течение краткосрочного хранения / Н. В. Барулин, К. Л. Шумский // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2018. - № 1(28). – С. 39–45.

3. Барулин, Н. В. Изменение подвижности сперматозоидов ленского осет-

ра в зависимости от их концентрации и срока хранения / Н. В. Барулин, К. Л. Шумский // Зоотехническая наука Беларуси : сборник научных трудов. – Жодино, 2018. – Т. 53, ч. 1 : Генетика, разведение, селекция, биотехнология размножения и воспроизводство. Технология кормов и кормления, продуктивность. – С. 12–20.

4. Барулин, Н. В. Компьютерный анализ подвижности сперматозоидов ленского осетра в аквакультуре / Н. В. Барулин, К. Л. Шумский // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2018. – № 3(30). – С. 11–16.

5. Шумский К. Л. Влияние консервирующих веществ на период краткосрочного хранения спермы осетровых / К. Л. Шумский, Н. В. Барулин // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси : сборник научных трудов. – Минск, 2018. – Вып. 34. – С. 249–251.

6. Шумский, К. Л. Влияние борной кислоты на качественные и количественные показатели сперматозоидов сибирского осетра в течение краткосрочного хранения / К. Л. Шумский, Н. В. Барулин, М. М. Усов // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2019. – № 1(32). – С. 3–10.

7. Шумский, К. Л. Влияние винной кислоты на качественные и количественные показатели сперматозоидов сибирского осетра в течение краткосрочного хранения / К. Л. Шумский, Н. В. Барулин // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сборник научных трудов. – Горки : БГСХА, 2019. – Вып. 22, Ч. 1. – С. 9–19.

8. Шумский, К. Л. Влияние цинка на качественные и количественные показатели сперматозоидов сибирского осетра в течение краткосрочного хранения / К. Л. Шумский, В. А. Герасимчик // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси : сборник научных трудов. – Минск, 2019. – Вып. 35. – С. 122–133.

### **Материалы конференций**

9. Барулин, Н. Краткосрочное хранение спермы осетровых в технологии искусственного оплодотворения / К. Л. Шумский, Н. В. Барулин // Аквакультура осетровых : современные тенденции и перспективы : материалы Международной научно-практической конференции. – Херсон, 2016. – С. 14–19.

### **Рекомендации**

10. Рекомендации по воспроизводству осетровых рыб в рыбоводных промышленных комплексах с применением инновационных методов / Н. В. Барулин [и др.]. – Горки : БГСХА, 2016. – 203 с.

11. Барулин, Н.В. Рекомендации по регулированию качества спермы осетровых рыб в технологии искусственного размножения: рекомендации / Н.В. Барулин, К.Л. Шумский – Горки : БГСХА, 2020. – 20 с.

## РЭЗІЮМЭ

### Шумскі Канстанцін Леанардавіч

#### Ацэнка, захаванне якасці і павышэнне апладняльнай здольнасці сперматазоідаў асятровых рыб пры штучным апладненні

Аквакультура, асятровыя, ўзнаўленне, штучнае апладненне, спермапрадукцыя, кароткатэрміновае захоўванне спермы, рухомасць, антыаксідант, кансервант.

**Мэта работы:** складалася ў распрацоўцы метадаў ацэнкі, захавання якасці і павышэння апладняльнай здольнасці спермы асятровых рыб пры штучным апладненні.

**Метады даследаванняў:** рыбаводна-біялагічныя, біяхімічныя, праграмна-тэхнічныя, статыстычныя.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна.** Упершыню вызначаны рэферэнтныя значэнні рухомасці сперматазоідаў для племянной ацэнкі вытворцаў асятровых рыб і іх гібрыдаў. Устаноўлены прычыны і заканамернасці змены якасных і колькасных паказчыкаў сперматазоідаў у перыяд кароткатэрміновага захоўвання. Распрацаваны спосабы павелічэння тэрмінаў кароткатэрміновага захоўвання спермапрадукцыі, заснаваныя на памяншэнні канцэнтрацыі сперматазоідаў шляхам развядзення пробы сываткай спермы (1:10), паніжэнні тэмпературы захоўвання да 5 °С, прымусовай аксігенацыі і даданні борнай кіслаты (500 мг/л) альбо віннай кіслаты (125 мг/л) у якасці кансервантаў і антыаксіданта, якія захоўваюць рухомасць і апладняльную здольнасць сперматазоідаў да 20 сутак. Распрацаваны метадычны прыём павышэння апладнення ікры (на 8-12%), выжывальнасці эмбрыёнаў (на 7-9%), прадлічынак (на 8-10%), лічынак (на 11-15%) асятровых рыб на аснове дэактывацыі анэмальных і слабарухомых сперматазоідаў пры штучным апладненні, за кошт рэгулявання канцэнтрацыі апладняльнага раствора і інтэрвалу паміж актывацыяй сперматазоідаў і момантам штучнага апладнення.

**Вобласць ужывання:** індустрыяльныя і сажалкавыя асятровыя гаспадаркі, селекцыйна-гібрыдныя цэнтры; ў навучальным працэсе пры падрыхтоўцы спецыялістаў ветэрынарнага, заатэхнічнага і біялагічнага профілю.

## РЕЗЮМЕ

**Шумский Константин Леонардович**

### **Оценка, сохранение качества и повышение оплодотворяющей способности спермы осетровых рыб при искусственном оплодотворении**

Аквакультура, осетровые, воспроизводство, искусственное оплодотворение, спермопродукция, краткосрочное хранение спермы, подвижность, антиоксидант, консервант.

**Цель работы** заключалась в разработке методов оценки, сохранения качества и повышения оплодотворяющей способности спермы осетровых рыб при искусственном оплодотворении.

**Методы исследований:** Рыбоводно-биологические, биохимические, программно-технические, статистические.

**Полученные результаты и их новизна.** Впервые определены референтные значения подвижности сперматозоидов для племенной оценки производителей осетровых рыб и их гибридов. Установлены причины и закономерности изменения качественных и количественных показателей сперматозоидов в период краткосрочного хранения. Разработаны способы увеличения сроков краткосрочного хранения спермопродукции, основанные на уменьшении концентрации сперматозоидов путем разбавления пробы сывороткой спермы (1:10), понижении температуры хранения до 5 °С, принудительной оксигенации и добавлении борной кислоты (500 мг/л) либо винной кислоты (125 мг/л) в качестве консерванта и антиоксиданта, сохраняющие подвижность и оплодотворяющую способность сперматозоидов до 20 суток. Разработан методический прием повышения оплодотворения икры (на 8–12 %), выживаемости эмбрионов (на 7–9 %), предличинок (на 8–10 %), личинок (на 11–15 %) осетровых рыб на основе деактивации аномальных и слабоподвижных сперматозоидов при искусственном оплодотворении, за счет регулирования концентрации оплодотворяющего раствора и интервала между активацией сперматозоидов и моментом искусственного оплодотворения.

**Область применения:** индустриальные и прудовые осетровые хозяйства, селекционно-гибридные центры; в учебном процессе при подготовке специалистов ветеринарного, зоотехнического и биологического профиля.

## SUMMARY

**Shumski Kanstantsin Leonardovich**

### **Assessment, preservation of the quality and increase of the fertilizing capacity of sturgeon sperm during artificial insemination**

Aquaculture, sturgeon, reproduction, in vitro fertilization, sperm production, short-term storage of sperm, motility, antioxidant, preservative.

**The purpose of the work** was to develop methods for assessing, maintaining the quality and increasing the fertilizing ability of sturgeon sperm during artificial insemination.

**Research methods:** Fish-breeding biological, biochemical, software and hardware, statistical.

**The results obtained and their novelty.** For the first time, the reference values of sperm motility were determined for breeding assessment of sturgeon producers and their hybrids.

The reasons and patterns of changes in the qualitative and quantitative indicators of spermatozoa in the period of short-term storage have been established. Methods have been developed to increase the short-term storage of sperm production, based on a decrease in the concentration of sperm cells by diluting the sample with semen serum (1:10), lowering the storage temperature to 5 °C, forced oxygenation and adding boric acid (500 mg/l) or tartaric acid (125 mg/l) as a preservative and antioxidant, preserving the mobility and fertilizing ability of spermatozoa for up to 20 days. A methodical technique has been developed to increase the fertilization of eggs (by 8-12%), the survival rate of embryos (by 7-9%), prelarvae (by 8-10%), larvae (by 11-15%) of sturgeon fish based on the deactivation of abnormal and low-mobility spermatozoa in artificial insemination, by regulating the concentration of the fertilizing solution and the interval between the activation of spermatozoa and the moment of artificial insemination.

**Area of application:** industrial and pond sturgeon farms, hybrid breeding centers; in the educational process during the training of specialists of veterinary, zoo-technical and biological profile.

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата сельскохозяйственных наук

**Шумского Константина Леонардовича**

Подписано в печать \_\_\_\_\_ 21. Формат 60 x 84/16.  
Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать Riso.  
Усл.-печ. л. 1,4. Уч.-изд. л. 1,22.  
Тираж 60 экз. Заказ № \_\_\_\_\_.

Издатель – Республиканское унитарное предприятие  
«Научно-практический центр Национальной академии наук  
Беларуси по животноводству».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий  
№ 1/409 от 14 августа 2014 г.  
222160, Минская обл., г. Жодино, ул. Фрунзе, 11.

Отпечатано с оригинал-макета Заказчика  
в МОУП «Борисовская укрупнённая типография им. 1 Мая».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий  
№ 2/13 от 21 ноября 2013 г.  
222120, г. Борисов, ул. Строителей, 33.