

Федеральное агентство по рыболовству

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА И ОКЕАНОГРАФИИ»**

**Филиал по пресноводному рыбному хозяйству
ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»)**

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры

Выпуск 94



Астрахань – 2023

УДК 639.3/6
ББК 47.2
С 23

С23 Сборник научных трудов. Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры. – Вып. 94. – Астрахань: Издатель: Сорокин Роман Васильевич, 2023 – 176 с.

Рецензент: С.Б. Купинский, к.б.н., доцент кафедры «Аквакультура и экология» Дмитровского рыбохозяйственного технологического института (филиал) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный технический университет»

Сборник научных трудов ВНИИПРХ Филиала по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»), включает статьи, по основным направлениям научного обеспечения аквакультуры: технологии выращивания, ихтиопатологии, криобиологии, кормлению рыб, селекционно-племенной работе и мониторинга естественных водоемов рыбохозяйственного значения.

Собранные вместе, статьи сборника формируют представление о тематике исследований, выполняемых в настоящее время в Филиалах ФГБНУ «ВНИРО». Научные статьи представлены в авторской редакции.

УДК 639.3/6
ББК 47.2
С 23

ISBN 978-5-00201-154-4

© Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»), 2023
© Издатель: Сорокин Роман Васильевич, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

Илясова В.А., Мельченков Е.А., Воробьев А.П., Арчибасов А.А., Калмыкова В.В. «Развитие половых клеток у годовиков гибридных форм осетровых рыб в индустриальных условиях»	5
Мельченков Е.А., Илясова В.А., Калмыкова В.В., Воробьев А.П., Арчибасов А.А., Мищенко А.В., Новоселова Ю.А., Козовкова Н.А., Антипина Ю.А. «Рыбоводно-биологическая характеристика гибридов осетровых рыб, как объектов товарного выращивания в условиях бассейнового индустриального хозяйства»	17
Иванёха Е.В., Дума Л.Н., Рекубратский А.В. «Сравнительная морфологическая характеристика диплоидных гибридов серебряного карася с карпом»	34
Симонов В.М., Шарт Л.А. «Сравнение кроссов карпа МР х черепетский и МР х ЗУ-НК по морфотипу».....	44
Докина О.Б., Ковалев К.В., Ананьев В.И., Миленко В.А., Пронина Н.Д. «Разработка подходов к криоконсервации эмбрионов рыб»	54
Ковалев К.В., Докина О.Б., Пронина Н.Д., Миленко В.А., Балашов Д.А., Новосёлова Ю.А., Яковлева Е.П., Макарова Е.Г., Козлова Н.В., Барина В.В. «Криобанк генетического материала рыб: методы сбора коллекции образцов криоконсервированной спермы ценных видов и пород рыб (на примере 2021 г.)»	78
Романова Н.Н., Головина Н.А., Головин П.П., Вишторская А.А. «Алгоритм определения паразитов рыб»	89
Юхименко Л.Н., Токарева С.Б., Кудинов П.В., Сехина О.В. «Эпизоотическая ситуация в осетровых хозяйствах»	116
Пыльнов В.А., Бурлаченко И.В., Бычкова Л.И. «Применение гнездового варианта ПЦР (ОТ-ПЦР) для диагностики вируса геморрагической септицемии у лососевых рыб»	122
Сафронова А.С., Кукин М.С., Токарева С.Б., Сехина О.В. «Сезонные характеристики микробиоценоза воды и рыб водохранилищ Московской области»	130
Тюлин Д.Ю., Никитенко А.И., Жернаков И.А., Христенко Г.И., Ерёмкин С.С. «Зоопланктон Пронского водохранилища в 2023 г.»	142
Никитенко А.И., Горячев Д.В., Клец Н.Н., Зингис И.В., Назаров А.С., Карпов В.А., Жарикова В.Ю. «Биологические показатели и динамика запасов промысловых видов рыб реки Днепр. 1. Семейство карповые Cyprinidae»	152
Никитенко А.И., Горячев Д.В., Клец Н.Н., Зингис И.В., Назаров А.С., Карпов В.А., Жарикова В.Ю. «Биологические показатели и динамика запасов промысловых видов рыб реки Днепр. 2. Семейства окуневые Percidae, щуковые Esocidae, тресковые Gadidae»	162

Биндюков С.В., Новоселова Ю.А., Арнаутов М.В., Баскакова Ю.А.,
Бондаренко О.А., Козлова Е.Ю. «Рыбоводно-биологические и
морфофизиологические показатели радужной форели, выращенной в
условиях УЗВ на комбикормах с заданным жирнокислотным составом»

..... 167

РАЗВИТИЕ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК У ГОДОВИКОВ ГИБРИДНЫХ ФОРМ ОСЕТРОВЫХ РЫБ В ИНДУСТРИАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

В.А. Илясова, Е.А. Мельченков,
А.П. Воробьев, А.А. Арчибасов, В.В. Калмыкова
*Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО»
(«ВНИИПРХ»)
E-mail: innovazii-vniiprh@mail.ru*

Исследования проводили у годовиков гибридных форм осетровых рыб в прямotoчном хозяйстве отдела «Конаковский». Показана связь развития половых клеток в зависимости от уровня ploидности родительских форм. У годовиков сибирского и русского осетров на белугу с разным количеством хромосом при сумме тепла 5830 градусо-дней наблюдается индифферентное состояние гонад с присутствием первичных гоний. У гибридов русского осетра и калуги с одинаковым уровнем ploидности родительских видов при сумме тепла 5743 градусо-дней гонады находятся в I – начале II стадии зрелости. Комбинированное содержание гибрида РО×К при сумме тепла 5643 градусо-дней показало качественный рывок в способности развития половых клеток – по краям сформированных яйцевых пластин расположены гнезда с делящимися оогониями и ооцитами синаптенного пути. Начало мейоза обеспечивает развитие ооцитов однослойного фолликула, что соответствует II полужировой стадии зрелости гонад.

Ключевые слова: гистология, гибриды осетровых рыб, гаметогенез, половые клетки, дифференцировка пола.

ВВЕДЕНИЕ

Искусственное воспроизводство некоторых видов осетровых рыб показывает высокую и многообразную способность к образованию жизнеспособных гибридных форм [Николюкин 1964, 1972; Серебрякова, 1975, 1979; Сафронов, 2003; Федосеева, 2004; Подушка, Армянинов, 2006; Подушка, Чебанов, 2007; Сафронов и др., 2016].

Одинаковый уровень ploидности дает фертильных гибридов от скрещиваний, например, белуги на стерлядь [Бурцев, 1983, 2013] и шипа на стерлядь [Кривошеин, 2007].

Промышленная гибридизация в рыбоводстве в раннем возрасте у гибридов первого поколения взаимосвязана с гетерозисным эффектом по скорости роста. С целью и задачами поиска путей управления в индустриальных условиях у годовиков гибридных форм с разным уровнем ploидности: сибирского, русского осетра и белуги, русского осетра и калуги (СО×Б, РО×Б и РО×К) проводился детальный гистологический анализ развития

половых клеток и рыбоводно-биологических характеристик в зависимости от температурного фактора суммы тепла в градусо-днях для совокупного анализа процессов развития организма в целом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Опыты проходили в прямоточных бассейнах индустриального хозяйства отдел «Конаковский», где температура воды косвенно зависит от водоисточника: Иваньковского водохранилища и сбросных теплых вод Конаковской ГРЭС. Колебания в течение календарного года находят свое отражение при содержании рыбы, которые соответствуют температурным показателям в разные времена года в зависимости от природных явлений. Таким образом, в прямоточных бассейнах температура воды в сравнении с УЗВ не постоянная и может меняться. Например, только в зимний период при средней температуре воды 7,8°C колебания могут достигать 7,1°C (от 4,4 до 11,5°C). Процессы содержания рыб в различных условиях влияют на развитие половых клеток, следовательно, надо вести учет температурных факторов в градусо-днях.

Отбор гистологических образцов осуществляли у трех гибридных форм СО×Б, РО×Б, РО×К, содержащихся в условиях прямоточного бассейна и одного гибрида РО×К при комбинированном содержании (УЗВ + прямоточные бассейны) в возрасте 1 года с различной массой тела (взятых произвольно – малая, средняя и крупная). Гистологическую обработку 12 проб гонад проводили общепринятыми методами [Ромейс, 1953]. Фиксацию проб осуществляли в 70% этиловом спирте с последующим обезвоживанием и заливкой в парафин. Серийные срезы размером 5-7 мкм делали на микротоме «РОТМИК-2». Окрашивание проводили железным гематоксилином по Гейденгайну, с дальнейшим обезвоживанием и заключением в канадский бальзам. Для изучения гаметогенеза использовали микроскоп «Микромед-2» и цифровую камеру для микроскопа серии TourCam. Процессы развития половых клеток изучали в краниальной, медиальной и каудальной частях правой и левой гонады у годовиков гибридов осетровых рыб в возрасте 374-381 сутки. Проанализировано 1076 снимков фрагментов гонад. При описании стадий зрелости гонад и развития половых клеток применяли универсальную шкалу [Сакун, Буцкая, 1963] с некоторыми дополнениями для осетровых рыб [Персов, 1947; Трусов, 1964; Серебрякова, 1964]. В связи со сходностью развития половых клеток в левой, правой и в различных частях гонад представлены снимки с характерными особенностями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рыбоводно-биологические показатели и гистологический анализ развития половых показывает ответную реакцию всего организма в целом на темп роста у годовиков гибридных форм осетровых рыб (СО×Б, РО×Б и РО×К) в зависимости от условий содержания и температурного фактора (сумма тепла в градусо-днях), таблица 1.

Таблица 1 – Рыбоводные показатели и состояние гонад исследуемых гибридов в годовалом возрасте на 26.01.2023 г.

№ образца	Масса рыбы, г	Масса гонад (левая + правая), г	Гистологическое состояние гонад и стадии зрелости
СО×Б /сумма тепла 5830 градусо-дней (прямоток)			
1	400	0,84 + 0,96	Индифферентное состояние гонад с присутствием первичных гоний от 10 до 12 мкм
2	860	3,57 + 2,8	
3	1400	23,1 + 17,9	
РО×Б/сумма тепла 5830 градусо-дней (прямоток)			
4	560	0,17 + 0,23	Индифферентное состояние гонад с присутствием первичных гоний от 10 до 12 мкм
5	600	1,29 + 1,48	
6	720	0,23 + 0,29	
РО×К/сумма тепла 5743 градусо-дней (прямоток)			
7	460	1,15 + 1,27	Размножение первичных гоний размерами от 6 до 10 мкм, что соответствует I стадии зрелости при еще индифферентном состоянии гонад у этой особи
8	540	1,65 + 1,4	Формирование анатомической дифференцировки пола характерное для самок, наличие в медиальной части гонады яйцевых пластин с размножением первичных гоний и борозды-щели, что соответствует I – началу II стадии зрелости
9	1120	25,2 + 17,7	
РО×К/сумма тепла 5643 градусо-дней (УЗВ + прямоток)			
10	520	4,3 + 3,4	Анатомическая дифференцировка пола, половые клетки находятся в начале II стадии зрелости яичников. На снимках видны развитые яйцевые пластины, вдоль которых расположены гнезда с оогониями
11	720	2,2 + 2,2	Гонады находятся на II полужировой стадии зрелости, прошла цитологическая дифференцировка пола, которая определяет развитие половых клеток в женском направлении. Яйцевые пластины хорошо развиты, вдоль краев, которых расположены гнезда с митотически делящимися оогониями размерами от 8 до 11 мкм и ооцитами синаптенного пути размерами от 18 до 22 мкм. Появляются единичные базофильные ооциты однослойного фолликула размером от 60 до 80 мкм. В гонадах в небольшом количестве присутствует ювенальный гермафродитизм, происходит размножение сперматогоний
12	800	4,4 + 4,0	Гонады имеют большие жировые тела, половые клетки находятся в индифферентном состоянии

Масса тела и масса гонад в зависимости от образца (пробы) коррелирует за счет присутствия в гонадах паренхиматозной и жировой ткани. Внешний вид соотносится с весовыми показателями массы тела и гонад. Соотношение исследуемых показателей в годовалом возрасте представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Соотношения массы гонад и тела, внешнего вида гонад гибридов в годовалом возрасте

№ образца	Гибридная форма/ сумма тепла, градусо-дни	Масса рыбы, г	Масса гонад, г (левая + правая)	Внешний вид гонад
1	СО×Б/5830	400	0,84 + 0,96	
2		860	3,57 + 2,8	
3		1400	23,1 + 17,9	
4	РО×Б/5830	560	0,17 + 0,23	
5		600	1,29 + 1,48	
6		720	0,23 + 0,29	
7	РО×К/5743	460	1,15 + 1,27	
8		540	1,65 + 1,4	
9		1120	25,2 + 17,7	
10	РО×К/5643	520	4,3 + 3,4	
11		720	2,2 + 2,2	
12		800	4,4 + 4,0	

В возрасте 381 суток при сумме тепла 5830 градусо-дней у годовалого гибрида сибирского осетра, имеющего тетраплоидный кариотип (238 ± 7 хромосом), на белугу с диплоидным кариотипом (116 ± 3 хромосом) характерно индифферентное состояние гонад с присутствием первичных гоний. Независимо от массы рыбы – 400 г, 860 г или 1400 г во всех частях гонады (краниальной, медиальной и каудальной) изменяющаяся масса гонад коррелирует с массой тела за счет присутствия паренхиматозной и жировой ткани (рисунок 1).

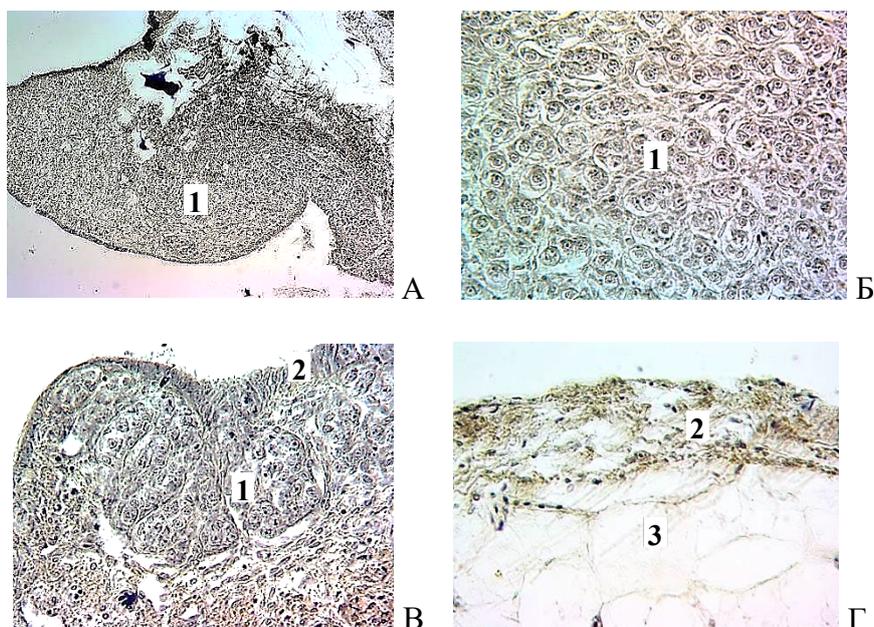


Рисунок 1 – Фрагменты гонад гибрида СО×Б в индифферентном состоянии:
 1 – первичные гонии; 2 – паренхиматозная ткань; 3 – клетки жировой ткани.
 А – ув. ок. $10 \times$ об. $10 \times$; Б, В, Г – ув. ок. $10 \times$ об. $40 \times$

При таких же условиях у годовалых гибридов русского осетра с тетраплоидным кариотипом (247 ± 6 хромосом) на белугу с диплоидным кариотипом в краниальной, медиальной и каудальной частях гонады наблюдается индифферентный период развития гонад с присутствием размножающихся первичных гоний и начальным формированием яйцевых пластин, указывающий на анатомическую дифференцировку пола, характерную для самок, имеющих массу 560 г, 600 г и 720 г (рисунок 2).

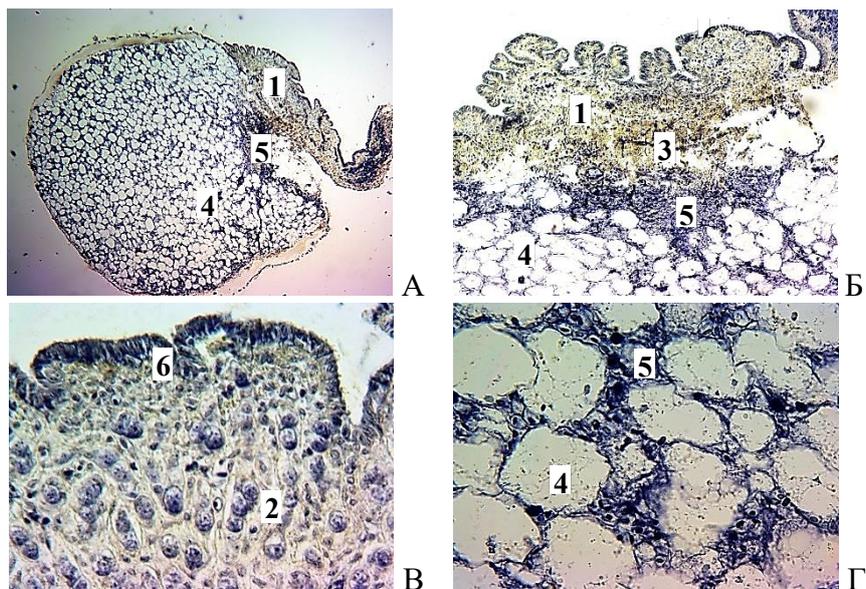


Рисунок 2 – Фрагменты гонады гибрида РО×Б: 1 – начальное формирование яйцевых пластин у гибрида; 2 – первичные гонии; 3 – паренхиматозная ткань; 4 – клетки жировой ткани; 5 – клетки крови; 6 – строма гонады.

А – ув.ок.10× об.4×; Б – ув.ок.10× об.10×; В, Г – ув.ок.10× об.40×

В прямоточных условиях с суммой тепла 5743 градусо-дней в возрасте 374 суток у тетраплоидных гибридов со сходным количеством хромосом – русского осетра на калугу (русский осетр – 247 ± 6 хромосом, калуга – 268 ± 4) в гонадах происходят изменения, где увеличивающаяся масса тела и гонад коррелирует в сторону более продвинутого развития в половых клетках.

У особи с массой 460 г в краниальной, медиальной и каудальной частях проходит размножение первичных гоний, что соответствует I стадии зрелости при еще индифферентном состоянии гонад (рисунок 3).

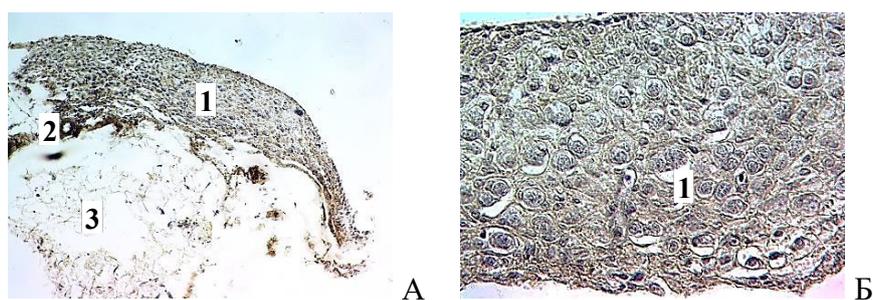


Рисунок 3 – Фрагменты гонады гибрида (масса тела 460 г) РО×К: 1 – размножающиеся первичные гонии; 2 – паренхиматозная ткань; 3 – клетки жировой ткани.

А – ув.ок.10× об.10×; Б – ув.ок.10× об.40×

У гибридной формы русского осетра и калуги с массой 540 г отмечается анатомическая дифференцировка пола, в гонадах видны борозда-щель и размножающиеся первичные гонии, что соответствует I – началу II стадии зрелости (рисунок 4).

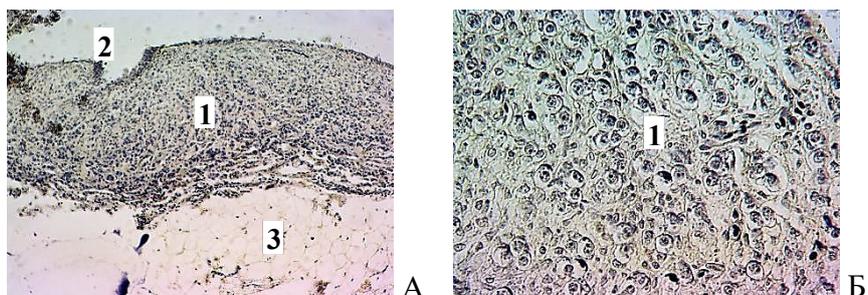


Рисунок 4 – Фрагменты гонады гибрида РО×К (масса тела 540 г) в I – начале II стадии зрелости: 1 – размножающиеся первичные гонии; 2 – появление борозды-щели; 3 – жировая ткань. А – ув.ок.10× об.10×; Б –ув.ок.10× об.40×

У крупной особи русского осетра и калуги массой 1120 г, присутствует анатомическая дифференцировка пола с формированием яйцевых пластин. По краям яйцевых пластин расположены гнезда с оогониями в процессе размножения, что также соответствует I – началу II стадии зрелости гонад (рисунок 5).

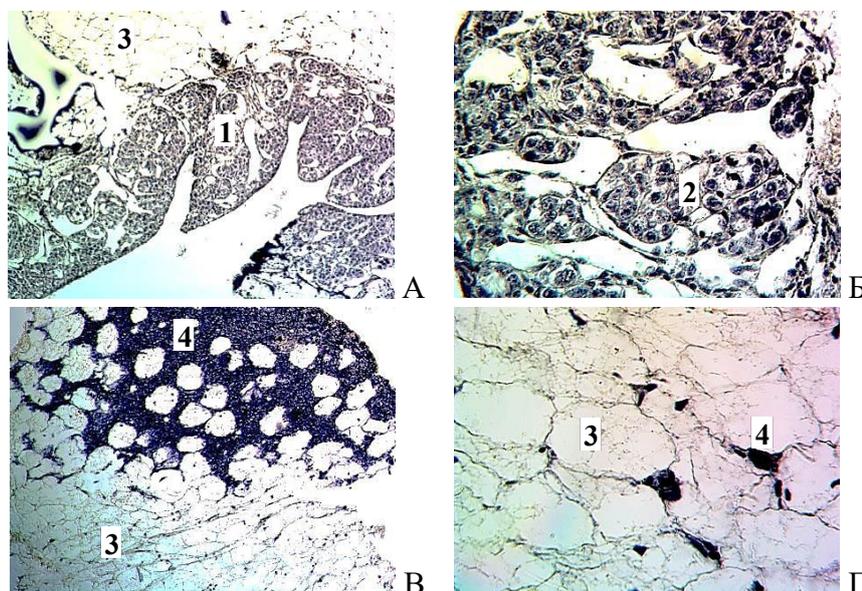


Рисунок 5 – Фрагменты гонады гибрида РО×К (масса тела 1120 г) в I – начале II стадии зрелости гонад: 1 – яйцевые пластины; 2 – размножающиеся оогонии; 3 – клетки жировой ткани; 4 – клетки крови. А, В – ув.ок.10× об.10×; Б, Г – ув.ок.10× об.40×

В условиях комбинированного содержания у годовалых гибридов РО×К в возрасте 374 суток при меньшей сумме тепла 5643 градусо-дней и с различной массой тела показано ускоренное развитие половых клеток.

При анализе фрагментов гонад особи массой 520 г половые клетки находятся во II стадии зрелости с показателем анатомической дифференцировки пола. Паренхимные клетки гонад содержат жир, вдоль развитых яйцевых пластин расположены гнезда размножающихся оогоний (рисунок 6).

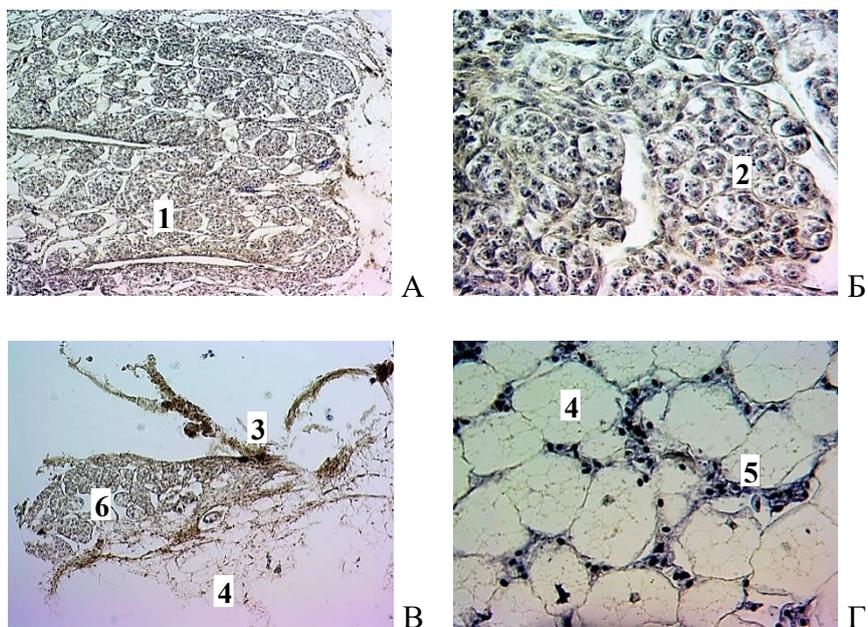
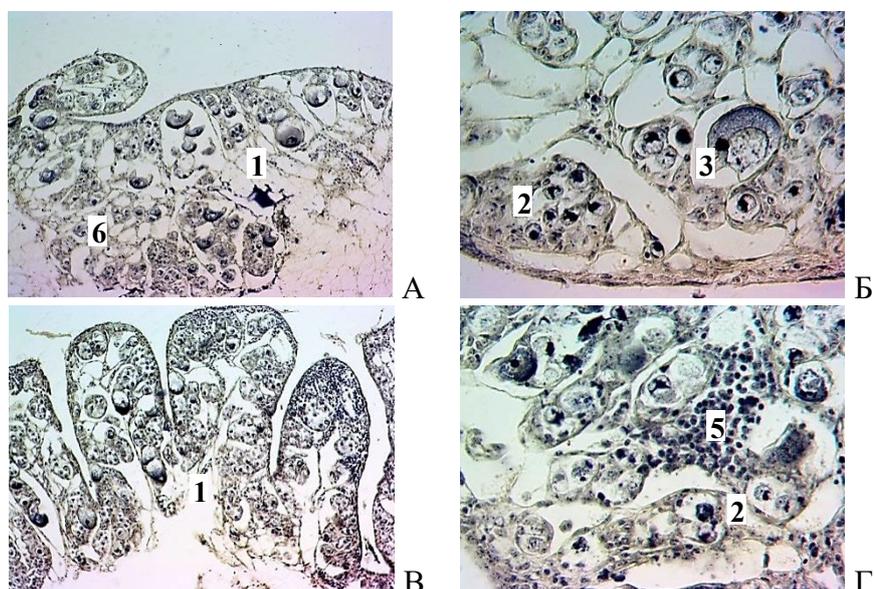


Рисунок 6 – Фрагменты гонады гибрида РО×К (масса тела 520 г) при комбинированном содержании: 1 – яйцевые пластины; 2 – размножающиеся оогонии; 3 – паренхиматозная ткань; 4 – жировая ткань; 5 – клетки крови; 6 – каудальная часть гонады.
А, В – ув.ок.10× об.10×; Б, Г – ув.ок.10× об.40×

В гонадах самки гибрида РО×К массой 720 г прошла цитологическая дифференцировка пола, которая определяет развитие половых клеток в женском направлении. Гонады находятся на II полужировой стадии зрелости. На снимках видны развитые яйцевые пластины, вдоль которых расположены гнезда с митотически делящимися оогониями и ооцитами синаптенного пути. В небольшом количестве имеются базофильные ооциты однослойного фолликула. На этом этапе в некоторой степени присутствует ювенальный гермафродитизм, в гонадах происходит размножение сперматогоний. Состояние половых клеток у самок гибрида РО×К во всех частях гонады представлено на рисунке 7.



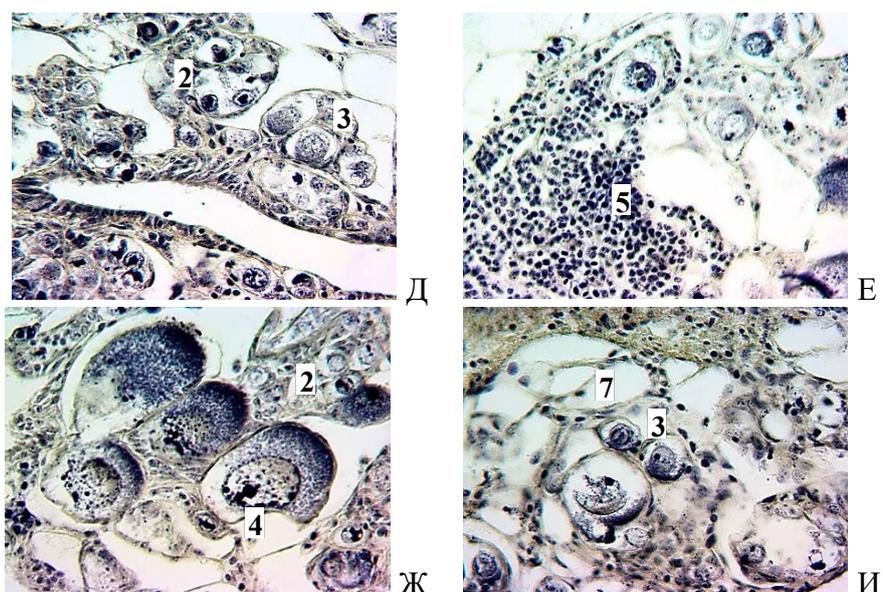


Рисунок 7 – Фрагменты гонады самки гибрида РО×К (масса тела 720 г): 1 – яйцевые пластины; 2 – размножающиеся оогонии; 3 – ооциты синаптенного пути; 4 – базофильные ооциты однослойного фолликула; 5 – размножающиеся сперматогонии; 6 – краниальная часть гонады; 7 – жировая ткань. А, В – ув.ок.10× об.10×; Б, Г, Д, Е, Ж, И – ув.ок.10× об.40×

У особи гибрида РО×К массой 800 г в годовалом возрасте половые клетки находятся в индифферентном состоянии, гонады имеют большие жировые тела (рисунок 8). Предположительно это самец.

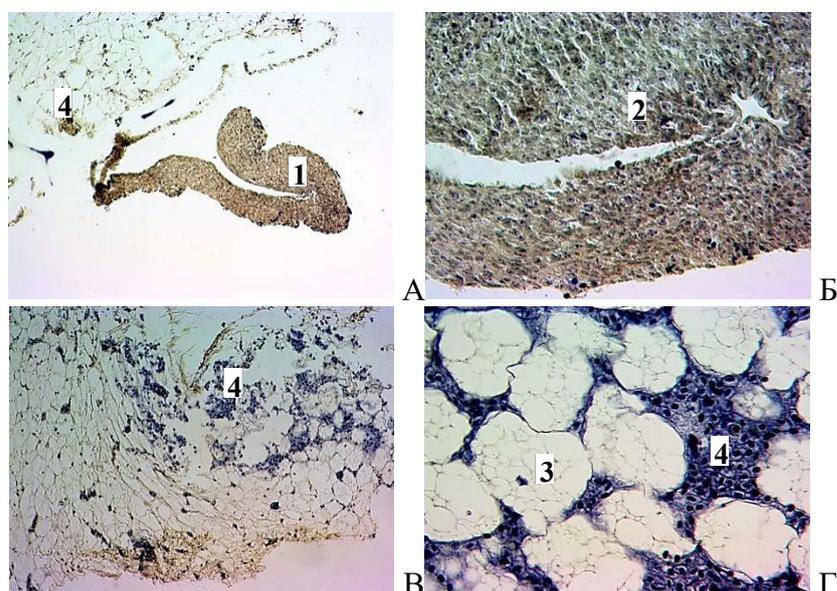


Рисунок 8 – Фрагменты гонады особи гибрида РО×К (масса тела 800 г) в индифферентном состоянии: 1 – гонада; 2 – паренхимные клетки в гонаде; 3 – жировая ткань; 4 – клетки крови. А, В – ув.ок.10× об.10×; Б, Г – ув.ок.10× об.40

В сравнении с самками цитологическая дифференцировка пола у самцов происходит в полностью сформированной железе, показателем служат волны сперматогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов при разных условиях содержания у гибридных форм в годовалом возрасте показана связь развития половых клеток с уровнем ploидности родительских форм. У годовиков сибирского и русского осетра на белугу с разным уровнем ploидности при сумме тепла 5830 градусо-дня наблюдается индифферентное состояние гонад с наличием первичных гоний. Изменяющаяся масса гонад коррелирует с массой тела за счет количественного присутствия паренхиматозной и жировой ткани, лучшие показатели по продукционной массе тела у сибирского осетра на белугу. Отсутствие дальнейшего развития половых клеток на данном этапе предполагает стерильность, что покажут дальнейшие исследования. У годовиков русского осетра на калугу с одинаковым уровнем ploидности родительских видов при сумме тепла 5743 градусо-дня, увеличивающаяся масса тела и гонад, находящихся в I – начале II стадии зрелости показывает корреляционную взаимозависимость в сторону более продвинутого развития и в половых клетках.

При комбинированном содержании при сумме тепла 5643 градусо-дня у гибрида РО×К также показана корреляционная взаимозависимость: у рыб с большей массой тела отмечается преимущество в сторону продвинутого развития половых клеток. У разных по массе особей проходит анатомическая (морфологические показатели) и цитологическая дифференцировка пола. Разрыв между анатомической и цитологической дифференцировкой пола у самок незначителен, переход от оогоний размером от 8 до 11 мкм к ооцитам синаптенного пути размером от 18 до 22 мкм проходит быстро. По краям сформированных яйцевых пластин расположены гнезда с делящимися оогониями и ооцитами синаптенного пути, которые определяют развитие половых клеток в женском направлении. Начало мейоза обеспечивает развитие ооцитов однослойного фолликула от 30 до 60 мкм, что соответствует II полужировой стадии зрелости гонад.

Из 12 проанализированных вариантов лучшая потенция роста наблюдается у сибирского осетра на белугу, а лучшая способность в ускоренном развитии половых клеток показана при комбинированном содержании у русского осетра на калугу. Перспективность гибридных форм по лучшему темпу роста и показателям развития половых клеток в зависимости от ploидности родительских форм покажет дальнейший гистологический анализ гонад.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Бурцев И.А. Гибридизация и селекция осетровых рыб при полноцикловом разведении и одомашнивании // Биологические основы рыбоводства: проблемы генетики и селекции. – Л., 1983. – С. 102-113.

Бурцев И.А. Биологические основы полноциклового культивирования осетровых рыб и создания новых пород методами гибридизации селекции: 03.02.06 Ихтиология; автореф. дис. ... докт. биол. наук. – 2013.

Кривошеин В.В. Разведение осетровых видов рыб в условиях тепловодной аквакультуры: 06.02.01 Разведение, селекция, генетика и воспроизводство сельскохозяйственных животных; автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Санкт-Петербург, 2007. – 51 с.

Николюкин Н.И. Некоторые наблюдения по гистологическому строению гонад гибридов осетровых рыб // Труды ВНИРО. – 1964. – Т. LV. – С. 145-158.

Николюкин Н.И. Отдаленная гибридизация рыб осетровых и костистых рыб (Теория и практика). – М.: Пищевая промышленность, 1972. – 335 с.

Персов Г.М. Дифференцировка пола у рыб. – Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1975. – 148 с.

Подушка С.Б., Армянинов И.В. Скрещивание ленского осетра с амурскими осетровыми в Кармановском рыбхозе и рыбоводная оценка полученных гибридов // Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития. Материалы докладов 4-й Международной научно-практической конференции. – М.: Изд-во ВНИРО, 2006. – С. 160-161.

Подушка С.Б., Чебанов М.С. Икорно-товарное осетроводство в Китае // Научно-технический бюллетень лаборатории ихтиологии ИНЭНКО. – 2007. – №13. – СПб. – С. 5-15.

Ромейс Б.С. Микроскопическая техника. – М.: Иностранная литература, 1953. – 648 с.

Сакун О.Ф., Буцкая Н.А. Определение стадий зрелости и изучение половых циклов рыб. – М.: Пищевая промышленность, 1963. – 35 с.

Сафронов А.С. Оценка качества производителей осетровых рыб на примере бестера, русского, сибирского и гибрида между ними как объектов разведения и селекции в аквакультуре: 03.00.10 Ихтиология; автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М.: ВНИИПРХ, 2003. – 24 с.

Сафронов А.С., Филиппова О.П., Зуевский С.Е., Бурлаченко И.В., Ежкин М.А., Суховер К.В. Характеристика гибридов осетровых рыб на основе бестера, культивируемых в установке замкнутого водоснабжения (УЗВ) // Труды ВНИРО, 2016. – Т. 163. – С. 108-123.

Серебрякова Е.В. Исследования гонад производителей осетра Волгоградского водохранилища // Труды ВНИРО. Осетровые южных морей Советского Союза. – 1964. – Т. 56, сб. 3. – С. 117-130.

Серебрякова Е.В. Кариологические исследования осетровых рыб в связи с применением метода гибридизации в осетроводстве: 03.00.10 Ихтиология; автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М.: ВНИРО, 1975. – 32 с.

Серебрякова Е.В. О возможности использования стерильных гибридов в осетроводстве // Вопросы морской аквакультуры / Труды ВНИРО. – 1979. – Т. СXXXVIII. – С. 68-72.

Трусов В.З. Некоторые особенности созревания и шкала зрелости половых желез // Труды ВНИРО. – 1964. – Т. 56, сборник 3. – С. 69-78.

Федосеева Е.А. Рыбоводно-биологическая и морфофизиологическая характеристика гибридов русского осетра: Дис... канд. биол. наук: 03.00.10 Ихтиология: Астрахань, 2004. – 174 с.

THE DEVELOPMENT OF SEX CELLS IN ONE-YEARS OF HYBRID FORMS OF STURGERY IN INDUSTRIAL CONDITIONS

V.A. Ilyasova, E.A. Melchenkov, A.P. Vorob'yov,
A.A. Archibasov, V.V. Kalmykova
Branch for the Freshwater Fisheries of VNIRO («VNIIPRKh»)
Email: innovazii-vniiprh@mail.ru

Abstract. The studies were carried out on yearlings of hybrid forms of sturgeons in the direct-flow farm of the Konakovskiy Department. The relationship between the development of germ cells depending on the level of ploidy of parental forms is shown. In yearlings of Siberian and Russian sturgeons for beluga with different numbers of chromosomes, with a total heat of 5830 degree days, an indifferent state of the gonads is observed with the presence of primary gonidia. In hybrids of the Russian sturgeon and Kaluga with the same level of ploidy of the parental species, with a sum of heat of 5743 degree-days, the gonads are in I - early II stages of maturity. The combined content of the hybrid RO×K at a total heat of 5643 degree-days showed a qualitative breakthrough in the ability to develop germ cells - nests with dividing oogonia and oocytes of the synaptic pathway are located along the edges of the formed egg plates. The onset of meiosis ensures the development of oocytes of a single-layer follicle, which corresponds to the second half-fat stage of gonadal maturity.

Keywords: histology, sturgeon hybrids, gametogenesis, germ cells, sex differentiation.

РЫБОВОДНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГИБРИДОВ ОСЕТРОВЫХ РЫБ, КАК ОБЪЕКТОВ ТОВАРНОГО ВЫРАЩИВАНИЯ В УСЛОВИЯХ БАССЕЙНОВОГО ИНДУСТРИАЛЬНОГО ХОЗЯЙСТВА

Е.А. Мельченков, В.А. Илясова, В.В. Калмыкова,
А.П. Воробьев, А.А. Арчибасов, А.В. Мищенко, Ю.А. Новоселова,
Н.А. Козовкова, Ю.А. Антипина

*Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО»
(«ВНИИПРХ»)*

Email: innovazii-vniiprh@mail.ru

Представлены технологические схемы получения и выращивания товарных двухлетков гибридов осетровых рыб в двухлетнем цикле. Определены (выбраны) наиболее перспективные, обладающие высоким темпом роста в условиях промышленных хозяйств, гибриды осетровых рыб, приведена их сравнительная рыбоводно-биологическая характеристика.

Ключевые слова: гибриды осетровых рыб, сумма тепла, коэффициент массонакопления, температура воды, масса, рыбопродуктивность.

ВВЕДЕНИЕ

Многообразие форм тепловодных хозяйств по наличию и возможности использования сбросной теплой воды ГРЭС, ТЭЦ и других энергообъектов с разной среднегодовой температурой воды и суммой тепла с возможностью использования энергопотерь для организации выращивания товарной продукции осетровых видов рыб, позволяет значительно сократить сроки и затраты на ее производство, в сочетании с объектами выращивания, наиболее полно отвечающих предъявляемым хозяйствами такого типа требований, значительно улучшить экономическую эффективность их работы.

Выбор объектов товарного выращивания зависит от условий и биотехнологии интенсивного рыбоводства. Одной из широко используемых технологий, способных в несколько раз сократить сроки выращивания объектов и круглогодично получать жизнестойкую молодь и товарную продукцию, является технология с использованием установок замкнутого водообеспечения (УЗВ). При таком способе выращивания преимущество отдается видам с высокими адаптационными возможностями и интенсивностью роста. Наиболее популярными объектами являются сибирский осетр, стерлядь и различные гибридные формы осетровых рыб, обладающие рядом преимуществ по сравнению с исходными родительскими видами [Никифоров, 2002; Пономарев, Иванов, 2009; Говорливых и др., 2012; Газимагомедова и др., 2013; Филиппова, Зуевский, 2013].

При выборе объектов выращивания в товарных индустриальных хозяйствах целесообразно подбирать виды осетровых рыб и их гибридных форм, имеющих высокую скорость роста, хорошо употребляющие искусственные корма, обладающие высоким выходом и качеством мяса при получении технологической продукции.

Изучение рыбоводно-биологических показателей гибридов осетровых видов рыб при выращивании в конкретных условиях дает возможность успешно внедрять их в практику товарного выращивания [Пономарев и др., 2019].

Белуга – самый крупный представитель семейства осетровых. В естественных условиях достигает массы 1,5 т. Средний возраст идущих на нерест самок составляет 18-25 лет, самцов – 12-16 лет. Плодовитость от 200 тыс. до 8 млн икринок. Товарной массы (3-5 кг) на фоне естественных температур достигает в течение 2-3 лет.

Русский осетр – может быть использован в качестве объекта товарного выращивания. В природных условиях созревает в возрасте 8-10 лет, достигая длины 2 м и массы 50-60 кг. Плодовитость от 150 до 840 тыс. икринок. В искусственных условиях товарной массы 1,5-3,0 кг достигает на вторые-третьи годы [Матишов и др., 2013].

Калуга – эндемик системы реки Амур, встречается в реке и крупных больших притоках, озерах. Растет медленнее белуги, половозрелость наступает довольно поздно – в 17-20 лет. Плодовитость самок варьирует от 500 тыс. до 4 млн икринок [Пономарев, Иванов, 2009].

Сибирский осетр является основным объектом товарного рыбоводства в России и Европе. Он созревает раньше русского осетра и лучшим образом приспособлен к условиям искусственного выращивания. При высокой обеспеченности пищей и повышенной, по сравнению с естественной, температуре воды темп роста сибирского осетра существенно увеличивается. Наиболее интенсивно осетр растет при температуре 15-25°C, однако рост сохраняется и при более низких температурах (1-10°C) [Пономарев, Магомаев, 2011].

Амурский осетр является эндемиком бассейна реки Амур и весьма близок к сибирскому осетру. Имеет проходную и пресноводную формы. Самцы созревают в возрасте 9-10 лет, самки – 13-17 лет. Сеголетки к концу осени имеют длину 12-17 см, массу 11-18 г. В Амурском лимане средняя масса промыслового осетра – 6-8 кг, в Амуре – 2,5-5,5 кг (может достигать 36 кг) [Промысловые рыбы России, 2006; Пономарев, Иванов, 2009].

Целью работы являлся поиск наиболее перспективных гибридных форм осетровых рыб для товарного выращивания в условиях индустриальных хозяйств различного типа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

На основании анализа литературных источников и опыта работы рыбоводных хозяйств с различными гибридными формами осетровых рыб

выполнены экспериментальные работы по сравнительному выращиванию межродового гибрида сибирского осетра с калугой (СО×К) и внутривидового гибрида сибирского осетра с амурским осетром (СО×АО), межродовых гибридов сибирского осетра ленской популяции с белугой (СО×Б), русского осетра на белугу (РО×Б), русского осетра на калугу (РО×К). Исследования выполнялись на экспериментальной базе отдела «Конаковский» и УЗВ цеха по исследованию индустриальной аквакультуры (расположен в ОСПХ «Якоть») Филиала по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»).

Для проведения скрещивания с целью получения посадочного материала гибридных форм осетровых рыб были использованы самки сибирского осетра в возрасте 11-12 лет и самцы амурского осетра в возрасте 11 лет, а также криоконсервированная сперма самца калуги, полученная в 2018 г. на индустриальном предприятии ООО «Биоакустик», г. Клин. Для создания гибридных форм (СО×Б), (РО×Б), (РО×К) использовались производители генерации: СО – 2008 года, Б – 1995 года, РО – 2007 года и К – 2005 года, выращенных в искусственных условиях. Технологическая схема получения гибридных форм осетровых рыб представлена на рисунке 1.



Рисунок 1 – Технологическая схема проведения работ по получению и выращиванию гибридных форм осетровых рыб

Выведение производителей на нерестовый режим осуществляли путём постепенного (1-2° в сутки) повышения температуры воды с 9 до 14°C. После достижения нерестовой температуры 14°C выдерживание продолжалось в течение 6-8 суток.

Для гормональной стимуляции использовали гипофизы карповых рыб и отечественный аналог гонадотропин-релизинг гормона млекопитающих (GnRH-a) «сурфагон». Самкам сибирского и русского осетров дозировка при предварительной инъекции гипофизом карповых рыб составила 0,7 мг/кг, разрешающей – 5 мкг/кг «сурфагона» с интервалом 12 часов. Самцов инъецировали однократно перед разрешающей инъекцией самкам гипофизом карповых рыб дозировкой 3,0 мг/кг. Всего в процессе воспроизводства использовали двух самцов белуги, одного калуги и двух самцов амурского осетра.

Овуляция икры наступила через 25-28 часов после разрешающей инъекции. Половые продукты от самок получали с использованием метода подрезания яйцеводов [Подушка, 1986], от самцов – путём сцеживания с использованием уретральных катетеров. Качество полученного эякулята соответствовало 4-5 баллам по пятибалльной шкале Г.М. Персова [Персов, 1941; Казаков, Образцов, 1990]. Средний объём эякулята на единицу массы тела (относительная плодовитость) у амурских осетров составил 35,7 мл/кг, белуги – 40,8 мл/кг, калуги – 37,0 мл/кг. Оплодотворение икры проводили по общепринятым методикам.

Задачей исследований являлась сравнительная характеристика результатов товарного выращивания экспериментальных групп гибридных форм осетровых рыб в двухлетнем цикле. Экспериментальные работы выполнены в отделе «Конаковский» и УЗВ цеха ИИА Филиала по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»).

Комбинированная технология выращивания товарных осетровых в двухлетнем цикле подразумевает получение крупного посадочного материала в первый год, за счет использования оптимальных искусственных условий, создаваемых УЗВ, и доращивания годовиков гибридов осетровых до товарной массы уже в условиях с естественным температурным режимом, а также в условиях промышленных бассейновых и садковых хозяйств.

Проведено 2 тура экспериментов по выращиванию опытных групп рыб: первый тур выполнен в 2021-2022 гг. с использованием гибридных форм, полученных на основе сибирского осетра (СО×АО и СО×К) в УЗВ цеха ИАА; второй тур по выращиванию гибридных форм на основе русского и сибирского осетров (РО×Б, РО×К, СО×Б) проводили в 2022-2023 гг. на базе УЗВ и прямоточных бассейнов отдела «Конаковский».

На первом этапе выращивание гибридных форм СО×К и СО×АО проводили в условиях установки с замкнутым циклом водообеспечения (цех ИИА) в лотках ейского типа с дальнейшим переводом в два идентичных бассейна объемом 6,6 м³ (φ 2,8 м и h 1,2 м) с кратностью водообмена 0,55 объема/час. Среднее содержание кислорода в воде на всем протяжении

рассматриваемого периода составляло 8,0 (7,3-9,2) мг/л. На этот период времени общая сумма тепла составила 7838 градусо-дней при средней температуре воды 19,4°C. Кормление осуществляли кормами фирм Biomar inicio plus с крупкой 1,5-2,0 мм, содержанием белка и жира 54 и 21%, соответственно, ЭПКО 48/18 – крупка 3,0 мм, Sorrens 46/15 с крупкой 4,5 мм. Норма кормления составляла 4,8 в начале и до 1,0% от биомассы в конце этапа при кратности 12-5 раз в сутки, соответственно.

На втором этапе после перевода в отдел «Конаковский» в возрасте 414 суток и средней массе гибридов СО×К и СО×АО – 2849 и 2103 г, соответственно, рыба была размещена в бетонном бассейне (ПБЦ) общей площадью 10 м², объемом 10 м³ с плотностью посадки 10 шт./м² при рыбопродуктивности 22,8 кг/м² (22,8 кг/м³).

Содержание кислорода за весь период выращивания (623 суток) колебалось от 5,8 до 10,0 (среднее 7,0) мг О₂/л при средней температуре воды 18,9°C (18,4-26,8°C), общая сумма тепла составила 12217 градусо-дней.

При выращивании двухлеток экспериментальных групп гибридных форм осетровых рыб (СО×АО и СО×К) для кормления использовался экструдированный продукционный корм для осетровых видов рыб – ЭПКО 46/19 с диаметром гранул от 3,0 до 6,0 мм с содержанием белка и жира 46 и 19%, соответственно, и перевариваемой энергией 17,5 МДж/кг. Начиная с 315 суток применялся продукционный корм Осетр 47/15 марки ООО «ЛимКорм» с содержанием сырого протеина 47% и жира 15%, перевариваемая энергия 17,5 МДж/кг, с 414 суток выращивания – Sorrens supreme с содержанием сырого протеина 40% и жира 15% (фракция 4,5 мм). Норма кормления составляла 0,30 в начале и до 0,70% от биомассы в конце этапа при кратности 1-3 раз в сутки, соответственно.

Сеголеток СО×Б, РО×Б, РО×К на первом этапе выращивали в УЗВ в лотках ейского типа и бассейнах площадью 20 м², с дальнейшим переводом экспериментальных групп по 600 шт. особей в каждой в прямоточные бассейны ПБЦ. Ввиду сходства температурного режима в УЗВ и ПБЦ в летний период в прямоточных бассейнах, оставшихся после формирования экспериментальных групп гибридов РО×К продолжали выращивать до возраста 266 суток и средней массы 715 г в условиях УЗВ. На первом году выращивания кормление сеголеток гибридных форм СО×Б, РО×Б, РО×К осуществляли кормами фирм ЭПКО – 52/15, Sorrens – 46/15, Biomar supreme – 46/15 крупкой 3,0-4,5 мм. Норма кормления составляла 2,1 в начале и до 0,70% от биомассы в конце этапа при кратности 5-3 раз в сутки, соответственно.

На втором этапе выращивания гибридных форм (СО×Б, РО×Б, РО×К) так же, как и предыдущих гибридов продолжали культивировать в прямоточных бетонных бассейнах площадью 10 м² (2,0×5,0×1,2 м), объемом 10 м³ (ПБЦ) с средней плотностью посадки 13 шт./м² или 28,6 кг/м² (24,5-34,3 кг/м²). Содержание кислорода за весь период выращивания (138 суток) колебалось от 5,6 до 9,9 (среднее 7,5) мг О₂/л при средней температуре воды 19,5°C (12,0-24,5°C); общая сумма тепла за период выращивания составила 2689 градусо-

дней. При выращивании для кормления использовался производственный корм Aquagex с диаметром гранул 4,5 мм, содержанием белка и жира 46 и 16%, соответственно, перевариваемой энергией 17,4 МДж/кг.

Корм вносился в зимний период в количестве 0,15-0,20% от биомассы рыбы с периодичностью 1-2 кормления в сутки, в весенний период – 0,30-0,70% в летний, соответственно, 0,70-1,20% от биомассы рыбы и 2-3 кормления в сутки.

Схема проведения работ по выращиванию сеголеток и двухлеток гибридных форм осетровых рыб в условиях индустриального хозяйства представлена на рисунке 2.

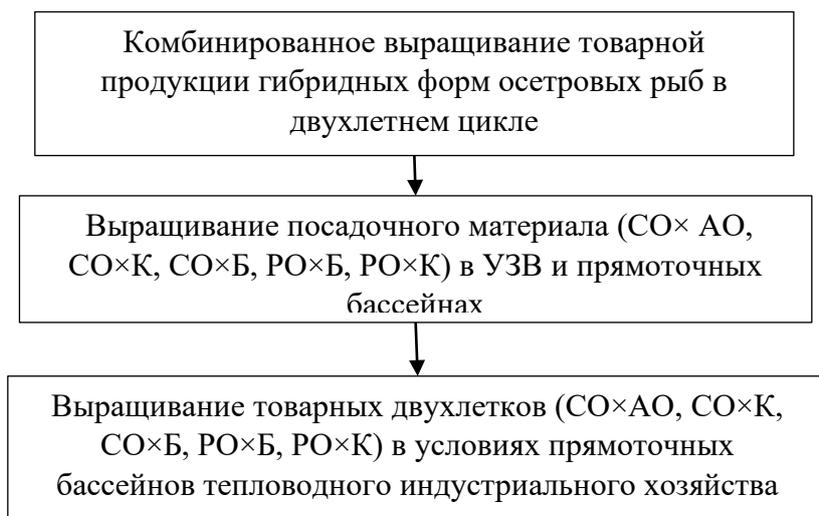


Рисунок 2 – Схема выращивания гибридных форм осетровых рыб в двухлетнем цикле

В процессе выращивания раз в месяц проводили полные обловы с определением размерного состава и минимальной, максимальной, средней массы выращиваемой рыбы. Также осуществляли контроль за гидрохимическими (температура, кислород), гидрологическими (удельный расход воды, кратность водообмена, общий расход воды) параметрами среды [Правдин, 1966]. Рассчитывали коэффициент массонакопления [Резников и др., 1978; Баранов и др., 1979]. Для статистической обработки полученных результатов использовали стандартную программу Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выбор объектов товарного выращивания обуславливается условиями рыбоводных хозяйств, использующих сбросную технологическую теплую воду (ТЭЦ, ГРЭС и др.), применение которой в целях аквакультуры позволяет значительно сократить сроки выращивания рыбы и организовать круглогодичное получение товарной продукции. С целью поиска наиболее перспективных объектов товарного выращивания в индустриальной аквакультуре были созданы в результате межвидовой и межродовой гибридизации гибридные формы СО×К, СО×АО, СО×Б, РО×Б и РО×К,

проведена их оценка по наиболее ценным рыбохозяйственным показателям.

Результаты сравнительного выращивания гибридов СО×К, СО×АО при сумме тепла 11664 градусо-дня представлены на рисунке 3.

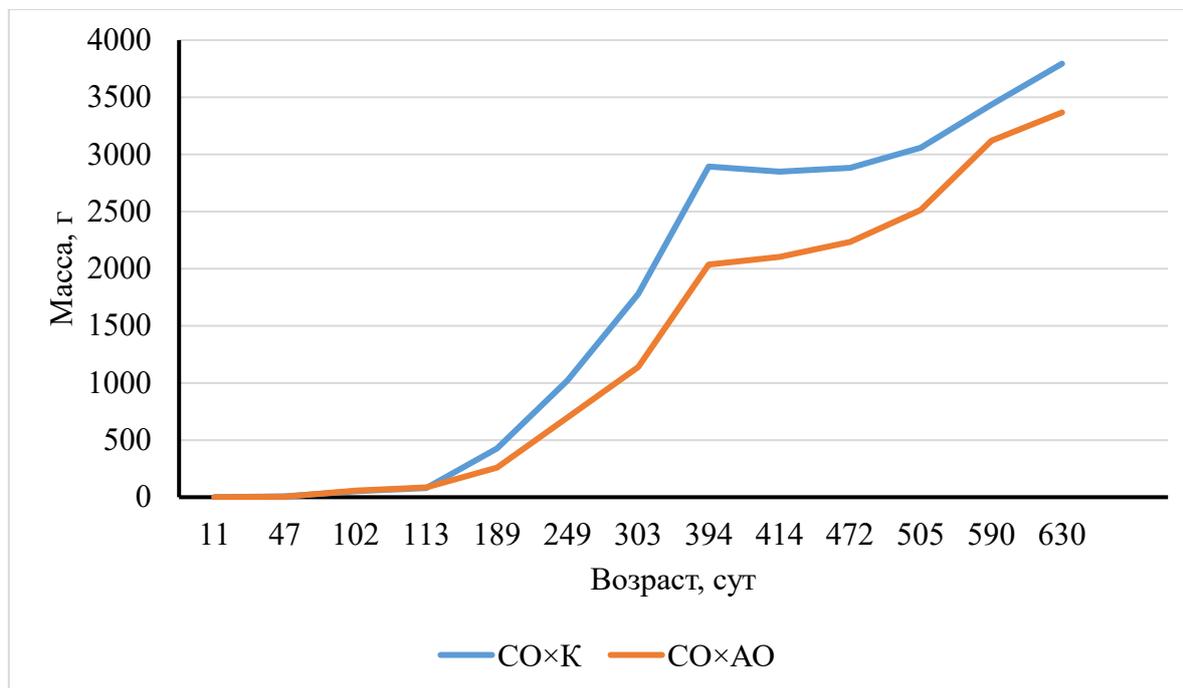


Рисунок 3 – Рост гибридных форм СО×К и СО×АО в условиях УЗВ цеха ИИА и прямоточных бассейнов отдела «Конаковский» за двухлетний период выращивания при общей сумме тепла 11664 градусо-дней

Согласно рисунку 3, с 2021 по 2022 год наилучшие ростовые качества за двухлетний период выращивания при средней температуре воды 18,9°C показала гибридная форма СО×К, достигнув в возрасте 623 суток средней массы 3794 г (колебания от 2140 до 5880 г), гибридная форма СО×АО при аналогичной сумме тепла показала более низкие результаты – 3367 г (колебания от 2020 до 4440 г). У гибрида СО×К в конце выращивания прирост биомассы был выше на 13,3%, чем у гибрида СО×АО. За 2022 год прирост средней массы гибрида СО×К увеличился на 1283 г или 51,3%, СО×АО – 1665,5 г или 97,9%, соответственно, что, по-видимому, связано с лучшей стрессоустойчивостью последнего.

Коэффициент массонакопления у гибрида СО×К составил 0,074 и был практически одинаковым с гибридом СО×АО - 0,071, но гибрид СО×К показал большую потенцию роста, при общем выходе продукции с единицы площади 31,8 кг/м².

При общей сумме тепла 11664 градусо-дней из рассматриваемой группы рыб наиболее эффективно тепловую энергию внешней среды на рост массы тела использует гибрид СО×К.

Далее представлены результаты двухлетнего выращивания за период с 2022 по 2023 год (624-631 суток) гибридных форм СО×Б, РО×Б и РО×К, весь

жизненный цикл находившихся в идентичных условиях УЗВ цеха ИИА и прямоточных бассейнов отдела «Конаковский» при средней температуре воды 16,1°C (4,7-25,5°C) и общей сумме тепла 10191 градусо-дней. Рост гибридных форм СО×Б, РО×Б и РО×К за двухлетний период выращивания при общей сумме тепла 10191 градусо-дней представлен на рисунке 4. Из рисунка видно, что явным преимуществом в реализации потенциала роста обладает гибрид СО×Б (2596 г). Промежуточное положение занимает гибрид РО×К (2049 г), наиболее низкие показатели имеет гибрид РО×Б (1870 г). Коэффициент массонакопления гибридных форм СО×Б, РО×Б (631 сутки) и РО×К (624 сутки) за весь период выращивания был практически одинаковым – 0,064 (СО×Б), 0,057 (РО×Б) и 0,060 (РО×К).

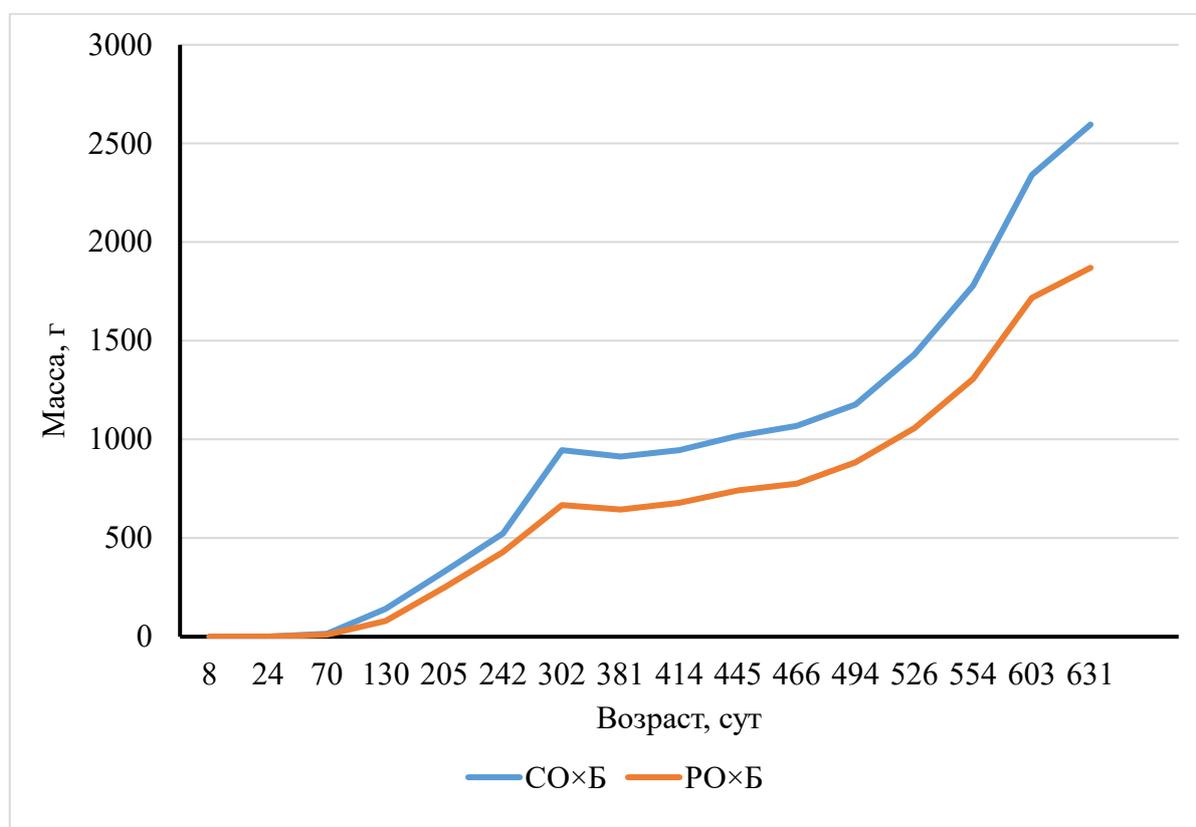


Рисунок 4 – Рост гибридных форм СО×Б, РО×Б в УЗВ цеха ИИА и прямоточных бассейнах до возраста 630 суток при общей сумме тепла 10191 градусо-дней

Хорошие результаты по темпу роста при сумме тепла 10004 градусо-дней показал гибрид РО×К, находившийся 266 суток в условиях УЗВ цеха ИИА при средней температуре 17,2°C и 358 суток в условиях прямоточных бассейнов при 14,4°C, достигший средней массы 2243 г (1600-3900 г) при среднем коэффициенте массонакопления 0,062 за все время выращивания (624 сутки). Рост гибридной формы РО×К в УЗВ цеха ИИА и прямоточных бассейнах до возраста 630 суток представлен на рисунке 5.

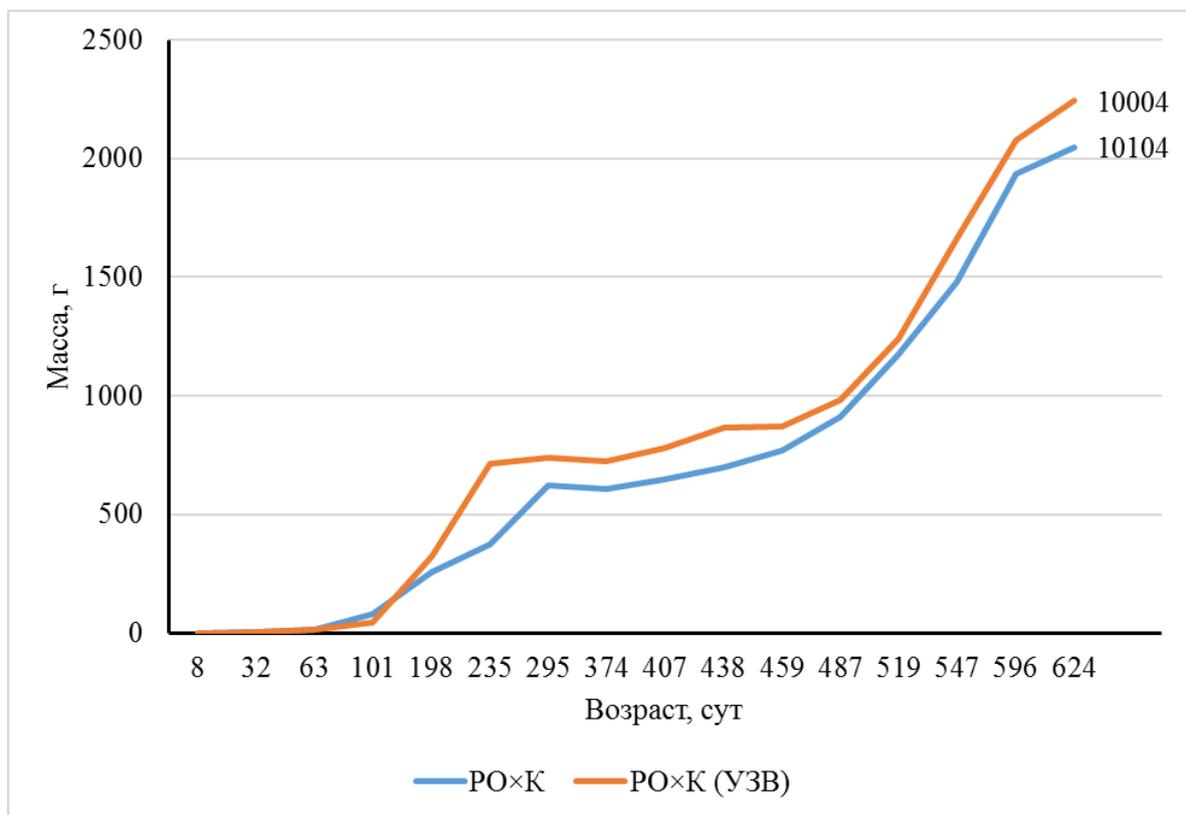


Рисунок 5 – Рост гибридных форм POxK в УЗВ цеха ИИА (10004 градусо-дней) и в прямоточных бассейнах отдела «Конаковский» (10104 градусо-дней)

В то же время средняя масса данного гибрида, выращиваемого все 624 суток в условиях УЗВ цеха ИИА при общей сумме тепла 5828 градусо-дней, составила 4160 г (2270-6000 г).

На основании выполненных работ разработана технологическая схема по выращиванию товарной продукции гибридных форм осетровых рыб. Технологическая схема выращивания и сравнительный анализ продукционных характеристик межродовых гибридных форм осетровых рыб СОxБ, СОxК, РОxК, РОxБ и межвидового СОxАО за два года выращивания в условиях промышленных бассейновых хозяйств представлена в таблице 1.

Сравнивая рыбоводно-биологические показатели, полученные в результате двухлетних исследований по комбинированному выращиванию гибридных форм осетровых рыб в идентичных условиях промышленных хозяйств можно отметить следующее: на первых этапах выращивания в возрасте 32-40 суток при одинаковых условиях (средняя температура, сумма тепла и др.) наилучшие результаты по темпу роста, выживаемости и кормовым затратам показала молодь гибридных форм СОxК и СОxАО.

Таблица 1 – Технологическая схема выращивания гибридных форм осетровых рыб в двухлетнем цикле

Время выращивания, сут.	T, °C	Сумма тепла, градусо-дни	СО×Б	РО×Б	РО×К*	Время выращивания, сут.	T, °C	Сумма тепла, градусо-дни	СО×К	СО×АО
Первый этап: Получение потомства и выращивание молоди в УЗВ										
8	15,6	125	Инкубация развивающейся икры			6	16	96	Инкубация развивающейся икры	
Выдерживание личинок, г										
8	17,2	137	0,015	0,02	0,022	13	17	221	0,47	0,45
Подращивание, г										
16/24*	17,6/17,4*	281/418*	0,39	0,18	1,3	15	18	286	0,72	0,72
Выращивание молоди, г										
46/31*	16,3/16,6*	750/514*	15	11	12	20	16,5	281	6,5	5
30	16,8/17,2*	504/516*	60	50	42					
Выращивание посадочного материала (сеголетков), г										
ПБЦ (май-ноябрь)						УЗВ (апрель-ноябрь)				
31	17,4	539	141	79	79	55	18,7	1011	50	60
64**	21,8	1395	330	249	190	137	22	3019	900	600
40	22,1	884	523	429	372					
59**	14,6	861	767	597	544	65	18,9	1231	1800	1200
Выращивание годовиков, г										
ПБЦ (декабрь-март)						УЗВ (декабрь-февраль)				
143	8,7	1246	1019	741	700	92	18,4	1693	2900	2100
Второй этап: выращивание товарной рыбы (двухлеток) в ПБЦ										
апрель-октябрь						март-октябрь				
49	15,9	780	1177	884	909	94	14,6	1370	3000	2500
109	20,2	2209	2341	1717	1937	49	21,7	1068	3100	2700
28	17,1	480	2596	1870	2049	37	20,6	762	3400	3200
						40	15,6	626	3800	3400

Примечание: * гибрид РО×К был получен в более поздний срок; ** сортировка

При дальнейшем выращивании в возрасте 101-109 суток наилучшие рыбоводные качества проявила молодь СО×Б и СО×АО достигнув массы 60 и 59 г, соответственно. Заболевание гибрида СО×К в этот период сказалось отрицательно на результатах его выращивания (увеличение кормового коэффициента и уменьшение рыбопродуктивности).

В возрасте 235-266 суток это нашло свое отражение в низких результатах выживаемости молоди 57,3% по сравнению с другими гибридными формами и

увеличении средней массы рыбы (до 900 г). Среди других гибридов наилучшие показатели роста и выживаемости при самом низком кормовом коэффициенте были у РО×К, который выращивался в течении 266 суток в условиях УЗВ цеха ИАА при общей сумме тепла за этот период 4857 градусо-дней.

На 294-311 сутки при общей сумме тепла 6049 градусо-дней наилучшие показатели по росту наблюдается у гибридов СО×К и СО×АО. При сумме тепла 5476 градусо-дней наилучших показателей по росту достиг гибрид СО×Б, однако наиболее низкие кормовые коэффициенты при средней массе 597 и 544 г наблюдались у гибридов РО×Б и РО×К – 0,99 и 0,97, соответственно.

Содержание в УЗВ цеха ИАА и отсутствие «зимовки» положительно сказалось на дальнейшем росте гибридов СО×К и СО×АО, которые в возрасте 403 суток при сумме тепла 7742 градусо-дня и низкой выживаемости в связи с заболеванием (39,0-58,0%) достигли массы 2849 и 2103 г. Гибридные формы (СО×Б, РО×Б и РО×К), находящиеся в условиях проточных бассейнов, прошедшие процесс зимовки с суммой тепла 6535-6722 градусо-дней и высоким уровнем выживаемости достигли массы 700-1019 г. Кормовой коэффициент составил 1,59-3,50 ед.

При дальнейшем выращивании и достижении возраста 486-497 суток наметившаяся тенденция положительного влияния общей суммы тепла 9112 градусо-дней на рост рыб нашла свое отражение у гибридов СО×К (3064 г) и СО×АО (2508 г) против группы рыб, получивших меньшую сумму тепла – 7315-7502 градусо-дней СО×Б (1180 г), РО×К (909, 982 г) и РО×Б (884 г).

По достижению возраста 623 суток при общей сумме тепла 11664 градусо-дней наибольшей средней массы достиг гибрид СО×К – 3794 г (2140-5880 г). При общей сумме тепла 10191 градусо-дней на 631 сутки выращивания лучший результат по росту показал гибрид СО×Б – 2596 г (1440-4140 г). Результаты сравнительного выращивания гибридных форм осетровых рыб представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Сравнительная рыбоводно-биологическая характеристика гибридных форм осетровых рыб в зависимости от факторов среды

Показатели	Гибридная форма					
	СО×К	СО×АО	СО×Б	РО×Б	РО×К	РО×К ¹
Возраст, сут.	34	34	32	32	40	-
Средняя масса, г	0,72	0,72	0,39	0,18	1,3	-
Средняя температура воды за этап, °С	18,0	18,0	17,4	17,4	17,3	-
Общая сумма тепла, градусо-дни	507	507	543	543	680	-
Количество рыб в начале этапа	8040	8167	12000	12000	6000	-
Выживаемость за этап	72,9	68,6	46,6	43,4	56,7	-
Общий расход корма за этап, кг	2,5	2,5	1,0	0,4	2,4	-
Кормовой коэффициент, ед.	0,51	0,53	0,50	0,57	0,57	-
Возраст, сут.	109	109	108	108	101	-
Средняя масса, г	51,2	59,0	60,0	50,0	42,0	-
Средняя температура воды за этап, °С	18,7	18,7	16,8	16,8	17,2	-
Общая сумма тепла, градусо-дни	1895	1895	1797	1797	1710	-
Количество рыб в начале этапа	650	650	13000	7000	8000	-

Показатели	Гибридная форма					
	СО×К	СО×АО	СО×Б	РО×Б	РО×К	РО×К ¹
Выживаемость за этап	75,2	90,9	100,0	100,0	100,0	-
Общий расход корма за этап, кг	10,7	18,7	313,2	132,3	156,9	-
Кормовой коэффициент, ед.	1,03 ²	0,59	0,65	0,60	0,59	
Рыбопродуктивность, кг/м ²	3,8	9,1	26,1	9,8	6,3	
Возраст, сут.	246	246	242	242	235	266
Средняя масса, г	900	560	523	430	372	715
Средняя температура воды за этап, °С	22	22	22,1	22,1	22,1	20,2
Общая сумма тепла, градусо-дни	4914	4914	4615	4615	4528	4857
Количество рыб в начале этапа	284	591	293	317	317	1500
Выживаемость за этап	57,3	86,0	97,3	95,6	98,1	99,5
Общий расход корма за этап, кг	131,1	152,4	76,8	56,8	55	378
Кормовой коэффициент, ед.	1,30	2,50	1,47	1,27	1,48	0,86
Рыбопродуктивность, кг/м ²	29,1	25,2	14,9	13,0	11,6	33,8
Возраст, сут.	311	311	301	301	294	294
Средняя масса, г	1779	1140	767	597	544	741
Средняя температура воды за этап, °С	18,9	18,9	14,6	14,6	14,6	14,9
Общая сумма тепла, градусо-дни	6145	6145	5476	5476	5389	5289
Количество рыб в начале этапа	123	123	285	303	311	470
Выживаемость за этап	87,8	96,7	97,9	97,6	95,1	99,5
Общий расход корма за этап, кг	156,0	108,9	71,0	44,8	43,3	15,3
Кормовой коэффициент, ед.	1,87	1,81	1,09	0,99	0,97	1,25
Рыбопродуктивность, кг/м ²	32,2	22,6	21,4	17,5	16,1	34,8
Возраст, сут.	403	403	444	444	437	437
Средняя масса, г	2849	2103	1019	741	700	865
Средняя температура воды за этап, °С	18,4	18,4	8,7	8,7	8,7	8,7
Общая сумма тепла, градусо-дни	7838	7838	6722	6722	6635	6535
Количество рыб в начале этапа	108	119	216	217	216	216
Выживаемость за этап	39,0	58,0	97,7	97,2	98,1	98,1
Общий расход корма за этап, кг	152,5	135,0	38,3	26,8	26,8	38,3
Кормовой коэффициент, ед.	3,90	2,80	3,50 ³	2,07 ³	1,90 ³	1,59 ³
Рыбопродуктивность, кг/м ²	20,2	23,4	21,5	15,6	14,9	18,3
Возраст, сут.	497	497	493	493	486	486
Средняя масса, г	3064	2508	1180	884	909	982
Средняя температура воды за этап, °С	14,6	14,6	15,9	15,9	15,9	15,9
Общая сумма тепла, градусо-дни	9208	9208	7502	7502	7415	7315
Количество рыб в начале этапа	38	57	211	211	212	212
Выживаемость за этап	100,0	96,5	100,0	100,0	100,0	100,0
Общий расход корма за этап, кг	33,2	33,2	48,3	36,3	36,1	38,8
Кормовой коэффициент, ед.	2,5	2,5	1,4	1,2	0,8	1,56
Рыбопродуктивность, кг/м ²	25,4	25,4	24,9	18,6	19,3	20,8
Возраст, сут.	623	623	631	631	624	624
Средняя масса, г	3794	3367	2596	1870	2049	2243
Средняя температура воды за этап, °С	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5
Общая сумма тепла, градусо-дни	11664	11664	10191	10191	10104	10004
Количество рыб в конце этапа	38	57	132	131	129	130
Выживаемость за этап	92,1	96,5	100,0	99,2	97,7	98,5
Общий расход корма за этап, кг	95,0	95,0	276,2	200,3	220,5	242,0
Кормовой коэффициент, ед.	2,10	2,10	1,60	1,63	1,49	1,54
Рыбопродуктивность, кг/м ²	31,8	31,8	34,3	24,5	26,4	29,1

Примечания: ¹ гибрид РО×К выращивался в УЗВ 266 суток; ² отмечено заболевание; ³ зимний период

Констатируя данные, полученные по определению скорости массонакопления исследуемых гибридных форм осетровых рыб на длительном отрезке времени для СО×К и СО×АО – 377 дней (6750 градусо-дней) и СО×Б, РО×Б и РО×К – 389 дней (5576 градусо-дней), установлено следующее. Коэффициенты массонакопления разных гибридных форм имеют близкие значения: у СО×Б за рассматриваемый период времени коэффициент массонакопления (Км) составил 0,044, за весь период двухлетнего выращивания 0,064, соответственно у РО×Б – 0,037/0,057, РО×К – 0,042/0,060, РО×К (УЗВ + прямоток) – 0,035/0,062, СО×К – 0,044/0,074 и СО×АО – 0,049/0,071.

Наиболее показательные коэффициенты массонакопления и массы тела наблюдались у гибридных форм, выращиваемых при более высокой средней температуре воды – 18,7°С и получивших большую сумму тепла – 11664 градусо-дня - СО×К (3794 г) и СО×АО (3367 г). Гибридные формы СО×Б и РО×К, получившие меньшую сумму тепла на 1473 градусо-дня при общей сумме 10191 градусо-дней также показали высокий уровень коэффициента массонакопления. Наименьшим показателем Км обладали гибриды РО×Б и РО×К (УЗВ + прямоток). Однако несмотря на низкий коэффициент массонакопления гибрид РО×К (УЗВ + прямоток) достиг хороших показателей по массе тела, которая составила 2243 г. Сравнительные результаты выращивания гибридных форм осетровых рыб представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Сравнительные результаты выращивания гибридных форм осетровых рыб

Возраст, сут.	242	302	381	414	445	494	526	554	603	631
СО×Б										
Средняя масса, г	523	946 ³	913	946	1019	1177	1431 ³	1779 ³	2341	2596
Min-мах	80-1140	340-1520	400-1580	400-1600	400-1920	440-2080	960-2500	1300-2700	1460-3740	1440-4140
CV, %	49,6	22,7	23,8	23,8	25,2	23,9	20,4	19,5	19,7	19,0
Км	-	0,088	-0,004	0,011	0,024	0,030	0,067	0,091	0,071	0,050
Σ общ.	4615	5476	6092	6448	6722	7502	8072	8658	9711	10191
Σ за этап	-	861	616	356	274	780	570	586	1053	480
T, °С	- ²	14,3 ²	8,8 ²	10,8 ²	8,8 ²	15,9 ²	17,8 ²	20,9 ²	21,5 ²	17,1
РО×Б										
Средняя масса, г	429	667 ³	644	678	741	884	1056 ³	1306 ³	1717	1870
Min-мах	100-980	440-1060	420-1040	400-1080	400-1240	500-1440	780-1680	1040-1980	1000-2680	1220-2920
CV, %	29,7	18,1	19,1	20,2	20,7	19,7	16,8	14,6	15,6	16,2
Км	-	0,060	-0,004	0,014	0,026	0,034	0,055	0,080	0,064	0,037
Σ общ.	4615	5476	6092	6448	6722	7502	8072	8658	9711	10191
Σ за этап	-	861	616	356	274	780	570	586	1053	480
T, °С	- ²	14,3 ²	8,8 ²	10,8 ²	8,8 ²	15,9 ²	17,8 ²	20,9 ²	21,5 ²	17,1

РО×К										
Возраст, сутки	235	295	374	407	438	487	519	547	596	624
Средняя масса, г	372	624 ³	606	648	700	909	1176 ³	1480 ³	1937	2049
Min-тах	40-1000	420-1260	420-1200	440-1260	460-1320	560-1720	800-2100	1140-2740	1380-4120	1400-4340
CV, %	37	21,8	22	20,9	21,2	21,8	20,7	19,9	22,9	22,8
Км	-	0,068	-0,003	0,017	0,022	0,049	0,081	0,090	0,065	0,025
Σ общ.	4528	5389	6005	6361	6635	7415	7985	8571	9624	10104
Σ за этап	-	861	616	356	274	780	570	586	1053	480
T, °C	- ²	14,3 ²	8,8 ²	10,8 ²	8,8 ²	15,9 ²	17,8 ²	20,9 ²	21,5 ²	17,1
РО×К (УЗВ + прямоток)										
Возраст, сутки	266	295	374	407	438	487	519	547	596	624
Средняя масса, г	715	741 ³	722	782	865	982	1241 ³	1662 ³	2080	2243
Min-тах	-	600-1060	560-1040	560-1140	580-1240	540-1520	900-1920	1300-2280	1460-3040	1600-3900
CV, %	-	12,3	13	14,2	16,2	18,6	16,2	13,9	18,3	18,7
Км	-	0,011	-0,003	0,022	0,030	0,025	0,076	0,118	0,056	0,035
Σ общ.	4857	5289	5905	6261	6535	7315	7885	8471	9524	10004
Σ за этап	-	861	616	356	274	780	570	586	1053	480
T, °C	- ¹	14,3 ²	8,8 ²	10,8 ²	8,8 ²	15,9 ²	17,8 ²	20,9 ²	21,5 ²	17,1 ²
СО×К										
Возраст, сутки	246	311	403	414	472	590	623			
Средняя масса, г	900	1779	2895	2849	2881	3435	3794			
Min-тах	330-1400	330-2470	1670-4150	1870-4250	1800-4100	1860-5360	2140-5880			
CV, %	22,4	19,1	19,5	20,2	22,4	28,8	27,2			
Км	-	0,114	0,070	-0,011	0,003	0,022	0,046			
Σ общ.	4914	6145	7838	8027	8766	11038	11664			
Σ за этап	-	1231	1693	189	739	2272	626			
T, °C	-	18,9 ¹	18,4 ¹	17,2 ¹	12,7 ²	19,2 ²	18,9 ²			
СО×АО										
Средняя масса, г	560	1140	2035	2103	2235	3119	3367			
Min-тах	270-800	860-1460	1360-2870	1380-2840	1400-3100	1840-4120	2020-4400			
CV, %	18,6	11,1	15,8	15,3	16,3	15,7	16,1			
Км	-	0,088	0,073	0,021	0,014	0,039	0,034			
Σ общ.	4914	6145	7838	8027	8766	11038	11664			
Σ за этап	-	1231	1693	189	739	2272	626			
T, °C	-	18,9 ¹	18,4 ¹	17,2 ¹	12,7 ²	19,2 ²	18,9 ²			

Примечания: ¹ Содержание рыбы в УЗВ; ² Прямоток; ³ Средняя масса после сортировки;
 Σ - Сумма тепла, градусо-дней; T, °C – средняя температура воды за этап, °C

Из полученных результатов можно сделать вывод, что степень реализации потенции роста у представленных гибридных форм осетровых рыб

в высшей степени зависит от температуры воды, при которой проходило выращивание: при более высокой температуре воды потенция роста раскрывается в наибольшей степени. Учитывая, что для сибирского осетра оптимумом для массонакопления является температура 26°C при коэффициенте роста 0,190 [Купинский и др., 2018] в наших экспериментальных условиях при средней температуре воды 18,9°C, гибриды не раскрыли своей потенции роста, особенно это касается гибридов, полученных на основе русского осетра, которым для достижения максимальных показателей роста требуется температура близкая к оптимальной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный анализ результатов товарного выращивания межродовых (СО×Б СО×К, СО×Б, РО×Б) и межвидового СО×АО, гибридов в условиях промышленных бассейновых хозяйств показал, что наилучшими ростовыми качествами за двухлетний период выращивания при сумме полученного тепла 11664 градусо-дней обладала гибридная форма СО×К, достигнув в возрасте 623 суток средней массы 3794 г. Гибридная форма СО×АО показала более низкие результаты – 3367 г. Группа гибридов, получившая сумму тепла в пределах 10004-10191 градусо-дней, по достигнутой за период выращивания массе тела распределилась следующим образом: СО×Б (2596 г), РО×К УЗВ (2243 г), РО×К (2049 г), РО×Б (1870 г) при выходе товарной продукции от 24,5 до 31,8 кг/м².

Из полученных результатов можно сделать вывод, что степень реализации потенции роста выше представленных гибридных форм осетровых рыб при прочих равных условиях в высшей степени зависит от температуры воды, при которой проходило выращивание гибридных форм. При более высокой температуре воды потенция роста раскрывается в наибольшей степени. Учитывая, что для сибирского осетра оптимумом для массонакопления является температура 26°C при коэффициенте роста 0,190, в наших экспериментальных условиях при средней температуре воды 18,9°C гибриды не раскрыли своей потенции роста, особенно это касается гибридов, полученных на основе русского осетра, которым для достижения максимальных показателей роста требуется температура близкая к оптимальной.

На основании выполненных исследований впервые получены материалы к техническому руководству по выращиванию товарных осетровых рыб – СО×К, СО×АО, СО×Б, РО×Б и РО×К в двухлетнем цикле в условиях промышленного хозяйства.

В результате оценки сравнительного выращивания межродовых гибридов осетровых рыб (СО×Б, РО×Б и РО×К) в «идентичных» условиях УЗВ и прямоточных хозяйств можно сделать вывод о перспективности использования для целей товарного рыбоводства в рыбоводных хозяйствах промышленного типа со среднегодовой суммой тепла 18°C, гибридных форм – СО×К, СО×АО, достигших за период 620 суток комбинированного выращивания средней массы 3,7 кг и 3,3 кг, соответственно. Для хозяйств со среднегодовой температурой

воды 16,0°C, наиболее перспективной гибридной формой для товарного выращивания является гибрид СО×Б, достигший за этот же период времени средней массы 2,5 кг.

В результате применения полученных данных по комбинированному выращиванию товарных гибридных форм осетровых рыб рыболовными предприятиями отрасли расширится ассортимент выпускаемой деликатесной продукции, улучшится экономическая эффективность работы предприятия за счёт более рационального использования производственных мощностей и сокращения сроков получения высококачественной товарной продукции осетровых рыб.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Баранов С.А., Резников В.Ф., Стариков Е.А., Толчинский Г.И. Основные уравнения роста биологических объектов // Биологические ресурсы внутренних водоемов СССР. – М.: Наука, 1979. – С. 156-168.

Газимагомедова И.К., Магомаев Ф.К., Шахназарова А.Б., Чалаева С.А. Динамика линейно-весового и белкового обмена гибрида русского и ленского осетров при индустриальном выращивании // Интенсивная аквакультура на современном этапе развития. – Махачкала, 2013. – С. 37- 41.

Говорливых А.С., Валитов Ф.Р., Каримова С.Г. Сравнительная характеристика роста и развития гибрида стерляди и калуги // Современные основы рационализации технологии воспроизводства сельскохозяйственных животных в условиях индустриальной системы производства в АПК / Материалы всероссийской молодежной научной школы в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. (Уфа, Россия, 11-14 сентября 2012 г.). – Уфа: Башкирский ГАУ, 2012. – С. 72-74.

Казаков Р.В., Образцов А.Н. Методы оценки качества половых клеток рыб: рыболовная оценка спермы / Обзорная информация. Рыбн. хоз-во. Сер. Мариккультура. – М.: ВНИЭРХ, 1990. – Вып. 4. – 53 с.

Купинский С.Б., Мельченков Е.А., Петрова Т.Г. Границы возможного роста сибирского осетра // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси. Материалы юбилейной международной научно-практической конференции, посвященной 60-летию РУП «Институт рыбного хозяйства. – Минск: Беларуская навука, 2018. – Вып. 34. – С. 140-155.

Матишов Г.Г., Пономарев С.В., Баканева Ю.М., Болонина Н.В., Грозеску Ю.Н., Кокоза А.А., Распопов В.М., Пономарева Е.Н., Федоровых Ю.В., Лагуткина Л.Ю., Белая М.М., Бахарева А.А., Красильникова А.А. Справочник рыбовода. Инновационные технологии аквакультуры юга России. – Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2013. – 224 с.

Никифоров А.И. Опыт выращивания товарных трехлетков белуги и сибирского осетра // Актуальные проблемы современной науки – М.: Изд-во «Компания Спутник+». – 2002. – № 1 (4). – С. 249-251.

Персов Г.М. Учет осетровых работ в связи с применением метода

гипофизарных инъекции // Метод гипофизарных инъекций и его роль в воспроизводстве рыбных запасов. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1941. – С. 42-50.

Подушка С.Б. Способ получения икры от самок осетровых рыб. Авторское свидетельство СССР, № 1412035. – 1986.

Пономарев С.В., Иванов Д.И. Осетроводство на интенсивной основе. – М.: Колос, 2009. – 312 с.

Пономарев С.В., Магомаев Ф.М. Осетроводство на интенсивной основе. – Махачкала: Экспо-экспресс, 2011. – 244 с.

Пономарева Е.Н., Ковалева А.В., Коваленко М.В., Матишов К.Д., Яицкая М.В. Особенности роста различных гибридных форм осетровых видов рыб // Наука юга России. – 2019. – Т. 15. – № 3. – С. 81-88.

Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. – М.: Пищепромиздат, 1966. – 376 с.

Промысловые рыбы России. / О.Ф. Гриценко, А.Н. Котляр, Б.Н. Котенев. В 2 томах. – М.: Изд-во ВНИРО, 2006.

Резников В.Ф., Баранов С.А., Стариков Е.А., Толчинский Г.И. Стандартная модель массонакопления // Сб. науч. тр. ВНИИПРХ. – М., 1978. – Вып. 22. – С. 182-196.

Филиппова О.П., Зуевский С.Е. Морфофункциональное состояние внутренних органов бестера при выращивании в установке с замкнутым циклом водообеспечения// Мат-лы научно-практич. конф. с междунар. участием «Интенсивная аквакультура на современном этапе развития», г. Махачкала 1-4 октября 2013. – Махачкала: «Эко-пресс», 2013. – С. 207-212.

FISH CULTIVATION AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF STURGEON FISH HYBRIDS AS OBJECTS OF COMMERCE CULTIVATION IN CONDITIONS OF BASIN INDUSTRIAL ECONOMY

E.A. Melchenkov, V.A. Ilyasova, V.V. Kalmykova, A.P. Vorobyov, A.A. Archibasov, A.V. Mishchenko, Yu.A. Novoselova, N.A. Kozovkova, Yu.A. Antipina
Branch for the Freshwater Fisheries of VNIRO («VNIIPRKh»)
Email: innovazii-vniiprh@mail.ru

Abstract. Technological schemes for obtaining and growing marketable two-year sturgeon hybrids in a two-year cycle are presented. The most perspective sturgeon hybrids with a high growth rate in industrial farms have been identified (selected), and their comparative fish-breeding and biological characteristics are given.

Keywords: sturgeon hybrids, heat amount, mass accumulation coefficient, water temperature, weight, fish productivity.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИПЛОИДНЫХ ГИБРИДОВ СЕРЕБРЯНОГО КАРАСЯ С КАРПОМ

Е.В. Иванёха, Л.Н. Дума, А.В. Рекубратский
Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО»
(«ВНИИПРХ»)
E-mail: elena_ivaneha@mail.ru

У диплоидных гибридов серебряного карася и карпа (восьмое гиногенетическое поколение G8) для четырёх групп разного возраста имела место высокая степень внутригрупповой однородности по анализируемым качественным и количественным морфологическим показателям. Достоверные различия по всем выбранным для сравнения наружным признакам морфотипа отсутствовали между четырёх- и шестигодовиками диплоидных карасекарпов. Число достоверно различающихся морфометрических признаков с высокой степенью различия между выборками диплоидных гибридов G8 и родительских видов было больше, чем между выборками G8 и триплоидных возвратных гибридов на карася или на карпа.

Ключевые слова: гибриды серебряного карася и карпа; диплоиды; морфометрические признаки; изменчивость; достоверное различие.

ВВЕДЕНИЕ

Отдалённая гибридизация широко распространена среди рыб. Исследованы и описаны внутри- и межродовые гибриды естественного и искусственного происхождения, которых больше всего в семействе Cyprinidae [Берг, 1949; Веригин, Макеева, 1972; Николюкин, 1952, 1972]. Некоторые отдалённые гибриды, в частности между карпом и серебряным карасём, могут давать жизнеспособное потомство [Николюкин, 1952, 1972], их использование в аквакультуре позволяет комбинировать положительные свойства разных видов рыб.

Во ВНИИПРХе в 1975 г. получены карасекарпы первого поколения (F1) от скрещивания самок двуполой формы серебряного карася *Carassius gibelio* Bloch Волминской популяции (Белоруссия) с самцами карпа *Cyprinus carpio* L. Поскольку самцы F1 стерильны, воспроизводство гибридов осуществляется с помощью индуцированного гиногенеза [Черфас, Илясова, 1980], который получают, оплодотворяя яйцеклетки рыб генетически инактивированной спермой своего или другого вида. Показано, что самки карасекарпа продуцируют диплоидные нередуцированные яйцеклетки (одно из следствий отдалённой гибридизации). Это обстоятельство облегчает получение гиногенеза, так как отпадает необходимость восстанавливать диплоидность у гиногенетических эмбрионов.

К настоящему времени получено девятое поколение индуцированного гиногенеза и, соответственно, десятое последовательное поколение гибридов ($F1 \rightarrow G1 \rightarrow G2 \rightarrow G3 \rightarrow G4 \rightarrow G5 \rightarrow G6 \rightarrow G7 \rightarrow G8 \rightarrow G9$).

От диплоидных самок карасекарпов, у которых с помощью селекции улучшены показатели репродуктивной способности, при скрещивании с самцами карпа могут быть получены возвратные триплоидные гибриды F_{bk} , с самцами серебряного карася – F_{bck} для товарного выращивания и зарыбления естественных водоемов.

Рыбоводно-биологические свойства всех трёх форм карасекарпов, их преимущества по сравнению с родительскими видами, основные направления рыбохозяйственного использования в аквакультуре и при реконструкции ихтиофауны естественных водоемов, а также результаты морфометрического анализа возвратных триплоидных гибридов (F_{bck} и F_{bk}) обсуждались ранее [Рекубратский и др., 2012].

Цель данной работы – морфологическая характеристика диплоидных гиногенетических гибридов серебряного карася с карпом на разных этапах онтогенеза и сравнение их по морфометрическим признакам с родительскими видами и с триплоидными возвратными гибридами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили диплоидные гибриды между серебряным карасём и карпом восьмого гиногенетического поколения $G8$: сеголетки ($0+$), двухлетки ($1+$), четырёхгодовики и шестигодовики.

Сравнительный морфометрический анализ диплоидных карасекарпов $G8$, серебряного карася, карпа (загорская породная группа) и возвратных триплоидных гибридов на серебряного карася (F_{bck}) и на карпа (F_{bk}) проведен в случайных выборках сеголетков $0+$ и двухлетков $1+$, выращенных в одинаковых условиях. Все три группы карасекарпов были получены от одних и тех же диплоидных самок $G7$ (седьмое поколение гиногенеза).

Для морфологической характеристики гибридов $G8$ использовали количественные (пластические и меристические) и альтернативные неметрические (качественные) признаки (окраска тела, наличие пятен, тип чешуйного покрова).

Промеры количественных морфологических признаков выполнены по традиционной методике [Правдин, 1966]. Схема промеров у сеголетков, четырёх- и шестигодовиков включала 7 пластических признаков, 3 меристических (только наружные признаки), у двухлетков – 10 пластических признаков, 8 меристических (в дополнение к наружным также внутренние признаки) и массу тела.

Пластические признаки (в см): длина тела без хвостового плавника, l ; высота тела, H ; наибольший обхват тела, O ; длина головы, C ; длина хвостового стебля, pl ; высота хвостового стебля, h ; толщина тела; у двухлетков – ещё длина кишечника, il ; длина передней камеры плавательного пузыря, $psal$; длина задней камеры плавательного пузыря, $psrl$.

Меристические признаки: количество ветвистых лучей в спинном плавнике D; количество ветвистых лучей в анальном плавнике A; число чешуй в боковой линии; у двухлетков – также количество тычинок на первой жаберной дуге (длинных с наружной стороны, коротких – с внутренней); общее число позвонков в осевом скелете, V; число позвонков в хвостовом отделе, Vc; число грудных и переходных (туловищных) позвонков, Vp+Vi.

Количество позвонков подсчитывали на сухих остеологических препаратах. При определении общего числа позвонков в осевом скелете Веберов аппарат засчитывали за 4 позвонка, уростиль – за 1 позвонок.

На основании непосредственно измеряемых значений пластические признаки были выражены также в виде следующих индексов: форма тела, l/H, ед.; обхват, O/l, %; величина головы, C/l, %; форма хвостового стебля, h/pl, ед.; у двухлетков ещё размер кишечника, il/l, ед.; передняя камера плавательного пузыря, pса, (pсаl/рсрl), ед.

Для всех морфометрических признаков были вычислены стандартные статистические параметры: средняя арифметическая (M), её ошибка (m_M), среднее квадратическое отклонение (σ), коэффициент вариации (V) и его ошибка (m_V).

Для определения достоверности различий морфометрических признаков у диплоидных гибридов G8, родительских видов и возвратных триплоидных гибридов F_{вск} и F_{вк} использовали t-критерий Стьюдента (t_{st}), степень различий оценивали с помощью коэффициента различия CD [Майр, 1971].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Качественные признаки у всех диплоидных карасекарпов G8 в исследованных выборках четырёх возрастных групп одинаковы: чешуйный покров сплошной, основная окраска тела серебристая, пятна отсутствуют.

Для оценки изменчивости количественных признаков использовали коэффициент вариации V, который характеризует степень наблюдаемой фенотипической изменчивости определённого признака.

Судя по значениям коэффициента вариации, в целом изменчивость большинства анализируемых морфометрических признаков у диплоидных гибридов G8 невысокая. Так, у сеголетков и шестигодовиков варьирование данных для всех четырнадцати количественных признаков небольшое – V не превышает 10% (таблицы 1, 4).

В двух остальных группах гибридов G8 значения V для небольшого числа пластических признаков были в пределах 11-20%, т.е. имело место среднее варьирование данных по этим признакам (таблицы 2, 3). У двухлетков отмечена средняя изменчивость двух непосредственно измеренных внутренних признаков – длины кишечника и передней камеры плавательного пузыря, а также соответствующих индексов – размера кишечника и плавательного пузыря (таблица 2). У четырёхгодовиков имела место средняя изменчивость двух связанных между собой наружных признаков – длины и формы хвостового стебля (таблица 3). Изменчивость остальных пластических и всех

просчитанных меристических признаков у этих возрастных групп карасекарпов невысокая (V не более 10%). Следовательно, имеет место высокая степень внутригрупповой однородности диплоидных гибридов G8 разного возраста как по неметрическим, так и по количественным признакам.

Таблица 1 – Морфологическая характеристика сеголетков G8

Признаки	$M \pm m_M$	Lim	$V \pm m_V, \%$
Длина, l, см	$12,3 \pm 0,09$	11,6-13,0	$2,9 \pm 0,54$
Форма тела, l/H, ед.	$2,4 \pm 0,01$	2,2-2,4	$1,5 \pm 0,27$
Обхват, O/l, %	$97,0 \pm 0,59$	94,6-104,7	$2,4 \pm 0,43$
Голова: величина, C/l, %	$30,2 \pm 0,16$	23,5-28,4	$2,1 \pm 0,38$
Хвостовой стебель, форма, h/pl, ед.	$0,80 \pm 0,01$	0,74-0,90	$4,9 \pm 0,89$
Число лучей в D	$19,0 \pm 0,10$	18,0-20,0	$2,9 \pm 0,38$
Число лучей в A	$5,0 \pm 0,05$	4,0-5,0	$5,2 \pm 0,67$
Число чешуй в боковой линии	$34,7 \pm 0,09$	34,0-35,0	$1,3 \pm 0,17$
Высота тела, H, см	$5,1 \pm 0,05$	4,7-5,3	$3,7 \pm 0,67$
Обхват, O, см	$11,6 \pm 0,10$	10,4-13,5	$4,8 \pm 0,62$
Длина головы, C, см	$3,7 \pm 0,04$	3,4-4,0	$4,3 \pm 0,79$
Длина хвостового стебля, pl, см	$2,3 \pm 0,03$	2,1-2,6	$5,6 \pm 1,02$
Высота хвостового стебля, h, см	$1,9 \pm 0,02$	1,7-2,0	$4,0 \pm 0,73$
Толщина, см	$2,3 \pm 0,03$	2,0-2,5	$5,4 \pm 0,99$

Таблица 2 – Морфологическая характеристика двухлетков G8

Признаки	$M \pm m_M$	Lim	$V \pm m_V, \%$
Длина, l, см	$19,9 \pm 0,21$	18,0-21,8	$5,7 \pm 0,74$
Форма тела, l/H, ед.	$2,34 \pm 0,02$	2,2-2,5	$3,6 \pm 0,46$
Обхват, O/l, %	$105,3 \pm 0,48$	100,0-110,0	$2,5 \pm 0,32$
Голова: величина, C/l, %	$27,1 \pm 0,16$	25,7-29,1	$3,1 \pm 0,41$
Хвостовой стебель, форма, h/pl, ед.	$0,81 \pm 0,01$	0,75-0,94	$6,6 \pm 0,85$
Кишечник: размер, il/l, ед.	$2,92 \pm 0,06$	1,89-3,62	$11,6 \pm 1,50$
Плавательный пузырь, pса, ед.	$0,98 \pm 0,02$	0,73-1,16	$12,2 \pm 1,67$
Число тычинок на 1-ой жаберной дуге (длинных)	$35,5 \pm 0,30$	33,0-39,0	$4,7 \pm 0,60$
Число тычинок на 1-ой жаберной дуге (коротких)	$37,1 \pm 0,40$	32,0-42,0	$5,9 \pm 0,76$
Число лучей в D	$19,4 \pm 0,16$	17,0-21,0	$4,7 \pm 0,60$
Число лучей в A	$5,41 \pm 0,09$	5,0-6,0	$9,3 \pm 1,20$
Число чешуй в боковой линии	$33,2 \pm 0,23$	31,0-35,0	$3,8 \pm 0,49$
Осевого скелет, V	$35,0 \pm 0,08$	34,0-36,0	$1,2 \pm 0,16$
Хвостовой отдел, Vc	$16,2 \pm 0,09$	15,0-17,0	$3,1 \pm 0,40$
Число туловищных позвонков, (Vp+Vi)	$13,8 \pm 0,07$	13,0-14,0	$2,9 \pm 0,37$
Высота тела, H, см	$8,5 \pm 0,13$	7,4-9,6	$8,5 \pm 1,09$
Обхват, O, см	$20,9 \pm 0,20$	18,6-23,1	$7,4 \pm 0,95$
Длина головы, C, см	$5,4 \pm 0,05$	4,8-5,9	$5,3 \pm 0,68$
Длина хвостового стебля, pl, см	$3,6 \pm 0,05$	3,3-4,3	$7,1 \pm 0,91$
Высота хвостового стебля, h, см	$3,0 \pm 0,04$	2,6-3,3	$7,1 \pm 0,92$

Признаки	$M \pm m_M$	Lim	$V \pm m_V, \%$
Длина кишечника, см	$57,9 \pm 1,41$	39,0-71,0	$13,3 \pm 1,72$
Передняя камера плавательного пузыря, см	$2,4 \pm 0,08$	1,6-3,1	$16,5 \pm 2,25$
Задняя *-*, см	$2,4 \pm 0,04$	2,1-2,8	$8,6 \pm 1,17$
Толщина, см	$3,96 \pm 0,06$	3,4-4,5	$8,4 \pm 1,08$

Таблица 3 – Морфологическая характеристика четырехгодовиков G8

Признаки	$M \pm m_M$	Lim	$V \pm m_V, \%$
Длина, l, см	$36,4 \pm 0,18$	34,5-38,0	$2,4 \pm 0,35$
Форма тела, l/H, ед.	$2,73 \pm 0,01$	2,61-2,82	$2,0 \pm 0,29$
Обхват, O/l, %	$91,2 \pm 0,43$	87,5-95,8	$2,3 \pm 0,33$
Голова: величина, C/l, %	$25,5 \pm 0,13$	24,6-26,7	$2,4 \pm 0,35$
Хвостовой стебель, форма, h/pl, ед.	$0,70 \pm 0,02$	0,48-0,89	$10,9 \pm 1,58$
Число лучей в D	$19,1 \pm 0,14$	18,0-20,0	$3,6 \pm 0,41$
Число лучей в A	$5,4 \pm 0,08$	5,0-6,0	$6,9 \pm 0,99$
Число чешуй в боковой линии	$34,3 \pm 0,15$	32,0-35,0	$2,2 \pm 0,32$
Высота тела, H, см	$13,3 \pm 0,07$	12,7-13,8	$2,4 \pm 0,35$
Обхват, O, см	$33,2 \pm 0,14$	31,5-35,0	$2,8 \pm 0,41$
Длина головы, C, см	$9,3 \pm 0,06$	8,8-9,8	$3,2 \pm 0,47$
Длина хвостового стебля, pl, см	$7,5 \pm 0,18$	6,7-10,9	$11,6 \pm 1,67$
Высота хвостового стебля, h, см	$5,2 \pm 0,05$	4,9-6,2	$5,1 \pm 0,73$
Толщина, см	$7,5 \pm 0,10$	6,8-8,5	$6,7 \pm 0,96$

Таблица 4 – Морфологическая характеристика шестигодовиков G8

Признаки	$M \pm m_M$	Lim	$V \pm m_V, \%$
Длина, l, см	$40,1 \pm 0,62$	37,5-42,0	$3,8 \pm 1,10$
Форма тела, l/H, ед.	$2,7 \pm 0,05$	2,5-2,9	$4,8 \pm 1,40$
Обхват, O/l, %	$93,1 \pm 1,27$	87,7-96,3	$3,3 \pm 0,96$
Голова: величина, C/l, %	$24,7 \pm 0,32$	23,8-25,6	$3,1 \pm 0,90$
Хвостовой стебель, форма, h/pl, ед.	$0,74 \pm 0,02$	0,68-0,82	$6,4 \pm 1,83$
Число лучей в D	$19,2 \pm 0,34$	18,0-20,0	$4,4 \pm 1,26$
Число лучей в A	$5,2 \pm 0,17$	5,0-6,0	$7,9 \pm 2,28$
Число чешуй в боковой линии	$34,3 \pm 0,49$	32,0-35,0	$3,5 \pm 1,02$
Высота тела, H, см	$14,9 \pm 0,31$	14,0-16,0	$5,1 \pm 1,46$
Обхват, O, см	$37,3 \pm 0,80$	34,5-39,5	$5,3 \pm 1,52$
Длина головы, C, см	$9,9 \pm 0,16$	9,5-10,5	$3,9 \pm 1,12$
Длина хвостового стебля, pl, см	$8,0 \pm 0,11$	7,6-8,4	$3,3 \pm 0,94$
Высота хвостового стебля, h, см	$5,9 \pm 0,08$	5,7-6,2	$3,3 \pm 0,95$
Толщина, см	$8,3 \pm 0,33$	7,5-9,8	$9,6 \pm 2,78$

У рыб возрастная изменчивость морфологических признаков выражена сильнее, чем у других позвоночных. Даже половозрелые рыбы продолжают расти и в длину, и в высоту [Правдин, 1966]. С возрастом изменяются размеры головы, туловища и плавников.

У диплоидных гибридов восьмого гиногенетического поколения средняя масса с возрастом изменялась следующим образом: сеголетки – 59,2 г; двухлетки – 283,6 г; четырёхгодовики – 1476,3 г; шестигодовики – 2211,7 г. За возрастным изменением размеров тела, головы, хвостового стебля у G8 можно проследить по таблицам 1-4.

Достоверность различий между группами рыб определяли для индексов, которые позволяют уменьшить влияние размеров особей на значения признака, и меристических признаков при уровне значимости 0,01.

При сравнении диплоидных гибридов с родительскими видами и с триплоидными возвратными гибридами дополнительно использовали коэффициент различия CD, который в отличие от t-критерия Стьюдента показывает величину различия. Степень различия, выраженная при помощи коэффициента различия, – один из критериев, используемых при выделении подвидов; принятый показатель подвидового различия равен 1,28 [Майр, 1971].

Значения t-критерия Стьюдента, подтверждающие достоверность различий морфологических признаков, и значения CD, превышающие принятый показатель подвидового различия, в таблицах 5-9 выделены полужирным шрифтом.

У диплоидных гибридов G8 из четырёх возрастных групп проведено сравнение наружных морфометрических показателей, характеризующих общий экстерьер и соотношение между частями тела рыб. Сеголетки G8 достоверно отличались от двухлетков, а двухлетки от четырёхгодовиков по пяти признакам из семи, выбранных для сравнения; четыре этих признака совпадали для обеих пар сравниваемых выборок диплоидных карасекарпов G8. Между группами четырёх- и шестигодовиков достоверные различия ни по одному из семи признаков не выявлены. Как видно, у половозрелых гибридов G8 пропорции тела сформированы, и сохраняются при продолжающемся увеличении размеров и массы рыб. Единственный признак, для которого различия были недостоверны между всеми возрастными группами G8, это число ветвистых лучей в спинном плавнике (таблица 5).

Таблица 5 – Достоверность различий морфометрических признаков у гибридов G8 разного возраста

Морфометрические признаки	t _{st}		
	0+ и 1+	1+ и 4-годовики	4- и 6-годовики
Форма тела, I/H, ед.	3,566	16,627	0,640
Обхват, O/l, %	9,845	20,073	1,859
Голова: величина, C/l, %	11,795	7,699	2,492
Хвостовой стебель, форма, ед.	0,900	5,733	1,118
Число лучей в D	2,024	1,192	0,261
Число лучей в A	3,362	0,264	1,852
Число чешуй в боковой линии	3,963	3,496	0,107

Как изменяются морфологические признаки диплоидных гибридов по сравнению с серебряным карасем и карпом, можно видеть в таблицах 6 и 7. Диплоидные карасекарпы G8 значительно отличались от обоих родительских видов по большинству выбранных для сравнения признаков. Так, уже у сеголетков из семи морфометрических признаков в сравниваемых выборках гибридов G8 и серебряного карася, как и в выборках G8 и карпа достоверно различались пять, большей частью с высокой степенью различия, четыре из которых совпадали у двух пар выборок (таблица 6). Достоверность различий по этим показателям между диплоидными гибридами G8 и родительскими видами сохранялась и через год (таблица 7).

Таблица 6 – Достоверность и степень различия морфометрических признаков у сеголетков G8, серебряного карася и карпа

Морфометрические признаки	М			G8-карась		G8-карп	
	G8	карась	карп	t _{st}	CD	t _{st}	CD
Форма тела, l/H, ед.	2,43	2,67	2,81	11,264	2,05	11,272	2,27
Обхват, O/l, %	97,0	86,4	88,2	14,973	2,69	7,045	1,34
Голова: величина, C/l, %	30,2	29,8	31,8	0,761	0,15	5,562	1,05
Хвостовой стебель, форма, ед.	0,80	0,88	0,77	3,924	0,80	1,476	0,27
Число лучей в D	19,0	15,6	17,3	19,888	2,75	8,996	1,20
Число лучей в А	5,0	4,9	5,0	0,869	0,12	0,948	0,18
Число чешуй в боковой линии	34,7	30,6	36,5	23,247	3,22	9,953	1,35

Таблица 7 – Достоверность и степень различия морфометрических признаков у двухлетков G8, серебряного карася и карпа

Морфометрические признаки	М			G8-карась		G8-карп	
	G8	карась	карп	t _{st}	CD	t _{st}	CD
Форма тела, l/H, ед.	2,34	2,44	2,65	4,867	0,70	7,759	1,22
Обхват, O/l, %	105,3	98,3	92,2	10,184	1,49	3,404	0,64
Голова: величина, C/l, %	27,1	26,0	29,0	5,207	0,73	4,853	0,77
Хвостовой стебель, форма, ед.	0,81	0,88	0,76	3,886	0,70	1,553	0,25
Кишечник: размер, il/l, ед.	2,92	3,32	2,68	3,992	0,57	3,005	0,46
Плавательный пузырь, pca, ед.	0,98	0,69	1,45	11,591	1,81	7,499	1,22
Число тычинок на 1-ой жаберной дуге	35,5	44,0	26,3	14,612	2,19	20,596	3,00
Число лучей в D	19,4	16,4	18,2	14,153	2,11	4,557	0,65
Число лучей в А	5,4	5,1	5,5	2,408	0,42	0,666	0,10
Число чешуй в боковой линии	33,2	30,2	38,1	10,489	1,56	11,758	1,75
Осевого скелет, V	35,0	32,0	38,0	34,322	6,82	12,405	2,05
Хвостовой отдел, Vc	16,2	14,0	18,1	21,804	4,40	8,806	1,35
Туловищные позвонки, (Vp+Vi)	13,8	13,0	14,8	10,379	2,05	5,750	0,91

У двухлетков диплоидных гибридов G8 и серебряного карася достоверно различались все тринадцать выбранных для сравнения морфометрических признаков, степень различия была высокой для восьми из них (таблица 7).

Между выборками двухлетков G8 и карпа выявлено одиннадцать достоверно различающихся признаков, при высокой степени различия у четырёх из них. Только для двух показателей – формы хвостового стебля и числа ветвистых лучей в анальном плавнике – различия оставались недостоверными как у сеголетков, так и у двухлетков.

При сравнении диплоидных гибридов G8 и двух форм триплоидных возвратных гибридов также выявлены достоверные различия по морфометрическим признакам, хотя и в меньшем количестве, чем при сравнении с родительскими видами. У сеголетков гибридов G8 и Fбск достоверно различались два морфометрических признака из семи, взятых для сравнения, оба с высокой степенью различия, у двухлетков – десять из тринадцати, но высокая степень различия осталась только у одного признака – числа ветвистых лучей в спинном плавнике (таблицы 8, 9).

Таблица 8 – Достоверность и степень различия морфометрических признаков у сеголетков G8, Fбск и Fбк

Морфометрические признаки	М			G8- Fбск		G8- Fбк	
	G8	Fбск	Fбк	t _{st}	CD	t _{st}	CD
Форма тела, л/Н, ед.	2,43	2,41	2,54	1,033	0,13	3,600	0,68
Обхват, О/л, %	97,0	95,4	90,2	1,985	0,35	7,000	1,29
Голова: величина, С/л, %	30,2	30,6	29,7	1,039	0,20	1,372	0,26
Хвостовой стебель, форма, ед.	0,80	0,82	0,76	0,544	0,10	2,007	0,36
Число лучей в D	19,0	17,2	18,1	11,414	1,51	4,356	0,59
Число лучей в А	5,0	5,0	5,1	0,948	0,18	1,701	0,24
Число чешуй в боковой линии	34,7	33,2	35,2	10,947	1,45	3,164	0,43

Таблица 9 – Достоверность и степень различия морфометрических признаков у двухлетков G8, Fбск и Fбк

Морфометрические признаки	М			G8- Fбск		G8- Fбк	
	G8	Fбск	Fбк	t _{st}	CD	t _{st}	CD
Форма тела, л/Н, ед.	2,34	2,28	2,53	2,707	0,36	5,914	0,89
Обхват, О/л, %	105,3	107,3	90,4	1,969	0,29	16,663	2,48
Голова: величина, С/л, %	27,1	26,5	26,4	2,791	0,36	2,946	0,41
Хвостовой стебель, форма, ед.	0,81	0,79	0,83	1,957	0,20	0,883	0,18
Кишечник: размер, и/л, ед.	2,92	3,46	3,28	4,628	0,67	3,921	0,57
Плавательный пузырь, рса, ед.	0,98	0,78	1,00	5,107	0,77	0,657	0,11
Число тычинок на 1-ой жаберной дуге	35,5	37,9	34,3	4,716	0,68	3,042	0,45
Число лучей в D	19,4	17,1	17,8	9,532	1,33	5,957	0,87
Число лучей в А	5,4	5,0	5,2	3,810	0,54	1,235	0,18

Морфометрические признаки	М			G8- Fbck		G8- Fbk	
	G8	Fbck	Fbk	t _{st}	CD	t _{st}	CD
Число чешуй в боковой линии	33,2	32,7	35,4	1,840	0,25	7,403	1,12
Осевого скелет, V	35,0	34,0	36,0	8,693	1,21	11,474	2,27
Хвостовой отдел, Vc	16,2	15,8	16,4	2,768	0,41	1,491	0,20
Туловищные позвонки, (Vp+Vi)	13,8	13,2	14,6	5,342	0,74	5,892	0,90

В выборках обеих возрастных групп диплоидных гибридов G8 и триплоидных возвратных гибридов на карпа достоверные различия выявлены более чем для половины морфологических признаков: сеголетки карасекарпов G8 и Fbk достоверно различались по четырём признакам из семи, и только для одного из них выявлена высокая степень различия, двухлетки – по девяти из тринадцати, при высокой степени различия у двух признаков (таблицы 8, 9). Общим для сеголетков и двухлетков признаком, достоверно отличающимся в выборках гибридов G8 и Fbk с высокой степенью различия, является обхват (индекс).

Недостоверные различия между парами сравниваемых выборок трех разных форм гибридов выявлены только по двум показателям, как у сеголетков, так и у двухлетков. Для гибридов G8 и Fbck это обхват и форма хвостового стебля, для гибридов G8 и Fbk – форма хвостового стебля и число ветвистых лучей в анальном плавнике (так же как для гибридов G8 и карпа).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для диплоидных гиногенетических карасекарпов G8 разного возраста характерна высокая степень внутригрупповой однородности по исследованным морфологическим показателям. Сравнение наружных морфометрических признаков у гибридов G8 из четырёх возрастных групп показало, что между сеголетками и двухлетками, а также двухлетками и четырёхгодовиками G8 имелись достоверные различия по пяти признакам, тогда как между четырёх- и шестигодовиками достоверные различия по этим признакам отсутствовали.

Диплоидные гибриды G8 по ряду морфометрических признаков отличаются как от серебряного карася и карпа, так и от обеих форм триплоидных возвратных гибридов, причём число достоверно различающихся признаков с высокой степенью различия между выборками гибридов G8 и родительских видов несколько выше, чем между выборками гибридов G8 и Fbck или Fbk. Больше всего достоверных различий (по всем исследованным морфометрическим характеристикам) наблюдалось между диплоидными карасекарпами G8 и серебряным карасём в двухлетнем возрасте. Достоверные различия между сравниваемыми выборками рыб отмечены как для пластических, так и для меристических признаков.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. Ч. 1–3. – М. – Л.: Изд-во АН СССР, 1949. – 1382 с.
- Веригин Б.В., Макеева А.П. Гибридизация карпа с пестрым толстолобиком // Генетика. – Т. 8, № 7. – 1972. – С. 55–64.
- Майр Э. Принципы зоологической систематики. – М.: Мир, 1971. – 454 с.
- Николюкин Н.И. Межвидовая гибридизация рыб. – Саратов: Обл. гос. изд-во, 1952. – 312 с.
- Николюкин Н.И. Отдаленная гибридизация осетровых и костистых рыб. – М.: Пищевая промышленность, 1972. – 335 с.
- Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. – М.: Пищевая промышленность, 1966. – 375 с.
- Рекубратский А.В., Иванёха Е.В., Балашов Д.А., Дума Л.Н., Дума В.В., Рекубратский Н.В., Ковалев К.В. Триплоидные гибриды серебряного карася с карпом - новый объект аквакультуры // Вопросы рыболовства. – Т. 13, № 3(51). – 2012. – С. 626-642.
- Черфас Н.Б., Илясова В.А. Индуцированный гиногенез у гибридов серебряного карася с карпом // Генетика. – Т. 16, № 7. – 1980. – С. 1260-1269.

COMPARATIVE MORPHOLOGICAL DESCRIPTION OF CRUCIAN CARP X COMMON CARP DIPLOID HYBRIDS

E.V. Ivanekha, L.N. Duma, A.V. Recoubratsky
Branch for the Freshwater Fisheries of VNIRO («VNIIPRKh»)
E-mail: elena_ivaneha@mail.ru

Abstract. Crucian carp and common carp diploid hybrids (four different age groups of eighth gynogenetic generation G8) were characterized by high degree of intragroup uniformity over examined qualitative and quantitative morphological parameters. Significant differences for all compared external morphometric characters were missed between four-year and six-year diploid hybrids. Number of significantly differing morphometric characters with high difference level was greater for samplings of diploid hybrids G8 and of parental species, than for samplings of G8 and of triploid backcross hybrids with crucian carp or with common carp.

Keywords: crucian carp x common carp hybrids; diploids; morphometric characters; variability; significant difference.

СРАВНЕНИЕ КРОССОВ КАРПА МР х ЧЕРЕПЕТСКИЙ и МР х ЗУ-НК ПО МОРФОТИПУ

В.М. Симонов, Л.А. Шарт

*Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО»
(«ВНИИПРХ»)*

E-mail:simvni50@gmail.com

В течение трех лет выращивания в прудах селекционного хозяйства ВНИИПРХ проведено сравнение рыбоводных и морфологических характеристик нового кросса московского разбросанного карпа х черепетский с кроссом московского разбросанного х ЗУ-НК. Показана высокая скорость роста нового кросса, которая аналогична значениям у высокопродуктивной группы московского разбросанного х ЗУ-НК. Установлено, что классификация рассматриваемых кроссов по пластическим признакам морфотипа трехлетков рыб не применима.

Ключевые слова: карп, кросс, селекционные индексы, признаки морфотипа, факторный анализ, коэффициент массонакопления.

ВВЕДЕНИЕ

На существующих в Российской Федерации 24 племенных рыбоводных предприятиях, специализирующихся на выращивании племенного материала (13 хозяйств из них являются карповыми), содержат более 120 тыс. производителей, в том числе 10 тыс. производителей карпа. Это создает условия для обеспечения хозяйства страны высококачественным материалом рыб до 30 тыс. т (21% от общего производства товарной продукции аквакультуры в России). В тоже время использование при разведении племенного материала по карпу не превышает 10% [Маслова, 2011]. Большое число хозяйств, по-прежнему, разводят, и выращивают беспородные маточные стада, получая посадочный материал низкого качества.

Цель любой селекционной программы – повышение генетического потенциала на максимально возможную величину. Это может быть достигнуто лишь при интенсивном использовании животных с действительно высокой генетической ценностью. Настоящее состояние наших генетических знаний не позволяет получать истинную характеристику количества и качества наследственных задатков животного по хозяйственно-полезным признакам. Поэтому использование фенотипических показателей животных было и остается пока единственной возможностью достаточно точного прогноза генотипа. Эффективное применение генетического потенциала племенного материала позволит значительно повысить производство товарной продукции [Кузнецов, 2002].

В Государственный реестр в 2022 г. входило 23 селекционных достижения, состоящий из 16 пород, 3 типов и 4 кроссов карпа.

Порода предназначена для использования в промышленной гибридизации, и, в частности, получения кроссов. Кросс – это комплекс высокопродуктивных линий, которые по определенной схеме скрещивания дают потомство, характеризующееся положительным гетерозисом по продуктивным признакам и жизнеспособности. Производство межпородных кроссов карпа позволяет увеличить выход рыб с 1 га прудовой площади в среднем на 22% [Симонов и др., 2019].

На основании проведенных исследований в Филиале по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ») для выращивания в рыбоводных хозяйствах Центрального и Северо-Западного регионов России был предложен чешуйчатый гибрид (кросс) «Дмитровский», получаемый в скрещивании производителей московского чешуйчатого карпа (внутрипородный тип парского карпа – МЧ) и генетически маркированной породы КМ1. Кросс «Дмитровский» обладает повышенной жизнеспособностью, и благодаря этому обеспечивает более высокий уровень рыбопродуктивности прудов при выращивании посадочного материала и товарной рыбы. Кросс предназначен для промышленного выращивания в рыбоводных хозяйствах в первой-второй зонах рыбоводства.

Во Всероссийском научно-исследовательском институте интегрированного рыбоводства – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста» (ВНИИР) выведен двухпородный кросс карпа «Петровский». Создание кросса осуществляли методом скрещивания самок породы карпа анишский зеркальный с самцами породы чувашский чешуйчатый. Продуктивность кросса в целом по сравнению с исходными породами повышена на 6,2-47,0%.

Во ВНИИР также получен кросс карпа «Сурский малокостный», где исходными породами явились самцы ангелинской зеркальной породы и самки анишской зеркальной породы. Кросс характеризуется значительной продуктивностью, высокой выживаемостью и устойчивостью к заболеваниям.

ФГБНУ «Государственный научно-исследовательский институт озерного и речного рыбного хозяйства им. Л.С.Берга» (ГосНИОРХ) создал кросс «Саратовский» на основе скрещивания самок породы фресинет рамчатый с самцами московского чешуйчатого карпа, предназначенный для товарного выращивания рыбы. Коэффициент массонакопления кросса превышает исходные группы карпов на 5,5 -17,6%. [Голод и др., 2008].

В настоящее время представляют интерес новая породная группа черепетского зеркального (крупночешуйного) карпа [Мурашкин, 2016, 2020] и породная группа среднерусских карпов ЗУ-НК [Катасонов, Черфас, 1986].

Целью настоящей работы являлось сравнение рыбохозяйственных и морфологических характеристик нового кросса МР х черепетский с высоко-

продуктивным кроссом МР х ЗУНК в условиях 1 зоны рыбоводства (Московская область).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа проведена на прудовой базе опытного селекционно-племенного хозяйства ВНИИПРХ в течение трех лет с 2020 по 2022 гг. В качестве объекта исследования служили кроссы МР х ЗУ-НК и МР х черепетский. Скрещивания проведены в 2020 г. в условиях инкубационного цеха ВНИИПРХ, между самками породы московский разбросанный карп (МР) и с самцами породной группы ЗУ-НК из племенного стада ВНИИПРХ, а также с самцами черепетского «крупночешуйного» карпа (черепетский), сперма которых привезена из АО «Черепетский рыбхоз» (г. Суворов Тульской области).

Трехдневных личинок полученных кроссов при отдельном выращивании и двукратной повторности разместили в выростные пруды хозяйства. На втором и третьем году рыбу выращивали совместно в одном пруду.

Селекционно-племенные мероприятия, бонитировку и морфологический анализ племенных ремонтно-маточных стад карпа выполняли в соответствии с «Инструкцией по племенной работе с карпом» [Инструкция по племенной работе с карпом в репродукторах и промышленных хозяйствах, 1982]. Анализ морфометрических признаков проводили по стандартным методикам [Правдин, 1966]. Скорость роста рыб изучаемых кроссов выражали через коэффициент массонакопления [Резников и др., 1978].

Анализ данных проводили в программе STATISTICA 12.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты выращивания за три года наблюдений кроссов показаны в таблице 1. Показано, что средняя масса сеголетков в группе МР х черепетский (206,0 г) выше, чем у кросса МР х ЗУ-НК (109,0 г). Выживаемость во всех исследуемых групп рыб была невысокая.

На второй год выращивания при совместной посадке, посадочная масса кроссов была выравнена: у МР х черепетский она составляла в среднем 181,3 г, у МР х ЗУ-НК – 177,0 г. При облове двухлетков преимущества по массе у этих двух групп, обнаружено не было (981,0 г и 947,0 г, соответственно). Тем не менее, выживаемость кросса МР х ЗУ-НК превышала выживаемость МР х черепетский (58,0 и 31,9%, соответственно).

Аналогичные результаты были получены и на третий год выращивания. Посадочная и конечная масса тела рыб не имели достоверных различий: средний прирост МР х черепетский составил 1001 г, МР х ЗУ-НК – 959 г. В тоже время, выживаемость рыб у обоих кроссов составила 62,5 и 54,0% соответственно.

Таблица 1 – Результаты прудового выращивания кроссов МР × черепетский и МР × ЗУ-НК

Кросс	Средняя масса при посадке, г	Средняя масса при облове, г	Выживаемость при облове, %	Коэффициент массонакопления	Превышение рыбопродуктивности МР × черепетский над МР × ЗУ-НК
Сеголетки (0+)*					
МР х черепетский	-	206,0±7,0	1,29±1,06		1,10
МР х ЗУ-НК	-	109,5±77,5	5,62±4,79		
Двухлетки (1+)**					
МР х черепетский	181,3	981,0	31,9	0,142	1,75
МР х ЗУ-НК	177,0	947,0	58,0	0,140	
Трехлетки (2+)**					
МР х черепетский	960,0	1967,0	54,0	0,088	1,13
МР х ЗУ-НК	1017,0	1976,0	62,5	0,083	

Примечание: * – выращивание раздельное в двух повторностях, ** – выращивание совместное, в одном пруду

Следует отметить, что новый кросс МР х черепетский за три года выращивания показал лучший рост (коэффициент массонакопления у этой группы был выше, чем у МР х ЗУ-НК). Превышение рыбопродуктивности этого кросса относительно МР х ЗУ-НК увеличилась и за три года наблюдений – колебалась от 1,1 до 1,75 (таблица 1).

Селекционные индексы кроссов за все три года наблюдений колебались незначительно (таблица 2). У сеголетков до трехлетков наблюдается небольшое снижение величины индекса толщины, обхвата тела и головного отдела, немного возрастает индекс длины хвоста. Достоверных различий по значениям селекционных индексов и упитанности между кроссами одного возраста не наблюдается.

С целью определения расхождения исследуемых кроссов, МР х черепетский и МР х ЗУ-НК в факторном пространстве, построенном на промерах 19 морфометрических признаков и 18 индексов пластических показателей морфотипа у рыб из каждого кросса, был проведен многомерный факторный статистический анализ (таблицы 3, 4, рисунок).

Таблица 2 – Селекционные индексы кроссов МР × черепетский и МР × ЗУ-НК

Селекционный индекс	Кросс (M±m / CV)					
	МР × черепетский Сеголетки (0+)	МР × ЗУ-НК	МР × черепетский Двухлетки (1+)	МР × ЗУ-НК	МР × черепетский Трехлетки (2+)	МР × ЗУ-НК
Количество, шт.	30	30	30	30	26	24
Масса рыбы, г	193,3±5,8 / 16,5	200,2±8,2 / 22,5	956±22,6 / 12,8	913±20,5 / 12,3	1942±63,6 / 16,7	1961±63,2 / 15,8
Упитанность, %	3,64±0,053 / 8,0	3,47±0,044 / 7,0	3,03±0,043 / 7,8	2,95±0,061 / 11,3	2,86±0,076 / 13,5	2,87±0,048 / 8,3

Селекционный индекс	Кросс (M±m / CV)					
	MP × черепетский	MP × ЗУ-НК	MP × черепетский	MP × ЗУ-НК	MP × черепетский	MP × ЗУ-НК
	Сеголетки (0+)		Двухлетки (1+)		Трехлетки (2+)	
L/Hmax, %	2,47±0,017 / 3,8	2,53±0,016 / 3,4	2,72±0,024 / 4,7	2,76±0,028 / 5,5	2,94±0,031 / 5,4	2,92±0,096 / 4,3
B/L, %	20,2±0,20 / 5,4	18,8±0,19 / 5,5	17,9±0,14 / 4,4	17,6±0,17 / 5,2	16,7±0,19 / 5,8	16,2±0,18 / 5,4
C/L, %	29,4±0,20 / 3,8	29,4±0,19 / 3,5	28,7±0,19 / 3,6	28,5±0,19 / 3,7	26,8±0,32 / 6,2	27,3±0,18 / 3,2
O/L, %	95,7±0,69 / 4,0	93,1±0,70 / 4,1	90,4±0,69 / 4,8	89,8±0,86 / 5,2	86,8±0,90 / 5,3	87,1±0,92 / 5,2
l хв. / L, %	15,5±0,21 / 7,3	15,7±0,23 / 7,9	17,1±0,19 / 6,1	18,2±0,21 / 6,3	17,5±0,19 / 5,4	18,4±0,24 / 6,4
h хв. / L, %	14,4±0,12 / 4,6	13,9±0,11 / 4,2	13,8±0,15 / 6,0	13,7±0,24 / 9,8	13,5±0,16 / 5,9	13,8±0,17 / 6,1
l хв. / hхв, %	1,08±0,017 / 8,6	1,13±0,018 / 8,6	1,25±0,013 / 5,6	1,34±0,027 / 10,9	1,03±0,013 / 5,2	1,34±0,018 / 6,8

Примечание: L – длина тела рыбы без хвостового плавника; H – наибольшая высота тела; B – толщина тела; C – длина головы; O – обхват тела; l хв – длина хвостового стебля; h хв – высота хвостового стебля.

Таблица 3 – Морфометрическое описание трехлетков кроссов MP × черепетский и MP × ЗУ-НК

Признак	Символ	MP x Черепетский (26 шт.), M±m /CV	MP x ЗУНК (24шт.), M±m /CV
Масса рыб, г	M	1,94±0,32 /16,69	1,96±0,31 /15,80
Длина без хвостового плавника, см	L	42,56±2,45 /5,75	42,27±2,70 /6,39
Длина головы, см	C	10,39±0,62 /5,94	10,50±0,72 /6,89
Длина рыла, см	r	2,58±0,30 /11,77	2,63±0,37 /14,10
Диаметр глаза, см	o	1,55±0,16 /10,01	1,63±0,15 /9,02
Заглазничное расстояние, см	zag	6,29±0,44 /6,94	6,30±0,43 /6,81
Высота головы, см	Hc	9,99±0,50 /4,99	9,79±0,66 /6,73
Наибольшая высота тела, см	Hmax	15,45±0,97 /6,28	15,51±1,03 /6,63
Наименьшая высота тела, см	Hmin	6,02±0,45 /7,46	5,98±0,40 /6,70
Антедорсальное расстояние, см	anteD	21,56±1,16 /5,37	21,67±1,53 /7,05
Длина спинного плавника, см	Ld	16,72±1,49 /8,89	16,56±1,21 /7,30
Высота спинного плавника, см	Hd	4,24±0,74 /17,45	4,15±0,85 /20,43
Постдорсальное расстояние, см	postD	7,80±0,75 /9,62	7,80±0,89 /11,38
Длина хвостового стебля, см	Lhv	6,42±0,72 /11,26	6,62±0,64 /9,61
Длина анального плавника, см	La	4,27±0,47 /10,90	4,17±0,42 /10,17
Высота анального плавника, см	Ha	5,23±0,55 /10,52	5,06±0,57 /11,17
Длина пектрального плавника, см	Lp	9,03±0,49 /5,46	9,11±0,56 /6,19
Длина вентрального плавника, см	Lv	6,76±0,51 /7,55	6,65±0,72 /10,78
Пектоцентрального расстояние, см	PV	11,26±0,83 /7,39	11,15±0,91 /8,14
Вентроанальное расстояние, см	VA	12,23±1,03 /8,43	11,68±0,98 /8,38

Примечание: M±m /CV – среднее значение признака ± ошибка среднего значения / коэффициент вариации.

Факторный анализ – совокупность методов, которые на основе реально существующих связей признаков (или объектов) позволяют выявить латентные обобщающие характеристики организационной структуры и механизмы развития изучаемых явлений и процессов. Признаки, их взаимодействие предполагает наличие определенных причин (скрытые факторы). Последние устанавливаются в результате обобщения элементарных признаков – интегрированные характеристики, или признаки, более высокого уровня [Вуколов, 2004].

Таблица 4 – Индексы пластических признаков морфотипа трехлетков кроссов МР × черепетский и МР × ЗУ-НК

Признак- символ	МР×Черепетский (26 шт.) М±m (CV)	МР×ЗУНК (24 шт.) М±m (CV)
C/L	0,24±0,02 (6,87)	0,25±0,01 (5,29)
r/C	0,25±0,02 (9,84)	0,25±0,02 (9,56)
o/C	0,15±0,01 (9,28)	0,16±0,01 (8,07)
zag/C	0,61±0,02 (3,33)	0,60±0,02 (2,72)
Hc/L	0,24±0,01 (4,46)	0,23±0,01 (3,92)
Hmax/L	0,36±0,02 (4,60)	0,37±0,01 (4,08)
Hmin/L	0,14±0,01 (4,99)	0,14±0,01 (4,06)
anteD/L	0,51±0,02 (4,62)	0,51±0,02 (4,17)
Ld/L	0,39±0,02 (5,40)	0,39±0,02 (5,33)
Hd/L	0,10±0,01 (14,72)	0,10±0,02 (18,04)
postD/L	0,18±0,01 (5,97)	0,18±0,01 (7,74)
Lhv/L	0,15±0,01 (7,88)	0,16±0,01 (6,25)
LA/L	0,10±0,01 (7,02)	0,10±0,01 (8,58)
HA/L	0,12±0,01 (7,44)	0,12±0,01 (7,82)
LP/L	0,21±0,01 (4,29)	0,22±0,01 (3,69)
LV/L	0,16±0,01 (3,50)	0,16±0,01 (7,37)
PV/L	0,26±0,01 (5,46)	0,26±0,01 (4,00)
VA/L	0,29±0,01 (4,86)	0,28±0,01 (5,21)

Примечание: обозначение символов в таблице 3

Проведенный анализ не показал значимых различий по морфотипу у трехлетков. Как следует из рисунка, распределение рыб в пространстве координат не позволяет классифицировать изучаемые кроссы. Все точки, представляющие рыб из кросса МР х ЗУНК (1) и кросса МР х черепетский (2) образуют общее облако распределения.

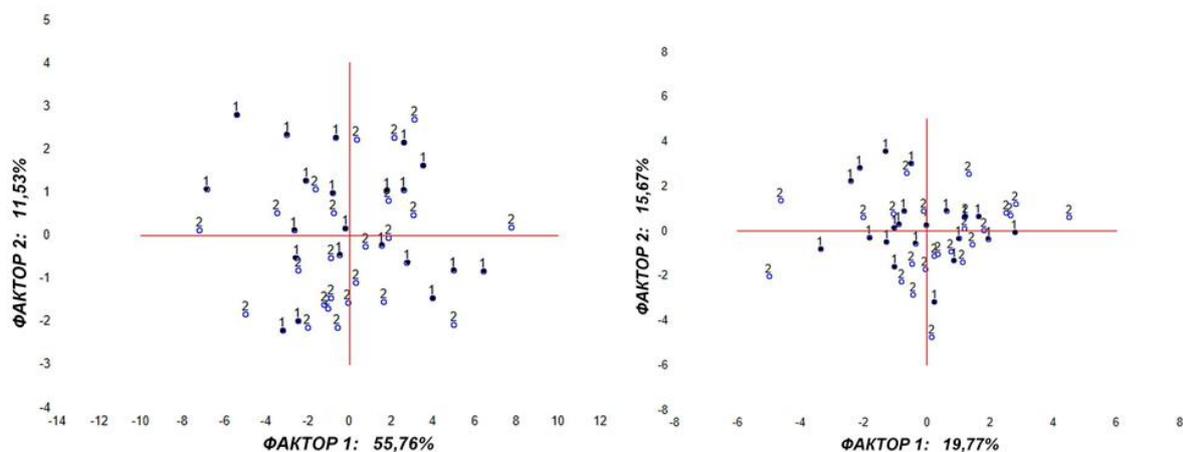
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Селекция среднерусского карпа была направлена на повышение темпа роста и выживаемость рыб в условиях рыбхозов первой и второй зон рыбоводства. В основу схемы создания породы положен принцип синтетической селекции. В исходное племенное ядро входило несколько помесных отводок, полученных от скрещивания производителей четырех групп

карпа: украинских (У), нивских (Н), курских (К) и загорских (З). Украинские и нивские карпы имели высокий темп роста и красивый «карповый» интерьер.

Абсолютные значения

Индексы



Кросс МР х ЗУ-НК (1 - ●) Кросс МР х черепетский (2 - о)

Рисунок – Распределение трехлетков кроссов МР х ЗУНК и МР х черепетский по абсолютным значениям и индексам пластических признаков морфотипа

Курские карпы гибридного происхождения использованы в скрещиваниях для повышения жизнеспособности исходного селекционного материала. Загорские карпы представляли аборигенную группу, прошедшую несколько поколений отбора в местных условиях. В настоящее время племенная отводка ЗУ-НК характеризуется повышенной скоростью роста, и максимально приспособлена к условиям содержания. Эффективная комбинационная способность племенной отводки ЗУ-НК при скрещивании их с московским разбросанным карпом (МР) показана в многочисленных исследованиях, и за счет удачного гетерозисного сочетания позволяет повысить рыбопродуктивность на 30-40% [Катасонов, Черфас, 1986]. При прудовом выращивании в рыбхозах Центральной зоны для получения рыб с разбросанным типом чешуйного покрова показана целесообразность скрещивания московского разбросанного карпа (МР) с породной группой ЗУ-НК [Катасонов и др., 2015].

Сходные результаты продемонстрировал кросс МР х черепетский. Учитывая наследственность родительских форм, эта комбинация представляется нам весьма перспективной.

Основным достоинством черепетских крупночешуйчатых карпов и черепетских чешуйчатых, является наличие высокой доли (порядка 70%) наследственности амурского сазана (*Cyprinus carpio haemotopterus*, Temminck et Schlegel, 1846). Это, в соответствии с разработанной отечественными специалистами концепцией максимального извлечения эффекта гетерозиса в карповодстве [Андрияшева, 1966], позволяет получать высокопродуктивных малочешуйчатых кроссов F1 при скрещивании с аналогичными по генотипу

чешуйного покрова (ssnn) породами, но генеалогически относящихся к европейскому подвиду сазана (*Cyprinus carpio carpio* L.) [Мурашкин, 2020].

В проведенном исследовании показано, что новый кросс при скрещивании самок московского разбросанного карпа (МР) и самцов крупночешуйчатого черепетского карпа (черепетский) за три года исследований показал результаты сопоставимые с данными выращивания высокопродуктивного кросса МР х ЗУ-НК.

На второй год выращивания в первой зоне рыбоводства скорость роста (коэффициент массонакопления) кросса МР х черепетский на 1,43% была выше, чем у кросса МР х ЗУ-НК. У трехлетков превосходство по этому показателю между МР х черепетский и МР х ЗУ-НК составило 6,02%.

Превышение рыбопродуктивности у кросса МР х черепетский над МР х ЗУ-НК в первый год выращивания составило 1,10%, для двухлетков и трехлетков 1,75 и 1,13%, соответственно.

Селекционные индексы у сравниваемых кроссов не имели различий для всех возрастных категорий рыб.

Исследование трехлетков кроссов по комплексу пластических признаков морфотипа показало их большую совместимость, что не позволяет визуально (по внешнему виду) разделить рыб между сравниваемыми группами скрещиваний.

Результаты рыбоводных опытов показывают, что кросс МР × черепетский обладает высокой скоростью роста и жизнеспособностью, сопоставимой с показателями кросса МР×ЗУ-НК.

Использование комбинации высокопродуктивной породы карпа московский разбросанный с породной группой черепетского крупночешуйчатого, которая имеет наследственность немецкого карпа и амурского сазана и создана в условиях тепловодного садкового хозяйства, представляется весьма перспективной.

Получение высокопродуктивного кросса карпов из рыбных хозяйств, расположенных в первой и третьей рыбоводных зонах – ОСПХ «Якоть» и рыбхоз «Черепетский», позволит улучшить ассортимент предлагаемых кроссов и расширить возможности по их широкому внедрению в карповые хозяйства России.

Таким образом, показана перспективность промышленного использования нового кросса МР х черепетский при товарном выращивании в первой зоне рыбоводства. Рыбоводные показатели нового кросса не уступают кроссу МР х ЗУ-НК, который пользуется повышенным спросом при реализации посадочного материала в фермерские рыбоводные хозяйства.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Андрияшева М.А. Гетерозис при внутривидовых скрещиваниях карпа // Изв. ГосНИОРХ. Л., 1966. – Т. 61. – С. 62-79.

Вуколов Э.А. Основы статистического анализа. – М., Форум-инфра-М, 2004. – 384 с.

Голод В.М., Никандров В.Я., Терентьева Е.Г., Шиндавина Н.И. Селекционные достижения и их использование в аквакультуре России: сб. «Современное состояние и перспективы развития аквакультуры в России». – М.: ООО «Столичная типография», 2008. – С. 67-79.

Инструкция по племенной работе с карпом в репродукторах и промышленных хозяйствах. – М.: «ВНИИПРХ». – 1982. – 39 с.

Катасонов В.Я. Породы и кроссы карпа селекции ВНИИПРХ / Поддубная А.В., Рекубратский А.В., Дементьев В.Н., Симонов В.М., Шарт Л.А., Балашов Д.А. // М, ВНИИПРХ, 2015. – 36 с.

Катасонов В.Я., Черфас Н.Б. Селекция и племенное дело в рыбоводстве. – М., Агропромиздат, 1986. – 182 с.

Кузнецов В.М. Перспективы генетической оценки сельскохозяйственных животных // Современные проблемы селекции и племенного дела в животноводстве. – СПб., 2002. – С. 63-64.

Маслова Н.И. Биологические основы племенного дела в рыбоводстве и методы управления селекционным процессом. – М., 2011. – 578 с.

Мурашкин В.Б. Зависимость хозяйственно-важных показателей от обилия чашуи на поверхности тела у евро-азиатских разбросанных кроссов карпа F1, полученных в скрещиваниях рамчатых и крупночешуйчатых производителей. Сообщение 1 // Новейшие генетические технологии для аквакультуры: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Москва, МВЦ «Крокус Экспо», 29-31 января 2020 г). – М.: Издательство «Перо», 2020. – С. 299-312.

Мурашкин В.Б. Сравнительные производственные испытания карпов породы Черепетский рамчатый и Кросса-F1 «Черепеть-Р» в тепловодном индустриальном хозяйстве АО «Черепетский рыбхоз» // Журнал «Рыбное хозяйство». – № 2. – 2016. – С. 67-72.

Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. – М.: «Пищевая промышленность». – 1966 г. – 376 с.

Резников В.Ф. Стандартная модель массонакопления рыбы / В.Ф. Резников, С.А. Баранов, Е.А. Стариков, Г.И. Толчинский // Сб. науч. трудов. Механизация и автоматизация рыбоводства и рыболовства во внутренних водоемах. – М.: «ВНИИПРХ». – 1978. – Вып. 22. – С. 182-196.

Симонов В.М. Анализ состояния и перспективные направления развития аквакультуры: науч. аналит. обзор. / Головина Н.А., Романова Н.Н., Головин П.П., Дементьев В.Н., Шишанова Е.И., Тренклер И.В., Пономарев С.В., Коноваленко Л.Ю., Мишуров Н.П. // М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2019. – 88 с.

**COMPARISON OF CARP CROSSES MR x CHEREPETSKY
and MR x ZU-NK BY MORPHOTYPE.**

V.M. Simonov, L.A. Shart

Branch for the Freshwater Fisheries of VNIRO («VNIIPRKh»)

E-mail: simvmi50@gmail.com

Abstract. During three years of cultivation in the ponds of the VNIIPRH breeding farm, the fish breeding and morphological characteristics of the new cross of the Moscow scattered carp x Cherepetsky with the cross of the Moscow scattered carp x ZU-NK were compared. The high growth rate of the new cross is shown, which is similar to the values of the highly productive group of the Moscow scattered x ZU-NK. It is established that the classification of the crosses under consideration according to the plastic features of the morphotype of three-year-old fish is not applicable.

Keywords: carp, cross, breeding indices, morphotype features, factor analysis, mass accumulation coefficient.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЭМБРИОНОВ РЫБ

О.Б. Докина, К.В. Ковалев, В.И. Ананьев, В.А. Миленко, Н.Д. Пронина

Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО»

(«ВНИИПРХ»)

E-mail: olgadokina@mail.ru

С целью определения подходов к дальнейшей разработке методов криоконсервации эмбрионов рыб выполнено исследование витрификационных свойств различных растворов криопротекторов, и проведены пробные опыты по замораживанию эмбрионов сибирского осетра и карпа. Показаны возможности порации мембран клеток, пути достижения витрификации, возможные режимы замораживания и оттаивания, составы витрификационных сред и концентрации проникающих и непроникающих протекторов в них, некоторые технологические приемы.

Ключевые слова: криоконсервация, криопротектор, витрификация, яйцеклетки, эмбрионы рыб

ВВЕДЕНИЕ

Неуклонное снижение численности популяций рыб, исчезновение многих видов, а также трудности, возникающие при воспроизводстве объектов аквакультуры, заставляют искать новые подходы к сохранению и восстановлению генофонда рыб. Одним из путей решения проблемы сохранения биоразнообразия является криоконсервация половых клеток, которые могут неограниченное время храниться в жидком азоте в низкотемпературных генных банках, не теряя жизнеспособность. В настоящее время во всем мире достаточно широко используются различные технологии криоконсервации спермы рыб, которые разработаны уже для более 200 видов. Некоторые из этих технологий весьма эффективны, т.е. обеспечивают оплодотворение икры размороженной спермой на уровне нативной спермы [Докина и др., 2020, 2022]. Но в условиях отсутствия самок и зрелой икры этот ценный генетический материал может оказаться бесполезным.

Безусловно, оптимальной для сохранения полноценного генотипа и способной обеспечить значительный экономический эффект в аквакультуре могла бы стать криоконсервация яйцеклеток и эмбрионов рыб. Однако созданию подобных технологий, в отличие от криоконсервации эмбрионов млекопитающих и человека, которая достаточно хорошо разработана, препятствуют объективные трудности, такие как огромные размеры и сложность организации яйцеклеток рыб, наличие физиологических барьеров, изолирующих развивающийся эмбрион от внешней среды, большое количество

цитоплазматических включений, обеспечивающих его автономность на ранних этапах онтогенеза.

В настоящем исследовании на основе изучения и анализа публикаций по данной проблеме была предпринята попытка провести собственные пробные эксперименты по замораживанию эмбрионов осетра и карпа с целью определения подходов к дальнейшей разработке методов их криоконсервации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на эмбрионах сибирского осетра и карпа. Половые продукты осетров получали в обособленном подразделении ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ») отделе «Конаковский», половые продукты карпа – в ОСПХ «Якоть». Получение половых продуктов, инкубацию оплодотворенной икры проводили в соответствии с действующими рыбоводными технологиями. В лаборатории криобиологии ВНИИПРХ инкубацию икры осуществляли на чашках Петри с регулярной сменой воды, температура которой поддерживалась на уровне $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Для проведения экспериментов использовались эмбрионы хорошего качества на разных стадиях развития.

При изучении способности растворов к витрификации и в пробных средах при замораживании эмбрионов использовались в качестве проникающих криопротекторов одно- и многоатомные спирты (метанол, этиленгликоль, 1,2-пропиленгликоль, глицерин), амиды (формаид, диметилформаид (ДМФА), ацетаид, диметилацетаид, карбаид), диметилсульфоксид (ДМСО), в качестве не проникающих криопротекторов сахара (сахароза, фруктоза, глюкоза, трегалоза), глицин, мед, водорастворимый крахмал, молоко, полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт, карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон в различных концентрациях. Растворителем служила дистиллированная вода или солевой раствор Рингера состава: 0,299 г хлорида калия, 0,649 г хлорида натрия, 0,029 г хлорида кальция, 0,0202 г гидрокарбоната натрия на 100 мл воды.

Для обеспечения проницаемости оболочек эмбрионы обрабатывались растворами фермента проназы (protease from *Streptomyces griseus* Type XIV) или поверхностно-активного вещества тритон X-305.

Витрификация растворов и замораживание эмбрионов осуществлялись в пластиковых пробирках объемом 1,5 мл или 15 мл путем их прямого погружения в жидкий азот или медленного охлаждения в программируемом замораживателе Biofreeze BV45 фирмы Consarctic, а также в режиме с ручным регулированием скоростей охлаждения. Для оттаивания пробирки помещались в водяную баню при температурах 0, 20, 40 или 50°C .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ опубликованных данных

Криобиологами разных стран уже более 30 лет изучаются физико-химические основы процессов криоконсервации эмбрионов рыб, причины и механизмы повреждений и устойчивости клеток при замораживании и оттаивании. Отмечалось, что в разработанных технологиях криоконсервации

эмбрионов человека и млекопитающих нашли применение два метода: метод управляемого медленного охлаждения, или классическая криоконсервация, и метод сверхбыстрого охлаждения с переходом жидкой фазы в стеклообразное состояние, или витрификация. Для криоконсервации эмбрионов рыб, по мнению многих исследователей, предпочтительным является использование метода витрификации, при котором клетки в высококонцентрированном растворе криопротекторов погружаются прямо в жидкий азот, что за счет экстремального повышения вязкости внутриклеточной жидкости во время охлаждения предотвращает образование крупных кристаллов льда, представляющих главную угрозу для клеточных структур.

Применение методов криоконсервации эмбрионов человека и млекопитающих для глубокого замораживания эмбрионов рыб не приводило к успеху из-за значительных различий этих объектов по своей морфологии и физиологии. Яйцеклетки и эмбрионы рыб характеризуются большими размерами, высоким содержанием воды, многокомпарментностью с практически непроницаемыми оболочками, большим количеством желточных включений, высокой чувствительностью к охлаждению, высокой активностью морфогенетических процессов.

Основной проблемой многие исследователи [Zhang, Rawson, 1995, 1998; Hagedorn et al., 1996, 1997; Hagedorn, Kleinhans, 2011; Rawson et al., 2000; Robles et al., 2006] считали непроницаемость для воды и криопротекторов оболочек трех компарментов оплодотворенной яйцеклетки: желтка, зародышевого пространства (развивающегося эмбриона) и перивителинового пространства. Желток окружен желточным синцитиальным слоем (вителиновой мембраной), развивающийся эмбрион – собственной плазматической мембраной, а перивителиновое пространство, окружающее эти компарменты, ограничивается наружной мембраной – хорионом. Предполагалось, что после удаления внешнего барьера (дехорионизации) становится возможным проникновение криопротектора в зародышевый компармент, что может обеспечить успешную витрификацию. При этом вителиновая мембрана остается непроницаемой, а ее нарушение приводит к гибели зародышей. Вителиновую мембрану у пресноводных рыб считают эволюционным приобретением, позволяющим эмбриону в гипоосмотической среде сохранять водно-солевой гомеостаз, пока не сформирована осморегуляторная система (почки, жабры, кожа). С целью преодоления вителинового барьера для протекторов предлагались способы электропорации, микроинъекций, ультразвука, гипербарии, встраивания в мембрану белка аквапорина с помощью инъекции измененной м-РНК [Bart, 2000; Hagedorn et al., 2002; Rawson, Zhang, 2005; Bart et al., 2010; Цветкова и др., 2014]. Однако все они далеки от реального воплощения в криотехнологии.

Другой важной проблемой является высокая чувствительность эмбрионов костистых рыб к охлаждению, которая возрастает по мере снижения температуры. Оптимальным путем преодоления этой проблемы видится сверхбыстрое замораживание, или витрификация.

Поскольку и проницаемость мембран, и чувствительность к охлаждению могут быть различны на разных стадиях развития эмбриона, третьей важной проблемой является выбор подходящей стадии для проведения процедур криоконсервации. М.С. Манохина и соавторы [Манохина, 1996; Манохина и др., 2000, 2004], проведя ряд удачных экспериментов с поздними эмбрионами и предличинками рыб и водных беспозвоночных, пришли к выводу о целесообразности проведения криоконсервации на этих стадиях, когда по завершении эмбриональных морфогенезов, истощении желточных включений, изменении проницаемости вителинового барьера и хориона естественным образом снимаются многие методические трудности.

С преодолением этих трудностей были связаны попытки криоконсервации эмбрионов гидробионтов на различных стадиях развития группами исследователей из многих стран. Пока найдены подходы к технологиям криоконсервации только поздних эмбрионов и ранних личинок морских моллюсков и иглокожих [Гахова и др., 1996; Манохина, 1996; Chao et al., 1997]. Сообщалось также об отдельных удачных попытках криоконсервации эмбрионов карпа [Zhang et al., 1989], данио рерио [Манохина и др., 2000, 2004, 2008], морской камбалы [Chen, Tian, 2004], но результаты этих опытов плохо воспроизводимы и расценивались иногда не как криоконсервация, а как сохранение в переохлажденном состоянии [Chao, Liao, 2001]. Сообщалось о криоконсервации изолированных бластомеров [Harvey, 1983; Strussmann et al., 1999; Pšenička et al., 2016] и ооцитов [Guan et al., 2010].

В последние годы появились сообщения об успешной криоконсервации яйцеклеток и эмбрионов осетровых рыб.

Российскими учеными [Тихомиров, 2010, 2011; Тихомиров и др., 2012, 2012; Фирсова, 2018] предложен способ витрификации икры осетровых рыб с использованием непроникающих криопротекторов «обволакивающего» действия: растительных масел, рыбьего жира, эфирных масел и их смесей. По мнению авторов, покрытие икринок тонким липидным слоем обеспечивает их разграничение и равномерное стеклование при сверхбыстром замораживании, что позволяет им после оттаивания сохранять целостность внешней оболочки, жизнеспособность и оплодотворяемость. Однако результаты описанных опытов также остаются невозпроизводимыми.

Об успешной криоконсервации эмбрионов персидского осетра и хорошей воспроизводимости результатов (судя по приведенным статистическим данным) сообщалось иранскими учеными [Keivanloo, Sudagar, 2016]. Предложенный ими метод заключается в осуществлении витрификации клеток в многокомпонентных растворах проникающих и непроникающих криопротекторов. Успех достигается за счет применения изученных ранее достаточно тонких методических приемов. Для криоконсервации использовались эмбрионы на стадии нейруляции (примерно через 48 ч после оплодотворения), которые, как выяснили авторы, были более устойчивы к криопротекторам, чем эмбрионы на стадии гастрюляции (примерно через 24 ч после оплодотворения). Перед смешиванием с протекторами эмбрионы

обрабатывались энзимом проназой в солевом растворе Рингера с целью удаления или порации хориона. При смешивании с витрификационными растворами применялась поэтапная методика увеличения концентраций криопротекторов путем последовательного кратковременного выдерживания эмбрионов в растворах разных концентраций от минимальной до максимальной с понижением температуры на двух последних стадиях, что давало возможность снизить осмотическое повреждение клеток и токсичность витрификационных растворов, избежать холодового повреждения во время замораживания, уменьшить образование внутриклеточного льда. После замораживания клеток в конечных растворах при прямом погружении пробирок с ними в жидкий азот на 10 минут, оттаивания при рекомендуемой авторами температуре 20°C и инкубации в течение суток было получено в опытах с различными витрификационными растворами от 13 до 45% живых личинок.

Чрезвычайно интересным представлялось повторение этих опытов с эмбрионами другого вида осетровых, однако в достаточно полно описанной методике концентрации витрификационных растворов выражаются не общепринятым, а понятным только авторам способом, что исключает возможность ее точного воспроизведения. Тем не менее, проведенный литературный поиск в области криоконсервации яйцеклеток и эмбрионов рыб дает теоретическую основу и направление в проведении собственных исследований по данной проблеме.

Эксперименты по замораживанию эмбрионов осетра и карпа

В ходе предварительных исследований, направленных на поиск витрификационных сред для глубокого замораживания эмбрионов рыб, было испытано 134 раствора индивидуальных веществ и смесей веществ, проявляющих свойства проникающих и не проникающих в клетку протекторов. Составы некоторых из этих растворов, в которых наблюдалась полная или частичная витрификация, приведены в таблице 1. В качестве растворителя использовалась дистиллированная вода или солевой раствор Рингера, примененный иранскими исследователями [Keivanloo, Sudagar, 2016] в средах для замораживания эмбрионов персидского осетра.

Таблица 1 – Составы растворов и их способность к витрификации при быстром погружении в жидкий азот

№ раствора	Компоненты раствора и их концентрация			Растворитель	Образование кристаллов льда в растворе		
	проникающие протекторы	непроникающие протекторы	дополнительн. компоненты		замораживание		оттаивание
					1 мин	1,5 мин и более	
1	ДМСО – 15%	сахароза – 20%		р-р Рингера	+		+
2	ДМСО – 15%	сахароза – 40%		р-р Рингера	-		+
3	ДМСО – 30%	сахароза – 40% *		р-р Рингера	±		+
3а	ДМСО – 30%	сахароза – 40% *		вода	±		±
4	ДМСО – 40%	сахароза – 10%		р-р Рингера	-		+
5	ДМСО – 40%	сахароза – 40% *		р-р Рингера	-		-
5а	ДМСО – 40%	сахароза – 40% *		вода	-		-

№ раствора	Компоненты раствора и их концентрация			Растворитель	Образование кристаллов льда в растворе		
	проникающие протекторы	непроникающие протекторы	дополнительн. компоненты		замораживание		оттаивание
					1 мин	1,5 мин и более	
6	метанол – 15%	сахароза – 20%		р-р Рингера	+		+
7	метанол – 15%	сахароза – 40%		р-р Рингера	-		+
8	метанол – 30%	сахароза – 20%		р-р Рингера	-		+
8а	метанол – 30%	сахароза – 20%		вода	-		±
9	метанол – 40%	сахароза – 10%		р-р Рингера	-		-
9а	метанол – 40%	сахароза – 10%		вода	-		-
					-		±
10	метанол – 30%	сахароза – 10%		р-р Рингера	+		+
10а	метанол – 30%	сахароза – 10%		вода	+		+
11	ДМСО – 40%	сахароза – 20%		р-р Рингера	-		-
11а	ДМСО – 40%	сахароза – 20%		вода	-		-
					-		±
					-	±	+
12	этиленгликоль – 40%	сахароза – 20%		р-р Рингера	-		-
					-		±
12а	этиленгликоль – 40%	сахароза – 20%		вода	-		-
					-		±
					-	±	±
16	ДМСО – 10% метанол – 12% глицерин – 10% ацетамид – 6%	сахароза – 20%		р-р Рингера	-		±
16а	ДМСО – 10% метанол – 12% глицерин – 10% ацетамид – 6%	сахароза – 20%		вода	-		-
					-		±
21	этиленгликоль – 40%	сахароза – 20% глюкоза - 5%		вода	-		-
					-	±	+
34	ДМСО – 40%	сахароза – 10% глюкоза- 10%		вода	-		-
35	метанол – 40%	сахароза – 5% глюкоза - 5%		вода	-		-
36	этиленгликоль – 40%	сахароза – 10% глюкоза - 10%		вода	-		-
38	ДМСО – 10% метанол – 5% глицерин – 12% ацетамид – 4,5%	сахароза – 20% глюкоза - 20%*		вода	-		-
					-		±
42	ДМСО – 60%			вода	-		-
					-	+	-
47	метанол – 50%			вода	-		±
50	метанол – 60%			вода	-		-
					±	+	-
52	ДМСО – 10% метанол – 12% глицерин – 10% ацетамид – 6%	сахароза – 20% глюкоза - 20%*		вода	±		+
					±		±
53	ДМСО – 10% метанол – 18% глицерин – 10%	сахароза – 20% глюкоза - 10%		вода	-		-
					-		±
55	ДМСО – 10% метанол – 12% глицерин – 10% ацетамид – 6%	сахароза – 20% глюкоза - 10%	крахмал-0,5%	вода	-		-
					±		-

№ раст вора	Компоненты раствора и их концентрация			Растворитель	Образование кристаллов льда в растворе		
	проникающие протекторы	непроникающие протекторы	дополнительн. компоненты		замораживание		оттаивание
					1 мин	1,5 мин и более	
57	ДМСО – 10% метанол – 12% глицерин – 10% ацетамид – 6%	сахароза – 20% глюкоза - 5%		вода	- - -		- ± +
60	ДМСО – 12% метанол – 18% глицерин – 10%	сахароза – 20% глюкоза - 5%		вода	-		±
63	ДМСО – 12% метанол – 12% глицерин – 12% ацетамид – 6%	сахароза – 20% глюкоза - 5%		вода	-		±
64	ДМСО – 12% метанол – 12% глицерин – 12% ацетамид – 6%	сахароза – 20% глюкоза - 10%		вода	±		+
66	ДМСО – 10% метанол – 20% глицерин – 10%	сахароза – 20% глюкоза - 5%		вода	- ±		± ±
67	ДМСО – 10% метанол – 20% этиленгликоль – 10%	сахароза – 20% глюкоза - 5%		вода	- ±		± ±
71a	метанол – 40%	сахароза – 20%		вода	- -	±	± ±
79	этиленгликоль – 40%	сахароза – 20%*	поливиниловый спирт – 5%	вода	- - -	±	- ± +
80	метанол – 40%	сахароза – 20%*	поливиниловый спирт – 5%	вода	- -	±	- ±
83	ДМСО - 40%	сахароза – 20%*	поливиниловый спирт – 5%	вода	- -	±	- ±
87	ДМСО – 10% метанол – 18% глицерин – 10%	сахароза – 20%*	поливиниловый спирт – 5%	вода	- -	±	- ±
93	ДМСО – 10% метанол – 18% этиленгликоль – 10%	сахароза – 20%*	поливиниловый спирт – 5%	вода	- -	±	- ±
100	метанол – 40%	сахароза – 20% фруктоза – 5%	поливиниловый спирт – 5%	вода	-		-
102	ДМСО – 10% метанол – 18% глицерин – 10%	сахароза – 20% фруктоза – 5%	поливиниловый спирт – 5%	вода	-		-
103	ДМСО – 10% метанол – 18% глицерин – 10%	сахароза – 20% мед – 5%	поливиниловый спирт – 5%	вода	-		-
104	ДМСО – 60%		поливиниловый спирт – 5%	вода	±	±	-
108	ДМСО – 10% метанол – 18% этиленгликоль – 10%	сахароза – 20%*	поливиниловый спирт – 1%	вода	-	±	±
109	ДМСО – 5% метанол – 6% глицерин – 5% ацетамид – 3%	сахароза – 20% фруктоза – 20%*	поливиниловый спирт – 10%	вода	-	-	±

№ раст вора	Компоненты раствора и их концентрация			Растворитель	Образование кристаллов льда в растворе		
	проникающие протекторы	непроникающие протекторы	дополнительн. компоненты		замораживание		оттаи вание
					1 мин	1,5 мин и более	
110	ДМСО – 5% метанол – 6% глицерин – 5% ацетамид – 3%	сахароза – 20% мед – 20%	поливинилпир- ролидон - 10%	вода	- - -	± ± ±	± - ±
111	ДМСО – 10% метанол – 18% глицерин – 10%	сахароза – 20%	поливинилпир- ролидон - 10%	вода	- -	± ±	- ±
113	ДМСО – 10% метанол – 18% этиленгликоль – 10%	сахароза – 20%	поливинилпир- ролидон - 10%	вода	-	±	-
121	ДМСО – 5% метанол – 6% глицерин – 5% ацетамид – 3%	сахароза – 20% фруктоза – 20%	поливинилпир- ролидон - 10%	вода	-	±	±
123	ДМСО – 5% метанол – 6% глицерин – 5% ацетамид – 3%	сахароза – 20% инозит – 20%*	поливинилпир- ролидон - 10%	вода	-	-	±
126	ДМСО – 5% метанол – 6% пропиленгликоль – 6% ацетамид – 3%	сахароза – 20% фруктоза – 20%*	поливинилпир- ролидон - 10%	вода	- -	- ±	- ±
132	пропиленгликоль – 6% этиленгликоль – 4% метанол – 6% ацетамид – 3%	сахароза – 20% фруктоза – 20%	поливинилпир- ролидон - 10%	р-р Рингера	-	-	-
133	пропиленгликоль – 6% этиленгликоль – 6% ДМСО – 5% ацетамид – 3%	сахароза – 20% фруктоза – 20%	поливинилпир- ролидон - 10%	р-р Рингера	-	-	-
134	пропиленгликоль – 40%	сахароза – 20% фруктоза – 20%	поливинилпир- ролидон - 10%	р-р Рингера	-	-	-

Примечание: «+» - полная кристаллизация; «±» - частичная кристаллизация; «-» - отсутствие кристаллизации;
* - неполное растворение.

Растворы в пластиковых криопробирках объемом 1,5 мл замораживались быстрым погружением в жидкий азот на 1-1,5 минуты, после чего размораживались в водяной бане при температурах 20-50°C в течение нескольких секунд. При этом проводилось наблюдение за образованием кристаллов льда. Витрификация, или стеклование, происходила в тех пробирках, которые оставались прозрачными в ходе замораживания и оттаивания.

Проведенные испытания показали, что при кратковременном замораживании для успешной витрификации (отсутствия кристаллообразования как при замораживании, так и при оттаивании) концентрация проникающего криопротектора в среде должна составлять около 40% (растворы №№ 1-12). Среди проверенных проникающих протекторов (метанол, диметилсульфоксид, этиленгликоль, пропиленгликоль, глицерин, формамид, диметилформамид, ацетамид, диметилацетамид, карбамид) лучшими витрифицирующими свойствами обладали метанол,

диметилсульфоксид (ДМСО) и этиленгликоль (растворы №№ 5, 5а, 9, 9а, 12, 12а). Влияния растворителей на витрификационные свойства растворов обнаружено не было.

В качестве непроникающих протекторов чаще всего испытывалась сахароза, а также в дополнение к ней фруктоза, глюкоза, трегалоза, глицин, мед. Наблюдения показали, что химическая природа непроникающего протектора значения не имела (сравнение растворов №№ 9 и 35, 11, 33 и 34, 12 и 36), успех витрификации определяла лишь его концентрация в растворе. В сочетании с 40% метанола концентрация сахарозы минимально составляла 10%, а в сочетании с 40% этиленгликоля или 35-40% ДМСО концентрация сахарозы должна составлять не менее 20% (растворы №№ 1-12). Дальнейшее повышение концентрации сахарозы ограничивалось ее растворимостью. Увеличение концентрации непроникающего протектора в растворе этиленгликоля и сахарозы добавлением 5% фруктозы, глюкозы или трегалозы, способствовало повышению витрифицирующих свойств. В отсутствие сахаров концентрация проникающего протектора в водном растворе должна составлять не менее 60% (растворы №№ 42, 47, 50). Присутствие сахаров в растворе необходимо для того, чтобы не повышать концентрацию проникающих протекторов, которые могут оказывать токсическое действие на эмбрионы, выше 40%. Кроме того, сахара за счет присутствия в их молекулах нескольких гидроксильных групп, способных образовывать водородные связи с полярными функциональными группами белков и фосфолипидов, защищают мембраны клеток при замораживании и оттаивании.

Многокомпонентные растворы, содержащие несколько проникающих протекторов, составлялись с целью снижения концентраций отдельных токсикантов и сохранения их общей концентрации в растворе, обеспечивающей его стеклование при охлаждении. Сравнение лучших по витрификационным свойствам многокомпонентных растворов (растворы №№ 16, 53, 55, 57) показало, что общая концентрация проникающих протекторов в них должна составлять около 40% при общей концентрации растворенных веществ около 70%. При этом снижение концентрации проникающих протекторов возможно за счет повышения концентрации сахаров (растворы №№ 109, 110, 116, 121, 123, 126, 128, 129). Увеличение концентраций проникающих протекторов выше 40%, сахаров выше 40% или общей концентрации выше 70% не способствовало успеху витрификации (растворы №№ 38, 52, 60, 63, 64, 66, 67).

Добавление веществ, способных активно связывать воду и препятствовать кристаллообразованию (водорастворимого крахмала, молока, полиэтиленгликоля, поливинилового спирта, карбоксиметилцеллюлозы, поливинилпирролидона), способствовало явному повышению витрификационных свойств. Наиболее эффективным было действие поливинилового спирта (растворы №№ 79, 80, 83, 87, 93, 100, 102, 109) и поливинилпирролидона (растворы №№ 110, 111, 113, 121, 123, 126) в концентрациях 10%.

Один и тот же эффект давало оттаивание растворов при температурах 40 и 50°C. Предпочтительным представляется использование температуры 50°C, т.

к. при этом быстрее происходило исчезновение кристаллов, почти всегда появляющихся при размораживании витрифицированных растворов. При размораживании кристаллообразование происходило чаще, чем при замораживании растворов. Размораживание при 20°C, рекомендованное иранскими исследователями [Keivanloo, Sudagar, 2016], усиливало кристаллообразование и увеличивало время оттаивания, что не могло оказывать положительного действия при предполагаемом размораживании эмбрионов.

Выявленные в ходе проведенных испытаний закономерности наблюдались для большинства растворов (витрификационных сред) лишь при кратковременном замораживании (1-1,5 минуты). При 5-10-минутном выдерживании в жидком азоте во всех вариантах происходила частичная кристаллизация. Тем не менее, из предварительно проверенных сред для экспериментов по замораживанию эмбрионов первоначально была выбрана среда № 103.

С учетом практических рекомендаций, приведенных в публикациях иранских [Keivanloo, Sudagar, 2016] и германских ученых [Lahnsteiner, Glienke, 2006], была предпринята попытка замораживания эмбрионов сибирского осетра в стадии ранней нейрулы с применением 6-стадийной методики увеличения концентраций криопротекторов в витрификационной среде путем последовательного перенесения клеток из одного раствора в другой в пластиковом цилиндрическом сосуде с сетчатым дном. Во всех растворах в качестве растворителя использовался раствор Рингера состава, указанного иранскими исследователями [Keivanloo, Sudagar, 2016], предположительно изотоничный внутренней среде клеток.

Вначале 20 эмбрионов были помещены на 5 минут в 0,01%-ный раствор поверхностно-активного вещества тритон X-305 при 20°C для рекомендованного германским патентом [Lahnsteiner, Glienke, 2006] повышения проницаемости внешних оболочек. Затем проводилось выдерживание (эквilibрация) при 20°C последовательно в четырех растворах: 1) 1,5 минуты в 5%-ном растворе ДМСО; 2) 1,5 минуты в 10%-ном растворе ДМСО; 3) 1 минуту в растворе, содержащем 10% ДМСО, 6% метанола и 3% глицерина; 4) 1 минуту в растворе, содержащем 10% ДМСО, 12% метанола и 6% глицерина. На последнем этапе при 10°C проводилась эквilibрация по 1 минуте в 5-ом (10% ДМСО, 18% метанола, 10% глицерина, 10% сахарозы, 2% фруктозы) и 6-ом (среда № 103: 10% ДМСО, 18% метанола, 10% глицерина, 20% сахарозы, 5% меда, 5% поливинилового спирта) растворах. Непосредственно после этого клетки в 6-ом растворе были помещены в криопробирку объемом 1,5 мл, в которой замораживались погружением в жидкий азот на 1 минуту, после чего пробирка размораживалась в водяной бане при 50°C за несколько секунд. Далее содержимое пробирки было вылито в воду на чашке Петри при 20°C. Оставшиеся не разрушенными (но не живыми) две клетки были отмыты от среды и оставлены в воде, где в течение суток сохраняли целостность оболочки.

На следующий день было поставлено 6 опытов по замораживанию эмбрионов сибирского осетра в стадии поздней нейрулы по 20 клеток в

пластиковых пробирках объемом 15 мл. В первом опыте клетки первоначально выдерживались в 0,05%-ном растворе тритона в течение 5 минут, затем последовательно в 1-ом, 2-ом, 3-ем и 4-ом растворах так же, как в предыдущем опыте, затем в 5-ом и 6-ом растворах при 0°C (объем 6-го раствора 10 мл). После погружения в жидкий азот на 1 минуту, размораживания при 33°C и отмывания от среды на чашке Петри были оставлены 3 эмбриона, сохранившие целостность оболочек. Для сравнения жизнеспособности клеток в другую чашку Петри были помещены контрольные 15 эмбрионов, прошедшие аналогичную эквilibрацию во всех растворах, но без замораживания.

Во втором опыте были проведены аналогичные первому опыту процедуры. Отличие состояло в том, что эквilibрация в 0,05%-ном растворе тритона осуществлялась в течение 1 минуты и температура размораживания составляла 50°C. Аналогично был проведен третий опыт с тем отличием от второго, что вначале 1-минутная эквilibрация осуществлялась в растворе Рингера.

В следующих трех опытах проводилась 1,5-минутная эквilibрация эмбрионов сразу в конечной витрификационной среде (в четвертом опыте – в среде № 103 при 10°C, в пятом опыте – в среде, содержащей 40% метанола, 20% сахарозы, 5% меда и 5% поливинилового спирта при 0°C, в шестом опыте – в среде № 87 при 0°C) с последующим замораживанием в течение 1 минуты в жидком азоте, размораживанием при 50°C и отмыванием от среды на чашках Петри.

Результатом всех шести опытов были оставшиеся после размораживания единичные не разрушенные клетки, которые сохраняли целостность в течение трех суток, но не развивались. В контроле 8 из 15 эмбрионов достигли выклева.

Еще четыре опыта было поставлено с эмбрионами сибирского осетра той же партии на стадии органогенеза по 20 клеток в пластиковых пробирках объемом 15 мл. В первом опыте клетки сначала выдерживались в течение 1 минуты в 0,05%-ном растворе тритона и затем последовательно по 1 минуте в шести растворах по вышеописанной методике (6-й раствор – среда № 103). Замораживание проводилось погружением пробирки в жидкий азот на 1,5 минуты, размораживание – при 50°C в течение нескольких секунд.

Во втором опыте первоначальная 1-минутная эквilibрация осуществлялась в растворе Рингера. Все последующие процедуры были аналогичны тем, которые проводились в первом опыте. К опыту был поставлен контроль с эмбрионами, прошедшими все процедуры, кроме замораживания.

В третьем опыте проводилась 1,5-минутная эквilibрация сразу в конечной среде № 103 при 0°C. К нему также был поставлен контроль. Четвертый опыт проводился так же, как второй, но с выдерживанием в жидком азоте в течение 10 минут.

Оставшиеся во втором и третьем опытах единичные клетки с целыми оболочками имели видимые под микроскопом внутренние повреждения, т. е. были не жизнеспособны. В обоих контролях на следующий день наблюдался выклев по одной личинке. Эмбрионы на стадии органогенеза в сравнении со

стадией нейрулы оказались менее устойчивыми не только к замораживанию, но и к токсическому действию растворов криопротекторов.

В дальнейшем было предпринято сравнение токсического действия ряда сред на эмбрионы сибирского осетра в стадии нейрулы без замораживания и одновременно с этим сравнение протективного действия тех же сред при быстром замораживании таких же клеток. В контролях эмбрионы в количестве около 10 шт. выдерживались в течение 1 минуты в витрификационной среде при 10°C и после отмывания оставлялись в воде на чашках Петри при 18-20°C для развития до выклева. В опытах по 15 эмбрионов таким же образом эквивилибировались в 5 мл среды и замораживались в ней в пробирках объемом 15 мл в вертикальном положении погружением в жидкий азот на 2 минуты. После размораживания в течение 1 минуты при 50°C оставшиеся не разрушенными клетки после отмывания от среды оставлялись на чашках Петри в тех же условиях, что и контроли. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Сравнение токсического и протективного действия витрификационных сред на эмбрионы сибирского осетра в стадии нейрулы

№ среды	Контроль		Опыт
	выживаемость клеток в течение суток, %	выклев личинок на 4-е сутки, %	количество и процент клеток с целыми оболочками
12	89	50	-
104	100	100	-
50	70	57	-
105	0	0	-
106	100	90	-
107	100	89	5 (33%)
79	100	100	-
12a	100	90	4 (27%)
21	90	100	1 (7%)
11a	100	100	-
83	100	89	3 (20%)
71a	100	100	-
80	100	60	-
87	100	100	-
87a	80	75	-
93	92	100	2 (13%)
108	80	100	-
109	100	100	4 (27%)

Наблюдение в течение 4-х суток за контрольными чашками показало, что большинство сред не проявило выраженного токсического эффекта. Заметное снижение выживаемости клеток и выклева происходило лишь при воздействии на них очень высоких (60%) концентраций проникающих протекторов, прежде всего, метанола. В опыте оставшиеся после оттаивания не разрушенными клетки сохраняли в течение 3-х суток целостность оболочек и четкий рисунок, характерный для стадии нейрулы, но не развивались и на 4-е сутки начали

разлагаться. Из шести проявивших защитное действие на эмбрионы сред четыре содержали этиленгликоль, что указывало на его достаточно высокие протективные свойства.

В следующих трех опытах по замораживанию эмбрионов сибирского осетра в стадии нейрулы использовались различные витрификационные среды и разные методики. В первом опыте приблизительно воспроизводилась методика, примененная иранскими исследователями [Keivanloo, Sudagar, 2016] для замораживания эмбрионов персидского осетра. Вначале 20 эмбрионов выдерживались в течение 5 минут в растворе проназы с концентрацией 2 мг/мл при 20°C для предполагаемой порации оболочки. Затем проводилась эквilibрация при 20°C последовательно в 4-х растворах (растворитель – раствор Рингера): 1) 1,5 минуты в 1%-ном растворе ДМСО; 2) 1,5 минуты в 3%-ном растворе ДМСО; 3) 1 минуту в растворе, содержащем 5% ДМСО, 2% метанола, 1% глицерина и 1% ацетамида; 4) 1 минуту в растворе, содержащем 5% ДМСО, 4% метанола, 3% глицерина и 2% ацетамида. На последнем этапе при 10°C проводилась эквilibрация по 1 минуте в 5-ом (5% ДМСО, 6% метанола, 5% глицерина, 3% ацетамида, 15% сахарозы, 15% меда, 5% поливинилпирролидона) и 6-ом (среда № 110) растворах. Сразу после этого клетки в 6-ом растворе объемом 10 мл в пробирке объемом 15 мл замораживались погружением в жидкий азот на 1,5 минуты, а затем размораживались в водяной бане при 40°C в течение 1,5 минут. Несмотря на тщательное выполнение описанной методики, опыт закончился неудачей (все клетки разрушились), по-видимому, из-за неполного растворения веществ в заключительном высококонцентрированном (69%) растворе и произошедшей вследствие этого кристаллизации.

Во втором опыте без использования проназы 20 эмбрионов эквilibрировались в течение 2 минут в 10 мл среды № 109 при 10°C, затем замораживались в ней в пробирке объемом 1,5 мл при ее вертикальном погружении в азот в течение 1,5 минут практически без кристаллизации. После оттаивания при 40°C в течение 1,5 минут 17 эмбрионов с целыми оболочками были отмыты от среды и оставлены в воде на чашке Петри. Через сутки оставшиеся целыми 15 эмбрионов сохранялись на чашке с ежедневной сменой воды еще 5 суток, но развития их не происходило.

В третьем опыте такая же партия эмбрионов после 5-минутного выдерживания в растворе проназы при 20°C эквilibрировалась аналогично предыдущему опыту в среде № 113. При замораживании в течение 1,5 минут наблюдалась частичная кристаллизация раствора. Оттаивание происходило в течение 3 минут. Вначале оставшиеся целыми 9, а через сутки - 5 эмбрионов, так же сохранялись без развития в течение 6 суток.

Близкие результаты замораживания, полученные во втором и третьем опытах, указывали на необходимость использования высококонцентрированных (около 70%) витрификационных сред, а также на отсутствие действия проназы и высокую прочность оболочек клеток, что могло быть следствием влияния танина, применяемого для обесклеивания оплодотворенной икры в производст-

венных условиях. Для проверки последнего предположения было предпринято замораживание оплодотворенной на чашке Петри необесклеенной икры. Клетки выдерживались в среде № 121 объемом 5 мл при 14°C и сразу замораживались в пробирке объемом 15 мл наклонным погружением в жидкий азот на 1,5 минуты. После оттаивания при 40°C в течение 1,5 минут остались 2 целые клетки из 18, которых, видимо, могло быть и больше при вертикальном погружении пробирки (при наклонном положении большая часть клеток оказалась на поверхности раствора, где их гибель была практически неизбежной), что свидетельствовало о естественной прочности клеточных мембран.

В следующих опытах на эмбрионах сибирского осетра в стадии органогенеза, более чувствительной, чем стадия нейрулы, было предпринято сравнение действия пяти витрификационных сред в двух вариантах методики: с постепенным увеличением концентраций проникающих протекторов и без него. Замораживание осуществлялось в криопробирках объемом 1,5 мл вертикальным погружением в жидкий азот на 1,5 минуты, размораживание – в водяной бане при 50°C в течение 1 минуты.

По первому варианту до смешивания клеток с конечной витрификационной средой № 109 или №111 проводилось их выдерживание при комнатной температуре последовательно в трех растворах: 1) 5 минут в 0,015%-ном растворе тритона; 2) 1,5 минуты в растворе, содержащем 3% ДМСО, 3% метанола и 1% ацетамида; 3) 1,5 минуты в растворе, содержащем 5% ДМСО, 6% метанола и 3% ацетамида. Перед смешиванием клеток со средами №№ 121, 123 и 126 проводились аналогичные процедуры за исключением раствора тритона.

По второму варианту перед замораживанием клетки смешивались непосредственно с конечной витрификационной средой (сначала средой из-за ее высокой вязкости заполнялась нижняя часть пробирки, затем помещались эмбрионы, и добавлялась среда до верха пробирки), в которой выдерживались в течение 1 минуты. Результаты опытов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Сравнение протективного действия витрификационных сред на эмбрионы сибирского осетра в стадии органогенеза

№ среды	Количество и процент клеток с целыми оболочками	
	первый вариант методики	второй вариант методики
109	0 (0%)	0 (0%)
111	0 (0%)	0 (0%)
121	2 (1 – через 1 час) (14,3%)	0 (0%)
123	1 (20%)	0 (0%)
126	4 (3 – через 1 час) (42,9%)	3 (42,9%)

Опыт показал отсутствие влияния тритона на проницаемость клеточных мембран, предпочтительность эквilibрации клеток в растворах с постепенным увеличением концентраций протекторов и перспективность включения пропиленгликоля в состав витрификационной среды (сравнение сред № 126 и № 121).

Далее с целью поиска оптимального режима замораживания клеток на ряде сред исследовались другие способы витрификации помимо прямого погружения пробирок с растворами в жидкий азот. Вопреки общепринятым представлениям о необходимости применения сверхвысоких скоростей охлаждения для достижения витрификации, идеальное стеклование происходило при медленном охлаждении 1,5 мл-пробирок с растворами в программируемом замораживателе Biofreeze BV45 по стандартной программе замораживания лейкоцитов, причем это состояние сохранялось после извлечения пробирок и стояния их на воздухе в течение достаточно длительного времени (более 20 минут). При последующем размораживании пробирок в водяной бане при 50°C кристаллизации растворов не наблюдалось (только в среде № 116 небольшое помутнение в середине пробирки) (таблица 4).

Почти такая же идеальная витрификация происходила при медленном замораживании тех же растворов в режиме, подобном режиму замораживания спермы осетровых рыб с ручным регулированием скоростей охлаждения в течение 30 минут и 12 минут. Однако в этих случаях кристаллизация некоторых сред происходила при стоянии пробирок на воздухе в течение нескольких минут или во время размораживания при 20°C (таблица 4).

Таблица 4 – Способность растворов к витрификации при медленном замораживании

№ раст-вора	Образование кристаллов льда в растворе								
	замораживание по программе для лейкоцитов			замораживание в ручном режиме					
	замора-живание	стояние на воздухе	оттаи-вание	30 минут			12 минут		
				замора-живание	стояние на воздухе	оттаи-вание	замора-живание	стояние на воздухе	оттаи-вание
110	-	-	-	-	-	-	-	-	±
111	-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	-	-	-	-	-	-	-	-	±
116	-	-	±	-	-	+	-	-	+
117	-	-	-	-	-	±	-	-	+
118	-	-	-	-	-	-	-	±	-
119	-	-	-	-	-	±	±	±	-
120	-	-	-	-	+	+	-	+	±
121	-	-	-	-	-	±	-	-	-
122	-	-	-	-	+	+	-	±	+
123	-	-	-	-	-	+	-	-	+
124	-	-	-	-	-	±	-	±	-
125	-	-	-	-	+	+	-	-	-
126	-	-	-	-	-	-	-	-	-
127	-	-	-	-	-	±	-	-	-
128	-	-	-	-	-	-	-	-	-
129	-	-	-	-	+	+	-	-	-
130	-	-	-	-	+	+	-	±	±
131	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «+» - полная кристаллизация; «±» - частичная кристаллизация; «-» - отсутствие кристаллизации.

На основании полученных данных в очередном опыте по замораживанию эмбрионов сибирского осетра на стадии нейрулы сравнивались медленный (по программе для лейкоцитов) и быстрый (прямое погружение в жидкий азот)

режимы охлаждения с использованием в обоих случаях обесклеенных танином и не обесклеенных клеток (4 варианта опыта) и постадийной методики увеличения концентраций протекторов в витрификационной среде.

Вначале в каждом варианте опыта по 20 эмбрионов помещались на 5 минут при 20°C в водный раствор проназы с концентрацией 2 мг/мл. Затем проводилось их выдерживание последовательно по 2 минуты при 20°C в 2%-ном и 4%-ном растворах пропиленгликоля и по 1,5 минуты при 0°C в растворе, содержащем 6% пропиленгликоля, 4% этиленгликоля, 2% ацетамида, 4% метанола, и конечном растворе, содержащем 6% пропиленгликоля, 4% этиленгликоля, 3% ацетамида, 6% метанола, 20% сахарозы, 20% фруктозы, 10% поливинилпирролидона (среда № 132). Во всех растворах в качестве растворителя использовался раствор Рингера вышеописанного состава.

Непосредственно после этого клетки в последнем растворе объемом 10 мл помещались в криобирки объемом 15 мл, имеющие внутренний полиэтиленовый чехол. Затем проводилось их замораживание в соответствующем варианту опыта режиме, причем при медленном замораживании по программе лейкоцитов пробирки размещались горизонтально, а при быстром погружении в азот – вертикально. Размораживание во всех случаях происходило в водяной бане при 20°C в течение 1 минуты.

Результатом опыта было сохранение целостности оболочек всеми 20 эмбрионами в каждом из четырех вариантов. После отмывания от среды клетки, в которых при микроскопировании не наблюдалось внутренних повреждений, были оставлены в воде на чашках Петри. Через 3 суток у необесклеенных клеток лопнули оболочки, обесклеенные оставались без изменений 4 суток, развития не происходило. Безусловно, положительную роль в сохранении целостности всех клеток сыграло использование внутреннего полиэтиленового чехла в пробирках, что, возможно, способствовало созданию той обволакивающей среды, которой придавал большое значение в своем методе замораживания эмбрионов в растительном масле А.М. Тихомиров [Тихомиров, 2010, 2011] (предпринятая нами ранее попытка реализации этого метода для замораживания эмбрионов сибирского осетра не привела к успеху). Влияние температуры оттаивания пока остается неясным и требует дальнейшего исследования. Но опыт в очередной раз показал отсутствие действия проназы как таковой на клеточные оболочки, естественная прочность которых не позволила выявить различия во влиянии режима витрификации на сохранность эмбрионов.

С учетом полученных данных в последующем опыте по замораживанию эмбрионов карпа на стадии нейрулы испытывались два способа предполагаемой порации оболочки: 1) с помощью проназы, действие которой активировалось добавлением аминокислоты серина и 2) с помощью раствора хлорида калия с концентрацией иона K^+ меньшей, чем внутриклеточная, для открытия калиевых каналов в мембранах. Опыт включал испытания двух сред с каждым из этих способов (т. е. состоял из 4 вариантов) с постепенным увеличением концентраций проникающих протекторов. Во всех растворах в качестве

растворителя использовался упоминаемый ранее раствор Рингера [Keivanloo, Sudagar, 2016].

В каждом варианте опыта замораживание 30 эмбрионов осуществлялось в пробирках объемом 15 мл с внутренним полиэтиленовым чехлом вертикальным погружением в жидкий азот на 1,5 минуты, размораживание – в водяной бане при 25°C в течение 1 минуты. После отмывания от среды неповрежденные клетки оставались в воде на чашках Петри.

К каждому варианту опыта был поставлен контроль, в котором 30 эмбрионов подвергались тем же процедурам, кроме замораживания. Помимо этого, осуществлялось сравнение и опытных, и контрольных клеток с интактным контролем (не подвергнутым никаким процедурам).

В первом варианте опыта эмбрионы вначале помещались на 5 минут при 20°C в водный раствор проназы с концентрацией 2 мг/мл, в который непосредственно перед использованием был добавлен серин в такой же концентрации. Затем проводилась эквilibрация последовательно по 2 минуты при 20°C в 2%-ном и 4%-ном растворах пропиленгликоля и по 1,5 минуты при 0°C в растворе, содержащем 6% пропиленгликоля, 2% ДМСО, 3% этиленгликоля, 2% ацетамида, и конечном растворе, содержащем 6% пропиленгликоля, 5% ДМСО, 6% этиленгликоля, 3% ацетамида, 20% сахарозы, 20% фруктозы, 10% поливинилпирролидона (среда № 133). В последнем растворе объемом 10 мл клетки замораживались.

Во втором варианте опыта после аналогичного выдерживания в растворе проназы и серина проводилась эквilibрация по 2 минуты при 20°C в 10%-ном и 20%-ном растворах пропиленгликоля и по 1,5 минуты при 0°C в 30%-ном растворе пропиленгликоля и конечном растворе, содержащем 40% пропиленгликоля, 10% сахарозы, 10% фруктозы, 10% поливинилпирролидона (среда № 134), затем – замораживание.

В третьем и четвертом вариантах опыта эмбрионы вначале помещались на 2 минуты при 20°C в водный раствор хлорида калия с концентрацией 2,5 мг/мл. Последующая эквilibрация осуществлялась соответственно так, как в первом и втором вариантах. Результаты опыта представлены в таблице 5.

Анализ полученных результатов и проведенные в ходе эксперимента наблюдения позволяют сделать вывод о частичном повреждении внешних оболочек всех клеток, подвергнутых действию активированной серином проназы. В первом и втором вариантах опыта оставшиеся после замораживания и оттаивания внешне целые и ровные оболочки сохранялись недолго и на 2-е сутки распались. В контролях на 2-е сутки начался выклев, раньше, чем в интактном контроле.

Воздействие раствора хлорида калия, по-видимому, не привело к ожидаемому повышению проницаемости мембраны для протекторов, а скорее за счет поступления воды снизило внутриклеточное осмотическое давление и способствовало повреждению эмбрионов во время замораживания и оттаивания, т. к. в третьем и четвертом вариантах опыта на 2-е сутки целые, но

явно мертвые клетки имели непрозрачные оболочки, и в них был виден мутный эмбрион.

Таблица 5 – Сравнение способов порации оболочки и протективного действия витрификационных сред на эмбрионы карпа в стадии нейрулы

№ среды	Количество клеток с целыми оболочками в 1-е сутки		Количество живых эмбрионов в контроле на 2-е сутки	Количество личинок в контроле на 6-е сутки
	опыт	контроль		
1-й способ (воздействие проназой и серином)				
133	24	27	24, начался выклев	22, 2 уродливых
134	18	24	13, начался выклев	11
2-й способ (воздействие раствором хлорида калия)				
133	25	29	28, нет выклева	25, 1 уродливых
134	23	29	22, нет выклева	22

Сравнение действия двух витрификационных сред как в опытных вариантах, так и в контролях показало нецелесообразность использования в них высоких (40%) концентраций проникающих протекторов. В первом и втором вариантах опыта клетки, сохранившиеся после замораживания и оттаивания, даже внешне сильно отличались друг от друга: если в первом варианте (со средой № 133) они были нормального размера, светло-желтые, то во втором варианте (со средой № 134) – более крупные и белые, что, вероятно, было следствием проникновения через порированные оболочки большого количества пропиленгликоля, однако это не способствовало выживанию, эмбрион в них был поврежден. Среда № 133 обеспечила также более высокую выживаемость клеток в контролях по сравнению со средой № 134, но, видимо, содержала токсичный для эмбрионов карпа компонент, повлиявший на появление уродства у личинок.

На основании проведенного исследования витрификационных свойств различных растворов криопротекторов, а также пробных опытов по замораживанию эмбрионов сибирского осетра и карпа на разных стадиях развития были определены следующие подходы к дальнейшей разработке методов криоконсервации эмбрионов рыб.

1. Режимы замораживания

Испытания 134 растворов разного состава и разных концентраций, проникающих и непроникающих криопротекторов с целью поиска сред для криоконсервации яйцеклеток и эмбрионов показали, что при сверхвысокой скорости охлаждения раствора (прямо погружении в жидкий азот) возможна лишь кратковременная витрификация, сохраняющаяся в течение 1-1,5 минут. Дальнейшее выдерживание растворов в жидком азоте неизбежно приводило либо к частичной, либо к полной кристаллизации. Идеальная витрификация наблюдалась при медленном замораживании растворов в программируемом замораживателе Biofreeze BV45 по стандартной программе замораживания лейкоцитов или в ручном режиме регулирования скорости охлаждения. Сравнение быстрого и медленного режимов охлаждения в одном из опытов по

замораживанию эмбрионов сибирского осетра не показало различия в их влиянии на сохранение целостности клеточных оболочек после замораживания и оттаивания. Но жизнеспособность была утрачена клетками в обоих случаях. Представляется целесообразным дальнейшее исследование способов достижения витрификации и сравнение упомянутых режимов в других условиях (с другими средами и другими технологическими приемами).

2. Составы и токсичность витрификационных сред

Испытания множества различных комбинаций, проникающих и непроникающих криопротекторов в растворах показали, что для достижения витрификации общая концентрация растворенных веществ в них должна составлять около 70%, причем концентрация проникающих протекторов не должна превышать 40%. Пробные опыты по замораживанию эмбрионов, однако, выявили нежелательность увеличения концентраций проникающих протекторов, способных оказывать токсическое действие на зародыши, выше 20%. При этом рациональным является использование многокомпонентных растворов, содержащих несколько проникающих протекторов, с целью снижения концентраций индивидуальных токсикантов. Опытами подтверждена также выявленная иранскими исследователями [Keivanloo, Sudagar, 2016] предпочтительность постепенного увеличения концентраций проникающих протекторов в витрификационных средах с целью предотвращения осмотического стресса для клеток.

Испытания ряда сред на контрольной партии эмбрионов сибирского осетра (без замораживания и без предварительного воздействия на оболочки клеток для их порации) не выявили токсического эффекта тех растворов, в которых общая концентрация проникающих протекторов была в пределах 20-40%. Заметное снижение выживаемости клеток и выклева происходило лишь при воздействии на них очень высоких (60%) концентраций этих веществ. Однако на контрольной партии эмбрионов карпа с порированными внешними оболочками была явно продемонстрирована необходимость ограничения концентрации проникающих протекторов до 20%.

При условии этого ограничения необходимая для витрификации высокая вязкость раствора должна обеспечиваться увеличением концентрации не проникающих протекторов, в основном сахаров, которые, кроме того, способны защищать мембраны клеток во время замораживания и оттаивания. Однако увеличение концентрации сахаров выше 40% также не способствовало успеху витрификации.

Значительное повышение витрификационных свойств растворов обеспечивало добавление в них веществ, способных активно связывать воду и препятствовать кристаллообразованию при охлаждении. Среди них наиболее эффективным было действие поливинилпирролидона в концентрации 10%.

Таким образом, было показано, что для достижения витрификации при охлаждении раствора он должен содержать 20% проникающих протекторов, 40% сахаров и 10% поливинилпирролидона. Среди проверенных проникающих протекторов лучшими витрифицирующими свойствами обладали метанол,

ДМСО, этиленгликоль и пропиленгликоль. Влияния растворителей и химической природы непроникающего протектора (сахара) на витрификационные свойства растворов обнаружено не было. Но природа всех компонентов раствора безусловно важна для обеспечения выживания клеток в ходе витрификации, что требует детального выяснения состава сред в дальнейших экспериментах по замораживанию яйцеклеток, эмбрионов и предличинок рыб.

3. Проницаемость мембран клеток

Общепризнано, что главной трудностью на пути к успеху криоконсервации яйцеклеток и эмбрионов рыб является практическая непроницаемость внешней и внутренних мембран клеток для криопротекторов. Попытки обеспечить проникновение протекторов через мембраны в пробных опытах по замораживанию эмбрионов сибирского осетра путем предварительной обработки клеток в растворах поверхностно-активного вещества тритон (согласно рекомендациям германского патента [Lahnsteiner, Glienke, 2006]) или фермента проназы (как описано иранскими исследователями [Keivanloo, Sudagar, 2016]) не привели к успеху. Но предпринятая в последнем опыте по замораживанию эмбрионов карпа активация проназы серином показала возможность нарушения целостности оболочки. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения возможности порации мембран и уточнения деталей этого процесса (концентраций проназы и активатора, времени воздействия и т.д.).

4. Режимы оттаивания

В исследовании витрификации множества растворов разного состава и разной концентрации было обнаружено, что образование кристаллов льда чаще происходило при оттаивании, чем при замораживании растворов. Поэтому в криоконсервации эмбрионов оттаивание может оказаться наиболее чувствительной и опасной для клеток стадией, что потребует тщательного подбора температуры и времени размораживания. В проведенных пробных опытах по замораживанию эмбрионов пока не удалось выявить различия во влиянии на сохранность клеток температур оттаивания в диапазоне от 20 до 50°C, хотя более предпочтительным представляется использование температуры 50°C, т. к. при этом быстрее происходит исчезновение кристаллов льда, представляющих главную среди других факторов опасность для эмбрионов.

5. Стадия развития эмбрионов

В результате наблюдений за опытными и контрольными партиями клеток в одном из проведенных экспериментов было отмечено, что эмбрионы сибирского осетра на стадии органогенеза в сравнении со стадией нейруляции оказались менее устойчивыми как к замораживанию, так и к токсическому действию растворов криопротекторов. Однако для тщательного выбора подходящей стадии развития эмбрионов данного вида рыб в дальнейшем исследовании необходимо сравнение результатов опытов, проведенных в одинаковых условиях с эмбрионами в разное время инкубации.

6. *Некоторые технологические приемы*

Проведенные пробные опыты показали целесообразность при замораживании вертикального погружения пробирок с эмбрионами в жидкий азот, что позволяет минимизировать площадь поверхности витрификационной среды, на которой неизбежно происходит частичная кристаллизация раствора либо при замораживании, либо при оттаивании, и соответственно снизить риск повреждения клеток. Безусловно, важный вклад в обеспечение сохранности клеток в ходе криоконсервации вносит использование внутреннего полиэтиленового чехла в пробирках, роль которого еще предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного анализа опубликованных сведений в области криоконсервации яйцеклеток, эмбрионов, предличинок рыб и водных беспозвоночных выявлена наиболее перспективная возможность глубокого замораживания данных клеток способом витрификации в защитной среде.

В результате выполненного исследования витрификационных свойств различных растворов криопротекторов и пробных опытов по замораживанию эмбрионов сибирского осетра и карпа показаны возможность порации мембран клеток, пути достижения витрификации, возможные режимы замораживания и оттаивания, составы витрификационных сред и концентрации проникающих и непроникающих протекторов в них, некоторые другие технологические приемы, позволившие определить подходы к дальнейшей разработке методов криоконсервации эмбрионов рыб.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Гахова Э.Н., Чекурова Н.Р., Манохина М.С. Низкотемпературная консервация геномов водных беспозвоночных: успехи, проблемы, перспективы // Материалы XIV рабочего совещания «Консервация генетических ресурсов» (Пушино, 28-30 мая 1996). – 1996. – С. 114-117.

Докина О.Б., Ковалев К.В., Пронина Н.Д., Миленко В.А. Эффективные технологии криоконсервации спермы карповых и осетровых рыб // Материалы Всероссийской науч.-практ. конф. с межд. участием «Новейшие генетические технологии для аквакультуры» (Москва, МВЦ «Крокус Экспо», 29-31 января 2020 г). – М.: «Перо», 2020. – С. 119-134.

Докина О.Б., Ковалев К.В., Пронина Н.Д., Миленко В.А., Коваленко В.Н. Оптимизированные технологии крупномасштабной криоконсервации спермы карповых рыб // Рыбное хозяйство. – 2022. – № 6. – С. 58-66.

Манохина М.С. Низкотемпературная консервация яйцеклеток и эмбрионов морских моллюсков // Материалы XIV рабочего совещания «Консервация генетических ресурсов» (Пушино, 28-30 мая 1996). – 1996. – С. 117-119.

Манохина М.С., Ананьев В.И., Какпаков В.Т. Способ криоконсервации эмбрионов *Brachydanio rerio* // Труды I межд. симпозиума «Генетический

криобанк для аквакультуры редких и исчезающих видов рыб и других гидробионтов, Пущино, 20-23 ноября 2000. – Решение симпозиума, 2000. – 12 с.

Манохина М.С., Ананьев В.И., Каменцев В.Н., Колтовой Н.А. Глубокое замораживание эмбрионов данио и карпа: изучение причин плохой воспроизводимости результатов экспериментов // Материалы межд. конф. «Сохранение генетических ресурсов» (С-Пб, 19-22 октября 2004). – Цитология. – 2004. – Т.46. – № 9. – С. 819-820.

Манохина М.С., Ананьев В.И. Криоконсервация эмбрионов и личинок гидробионтов. Проблемы и перспективы // Биофизика живой клетки. – 2008. – Т. 9. – С. 88-89.

Тихомиров А.М. Способ криоконсервации яйцеклеток осетровых рыб: патент РФ. - №2460284 (54). - 2010.

Тихомиров А.М. К вопросу о криоконсервации яйцеклеток рыб // Материалы межд. конф. «Актуальные проблемы обеспечения продовольственной безопасности юга России: инновационные технологии для сохранения биоресурсов, плодородия почв, мелиорации и водообеспечения». – Ростов-на-Дону, 2011 – С. 117-120.

Тихомиров А.М., Пономарева Е.Н., Красильникова А.А. Использование жиров растительного и животного происхождения при глубокой заморозке яйцеклеток рыб // Доклады межд. науч.-практ. конф. «Сельскохозяйственное рыбоводство: возможности развития и научное обеспечение инновационных технологий» (Ногинск, 5-7 сентября 2012). – Ногинск, 2012. – С. 284-288.

Тихомиров А.М., Пономарева Е.Н., Красильникова А.А. Возможности использования эфирных масел в качестве протекторов «обволакивающего» действия при криоконсервации яйцеклеток рыб // Использование жиров растительного и животного происхождения при глубокой заморозке яйцеклеток рыб // Доклады межд. науч.-практ. конф. «Сельскохозяйственное рыбоводство: возможности развития и научное обеспечение инновационных технологий» (Ногинск, 5-7 сентября 2012). – Ногинск, 2012. – С. 292-296.

Фирсова А.В. Низкотемпературное консервирование яйцеклеток и эмбрионов рыб // Сборник материалов III нац. науч.-практ. конф. / Состояние и пути развития аквакультуры в Российской Федерации в свете импортозамещения и обеспечения продовольственной безопасности страны. – 2018. – С. 271-274.

Цветкова Л.И., Пронина Н.Д., Докина О.Б., Рекубретский А.В., Ковалев К.В., Парнышков В.А. Использование метода электропорации при криоконсервации эмбрионов рыб // Биофизика живой клетки. Консервация генетических ресурсов / Материалы международной конференции «Криоконсервация генетических ресурсов. Современное состояние, проблемы и перспективы» (Пущино, 28-30 октября 2014). – 2014. – Т.10. – С. 215-216.

Bart A. New approaches in cryopreservation of fish embryos // Cryopreservation in aquatic species / T.R. Tiersch and P.M. Mazik (eds). – World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 2000. – P. 123-129.

Bart A. et al. Ultrasound enhanced permeation of methanol into zebrafish, *Danio rerio*, embryos // *Aquaculture*. – 2010. – V. 303. – P. 71-76.

Chao N.H., Lin T.T., Chen Y.J., Hsu H.W., Liao I.C. Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam // *Aquaculture*. – 1997. – V.155. – P. 31-44.

Chao N.H., Liao I.C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos // *Aquaculture*. – 2001. – V.197. – P. 161-189.

Chen S.L., Tian Y.S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification // *Theriogenology*. – 2004. – V. 63. – P. 1207-1219.

Guan M., Rawson D.M., Zhang T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification // *CryoLetters*. – 2010. – V. 31 (3). – P. 230-238.

Hagedorn M., Hsu E.W., Pilatus U., Wildt D.E., RalW.F.I., Blackband S. Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartamental biological system // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1996. – V.93. – P. 7454-7459.

Hagedorn M., Hsu E., Kleinhans F.W., WildtD.E. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation // *Cryobiology*. – 1997. – V.34. – P. 335-347.

Hagedorn M., Lance S.L., Fonseca D.M., Kleinhans F.W. et al. Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step towards successful cryopreservation // *Biol. Reprod*. – 2002. – V.67. – P. 961-966.

Hagedorn M., Kleinhans F.W. Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos // *Cryopreservation in aquatic species, 2nd Edition* / T.R. Tiersch and C.C. Green (eds). - World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. – 2011. – P. 483-502.

Harvey B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebra fish *Brachydanio rerio* to -196°C // *Cryobiology*. – 1983. – V. 20. – P. 440-447.

Keivanloo S., Sudagar M. Cryopreservation of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) embryos by DMSO-based vitrificant solutions // *Theriogenology*. – 2016. – V. 85. – P. 1013-1018.

Lahnsteiner F., Glienke A. Gefrierkonservierung von Eiern und Embryonen von Fischen: DE 10 2004 030 285 A1. – 2006.

Pšenička, M., Saito, T., Rodina, M., Dzyuba, B., Cryopreservation of early stages of germ cells in sturgeon, comparison between whole tissue and dissociated cells freezing // *Cryobiology*. – 2016. – V. 72. – P. 119–122.

Rawson D.M., Zhang T., Kalicharan D., Jongebloed W.L. FE-SEM and TEM studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula stage embryo of the zebrafish (*Brachydanio rerio*): a consideration of the structural and functional relationship with respect to cryoprotectant penetration // *Aquaculture Res*. – 2000. – V. 31. – P. 325.

Rawson D.M., Zhang T. New approaches to the cryopreservation of fish oocytes and embryos // *The role of biotechnology* (Villa Gualino, Turin, Italy, 5-7 March 2005). – P. 209-210.

Robles V., Cabrita E., Acker J.P., Herraez M.P. Embryo cryopreservation: what we know until now // Methods in reproductive aquaculture marine and freshwater species. Boca Raton: CRC Press. – 2006. – P. 265-294.

Strussmann C.A., Nakatsugawa H., Takashima F., Hasobe M., Suzuki T., Takai R. Cryopreservation of isolated fish blastomeres: effects of cell stage, cryoprotectant concentration, and cooling rate on postthawing survival // Cryobiology. – 1999. – V. 39. – P. 252-261.

Zhang X.S., Zhao I., Hua T.C., Chen X.H., Zhu H.Y. A study on the cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) embryos // Cryo-Letters. – 1989. V 10. – P. 271-278.

Zhang T., Rawson D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos // Cryobiology. – 1995. – V.32. – 239-246.

Zhang T., Rawson D.M. Permeability of dechorionated one cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol // Cryobiology. – 1998. – V.37. – P. 13-21.

DEVELOPMENT OF APPROACHES TO CRYOPRESERVATION OF FISH EMBRYOS

O.B. Dokina, K.V. Kovalev, V.I. Anan'ev, V.A. Milenko, N.D. Pronina
Branch for the Freshwater Fisheries of VNIRO («VNIIPRKh»)
E-mail: olgadokina@mail.ru

Abstract. In order to determine approaches to the further development of methods for cryopreservation of fish embryos, a study of the vitrification properties of various cryoprotectant solutions was carried out and trial experiments were conducted on freezing embryos of Siberian sturgeon and carp. The possibility of poration of cell membranes, ways to achieve vitrification, possible modes of freezing and thawing, compositions of vitrification media and the concentration of penetrating and non-penetrating protectors in them, and some technological methods are shown.

Keywords: cryopreservation, cryoprotectant, vitrification, eggs, fish embryos.

КРИБАНК ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА РЫБ: МЕТОДЫ СБОРА КОЛЛЕКЦИИ ОБРАЗЦОВ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ ЦЕННЫХ ВИДОВ И ПОРОД РЫБ (НА ПРИМЕРЕ 2021 Г.)

К.В. Ковалев¹, О.Б. Докина¹, Н.Д. Пронина¹, В.А. Миленко¹, Д.А. Балашов¹,
Ю.А. Новосёлова¹, Е.П. Яковлева², Е.Г. Макарова², Н.В. Козлова²,
В.В. Барина²

¹*Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО»
(«ВНИИПРХ»)*

E-mail: silur5@mail.ru

²*Волжско-Каспийский филиал ФГБНУ «ВНИРО» («КаспНИРХ»)*

В филиале по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ») (Московская область, поселок Рыбное) создан самый крупный в Российской Федерации низкотемпературный генетический банк спермы и тканей рыб. Самые ранние криоконсервированные образцы спермы, хранящиеся в криобанке, датируются 1989 г. Целью работ лаборатории криобиологии является разработка и усовершенствование технологий криоконсервации и хранения в низкотемпературном банке спермы рыб (осетровых, карповых, лососевых) и сбор коллекции образцов криоконсервированной спермы. Пополнение коллекции криобанка происходит в ходе регулярно проводимых экспедиционных мероприятий. В 2021 г. генетическая коллекция криобанка была пополнена 72 образцами спермы ценных форм и пород рыб, из них 46 образцов спермы осетровых, 20 – лососевых и 13 – карповых видов рыб. Широкое использование криотехнологий будет способствовать продовольственной безопасности страны, восстановлению деградированных популяций, ускорению селекционных разработок, являться гарантией восстановления генетического разнообразия рыб после экологических катастроф.

Ключевые слова: криоконсервация, криобанк, биоразнообразие, осетровые, лососевые, карповые рыбы

ВВЕДЕНИЕ

В филиале по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ») (Московская область, поселок Рыбное) создан самый крупный в Российской Федерации низкотемпературный генетический банк спермы и тканей рыб. Первые работы по криоконсервации спермы рыб были начаты в 1988 году с участием учёных из Института проблем криобиологии и криомедицины (г. Харьков). Работы выполнялись при поддержке и участии межведомственной ихтиологической комиссии (МИК). Самые ранние

криоконсервированные образцы спермы, хранящиеся в криобанке, датируются 1989 г.

Основными задачами лаборатории криобиологии ВНИИПРХ в настоящее время являются:

- усовершенствование базовых и разработка новых методов криоконсервации спермы осетровых, карповых и лососевых рыб;
- сбор спермы ценных видов рыб для пополнения коллекции криобанка;
- разработка способов реализации сохраненной в сперматозоидах генетической информации с использованием методов молекулярной биологии и биологии развития;
- проведение исследований, направленных на решение проблемы криоконсервации эмбрионов, яйцеклеток и личинок рыб;
- проверка сохранности криоконсервированной спермы, заложенной на хранение;
- разработка методик оплодотворения промышленных партий икры криоконсервированной спермой.

Лабораторией криобиологии ВНИИПРХ разработаны эффективные технологии криоконсервации и хранения в низкотемпературном банке спермы рыб (осетровых, карповых, лососевых) [Цветкова и др., 2004; Докина и др., 2008, 2019, 2020, 2021, 2022], а также собрана коллекция образцов в самом крупном в Российской Федерации и одном из крупнейших в мире криобанке половых продуктов и тканей рыб [Ковалев и др., 2020]. Коллекция криобанка представлена 32 видами и 38 породами, среди которых имеются виды, занесенные в Красную книгу (белуга, калуга, сахалинский осетр, амурский осетр, шип, севрюга, амур черный, буффало черный, кета сахалинская, белорыбица). Особую ценность коллекции представляет криоконсервированная сперма осетровых рыб, состояние естественных популяций которых является катастрофическим. В криобанке находятся образцы, заложенные на хранение около 20 лет назад от самцов, выловленных в естественных водоёмах. Общий объем спермы, хранящейся в криобанке, составляет 28849,18 мл, в том числе: осетровых – 15751,65 мл от 697 самцов, лососевых – 2192,32 мл от 540 самцов, карповых – 10459,99 мл от 1029 самцов, сиговых – 401,97 мл от 322 самцов, кефалевых – 43,25 мл от 26 самцов.

Мониторинг сохранности криоконсервированных образцов в течение 30 лет показывает, что время хранения в криобанке не влияет на качество спермы [Цветкова и др., 2006; Kovalev et al., 2018]. Использование размороженной спермы позволяет достигать процента оплодотворения икры, сопоставимого с оплодотворением свежей спермой [Рекубратский, Ковалев, 2016; Докина и др., 2020]. Криоконсервированная сперма успешно применяется для осеменения промышленных объемов икры [Цветкова и др., 2006; Kovalev et al., 2019].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

При сборе коллекционных образцов сперма от каждого самца отцеживалась в отдельную ёмкость, передерживалась, если было необходимо, в

холодильнике и транспортировалась при температуре тающего льда в лабораторию криобиологии ВНИИПРХ для криоконсервации и закладки на хранение в криобанк. Из селекционно-племенного участка «Изобелино» РУП «Институт Рыбного хозяйства» Республики Беларусь сперму получали посредством курьерской доставки, образцы были доставлены авиатранспортом в изотермических контейнерах. Белорусские специалисты получали сперму непосредственно перед отправкой, отбирали образцы с подвижностью 100%, разливали в пластиковые пробирки до половины объёма и помещали в изотермический контейнер, перекладывая хладагентами и уплотнительными материалами. Посредством курьерской доставки также была получена сперма одного самца белуги с научно-экспериментального комплекса аквакультуры (НЭКА «БИОС») Волжско-Каспийского филиала ФГБНУ «ВНИРО». Сперму от самцов горбуши нечётных лет нереста получали в условиях Умбского рыбноводного завода (Мурманская область) в соответствии с действующими в данном хозяйстве нормативами.

Перед замораживанием оценивали качество нативной спермы, определяли её подвижность и, при наличии икры, ставили пробу для определения оплодотворяющей способности. Для замораживания спермы самцов рыб применялись видоспецифичные технологии криоконсервации, разработанные в лаборатории криобиологии ВНИИПРХ и усовершенствованные в последние пять лет [Докина и др., 2020]. При замораживании спермы самцов – реверсантов в технологии криоконсервации спермы лососевых рыб использовалась протективная среда, предложенная польскими криобиологами [Ciereszko et al., 2015]. После процедуры криоконсервации порцию спермы размораживали, и также оценивали по подвижности и оплодотворяющей способности. При этом в случае отсутствия нативной спермы данного самца и для исключения влияния некачественной икры на результаты проверки, использовали не абсолютный контроль, а контроль по икре (K_n – процент оплодотворения икры имеющейся нативной спермой), и подсчитывали процент оплодотворения относительно контроля по икре.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 2021 г. генетическая коллекция криобанка была пополнена 106 образцами спермы ценных форм и пород рыб, из них 46 образцов спермы осетровых, 54 – лососевых и 13 – карповых видов рыб. Образцы спермы осетровых рыб были получены из живой коллекции обособленного подразделения ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ») отдела «Конаковский», образцы спермы самцов белуги, севрюги, стерляди и амурского осетра отобраны на научно-экспериментальном комплексе аквакультуры Волжско-Каспийского филиала ФГБНУ «ВНИРО», образцы спермы сахалинского осетра доставлены из рыбноводного цеха ПО «Алексинский химический комбинат». Образцы спермы карпов КМ-1 собраны в опытном селекционно-племенном хозяйстве «Якоть» Филиала ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»). Из селекционно-племенного участка «Изобелино» РУП «Институт Рыбного

хозяйства» Республики Беларусь были доставлены образцы спермы карпов пород лахвинский чешуйчатый, изобелинский чешуйчатый, тремлянский зеркальный. Из Федерального селекционно-генетического центра рыбоводства были получены образцы спермы самцов форели с переопределённым полом. Образцы спермы камчатской микижи были получены в полевых условиях на р. Камчатка (таблица 1).

Таблица 1 – Образцы криоконсервированной спермы ценных видов и пород рыб, заложенные на хранение в криобанк ВНИИПРХ в 2021 г.

Вид, породная принадлежность рыб	Количество образцов, шт.	Объём спермы, мл
Осетр сибирский	3	79,5
Осетр русский	7	414,0
Осетр амурский	4	294,0
Осетр сахалинский	2	84,75
Белуга	7	951,25
Севрюга	6	358,5
Калуга	2	588,0
Стерлядь	15	341,25
Радужная форель - реверсant	11	22,51
Микижа	9	32,38
Горбуша	34	334,5
Карп КМ-1	6	62,25
Карп тремлянский зеркальный	3	18,75
Карп изобелинский чешуйчатый	2	16,5
Карп лахвинский чешуйчатый	2	9,75
Всего:	106	3607,89

В таблице 2 представлены характеристики (подвижность и оплодотворяющая способность) образцов спермы осетровых рыб, полученных в подразделении ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ») отделе «Конаковский». Криоконсервированы и заложены на долговременное хранение: 3 образца спермы сибирского осетра ленской популяции, 7 образцов русского осетра, 2 образца спермы амурского осетра, 4 образца спермы севрюги, 2 образца спермы калуги и 2 образца спермы белуги. Оплодотворяющая способность была определена для 20 образцов, и составила от 7,4 до 78,9%.

Таблица 2 – Характеристики образцов спермы осетровых рыб, собранных в отделе «Конаковский» и заложенных в криобанк ВНИИПРХ в 2021 г.

Вид рыб	Нативная сперма		Размороженная сперма	
	подвижность, %	оплодотворение, %	подвижность, %	оплодотворение, %
Осетр сибирский (ленская популяция)	80	35,3	30	52,4
	70	K _n -80,1	30	45,6
	60	K _n -80,1	15	31,3
Осетр русский	60	K _n - 80,1	20	20,7

Вид рыб	Нативная сперма		Размороженная сперма	
	подвижность, %	оплодотворение, %	подвижность, %	оплодотворение, %
	60	K _и - 80,1	15	12,8
	70	81,2	20	19,7
	80	K _и -82,0	20	78,9
	70	K _и -82,0	30	43,6
	70	73,7	-	50,0
	30	67,3	-	66,2
	90	K _и -81,6	40	62,1
Осетр амурский	80	K _и -81,6	30	61,9
Севрюга	80	85,9	20	21,1
	90	62,4	30	21,1
	70	56,9	50	16,2
	80	60,0	40	7,4
Калуга	80	K _и -80,1	20	69,6
	80	K _и -77,6	30	76,2
Белуга	70	K _и -80,1	10 – 15	41,7
	70	K _и -81,6	20 – 30	78,2

В таблице 3 представлены характеристики (подвижность и оплодотворяющая способность) образцов спермы осетровых рыб, собранных на НЭКА «БИОС» («КаспНИРХ», г. Астрахань) и криоконсервированных там же или после доставки в лабораторию криобиологии ВНИИПРХ. Все отобранные в НЭКА «БИОС» образцы спермы осетровых рыб подвергались молекулярно-генетическому анализу в лаборатории молекулярной генетики и физиологии «КаспНИРХ» и закладывались в коллекцию криобанка с результатами генотипирования, что позволит в дальнейшем быстро осуществлять подбор оптимального генетического материала и избегать близкородственных схем при оплодотворении икры. Криоконсервированы и заложены на долговременное хранение: 2 образца спермы амурского осетра, 2 образца спермы севрюги, 5 образцов спермы белуги и 15 образцов спермы стерляди. Оплодотворяющая способность была определена для 22 образцов, и составила от 0 до 67,2%.

Таблица 3 – Характеристика образцов спермы осетровых видов рыб, полученных из НЭКА «БИОС» и заложённых в криобанк в 2021 г.

Вид рыб	Нативная сперма		Размороженная сперма	
	подвижность, %	оплодотворение, %	подвижность, %	оплодотворение, %
Осетр амурский	90	K _и -74,4	20	0
	90	K _и -74,4	35	2,3
Севрюга	70	-	25	-
	90	-	40	-
Белуга	40	K _и -69,4	10	5,2
	100	K _и -97,7	-	56,5
	90	K _и -97,7	-	44,2
	100	K _и -61,4	35	5,2

Вид рыб	Нативная сперма		Размороженная сперма	
	подвижность, %	оплодотворение, %	подвижность, %	оплодотворение, %
	100	K _и -61,4	20	4,2
Стерлядь	90	K _и -74.4	35	36,4
	90	K _и -74.4	40	15,8
	85	K _и -74.4	20	25,5
	80	K _и -74.4	40	50,3
	90	K _и -74.4	40	53,8
	90	K _и -74.4	40	66,8
	90	K _и -74.4	35	67,2
	90	K _и -74.4	30	52,7
	90	K _и -74.4	35	46,5
	90	K _и -74.4	35	53,8
	100	K _и -74.4	25	64,4
	90	K _и -74.4	20	17,4
	90	K _и -74.4	20	48,9
	100	K _и -74.4	30	43,1
100	K _и -74.4	35	41,7	

В таблице 4 представлены характеристики (подвижность и оплодотворяющая способность) двух образцов спермы сахалинского осетра, полученных из рыбоводного цеха ПО «Алексинский химический комбинат» (Тульская область) и криоконсервированных после доставки в лабораторию криобиологии ВНИИПРХ. Время доставки спермы сахалинского осетра автотранспортом из Тульской области составило 10 часов.

Таблица 4 – Характеристики образцов спермы, собранных в ПО «Алексинский химический комбинат» Тульской области и заложённых в криобанк в 2021 г.

Вид рыб	Нативная сперма		Размороженная сперма	
	подвижность, %	оплодотворение, %	подвижность, %	оплодотворение, %
Осетр сахалинский	90	K _и -69,3	20	24,3
	90	K _и -69,3	25	24,7

В таблице 5 представлены характеристики нативной и криоконсервированной спермы пород карпа, собранной в ОСПХ «Якоть», а также полученной из селекционно-племенного участка «Изобелино» РУП «Институт Рыбного хозяйства» Республики Беларусь. В 2021 г. сперму карпов пород лахвинский чешуйчатый, тремлянский (линии зеркальная, чешуйчатая) из селекционно-племенного участка «Изобелино» РУП «Институт Рыбного хозяйства» Республики Беларусь транспортировали в течение 34 ч. Температура внутри изотермического контейнера при получении посылки была + 4°C. Образцы нативной спермы после транспортировки имели подвижность от 60 до 90%. Криоконсервированные образцы спермы белорусских карпов после оттаивания показали, в основном, приемлемые значения подвижности и

оплодотворяющей способности – от 14,8 до 31,9%. На абсолютные результаты оплодотворяющей способности криоконсервированных образцов повлияло качество используемой для проверки икры: так контроль оплодотворяющей способности по икре составил 51,4%. Помимо этого, криоконсервированы и заложены на длительное хранение 6 образцов спермы карпа КМ-1 из ОСПХ «Якоть». Оплодотворяющая способность составила от 29,1 до 80,6%, что в значительной степени определялось качеством используемой для проверки икры.

Таблица 5 – Характеристика образцов спермы карпов, заложенных в криобанк в 2021 г.

Вид, породная принадлежность рыб	Нативная сперма		Размороженная сперма	
	подвиж- ность, %	оплодотворе- ние, %	подвиж- ность, %	оплодотворе- ние, %
Карп КМ-1	90	91,9	20	80,6
	90	55,4	25	58,4
	90	46,3	20	41,0
	90	59,1	25	29,1
	90	45,5	30	39,2
	90	50,7	25	37,5
Карп тремлянский зеркальный	70	К _и -51,4	20	23,5
	70	К _и -51,4	20	14,8
	70	К _и -51,4	15	29,3
Карп тремлянский чешуйчатый	60	К _и -51,4	15	31,9
	90	К _и -51,4	20	30,1
Карп лахвинский чешуйчатый	80	К _и -51,4	20	29,2
	90	К _и -51,4	25	25,3

В таблице 6 представлены характеристики (объем и подвижность) спермы камчатской микижи. Образцы спермы камчатской микижи были собраны на р. Камчатка (п-ов Камчатка) и криоконсервированы в полевых условиях. Подвижность нативной спермы составляла от 0 до 60%. О фертильности данных образцов можно будет судить только после проверки оплодотворяющей способности.

Таблица 6 – Характеристики образцов спермы микижи, заложенных в криобанк в 2021 г.

Объем нативной спермы, мл	Подвижность нативной спермы, %	Количество пробирок, шт.
2,25	5	3
4	5	8
4	0	8
5,5	60	8
3	20	6
2,5	60	4

Объём нативной спермы, мл	Подвижность нативной спермы, %	Количество пробирок, шт.
2,5	60	6
3	20	4
5,5	50	9

В таблице 7 представлены характеристики (подвижность и оплодотворяющая способность) спермы самцов форели с переопределённым полом, полученных из Федерального селекционно-генетического центра рыбоводства. Нативная сперма была получена из иссечённых гонад после вскрытия самцов-реверсантов. Подвижность нативной спермы составляла от 40 до 70%, а размороженной – от 10 до 20%. Оплодотворяющая способность была определена для 6 образцов, и составила от 33,3 до 94,4%.

Таблица 7 – Характеристики образцов спермы, полученных от самцов-реверсантов радужной форели

Вид рыб	Нативная сперма		Размороженная сперма	
	подвижность, %	оплодотворение, %	подвижность, %	оплодотворение, %
Радужная форель – реверсant	60	95,6	15	33,3
	60-70	95,6	15	94,4
	60	95,6	15	45,6
	50-70	95,6	15	84,8
	60-70	92,2	15	54,7
	50-60	-	20	-
	40-60	-	15	-
Радужная форель – реверсant золотого окрашивания	60	-	10	-
	60	-	15	-
	70	К _и – 91,0	15	64,4
	60	-	15	-

В 2021 г. была проведена также криоконсервация индивидуальных образцов спермы от 34 самцов горбуши нечётных лет нереста на Умбском рыбноводном заводе (Мурманская область) общим объемом 334,5 мл для пополнения коллекции криобанка. Подвижность размороженной спермы в большинстве из проверенных образцов составляла от 5 до 15%, что соответствует принимаемой многими исследователями [Lahnsteiner et al., 1996; Babiak et al., 2002; Tekin et al., 2007; Dziewulska et al., 2011; Dziewulska, Domagala, 2013] норме (5-20%) для криоконсервированной спермы лососевых рыб.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование эффективных методик на различных этапах технологии криоконсервации позволяет получать после размораживания качественную сперму для целей воспроизводства и получения полноценного жизнестойкого потомства. Для достижения успешного результата (сохранения высокой

оплодотворяющей способности спермы) определяющее значение среди других факторов имеет протективная среда, представляющая собой раствор специфичных для данного вида рыб веществ, обеспечивающий при замораживании защиту клеток от повреждений, предотвращая их обезвоживание, денатурацию белков и внутриклеточную кристаллизацию воды. В лаборатории криобиологии разработаны и запатентованы криозащитные среды для спермы осетровых, карповых и лососевых рыб. Тем не менее, потребность в совершенствовании технологий криоконсервации и корректировке состава сред для усиления протективного действия остается актуальной в связи с непостоянством качества используемой нативной спермы.

Несмотря на то, что к настоящему времени методы криоконсервации спермы карповых и осетровых рыб достаточно хорошо разработаны, криоконсервированная сперма пока не имеет широкого применения в промышленном рыбоводстве. В настоящее время существует острая потребность в формировании страховых запасов спермы. От научных коллективов и промышленных хозяйств поступают заявки на предоставление спермы черного амура, белуги, калуги, веслоноса, буффало, сахалинского осетра. Кроме того, несмотря на неоднократные обсуждения на совещаниях, конференциях, симпозиумах, до сих пор не разработана единая система сертификации собранных образцов, не решены правовые и юридические вопросы, связанные со сбором, хранением, использованием и транспортировкой генетического материала.

Тем не менее, широкое использование криотехнологий будет способствовать продовольственной безопасности страны, восстановлению деградированных популяций, ускорению селекционных разработок, являться гарантией восстановления генетического разнообразия рыб после экологических катастроф.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Докина О.Б., Цветкова Л.И., Пронина Н.Д., Миленко В.А. Способ криоконсервирования спермы осетровых рыб: патент РФ. – № 2317703. – 2008.

Докина О.Б., Ковалев К.В., Пронина Н.Д., Миленко В.А. Защитная среда для криоконсервации спермы осетровых рыб: патент РФ. – № 2683682. – 2019.

Докина О.Б., Пронина Н.Д., Ковалев К.В., Миленко В.А., Цветкова Л.И. Усовершенствованная технология криоконсервации спермы карпа в крупномасштабном криобанке // Рыбное хозяйство. – 2019. – № 5. – С. 97-105.

Докина О.Б., Ковалев К.В., Пронина Н.Д., Миленко В.А. Эффективные технологии криоконсервации спермы карповых и осетровых рыб // Новейшие генетические технологии для аквакультуры / Мат-лы Всероссийской науч.-практ. конф. с межд. участием (Москва, МВЦ «Крокус Экспо», 29-31 января 2020 г.). – М.: «Перо», 2020. – С. 119-134.

Докина О.Б., Ковалев К.В., Пронина Н.Д., Миленко В.А., Новоселова Ю.А. Усовершенствованная криозащитная среда для низкотемпературной консервации спермы радужной форели // Сборник научных трудов /

Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры. – М.: «Перо», 2021. – Вып. 92. – С. 39-48.

Докина О.Б., Ковалев К.В., Пронина Н.Д., Миленко В.А., Коваленко В.Н. Оптимизированные технологии крупномасштабной криоконсервации спермы карповых рыб // Рыбное хозяйство. – 2022. – № 6. – С. 58-66.

Ковалев К.В., Докина О.Б., Пронина Н.Д., Миленко В.А. Об итогах и перспективах работы крупнейшего в России криобанка спермы рыб // Новейшие генетические технологии для аквакультуры: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Москва, МВЦ «Крокус Экспо», 29-31 января 2020 г.). – М.: Издательство «Перо», 2020. – С. 243-246.

Рекубратский А.В., Ковалев К.В. Способы восстановления генотипов редких видов рыб из криоконсервированных спермиев: получение потомства с высоким уровнем генетической изменчивости // Рыбное хозяйство. – 2016. – № 5. – С. 64-68.

Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д., Миленко В.А. Способ криоконсервирования спермы карповых рыб: патент РФ. – № 2241324. – 2004.

Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д., Миленко В.А. Перспектива использования криоконсервированной спермы рыб для нужд аквакультуры // Биофизика живой клетки. – 2006. – Т. 8. – С. 163-166.

Babiak I., Glogowski J., Dobosz S., Kuzminski H., Goryczko K. Semen from rainbow trout produced using cryopreserved spermatozoa is more suitable for cryopreservation // J.Fish Biol. – 2002. – V. 60. – P. 561-570.

Ciereszko A., Dietrich G.J., Nynca J. Semen from sex-reversed rainbow trout of spring strain can be successfully cryopreserved and used for fertilization of elevated number of eggs // Aquaculture. 2015. – V. 448. – P. 564-568.

Dziewulska K., Rzemieniecki A., Czerniawski R., Domagala J. Post-thawed motility and fertility from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) sperm frozen with four cryodiluent in straws or pellets // Theriogenology. – 2011. – V. 76. – P. 300-311.

Dziewulska K., Domagala J. Spermatozoa concentration influences cryopreservation success in sea trout (*Salmo trutta* m. *trutta* L.) // Theriogenology. – 2013. – V. 80. – P. 659-664.

Kovalev K.V., Pronina N.D., Dokina O.B., Milenko V.A. Opportunities of the largest fish sperm cryobank in Russia // Cryobiology. – 2018. – V. 85. – P. 176.

Kovalev K., Pronina N., Dokina O., Milenko V. Method for large-scale production of sturgeon embryos using cryopreserved sperm // 7th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, 3-6 sept. 2019, Rennes, France. – Book of abstracts, Rennes, 2019. – P. 124-125.

Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T., Patzner R. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation // J. Appl. Ichthyol. – 1996. – V. 12. – No 2. – P. 99-106.

Tekin N., Secer S., Akcay E., Bozkurt Y., Kayam S. Effects of glycerol additions on post-thaw fertility of frozen rainbow trout sperm, with an emphasis on

interaction between extender and cryoprotectant // J. Appl. Ichthyol. – 2007. – V. 23. – P. 60-63.

CRYOBANK OF FISH GENETIC MATERIAL: METHODS FOR COLLECTING A COLLECTION OF CRYOPRESERVED SPERM SAMPLES OF VALUABLE FISH SPECIES AND BREEDS (BASED ON THE EXAMPLE OF 2021)

K.V. Kovalev¹, O.B. Dokina¹, N.D. Pronina¹, V.A. Milenko¹, D.A. Balashov¹, J.A. Novoselova¹, E.P. Yakovleva², E.G. Makarova², N.V. Kozlova², V.V. Barinova²

¹ *Branch for the Freshwater Fisheries of VNIRO («VNIIPRKh»)*

E-mail: silur5@mail.ru

² *Volga-Caspian branch of "VNIRO" ("KaspNIRH")*

Abstract. The largest low-temperature genetic bank of fish sperm and tissue in the Russian Federation has been created in the Branch for Freshwater Fisheries of the Federal State Budgetary Institution "VNIRO" ("VNIIPRH") (Moscow region, Rybnoye village). The earliest cryopreserved sperm samples stored in a cryobank date back to 1989. The goal of the cryobiology laboratory is to develop and improve technologies for cryopreservation and storage of fish (sturgeon, carp, salmon) sperm in a low-temperature bank and to collect a collection of cryopreserved sperm samples. The cryobank collection is replenished during regularly scheduled expeditions. In 2021, the genetic collection of the cryobank was replenished with 72 sperm samples of valuable forms and breeds of fish, of which 46 sperm samples were from sturgeon, 20 from salmon and 13 from carp fish species. The widespread use of cryotechnologies will contribute to the country's food security, restoration of degraded populations, acceleration of breeding development, and guarantee the restoration of genetic diversity of fish after environmental disasters.

Keywords: cryopreservation, cryobank, biodiversity, sturgeon, salmon, carp.

АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРАЗИТОВ РЫБ

Н.Н. Романова, Н.А. Головина, П.П. Головин, А.А. Вишторская
Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО»
(«ВНИИПРХ»)
E-mail: lab.ihhiopat@mail.ru

Представлен алгоритм определение паразитов рыб, складывающийся из трех этапов: выявления паразита в нативных препаратах и определение до рода; фиксация и окраска паразита (приготовление тотальных препаратов); видовая идентификация. Целью данной работы являлось формирования банка данных (фотоматериала) наиболее часто выявляемых возбудителей инвазий для первичной идентификации до рода с помощью современной микроскопической техники. Применение компьютерных технологий позволяет сократить время постановки диагноза, что ускорит разработку профилактических и терапевтических мероприятий. Представленный в работе фотоматериал нативных препаратов поможет определить род паразита.

Ключевые слова: идентификация, компьютерные технологии, рыбы, паразиты.

ВВЕДЕНИЕ

Паразитами называют животных, которые живут за счет особей другого вида, будучи биологически и экологически тесно связаны с ними в своем жизненном цикле на большем или меньшем его протяжении. Организм, обеспечивающий паразита питанием и постоянным или временным местом обитания, является его хозяином [Догель, 1962]. Паразитические организмы встречаются почти во всех систематических группах животных и растений. Они подчиняются общим закономерностям живой природы и входят в состав экологических сообществ водоемов.

Важной чертой паразитизма является патогенность паразитов. При совместном сосуществовании паразиты и их хозяева находятся в антагонистических отношениях. В процессе эволюции выработалось некое равновесие, при котором вредное влияние паразита в той или иной мере нейтрализуется действием защитных сил организма хозяина, т.е. формируется конкурентное равновесие – система «паразит-хозяин». Такая форма взаимодействия паразита и хозяина называется паразитоносительством, находится в неустойчивом состоянии и в значительной мере зависит от организма хозяина и условий, способствующих проявлению патогенности паразита [Кенеди, 1978].

Паразитоносительство является одним из самых распространенных явлений в популяциях рыб в естественных водоемах. Факторами риска возникновения болезни является проявление патогенности паразита при

снижении иммунных механизмов хозяина, связанных с воздействием стресс-факторов и ухудшением условий обитания.

У рыб встречаются паразиты, относящиеся к простейшим (тип Protozoa), гельминтам (паразитические черви классов Monogenea, Trematoda, Cestoda, Acanthocephala, Annelida), ракообразным (класс Crustacea), личинкам двустворчатых моллюсков (класс Bivalvia) и кишечнополостные (*Polypodium hydriforme*).

В ихтиопаразитологии разработан метод полного паразитологического вскрытия, который позволяет выявить состав паразитов, что необходимо для объективной оценки эпизоотической ситуации в конкретном рыбноводном хозяйстве или водоеме. Этот метод был разработан В.А. Догелем, Э.М. Ляйманом, А.П. Маркевичем, позднее усовершенствован многими другими исследователями. Большую роль в определении паразитов до вида сыграли «Определители паразитов пресноводных рыб», в которых приведены ключи для определения видовой принадлежности паразитов пресноводных рыб [Определитель паразитов ..., 1984; 1985; 1987; Судариков и др., 2002; Судариков и др., 2006].

Сведения о различных группах паразитов, встречающихся у рыб, таксономическом составе и современной ревизии в систематике отражены в огромном числе работ [Lom, Дукова, 1992; Головина, Головин, 1997; Пугачев, 2003; Moravec, 2004; Соколов, 2006; Молодожникова, Жохов, 2007; Семенова, Иванов, Иванов, 2007; Евсеева, Барская, Лебедева, 2009; Чепурная, 2009; Абдуллаева, 2011; Гаврилов, Бурдакова, 2011; Иванов, Семенова, Калмыков, 2012; Вастьянова, 2013; Новак, Жаворонкова, Берестова, 2013; Румянцев, 2013; Жохов и др., 2014; Доровских, Степанов, 2015; Жаворонкова, 2015; Соколов и др., 2016; Перова, Пряничникова, Тютин, 2018; Жохов и др., 2019; Кудрявцева, 2020; Казарникова, 2021; Морозко, 2022; Плаксина, 2022 и др.].

Достаточно интенсивная и плодотворная работа ведется по планированию рационального ведения рыбного хозяйства и необходимости организации борьбы с болезнями рыб, регионализации территорий, с целью недопущения расширения ареала природных очагов инвазий и инфекций [Приказ Министерства сельского хозяйства ..., 2015].

Однако специалисты, имеющие дело с определением паразитов, сталкиваются со значительными специфическими трудностями при необходимости точного определения вида, а иногда и рода возбудителя.

В данной работе мы представляем алгоритм определения паразитов, который складывается из трех этапов:

- выявления паразита в нативных препаратах и определение до рода;
- фиксация и окраска паразита (приготовление тотальных препаратов);
- видовая идентификация.

Целью данной работы являлось формирование банка данных фотоматериала основных и наиболее часто выявляемых возбудителей инвазий для первичной идентификации их до рода.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В настоящей работе использовали классические методы паразитологического анализа рыб [Мусселиус и др., 1983; Быховская-Павловская, 1985; Головина и др., 2016 и др.]. Исследование проводили непосредственно на рыбоводном хозяйстве или водоемах, а также доставляли рыбу в живом виде в лабораторию. Для исследования применяли микроскопическую технику: биологические микроскопы с увеличением до 1000 раз и стереомикроскопы (бинокляры) увеличением до 400 раз.

Для осуществления видеосъемки и сохранения в электронной базе паразитов необходим микроскоп биологический с набором объективами на x10, x20, x40, x100 и видеокамерой с доступом к компьютеру (рисунок 1).

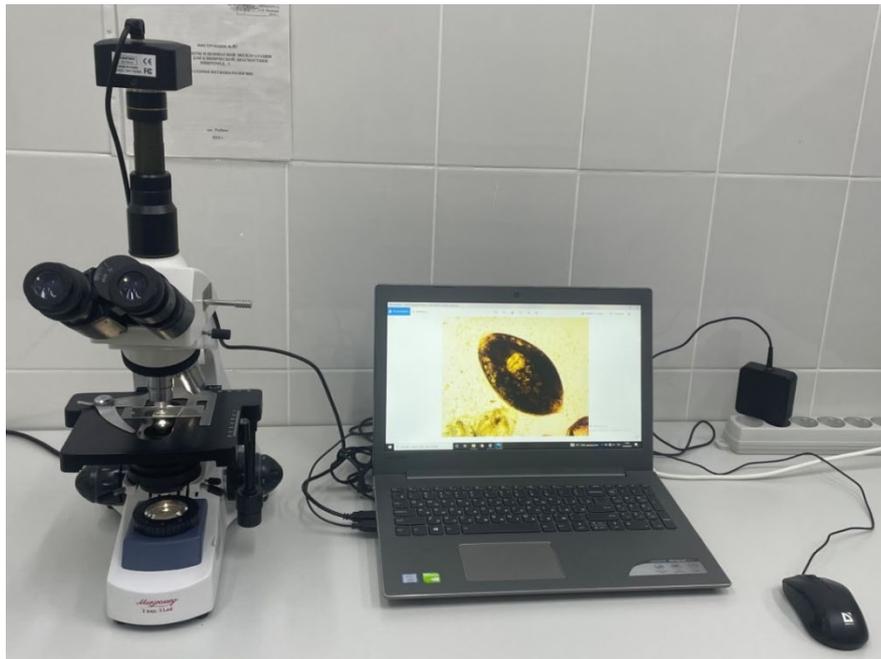


Рисунок 1 – Микроскоп с видеокамерой и выводом объекта на монитор компьютера

Классический метод проведения паразитологического анализа рыб заключается в определенной последовательности. Рыбу отбирают с клиническими признаками заболевания, если таковые имеются. Обследованию подвергают не менее чем 15 рыб каждого вида и возраста, личинок и мальков исследуют не менее 25 экз.

Отбор биологического материала проводят у только что обездвиженной рыбы, вынутой из воды. Особенно важно этот момент учитывать при просмотре соскобов слизи с поверхности тела и жабр, т.к. простейшие у погибшей рыбы очень быстро лизируются и обнаружить их присутствие в этом случае становится невозможным.

Тупой стороной скальпеля в направлении от головы к хвосту берется соскоб слизи на предметное стекло и разбавляется каплей воды. Соскоб накрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом. Здесь можно

обнаружить простейших (микро- и миксоспоридий, жгутиконосцев, инфузорий), моногеней, паразитических ракообразных.

Для исследования жабр ножницами удаляют жаберную крышку и вырезают каждую жаберную дугу отдельно. Помещают их на стекло и просматривают под биноклем, затем с каждой жаберной дуги делают соскоб на предметное стекло, добавляют каплю воды, покрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом для обнаружения более мелких паразитов. При мониторинговых работах и большой выборки рыб допустимо соскабливать ткань с двух жаберных дуг.

Затем проводят вскрытие брюшной полости, осматривая на наличие полостных паразитов и затем выделяя комплекс внутренних органов и проводя их визуальный осмотр на наличие цист. Почки и плавательный пузырь расположены тяжом вдоль позвоночника и чаще всего они остаются внутри рыбы, поэтому необходимо обратить внимание на возможные цисты, лежащие на плавательном пузыре и почках (посчитать их количество) и выделить для выявления паразита и его определения. Затем соскоблить все почечную ткань для компрессионного просмотра под микроскопом. Выделенный комплекс органов разделяют на желчный пузырь, печень, селезенку, плавательный пузырь, пищеварительный тракт, гонады.

Печень, селезенку, гонады просматривают компрессорно, т.е. продавливают на давящем стекле для исследования под микроскопом. Обнаруженных паразитов освобождают от ткани и переносят на предметное стекло в каплю физиологического раствора, прикрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом.

Плавательный пузырь прокалывают и делают соскобы со стенок на стекло, и затем просматривают на наличие паразитов, чаще всего в плавательном пузыре у карпа, сазана и карася встречается нематода *Philometroides lusiana*.

Желчный пузырь вскрывают в часовое стекло и просматривают под биноклем, затем содержимое переносят на предметное стекло, накрывают покровным и просматривают под большим увеличением микроскопа.

Кишечник вскрывают по всей длине, обращая внимание на наличие воспаленных участков, крупных кишечных гельминтов, видимых невооруженным взглядом. Пищевой комок убирают в отдельную чашку Петри и просматривают. Содержимое кишечника соскабливают на компрессорное стекло и просматривают под биноклем. Со стенок кишечника берутся соскобы для микроскопирования на обнаружение микро- и миксоспоридий, кокцидий, мелких гельминтов. Другим вариантом может быть проведение копрологического анализа: освобожденный от содержимого кишечник тщательно промывают в стакане с дистиллированной водой и оставляют отстаиваться. После осаждения на дно взвеси, верхний слой воды сливают, а осадок сливают в чашку Петри и просматривают под биноклем. В кишечнике могут быть мариты трематод, цестоды, нематоды и скребни. При обнаружении паразитов аккуратно отсасывают пастеровской пипеткой и

помещают на предметное стекло в каплю физиологического раствора, прикрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом для определения рода.

Глаза вырезают, помещают на компрессорное стекло, вскрывают, выделяя хрусталик и стекловидное тело и внутренние оболочки глазного яблока, просматривают отдельно под бинокляром.

После вскрытия черепной коробки вынимают головной мозг, помещают на компрессорное стекло и исследуют под микроскопом.

Исследование хрящей проводят с целью обнаружения микроспоридий. Черепные и межпозвоночные хрящи исследуют следующим методом: хрящи растирают в ступке и заливают водой, центрифугируют и надосадочную жидкость просматривают под микроскопом.

Для исследования мускулатуры сзади жаберных крышек делают поперечный разрез и с помощью ножниц и пинцета снимают кожу по всей длине тела. Сначала визуально осматривают подкожную клетчатку, отбирая несколько кусочков для микроскопирования. Затем проводят глубокие поперечные разрезы до позвоночника от головы до хвоста для выявления цист микроспоридий, личинок гельминтов.

При мониторинговых исследованиях применяют упрощенный способ определения интенсивности инвазии рыб метацеркариями трематод, предложенный В.В. Звягиной [Беэр, 2005]. Вырезают под спинным плавником (верхней участок средней трети спины) кусочек мышц 3-4 мм, измельчают в 3-4 каплях воды на компрессорном стекле, прикрывают стеклом чуть меньшего размера и просматривают под бинокляром. При обнаружении цист с метацеркариями трематод подсчитывают их количество и умножают на 10, т.к. в этом участке спинной мышцы сосредоточено 10% личинок от всего их количества в рыбе. Для идентификации паразита отбирают цисту на предметное стекло, освобождают от ткани и вскрывают с помощью двух препаровальных игл и высвобождают личинку для просмотра под микроскопом.

Род паразита можно определить в нативном препарате, но для определения вида паразита чаще всего необходимо изготовление постоянных (тотальных) препаратов. Методика приготовления постоянных препаратов подробно представлена в ряде руководств [Мусселиус и др., 1983; Быховская-Павловская, 1985; Головина и др., 2016; Головина и др., 2010 и др.]. Паразитов промывают, освобождая от ткани, сгустков слизи. С целью сохранения обнаруженных паразитов проводят их фиксацию. Для простейших используют жидкость Шаудина; для нематод, пиявок, ракообразных – жидкость Барбагалло; для трематод, цестод, пиявок, ракообразных – 70°-ый спирт, а также для ракообразных – 4%-ый формалин. Для сохранности моногеней, мелких нематод, микроспоридий их заключают после подсыхания на предметном стекле в глицерин-желатин.

Приготовление постоянных препаратов проводят по разным методикам. Жгутиконосцев и инфузорий окрашивают железным гематоксином или

применяют метод серебрения. Личинок и взрослых трематод окрашивают раствором квасцового кармина, затем окрашенных гельминтов промывают водой и заливают солянокислым спиртом, контролируя под биноклем степень дифференцировки органов по окраске, затем паразитов пропускают через спирты возрастающей крепости (70°, 80°, 90°- и 96°-ный) и, просветляя ксилолом, гвоздичным маслом или диметилфталатом, заливают в канадский бальзам. Приготовление постоянных препаратов из цестод, нематод и скребней осуществляют, как и при работе с трематодами, только при более крупных размерах увеличивают время окраски и просветления. Ракообразных просветляют в спирте с диметилфталатом или спирте с глицерином, переносят на предметное стекло в заранее нанесенную на него каплю глицерин-желатина или канадского бальзама и аккуратно, не слишком придавливая, покрывают покровным стеклом.

При идентификации паразитов необходимо учитывать, что живые паразиты в нативных препаратах и фиксированные в постоянных будут различаться в размерах. При фиксации паразит сокращается, и размеры его уменьшаются, приведенные размерные характеристики в Определителях паразитов соответствуют размерам фиксированных препаратов.

В ходе выполнения паразитологических исследований в лаборатории ихтиопатологии накоплен банк данных нативных препаратов паразитов, который может быть использован и дополнен другими специалистами.

Для определения паразитов до рода были подготовлены обобщающие таблицы с фотографиями паразитов из нативных препаратов и специфическими признаками, развивающимися при заражении рыб.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

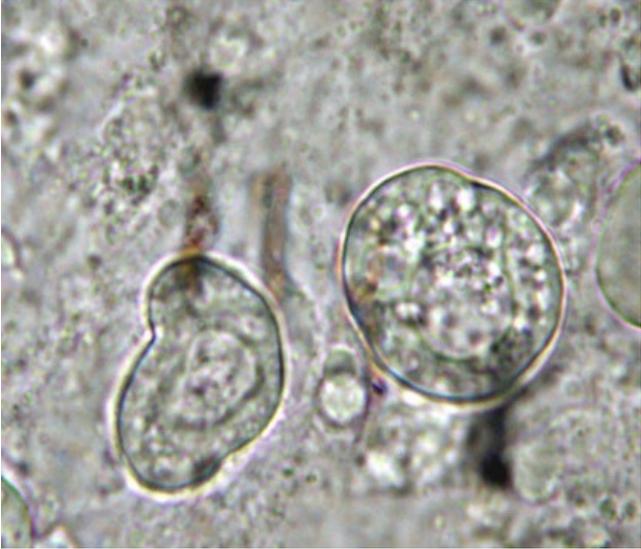
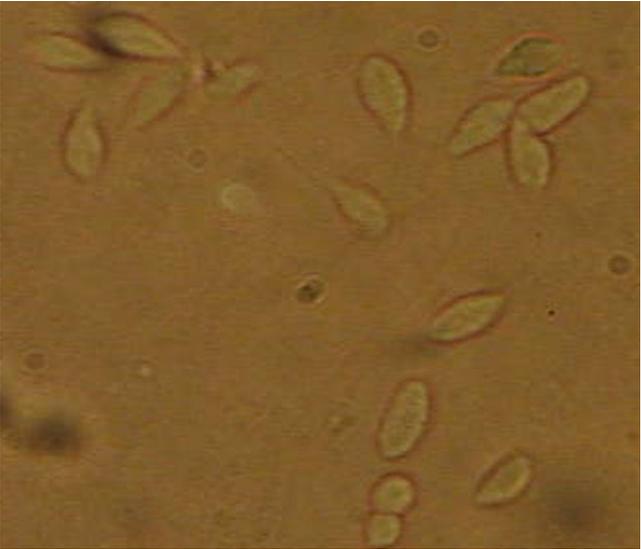
Определение паразитических простейших у рыб

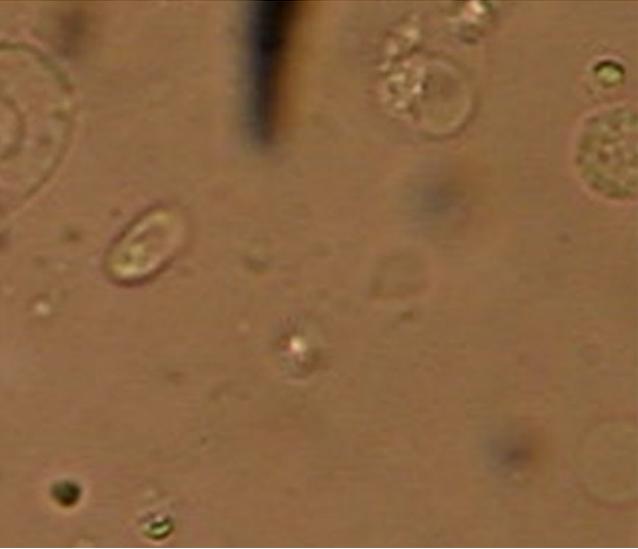
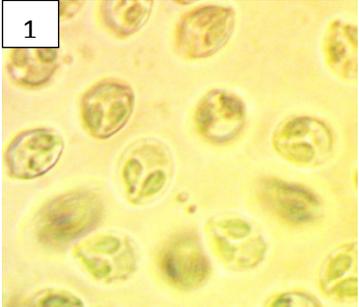
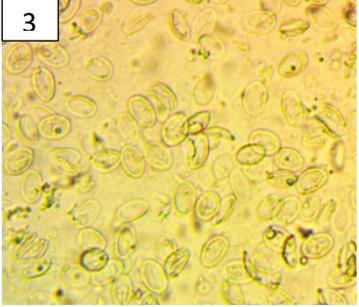
Простейшие, паразитирующие у пресноводных рыб, представлены следующими типами: *Sarcomastigophora* (саркомастигофоры), *Apicomplexa* (апикомплекса), *Mixozoa* (миксоспоридии), *Microspora* (микроспоридии), *Ciliophora* (ресничные инфузории).

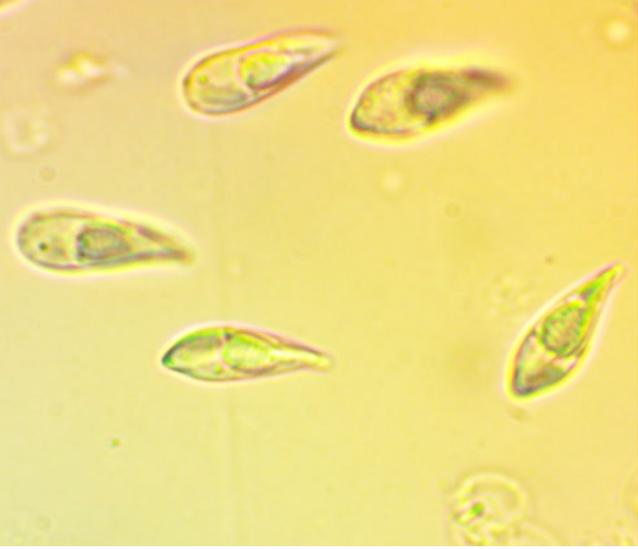
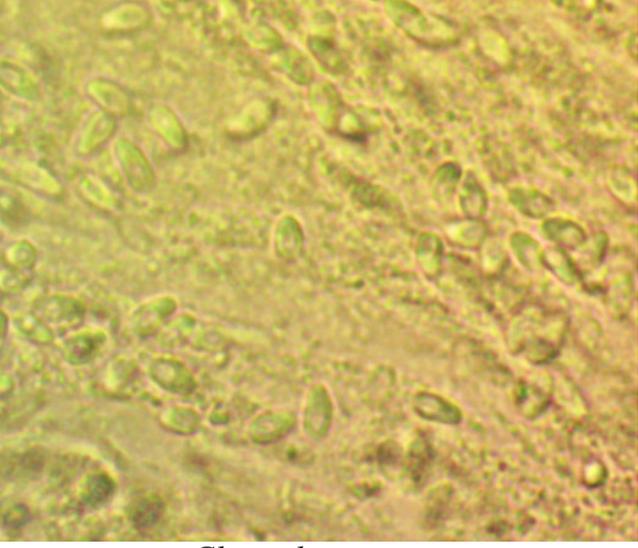
Простейшие могут быть экто- и эндопаразитами, то есть поселяться на внешней поверхности тела или поражать внутренние ткани и органы. Многие протозоозы протекают в ассоциации с бактериальной инфекцией, что приводит к массовой гибели рыб.

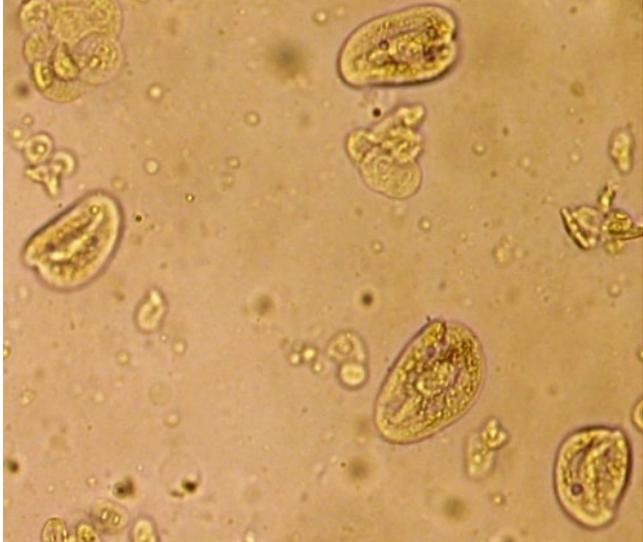
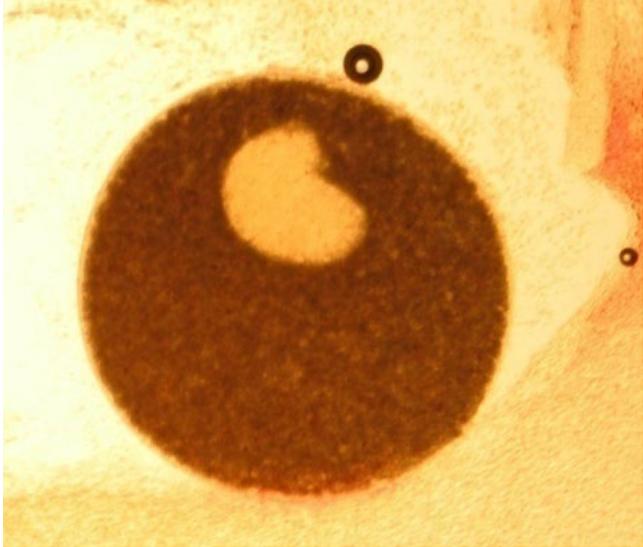
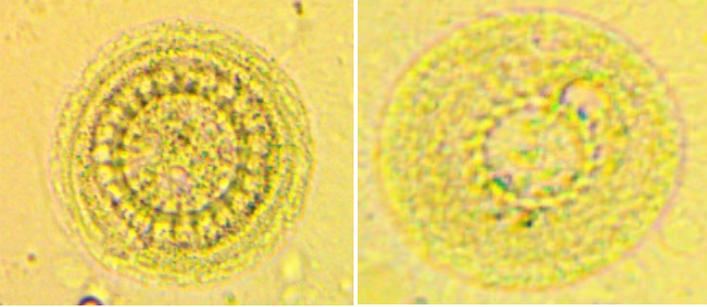
Часто встречающиеся паразитические простейшие приведены в таблице 1.

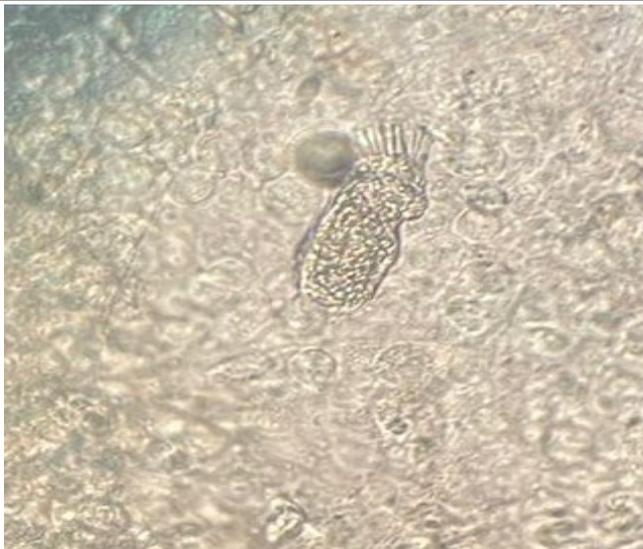
Таблица 1 – Паразитические простейшие у рыб

Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p data-bbox="437 938 603 972">род <i>Амеба</i></p>	<p data-bbox="906 286 1449 1081">Одноклеточные организмы, имеющие псевдоподии (ложноножки), клетка меняет свою форму. Амебы обычно прозрачны, похожи на тканевые клетки рыб. Для различия под микроскопом от других клеток необходимо осматривать одно поле зрения в течение не менее 15 минут, чтобы обнаружить амебу по изменению формы клетки. Если они находятся на умирающей рыбе, то начинают образовывать цисты, трудно отличимые от клеток органов рыб. Поэтому для исследования берут только живых или погибающих рыб. Амебы паразитируют на жабрах и в слизи на поверхности тела рыб. У зараженных рыб происходит изменение окраски, повышение ослизнения покровов тела, жабры бледные, жаберные лепестки слипшиеся.</p>
 <p data-bbox="395 1666 647 1700"><i>Hexamita salmonis</i></p>	<p data-bbox="906 1115 1449 1664">Мелкий паразит овальной формы, жгутиконосец. Имеет 4 пары жгутиков, при помощи которых передвигается: 3 пары расположены на переднем конце тела и одна пара – на заднем. Возле переднего конца находятся 2 продолговатых ядра. <i>Hexamita salmonis</i> локализуется в кишечнике и желчном пузыре у лососевых рыб. При заражении у рыб отмечают выделение слизистых тяжей из ануса, гиперемию слизистой кишечника, особенно в передней части, наполнение желчного пузыря желчью красноватого цвета.</p>

Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p data-bbox="276 768 767 801"><i>Ichthiobodo necator (Costia necatrix)</i></p>	<p data-bbox="903 264 1449 734">Мелкий паразит, жгутиконосец. Тело грушевидной формы, в центре расположено округлое ядро. На переднем конце тела находятся два довольно длинных жгутика. В нативных препаратах из слизи и жабр наблюдают специфическое движение <i>Ichthiobodo necator</i>. У зараженных рыб на боках туловища образуются пятна, сливающиеся в сплошной сероватый налёт, наблюдается разрушение плавников, жабры бледные, обильно ослизненные.</p>
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="164 808 523 1115">  <p data-bbox="180 819 196 842">1</p> </div> <div data-bbox="528 808 879 1115">  <p data-bbox="831 819 847 842">2</p> </div> </div> <div style="margin-top: 20px;">  <p data-bbox="180 1200 196 1223">3</p> </div> <div style="margin-top: 20px;"> <p data-bbox="560 1234 826 1328">1 – <i>Myxobolus sander</i> (с жабр судака;)</p> <p data-bbox="603 1350 783 1417">2 – <i>Myxobolus brahamae</i> (с жабр леща);</p> <p data-bbox="603 1507 783 1574">3 – <i>Myxobolus muscoli</i></p> </div>	<p data-bbox="903 808 1449 1574">Цисты миксоспоридий из р. <i>Myxobolus</i> молочно-белые неправильной, округлой, овальной или веретеновидной. В цистах обычно образуется большое число спор, которые имеют округлые, овальные, грушевидные формы. Почти у всех видов они имеют 2 полярные капсулы, створки лишены отростков. Встречаются у рыб как в виде вегетативных стадий, так и спор. При паразитировании в желчном и мочевом пузырях (полостной паразитизм) вегетативные стадии представлены подвижными многоядерными амeboидами. При паразитировании в тканях (тканевой паразитизм) – принимают вид овальных или округлых неподвижных образований, внешне напоминающих цисты.</p>

Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p data-bbox="359 761 686 833"><i>Henneguya oviperda</i> (из полости тела щуки)</p>	<p data-bbox="901 257 1449 772">Микроспоридии р. <i>Henneguya</i> встречаются в виде вегетативных форм – амебоид, имеющих эктоплазму, снабженную ворсинками (в икринках), или в виде желтоватых цист, окруженных капсулой из соединительной ткани хозяина (в тканях органов). Споры веретеновидной формы, приближающиеся к удлинено-овальным, слегка закругленные на переднем конце и сужены на заднем. От заднего конца створок отходит один или два отростка.</p>
 <p data-bbox="406 1411 630 1444"><i>p. Thelohanellus</i></p>	<p data-bbox="901 918 1449 1355">Цисты микроспоридий р. <i>Thelohanellus</i> имеют разные размеры и форму: встречаются как мелкие так и крупные; округлые и овальные, иногда узкие и длинные мечевидные. Цисты могут быть белого цвета с разной локализацией, а в лучах плавников встречаются попарные цисты черного или желтовато-оранжевого цвета. Споры яйцевидные или удлинено-грушевидные с одной полярной капсулой.</p>
 <p data-bbox="391 2004 646 2027"><i>Glugea luciopercae</i></p>	<p data-bbox="901 1579 1449 1904">Цисты микроспоридий р. <i>Glugea</i> встречаются с большими, часто лентовидной формы многоядерными плазмодиями. Споры удлинено-овальной формы, с большой задней вакуолью и полярной трубкой. Локализация – стенки кишечника, подкожная и межмышечная ткань, гонады.</p>

Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p data-bbox="422 743 619 772"><i>p. Chilodonella</i></p>	<p data-bbox="906 286 1449 683">Паразитические ресничные инфузории <i>p. Chilodonella</i> имеют тело сплющенное в дорсовентральном направлении. Выпуклая дорсальная сторона почти лишена ресничек, на вогнутой или плоской вентральной стороне 2 полосы соматокинет. Локализуются в слизи и на жабрах. На поверхности тела рыб образуется голубовато-серый налет, в большей степени выражен на головной части.</p>
 <p data-bbox="347 1330 694 1359"><i>Ichthyophthirius multifiliis</i></p>	<p data-bbox="906 817 1449 1326">Крупная ресничная инфузория. Тело круглое или овальное, слегка суженное спереди. Цилиатура хорошо выражена, реснички находящиеся на всей поверхности тела позволяют инфузории совершать круговые движения. Цитоплазма клетки темная, с большим количеством пищеварительных вакуолей, толстый колбасовидный макронуклеус находится посреди тела. <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> паразитирует под эпителием кожи и жабр рыб в виде крупинок «манки».</p>
 <p data-bbox="434 1713 609 1742"><i>p. Trichodina</i></p>	<p data-bbox="906 1366 1449 1758">Инфузории отнесенная к <i>p. Trichodina</i> имеют тело большей частью дисковидное или полусферическое, с расположенным внутри округлым опорным диском, состоящим из кольца хитиноидных крючьев различной величины и формы. Локализуются на коже и жабрах рыб. Тело рыб покрыто беловатой слизью, в тяжелых случаях слизь отделяется клочьями.</p>

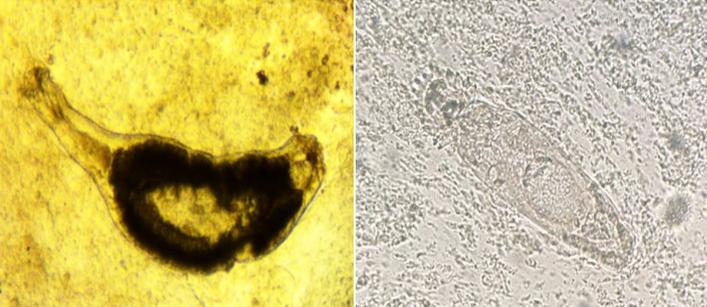
Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p data-bbox="438 840 598 873" style="text-align: center;"><i>p. Apiosoma</i></p>	<p data-bbox="901 197 1449 952">Сидящие инфузории <i>p. Apiosoma</i> в большинстве случаев одиночные формы, прикрепляющиеся к рыбе при помощи подошвы, отдельные виды способны давать стебли и даже образовывать колонии. Большинство апиозом имеет колоколовидную или бокаловидную форму, в последнем случае часто с хорошо выраженной ножкой. Бывают виды с грушевидным, бочечковидным, цилиндрическим телом и на переднем конце расположено ротовое отверстие – перистон, окруженное венчиком ресниц. Локализуют в слизи и на жабрах личинок и ранней молоди. Тело рыб покрыто беловатым налетом, слизеотделение увеличивается, отмечают покраснение кожного покрова, иногда и слабое ерошение чешуи.</p>
 <p data-bbox="367 1512 678 1579" style="text-align: center;"><i>Capriniana piscium</i> (=<i>Trichophria piscium</i>)</p>	<p data-bbox="901 1019 1449 1534">Сосущие инфузории <i>p. Capriniana</i> имеют овальное или вытянутое, грушевидное, изогнутое тело; внешний облик изменчив, но обычно один из концов тела меньше другого. Щупальцы примерно равной длины, утолщенные, несократительные, расположенные в одном или нескольких пучках. Локализуются на жабрах рыб, паразитирование приводит к деформации жаберной ткани, кровоизлияниям, изменению окраски, обширному некрозу жаберных лепестков.</p>

Определение гельминтов у рыб

Классификация гельминтов постоянно меняется. На данный момент гельминтов делят на четыре типа: Plathelminthes (Platyhelminthes, плоские черви), Nematelminthes (нематгельминты, устар. первичнополостные), Acanthocephales (скребни), Annelida (кольчатые черви). Среди них различают эктопаразитов и эндопаразитов.

Часто встречающиеся гельминты приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Гельминты рыб

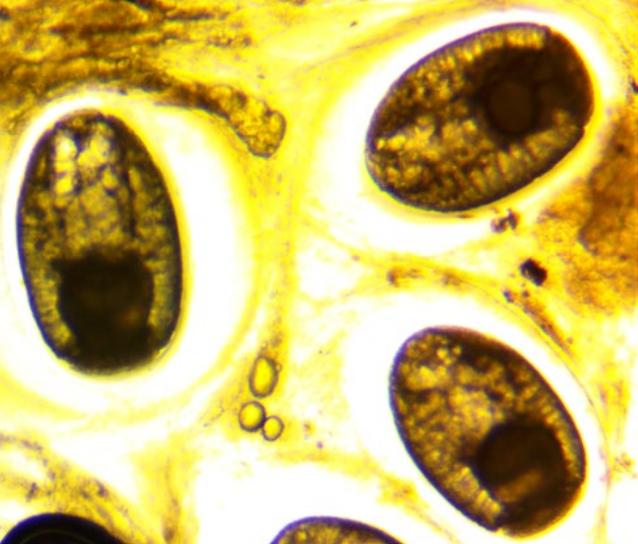
Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p data-bbox="411 831 635 898"><i>Dactylogyrus sp.</i> (с жабр плотвы)</p>	<p data-bbox="906 315 1449 864">Моногенеи – представители р. <i>Dactylogyrus</i> имеют прикрепительный аппарат с 14 краевыми крючьями, одной парой срединных крючьев, одной соединительной пластинкой, а иногда еще и одной дополнительной. С другой стороны тела имеются две пары глаз. Паразитируют на жабрах и реже в слизи на поверхности тела. При высоком заражении у рыб бледные жабры, иногда мозаичной окраски, обильно покрытые слизью, жаберный эпителий на концах лепестков разрушен, выросты и анастомозы между лепестками.</p>
 <p data-bbox="244 1330 448 1397"><i>p. Gyrodactylus</i> (с жабр карпа)</p> <p data-bbox="507 1330 874 1397"><i>p. Gyrodactylus</i> (с жабр радужной форели)</p>	<p data-bbox="906 920 1449 1496">Моногенеи – представители р. <i>Gyrodactylus</i>. имеют прикрепительный аппарат, состоящий из 16 краевых и 2 лишенных наружного отростка срединных крючьев, снабженных двумя соединительными пластинками. Локализуются на поверхности тела, плавниках и жабрах рыб. При инвазии тело рыб покрыто голубоватым налетом слизи, отмечается разрушение тканей кожи и плавников с образованием плоских язв и разрушение межлучевых участков плавников, неравномерная окраска жаберных лепестков, разрушение и некроз жаберной ткани.</p>

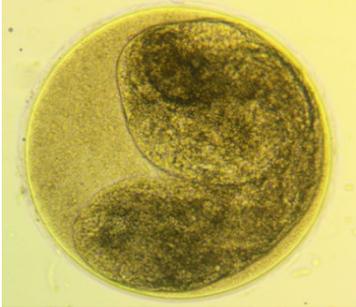
Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p data-bbox="308 842 735 913"><i>Dicybothrium armatum</i> головная часть (с жабр осетра)</p>	<p data-bbox="903 197 1445 922">Моногенея <i>Dicybothrium armatum</i> довольно крупные черви. Тело листовидное, вытянутое, на заднем конце располагается хорошо отграниченный от тела прикрепительный диск, несущий 3 пары прикрепительных клапанов, внутри которых расположены крупные крючки. На заднем конце прикрепительного диска имеется вырост, несущий 3 пары крупных и 1 пару очень мелких крючков. Паразитирует на жабрах осетровых рыб. При высоком заражении жабры истончаются, приобретают мраморную окраску, жаберные лепестки расслаиваются, имеют неровные края в виде бахромы со множественными кровоизлияниями и участками некротизированной ткани.</p>
 <p data-bbox="336 1565 707 1637">Моногенеи из р. <i>Diplozoon</i> (с жабр леща)</p>	<p data-bbox="903 972 1445 1590">Моногенеи из р. <i>Diplozoon</i> во взрослом состоянии представлены сросшими двумя особями крест-накрест. Тело подразделяется на переднюю часть и заднюю. Задняя часть тела отчетливо делится на три участка. Передний имеет на вентральной стороне немногочисленные складки, средний – чашевидной формы, задний несет прикрепительные клапаны и срединные крючья. Потенциально опасные моногенетические сосальщики, паразитирующие на жабрах различных видов рыб в естественных водоемах и прудовых хозяйствах.</p>

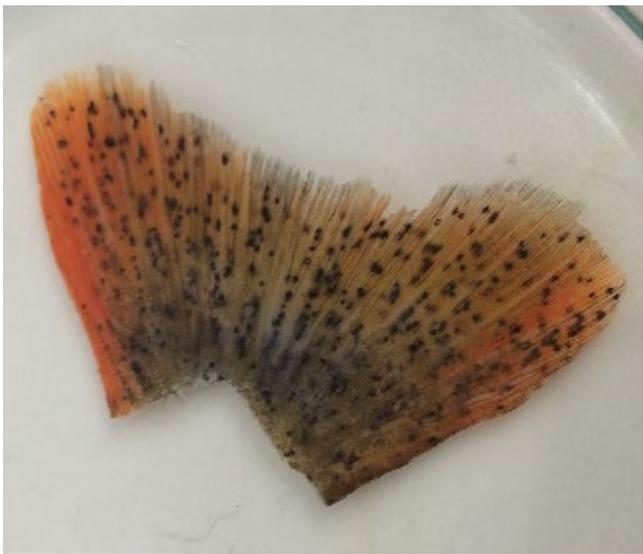
Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p data-bbox="300 741 746 772">Кишечник рыб с <i>Khawia sinensis</i></p>	<p data-bbox="906 264 1449 701">Цестоды р. <i>Khawia</i> относительно крупные черви, головной конец обычно расширен, четко выраженного шейного отдела нет, желточные фолликулы располагаются в кортикальном слое паренхимы. Гельминт паразитирует в кишечнике карпа, сазана и их гибридов. Вызывает воспаление стенок кишечника, при высокой интенсивности инвазии закупорка кишечника.</p>
 <p data-bbox="244 1323 802 1391"><i>Caryophyllaeus fimbriceps</i> головная часть (из кишечника леща)</p>	<p data-bbox="906 869 1449 1305">Цестоды р. <i>Caryophyllaeus</i> имеют головной конец с гладким или фестончатым передним краем. Передняя граница расположения семенников и желточных фолликулов проходит на некотором расстоянии от головного расширения или непосредственно за ним. Гельминты паразитируют в кишечнике карповых рыб. Вызывает воспаление слизистой оболочки кишечника, его закупорка, прободение его стенок.</p>

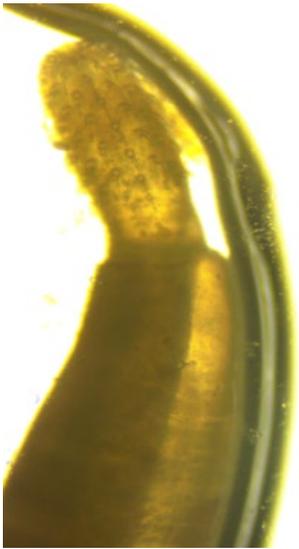
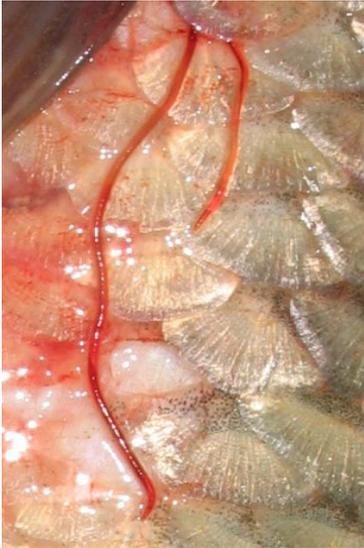
Паразит	Идентификация паразита и патогенез
<div data-bbox="343 338 699 647" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="256 656 788 723">плероцеркоид <i>Triaenophorus nodulosus</i> головная часть (из печени окуни)</p> <div data-bbox="343 763 699 1072" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="264 1077 775 1144">цестода <i>Triaenophorus crassus</i> головная часть (из кишечника щуки)</p>	<p>Цестоды из р. <i>Triaenophorus</i> паразитируют у рыб как на стадии плероцеркоидов, так и зрелых гельминтов. Определительным признаком является сколекс, вооруженный двумя парами трехзубцовых крючьев, расположенных на переднем конце. На поверхности стробилы может наблюдаться поперечная складчатость. Эпизоотическое значение имеют <i>T. nodulosus</i> и <i>T. crassus</i>. У <i>T. nodulosus</i> имеет 4 зубца в форме трезубца и тонкую базальную пластинку с сильно изогнутыми боковыми острями, а <i>T. crassus</i> – крючья имеют массивную базальную часть и небольшие прямые зубцы. Зараженные <i>T. nodulosus</i> рыбы имеют печень, в которой хорошо видны цисты паразита. Плероцеркоиды <i>T. crassus</i> локализуются в мускулатуре под кожей, образуя припухлости, внутри которых находятся плероцеркоиды. В кишечнике окончательного хозяина (щука) цестоды вызывают механические повреждения с мелкими кровоизлияниями, геморрагическим воспалением.</p>
<div data-bbox="347 1308 678 1839" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="284 1843 758 1910"><i>Bothriocephalus</i> sp. головная часть (из кишечника карася)</p>	<p>Цестоды из р. <i>Bothriocephalus</i> имеют сколекс удлинённый, прямоугольный, конический или сферический, с различно выраженным, обычно мускулистым теменным диском, не вооруженным крючьями. Ботрии продольно-овальные или щелевидные, различной глубины. Шейка отсутствует, расчленение тела начинается непосредственно за сколексом. Гельминты паразитируют в кишечнике у карповых рыб. Гельминты вызывают повреждение слизистой оболочки кишечника, очаговые кровоизлияния.</p>

Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p data-bbox="459 638 582 672"><i>p. Ligula</i></p>	<p data-bbox="906 212 1449 649">Плероцеркоиды ремнецов из р. <i>Ligula</i> (син. <i>Digramma</i>) имеют мускулистое, ремневидное, нерасчлененное тело. Вдоль всей поверхности червя с вентральной и дорсальной сторон проходит по 1 или 2 продольные борозды. Ремнецы паразитируют в полости тела многих пресноводных рыб, в т.ч. семейства карповых. Зараженная рыба всплывает на поверхность, брюшко ее обычно вздуто.</p>
 <p data-bbox="379 1048 670 1081">(из хрусталика ерша)</p>  <p data-bbox="311 1388 730 1422">(из стекловидного тела окуня)</p> <p data-bbox="411 1429 630 1462"><i>p. Diplostomum</i></p>	<p data-bbox="906 683 1449 1467">Метацеркарии (личинки) трематоды из р. <i>Diplostomum</i> в основном паразитирует в хрусталиках глаз и могут выявляться в стекловидном теле, между склерой и ретиной. Тело состоит из крупного плоского переднего сегмента и небольшого заднего, имеющего вид округлого придатка, более узкого, чем передний сегмент. Присоски хорошо развиты, орган Брандеса округлый с вертикальной или неправильной искривленной щелью. Псевдоприсоски хорошо выраженные. При поражении хрусталика формируется паразитарная катаракта, отмечают частичное или полное помутнение хрусталика, разрыв его капсулы, сужение зрачка до точечных размеров, деформация роговицы (кератоглобус), развитие панфталъма и микрофтальма.</p>
 <p data-bbox="347 1982 694 2016"><i>p. Tylodeiphys (T. clavata)</i></p> <p data-bbox="316 2016 726 2049">(из стекловидного тела леща)</p>	<p data-bbox="906 1512 1449 2027">Метацеркарии трематод <i>p. Tylodeiphys</i> подвижные, паразитируют в стекловидном теле глаз и головном мозге у различных видов рыб. Тело сильно вытянутое, узкое, с тупым передним и заостренным задним концом. Граница между сегментами плохо заметна. Вентральная впадина слабо выражена. Орган Брандеса овальный, с продольной вентральной щелью, далеко сдвинут к заднему концу тела. Уровень заражения рыб, особенно окуневых, может быть очень высоким.</p>

Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p data-bbox="300 745 743 808"><i>Postodiplostomum brevicaudatum</i> (из стекловидного тела окуня)</p>	<p data-bbox="906 248 1450 757"> Метацеркарии трематод <i>Postodiplostomum brevicaudatum</i> заключены в овальные цисты молочно-белого цвета. Орган Брандеса вытянут по длине оси тела. Длина задней части $\frac{1}{2}$-$\frac{1}{3}$ длины передней. Паразитируют в стекловидном теле и пигментном слое глаза, реже в головном мозге, главным образом окуня, судака, берша, некоторых карповых, щуки. Стекловидное тело мутнеет, становится молочно-белым, рыба слепнет. </p>
 <p data-bbox="344 1339 702 1406"><i>Postodiplostomum cuticola</i> (из кожи плотвы)</p>	<p data-bbox="906 866 1450 1375"> Метацеркарии трематод <i>Postodiplostomum cuticola</i> находятся в чечевицеобразной цисте (диаметром до 2 мм), окруженной черным пигментом. Тело личинки ложковидной формы, четко поделено на сегменты. Вентральная впадина хорошо выражена. На дне ее находится мало выступающий орган Брандеса с узкой или округло-вытянутой продольной щелью. Локализуются в коже и подкожной клетчатке, мускулатуре, мозге и на жабрах рыб. </p>
 <p data-bbox="355 1899 692 1933"><i>Ichthyocotylurus pileatus</i></p>	<p data-bbox="906 1417 1450 2063"> Метацеркарии сосальщиков из сем. Strigeidae. Наибольшее эпизоотическое значение имеет р. <i>Ichthyocotylurus</i>. Метацеркарии обнаруживаются в толстых (гиалиновых цистах) или тонких (непрочные, легко разрушающиеся) цистах. Стенки цисты имеют прочный гиалиновый слой – <i>I. erraticus</i>, стенки цисты, окруженные тонкой цистой: - если брюшная присоска заметно крупнее ротовой и длина тела превосходит его ширину в 1,7-1,9 раза – <i>I. platycephalus</i>; -разница в размерах присосок незначительная, длина тела превышает ширину менее чем в 1,6 раза: у <i>I. variegatus</i> в 1,2 раза, у <i>I.</i> </p>

Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p><i>Ichthyocotylurus platyocephalus</i> (с сердца судака)</p>  <p><i>p. Ichthyocotylurus erraticus</i> (с сердца леща)</p>	<p><i>pileatus</i> – в 1,4 раза.</p> <p>Заражению подвержены разные виды рыб различных возрастов в естественных водоемах и прудовых хозяйствах. На месте прикрепления паразита часто образуется воспаление и соединительнотканная капсула. Патогенное воздействие зависит от локализации паразита. Паразиты локализуются в полости тела: в области сердца, почек, стенках плавательного пузыря, на серозных покровах других органов. При сильном заражении рыба заметно худеет, снижается упитанность. Других внешних признаков не наблюдается.</p>
 <p>Циста с метацеркарием <i>Poraenogonimus ovatus</i> (в мышцах плотвы)</p>  <p><i>Poraenogonimus ovatus</i> (личинка, выделенная из цисты)</p>	<p>Метацеркарии <i>Poraenogonimus ovatus</i> паразиты мышц, реже других органов и тканей (жабр, мозга, печени, почек, гонад) многих видов рыб. Метацеркарии находятся в мелких шаровидных цистах с прочной гиалиновой оболочкой, не заполняя собой всю полость цисты. Интенсивность инвазии может достигать сотни паразитов на рыбу. Мясо пораженных рыб по биохимическим, микробиологическим показателям не отличается от мяса здоровых рыб, но по химическому составу ухудшается (больше влаги, меньше жира) [Косяев, Ксенофонтова, 2012].</p>

Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p data-bbox="199 795 842 869">Цисты с метацеркариями <i>Apophallus muehlingi</i> в лучах плавника</p>	<p data-bbox="901 190 1449 925">Цисты с метацеркариями <i>Apophallus muehlingi</i> расположены в лучах плавников, в коже, под чешуей у окуневых и карповых рыб. Личинка трематоды находится внутри мелкие шаровидных или овальных цист размером 0,20-0,29x0,14-0,26 мм. Вокруг цисты откладывается черный пигмент (при локализации в мышцах черный пигмент откладывается не всегда). Тело метацеркария внутри цисты свернуто в плотный клубок и просматривается темный экскреторный пузырь. При освобождении из цисты тело личинки сильно вытянутое. Передняя часть расширена и вооружена плотными рядами мелких шипиков. Небольшая брюшная присоска располагается по центру тела.</p>
 <p data-bbox="370 1473 671 1543"><i>Bunodera luciopercae</i> (из кишечника окуня)</p>	<p data-bbox="901 925 1449 1543"><i>Bunodera luciopercae</i> встречаются у рыб в кишечнике. Трематода с удлинённым телом, расширенным в области полового комплекса и суженным позади ротовой присоски. Ротовая и брюшная присоски равной величины. Брюшная присоска лежит в передней части тела. Часто можно встретить в полости матки скопление яиц и при приготовлении нативного препарата выброс яиц из полости трематоды. Эпизоотическое значение не ясно. Иногда они встречаются в больших количествах, но заметного влияния на слизистую кишечника не оказывают.</p>

Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p data-bbox="320 817 722 887"><i>p. Acanthocephalus</i> (<i>A. lussi</i> из кишечника окуня)</p>	<p data-bbox="906 197 1441 264">Половозрелые скребни <i>p. Acanthocephalus</i></p> <p data-bbox="906 271 1441 958">локализуются в кишечнике и пилорических придатках чаще всего у окуневых рыб. Тело и хоботок имеют цилиндрическую форму. Корни крючков обычно имеют боковые выросты, ганглий расположен у основания хоботкового влагалища. Цементных желез 6, они округлой или грушевидной формы. Видовым признаком является число продольных рядов крючьев и их количество в ряду на хоботке. У рыб на поврежденном участке кишечника воспаление, вокруг хоботка сильное разрастание соединительной ткани, стенка заметно утолщается, происходит отложение извести (петрификация), прободение стенок кишечника.</p>
 <p data-bbox="368 1534 675 1568"><i>Philometroides lusiana</i></p>	<p data-bbox="906 965 1441 1032">Самки нематоды <i>Philometroides lusiana</i> ярко-розового цвета</p> <p data-bbox="906 1039 1441 1583">локализуются в чешуйчатых кармашках. Тело самки покрыто многочисленными неравномерно разбросанными сосочками, ротовое отверстие окружено 4 папиллами, вся полость тела заполнена маткой, содержащей округлые яйца. Самцы значительно меньше самок, обнаружение их возможно в плавательном пузыре. На заднем конце тела самцов располагаются две спикулы и небольшой рулек. Филометроидоз широко распространенное заболевание карпа в прудовых и садковых хозяйствах.</p>

Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p data-bbox="368 745 675 808"><i>Camallanus sp.</i> (из кишечника окуня)</p>	<p data-bbox="903 264 1449 741">Нематоды из р. <i>Camallanus</i> имеет ротовую присоску с латеральными створками, ротовое отверстие щелевидное, трезубцы имеются или отсутствуют; спикулы почти равные. Паразитируют в кишечнике пресноводных рыб: окуневых, лососевых, сомовых, тресковых, карповых и других. Видовую идентификацию осуществляют на тотальных препаратах, видовыми признаками являются длина ротовой капсулы, трезубцов, пищевода.</p>
 <p data-bbox="280 1364 762 1395"><i>Piscicola geometra</i> (с жабр плотвы)</p>	<p data-bbox="903 815 1449 1395">Тело пиявки <i>Piscicola geometra</i> цилиндрическое, на переднем конце присоска, на которой расположены две пары глаз. Задний конец тела снабжен присоской, края которой выступают за пределы тела. На задней присоске имеются радиальные пигментные полосы, между которыми расположены глазоподобные пятна. Паразитирует у многих видов рыб, прикрепляясь к телу, жаберным дугам. При осмотре рыб пиявки видны невооруженным глазом. Вызывают разрушение кожных покровов, образование небольших язв.</p>

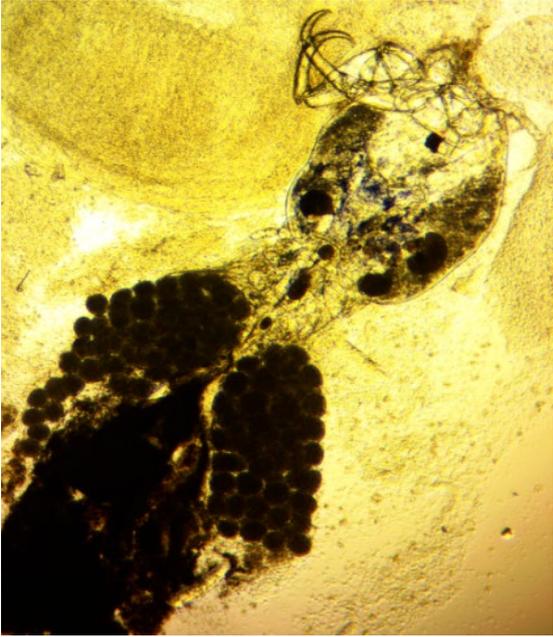
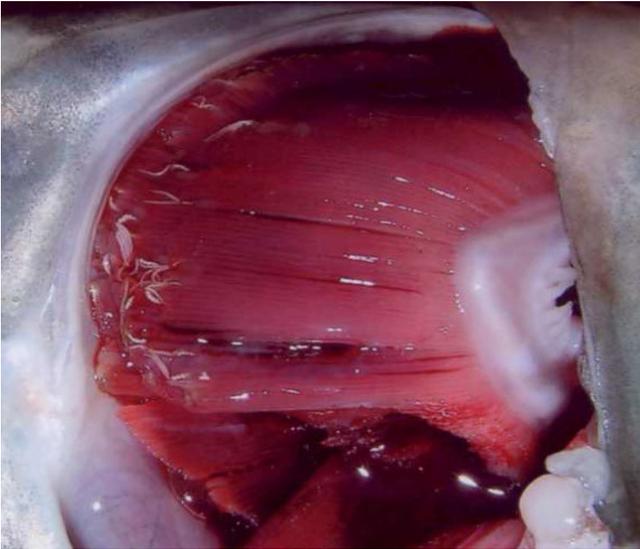
Определение паразитических ракообразных у рыб

У рыб паразитируют ракообразные, относящиеся к трем отрядам – Соперода (веслоногие), Branchiura (жаброхвостые), Isopoda (равноногие).

Обнаружить рачком можно визуалью на поверхности тела и жабр. При микроскопии нативных препаратов слизи и соскоб с жабр проводится определение рачка до рода.

Часто встречающиеся у рыб паразитические ракообразные приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Паразитические ракообразные рыб

Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p data-bbox="405 952 564 981" style="text-align: center;"><i>p. Ergasilus</i></p>	<p>Копеподы из р. <i>Ergasilus</i> паразитируют на жаберных лепестках, наиболее часто встречаются <i>E. sieboldi</i> и <i>E. briani</i>, но заболевание в основном вызывает <i>E. sieboldi</i>. Половозрелая самка рачка имеет грушевидное тело с расширенным передним и суженным задним концом. Первый грудной сегмент слит с головным, имеет пять пар плавательных ножек. Коготь у <i>E. sieboldi</i> более длинный, чем у <i>E. briani</i>. На половом сегменте у <i>E. sieboldi</i> есть мелкие шипики, а у <i>E. briani</i> их нет. У зараженных рыб отмечают деформацию, разрыв жаберных лепестков, сдавливание сосудов, повышенное слизеотделение, разрушение и некроз жаберной ткани.</p>
 <p data-bbox="231 1608 740 1682" style="text-align: center;">Рачки из р. <i>Sinergasilus</i> на жаберных лепестках белого амура</p>	<p>Рачки из р. <i>Sinergasilus</i> паразитируют на жаберных лепестках чаще все у растительноядных рыб (белого амура и толстолобиков), в основном два вида – <i>Sinergasilus major</i> и <i>S. lienii</i>. Оба вида рачков строго специфичны: первый локализуется на жаберных лепестках только белого амура, второй – только белого и пестрого толстолобиков. Тело половозрелых самок цилиндрической формы. Сегменты тела слиты друг с другом, но границы между ними отчетливо видны. На заднем конце тела имеются парные яйцевые мешки. У <i>S. lienii</i> тело несколько короче, половой сегмент у него больше первого сегмента брюшка; у <i>S. major</i>, наоборот, половой сегмент меньше первого сегмента брюшка. Рачки вызывают деформацию, разрыв жаберных лепестков, сдавливают сосуды, образуются участки некроза ткани.</p>

Паразит	Идентификация паразита и патогенез
 <p data-bbox="231 965 738 994">Рачки из р. <i>Lernaea</i> на теле у форели</p>	<p data-bbox="831 197 1449 994">Характерным признаком р. <i>Lernaea</i> является строение прикрепительного органа на головном конце, имеющего вид хитиновых ветвистых выростов («якоря»). У рыб на территории России паразитирует в основном два вида рачков <i>Lernaea suprinacea</i> и <i>L. elegans</i>. Рачки паразитируют на кожи у разных видов рыб. На месте прикрепления в мышечном слое образуется глубокая язва, абсцесс, свищ, края язвы ярко-красные, иногда сероватые, резко ограниченные. Тело половозрелой самки длинное, нерасчлененное, слегка расширяющееся к заднему концу. Голова имеет ветвистые выросты, при помощи которых рачок закрепляется в теле рыбы. Имеется 5 пар двуветвистых плавательных ножек, каждая ветвь состоит из трех члеников. Яйцевые мешки у самок парные. <i>L. suprinacea</i> обладает узкой специфичностью, его основным хозяином является золотой карась. <i>L. elegans</i> имеет широкую специфичность и встречается у многих видов пресноводных рыб. Видовая идентификация проводится после приготовления постоянных препаратов и измерения выростов прикрепительного аппарата.</p>
 <p data-bbox="416 1883 552 1912">р. <i>Argulus</i></p>	<p data-bbox="831 1223 1449 1496">Рачки р. <i>Argulus</i> имеют тело широкой, овальной формы, сплющенное, серовато-зеленого цвета. Голова сливается с первым грудным сегментом, а пятый и шестой сегменты сливаются с брюшком, образуя хвостовой плавник, в конце которого в вырезке расположена пара редуцированных хвостовых ветвей.</p> <p data-bbox="831 1503 1449 2022">Головогрудь покрыта широким выпуклым щитом, задний край которого сердцевидно вырезан. Антенны I превращены в прикрепительные органы, заканчивающиеся изогнутыми крючками. Имеется сосущий хоботок, в полости которого помещаются мандибулы. Максиллы превращены в присосковидные органы. Имеется 4 пары плавательных ножек и 2 фасеточных глаза. Аргулюсы разных видов внешне похожи и различить их можно по форме и строению хвостового плавника. Рачки р. <i>Argulus</i> паразитируют на кожи у разных видов рыб. На месте прокола могут образовываться ранки и мелкие язвочки.</p>

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В популяционных и фаунистических исследованиях паразитов рыб важным этапом работы является видовая идентификация. Накоплен обширный литературный материал, базовой основой которого является использование Определителей паразитов пресноводных рыб, изданных в конце 20 века [Определитель паразитов ..., 1984; 1985; 1987]. Однако в мировой практике происходят постоянные ревизии таксонов и уточняется валидность видов с учетом проводимых современных генетических исследований. К сожалению, в России подчас доступность данной информации проблематична, отсутствие сводных обобщающих изданий затрудняет работу ихтиопаразитологов.

Необходимость приготовления тотальных препаратов является трудоемким и длительным процессом. Идентификация паразитов в практической работе ихтиопатологов и особенно работников, занимающихся контролем здоровья рыб на предприятиях аквакультуры, связана со значительными специфическими трудностями и, в большинстве случаев, может быть ограничена только определением до рода.

Использование современной микроскопической техники и компьютерных технологий позволяет сократить время и безошибочно определить род паразита, что в условиях рыбоводных предприятий часто бывает достаточным для разработки профилактических и терапевтических мероприятий. Накопленный и представленный нами фотоматериал (электронный банк паразитов) и микроскопия нативных препаратов ихтиопаразитов позволяет это сделать при наличии профессиональных компетенций. В настоящее время в нашей стране у многих исследователей уже накоплен аналогичный фотоматериал, но он, в основном, закрыт для общего пользования.

Безусловно, актуальным является создание единой электронной информационной базы данных паразитов для специалистов ихтиопатологических лабораторий НИИ, практикующих ихтиопатологов и ветеринарных врачей. Они могут быть включены в виде электронного атласа в структуру сайта общества паразитологов РАН и Департамента Ветеринарии Министерства сельского хозяйства, ведущих эпизоотический контроль за состоянием водных биоресурсов во внутренних водоемах и на предприятиях аквакультуры.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Абдуллаева Х.Г. К изучению распространения диплостомоза среди рыб в рыбоводческих хозяйствах Азербайджана// The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University, 2011. – 14. – №971. – С. 98-102.

Быховская-Павловская И.Е. Паразиты рыб. Руководство по изучению. – Л.: Наука, 1985. – 118 с.

Бэр С.А. Биология возбудителя описторхоза. Москва: Товарищество научных изданий КМС, 2005. – 336 с.

Вастьянова А.А. Гельминтозы рыб в рыбохозяйственных водоемах Саратовской области): автореф. дисс. ... канд. ветерин. наук. – Саратов, 2013. – 22 с.

Гаврилов А.Л., Бурдакова Н.В. Влияние зараженности метацеркариями трематоды *Ichthyocotylurus erraticus* (Rudolphy, 1809) на биоресурсы сиговых рыб // Аграрный вестник Урала, 2011. – № 8 (87). – С. 14-16.

Головина Н.А., Головин П.П. Оценка морфофизиологических адаптаций в системе цестоды *Bothriosephalus opsariichthydis* Yamaguti, 1934 и *B. acheilognati* Yamaguti, 1934 – карп (*Cyprinus carpio* L.) // Актуальные вопросы теоретической и прикладной трематологии и цестодологии: Материалы докладов научной конференции. М., 1997. – С. 39-41.

Догель В.А. Общая паразитология. – Издательство Ленинградского университета, 1962. – 464 с.

Доровских Г.Н., Степанов В.Г. Каталог паразитов пресноводных рыб северо-востока европейской части России. Простейшие: монография. – Сыктывкар: Изд-во Сыктывкарского госуниверситета, 2015. – 145 с.

Евсеева Н.В., Барская Ю.Ю., Лебедева Д.И. Первый случай гиродактилеза радужной форели в аквакультуре Карелии// Сборник научных трудов ФГНУ «ГосНИОРХ»: Проблемы ихтиопатологии в начале XXI века. Санкт-Петербург, 2009. – Вып.338. – С. 71-76.

Жаворонкова Н.В. Эколого-биологическая характеристика паразитофауны рыб в водоемах: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Рязань, 2015. – 126 с.

Иванов В.М., Семенова Н.Н., Калмыков А.П. Гельминты в экосистеме дельты Волги. Том 1. Трематоды. Монография. – Астрахань: ГП АО Издательско-полиграфический комплекс «Волга», 2012. – 255 с.

Ихтиопатология: учебник / Н.А. Головина, Ю.А. Стрелков, В.Н. Воронин, П.П. Головин, Е.Б. Евдокимова, Л.Н. Юхименко. – М.: Колос, 2010. – 512 с.

Казарникова А.В. Анализ Эпизоотического состояния рыб дельты Дона и восточной части Таганрогского залива в современных условиях// Наука юга России, 2021. – Т.17. – №1. – С.97-108.

Кенеди К. Экологическая паразитология. – М.: Мир, 1978. – 227 с.

Косяев Н.И., Ксенофонтова В.А. Параценогонимоз рыб: ветеринарно-санитарная экспертиза // Ученые записки КГАВМ им. Н. Э. Баумана, 2012. – выпуск 4. – Т.212. – С. 60-63.

Кудрявцева Т.М. Распространение метацеркарий сем. *Opisthorchiidae* в рыбах водоемов северо-запада России (эпизоотология, диагностика): автореф. дисс. ... канд. ветерин. наук. – Санкт-Петербург, 2020. – 18 с.

Метацеркарии трематод – паразиты гидробионтов России. Т.1: Метацеркарии трематод – паразиты пресноводных гидробионтов Центральной России/ В.Е. Судариков, А.А. Шигин, Ю.В. Курочкин, В.В. Ломакин, Р.П. Стенько, Н.И. Юрлова. – М.: Наука, 2002. – 417 с.

Метацеркарии трематод – паразиты гидробионтов России. Т.2: Метацеркарии трематод – паразиты рыб Каспийского моря и дельты Волги/

В.Е. Судариков, В.В. Ломакин, А.М. Атаев, Н.Н. Семенова. – М.: Наука, 2006. – 183 с.

Молодожникова Н.М., Жохов А.Е. Таксономическое разнообразие паразитов рыбообразных и рыб бассейна Волги. III. Аспидогастры (*Aspidogastrea*) и трематоды (*Trematoda*)// Паразитология, 2007. – 41, 1. – С. 28-54.

Морозко А.В. Экологические факторы, влияющие на формирование компонентного сообщества трематод промысловых рыб Новосибирского водохранилища: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 2022. – 25 с.

Лабораторный практикум по болезням рыб / В.А. Мусселиус, В.Ф. Ванятинский, А.А. Вихман и др.; под ред. В.А. Мусселиус. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. – 296 с.

Новые данные о чужеродных видах паразитов и их хозяев в экосистеме оз. Глубокое (Московская обл., Россия) / С.Г. Соколов, А.Н. Решетников, Е.Н. Протасова, Е. Л. Воропаева // Российский журнал биологических инвазий, 2016. – №4. – С.118-125.

Новак А.И., Жаворонкова Н.В., Берестова А.Н. Дифференциальные признаки метацеркариев, локализуемых в тканях рыб // Труды Кубанского государственного аграрного университета, 2013. – № 4 (43). – С. 228-230.

Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т.1 Паразитические простейшие. – Л.: Наука, 1984. – 428 с.

Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т.2 Паразитические многоклеточные. (Первая часть). – Л.: Наука, 1985. – 425 с.

Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т.3 Паразитические многоклеточные. (Вторая часть). – Л.: Наука, 1987. – 583 с.

Перова С.Н., Пряничникова Е.Г., Тютин А.В. О расширении ареала обитания причерноморского моллюска *Lithoglyphus naticoides* (С. Pfeiffer, 1828) и ассоциированных с ним видов трематод в бассейне Верхней Волги //Биология внутренних вод, 2018. – №2. – С.91-93.

Плаксина М.П. Фауна и экология сообществ гельминтов пелагических и придонно-пелагических рыб побережья Крыма (Черное и Азовское моря): автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Санкт-Петербург, 2022. –22 с.

Практикум по ихтиопатологии / Под ред. Н.А. Головиной, Е.В. Авдеева, Е.Б. Евдокимова, О.В. Казимирченко, М.Ю. Котлярчук. – М.: Моркнига, 2016. – 417 с.

Приказ Министерства сельского хозяйства РФ от 14 декабря 2015 г. №635 «Об утверждении ветеринарных правил проведения регионализации территории Российской Федерации»: <https://docs.cntd.ru/document/420325658>

Пугачев О.Н. Каталог паразитов пресноводных рыб Северной Азии. Книдарии, моногенеи, цестоды. – СПб.: Тр. ЗИН РАН, 2003. – Т. 297. – 248 с.

Разнообразие паразитов рыб бассейна Волги: проблемы изучения и оценки / А.Е. Жохов, М.Н. Пугачева, А.В. Шершнева, Н.М. Молодожникова,

С.Н. Ларина // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. – Тольятти, 2014 – Т. 23 – № 2 – С. 84-91.

Румянцев Е.А. Об использовании паразитологических данных при изучении типологического статуса озер европейского севера // Принципы экологии, 2013. – № 4. – С. 4–9.

Семенова Н.Н., Иванов В.П., Иванов В.М. Паразитофауна и болезни рыб Каспийского моря. – Астрахань: Издательство АГТУ, 2007. – 557 с.

Соколов С.Г. Дракункулоидные нематоды (Spirurida: Dracunculoidea) рыб дельты Волги// Паразитология, 2006. – 40, 4. – С. 355-362.

Чепурная А.Г. Микроспоридии рыб в водоемах Нижневолжского региона // Вестник АГТУ: Рыбное хозяйство, 2009. – №1. – С. 51-53.

Чужеродные виды паразитов рыб в бассейне Волги: обзор данных по числу видов и распространению/ А.Е. Жохов, М.Н. Пугачева, Н.М. Молодожникова, И.А. Беречикидзе // Российский Журнал Биологических Инвазий, 2019. – №1. – С. 38-54

Lom J., Dykova I. Protozoan parasites of fishes. – Amsterdam: Elsevier Science, 1992. – 315 p.

Moravec F. The systematic status of *Philometra abdominalis* Nybelin, 1928 (Nematoda: Philometridae) [= a junior synonym of *P. ovata* (Zeder, 1803)] //Folia Parasitol (Praha), 2004. –51(1). –75-76.

ALGORITHM FOR DETERMINING FISH PARASITES

N.N.Romanova, N.A. Golovina, P.P. Golovin, A.A.Vishtorskaya
Branch for the Freshwater Fisheries of VNIRO («VNIIPRKh»)
E-mail: lab.ihhiopat@mail.ru

Abstract. The algorithm for determining fish parasites is presented, consisting of three stages: identification of the parasite in native preparations and determination of the genus; fixation and coloring of the parasite (preparation of total preparations); species identification. The purpose of this work was to form a data bank (photographic material) of the most frequently detected pathogens of invasions for primary identification of the genus using modern microscopic technology. The use of computer technology can reduce the time of diagnosis, which will accelerate the development of preventive and therapeutic measures. The photo material of native preparations presented in the paper will help determine the genus of the parasite.

Keywords: identification, computer technology, fish, parasites.

ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ В ОСЕТРОВЫХ ХОЗЯЙСТВАХ

Л.Н. Юхименко, С.Б. Токарева, П.В. Кудинов, О.В. Сехина
*Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО»
(«ВНИИПРХ»)
E-mail: yln1937@mail.ru*

Приведены результаты эпизоотического обследования осетровых хозяйств. Выявлены основные группы этиологически значимых микроорганизмов, способных снижать качество рыбной продукции. В летний период выращивания рыбы общее микробное число (ОМЧ) на эритритагаре было от минимальных (1180 КОЕ/мл) до максимальных (8400 КОЕ/мл) показателей. В микрофлоре водной среды обнаруживали бактерии группы кишечной палочки (БГКП), аэромонады, неферментирующие щелочеобразователи (НФЩ) – моракселлы и ацинетобактеры, миксобактерии и протей. При высеве проб из внутренних органов рыб выявляли аэромонады и НФЩ, а в посевах соскобов с поверхности жабр – аэромонады, миксобактерии и НФЩ.

Ключевые слова: осетровые хозяйства, эпизоотическое обследование, микробиоценоз рыбы и воды.

ВВЕДЕНИЕ

Эпизоотологическое обследование осетровых хозяйств показало, что важную роль в обеспечении эпизоотического благополучия рыб играет среда их обитания. При сравнительном изучении микробиоценоза воды и рыбы выявили основные группы этиологически значимых микроорганизмов, способных снижать качество рыбной продукции. Эпизоотическое состояние индустриальных хозяйств, функционирующих на прямотоке, не всегда было благополучным и во многом зависело от качества поступающей воды. На протяжении нескольких лет проводились бактериологические исследования воды в таких хозяйствах. По результатам было выявлено, что в летний период выращивания рыбы регистрировали общее микробное число (ОМЧ) на эритритагаре от минимальных (1180 КОЕ/мл) до максимальных (8400 КОЕ/мл) показателей. На входе в отстойник всегда отмечали высокий уровень ОМЧ (до 11940 КОЕ/мл). Часто бактериальный фон воды в отстойнике и в бассейнах был настолько высоким, что на плотных питательных средах при посеве без разведения образовывался сливной рост не поддающихся подсчёту колоний.

В микрофлоре водной среды обнаруживали БГКП, аэромонады, НФЩ – моракселлы и ацинетобактеры, миксобактерии и протей. При высеве проб из внутренних органов рыб выявляли аэромонады и НФЩ, а в посевах соскобов с поверхности жабр – аэромонады, миксобактерии и НФЩ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор проб осуществляли в осетровых хозяйствах различного типа. Для исследования брали рыбу и воду из водоёма, в котором находилась рыба. Количественный посев проб воды производили на среды: эритритагар – определение ОМЧ; Эндо – определение энтеробактерий, аэромонад, моракселл и ацинетобактеров (НФЦ); Сабуро – определение грибковой флоры и миксобактерий; энтерококкагар – определение энтерококков; висмутсульфитный агар – определение бактерий тифо-паратифозной группы и сальмонелл.

На эти же среды делали посев паренхиматозных органов стерильно вскрытой рыбы [Мусселиус и др., 1983]. Вирулентность выделенных аэромонад определяли по величине зоны деполимеризации дезоксирибонуклеиновой (ДНК) кислоты на ДНКазном агаре [Методические указания..., 1999]. Идентификацию выделенных бактерий проводили в соответствии с Определителем бактерий Берджи [Хоулта и др., 1997].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При эпизоотологическом обследовании осетрового товарного хозяйства отмечали неблагополучие поступающей в лотки и бассейны прямоочной воды. Количественные показатели микрофлоры воды были от минимального ОМЧ (1940 КОЕ/мл) до максимального (9160 КОЕ/мл) значений. В воде обнаруживали большое количество моракселл, БГКП, протей, ацинетобактеров и аэромонад разных видов и биоваров. В одном случае наблюдали рост моракселл до 25760 КОЕ/мл, что способствовало контаминации внутренних органов молоди стерляди и бестера моракселлами и аэромонадами. При обработке воды хлорамином ситуацию удалось нормализовать.

Выращивание осетровых и других видов рыб в садках рыбоводного садкового хозяйства приводит к массивированному органическому загрязнению водной среды с ОМЧ 1580-33220 КОЕ/мл, что отрицательно воздействует на рыбу. У годовиков белуги отмечали вздутие брюшка и поверхностное плавание. При вскрытии наблюдали тёмную печень с фиолетовым оттенком, рыхлые и отёчные почки, в плавательном пузыре – большое количество экссудата. Высев из внутренних органов рыб выявил обильный рост аэромонад и энтерококков, цитробактера и ацинетобактера калькоацетикус.

Другой формой выращивания рыбы является УЗВ. На рыбоводном заводе была предусмотрена замкнутая система водообеспечения с биологической и механической очисткой. Однако состав микрофлоры воды не всегда был благоприятным для выращивания осетровых рыб и зависел от её качества, степени очистки, микрофлоры используемых кормов, их размываемости, продуктов жизнедеятельности рыб и санитарного состояния рыбоводных ёмкостей. Исследования микробиоценоза воды в условиях УЗВ часто показывали, что поступающая в бассейны вода контаминирована в большом количестве БГКП с бронзовым блеском, аэромонадами, ацинетобактерами, моракселлами, протеем и миксобактериями. При отсутствии специального УФ-

облучения показатели ОМЧ в воде, поступающей в бассейны и в разные циклы системы, колебались от 4060 до 46060 КОЕ/мл. Высокий уровень ОМЧ (10080 - 13600 КОЕ/мл) регистрировали в осветлённой воде после механической очистки, что свидетельствовало о накоплении бактерий на механических фильтрах.

В посевах из внутренних органов выращиваемой рыбы рост бактериальной флоры не отмечали или это были единичные колонии (в основном аэромонады и цитробактер в монокультуре или в ассоциации с БГКП). Регистрировали умеренную контаминацию жабр БГКП, аэромонадами, моракселлами, ацинетобактером и протеом. Многолетние исследования осетровых рыб показали, что наибольшую опасность для них представляют ассоциативные болезни, вызываемые комплексом микроорганизмов – бактериальная геморрагическая септицемия (БГС). При миксобактериозе и аэромонозе осетровых выделяется сопутствующая микрофлора, количество которой часто превышает основные для этих инфекций патогены. Кроме осложнения течения болезни, она затрудняет лечение, так как обладает разной чувствительностью к антибактериальным препаратам. [Юхименко, Бычкова, 2007].

У осетровых рыб структура аэромонад и сопутствующей микрофлоры довольно пёстрая (таблицы 1 и 2). Содержание анаэробных аэромонад и НФС составляет 33,9 и 18,6 % соответственно, что свидетельствует о высоком органическом загрязнении рыбоводных водоёмов и способствует развитию бактериальной геморрагической септицемии (БГС).

Таблица 1 – Этиологическая структура аэромонад, выделенных от осетровых рыб

Годы	1980-1989	1990-1999	2000-2009	2010-2019	2020-2023	Всего
Количество рыб	32	264	309	259	77	941
Аэромонады						
<i>A. sobria</i>	6	42	353	62	15	478
<i>A. hydrophila</i>	42	57	40	26	58	223
<i>A. caviae</i>	23	64	30	5	24	146
<i>A. sp.</i>	5	5	11	31	14	66
<i>A.s. 1</i>	-	-	33	3	2	38
<i>A.s. 2</i>	-	10	34	8	1	53
<i>A.s. 3</i>	-	4	13	3	2	22
<i>A.s. 4</i>	-	2	50	14	4	70
<i>A.s. 5</i>	-	-	159	8	30	197
<i>A.s. 6</i>	-	1	3	1	6	11
<i>A.s. 7</i>	-	-	6	6	7	19
<i>A.s. 8</i>	-	-	10	3	18	31
<i>A.s. 9</i>	-	-	3	8	6	17
<i>A.s. 10</i>	-	-	1	2	2	5
<i>A.s. 11</i>	-	-	42	8	8	58
<i>A.s. 12</i>	-	-	-	1	2	3
<i>A.s. 13</i>	-	-	-	-	47	47
Всего	76	185	788	189	246	1484

Таблица 2 – Сопутствующая условно-патогенная микрофлора, выделенная от осетровых рыб

Годы	БГКП	Proteus	НФЦ	Миксобактерии	Enterobacter sp.	Citrobacter sp.	Pseudomonas sp.	Pseud. capsulata	Vac.sp.	Прочие	Всего
1980-1989	4	1	5	2	-	-	-	-	-	-	12
1990-1999	63	71	37	29	20	3	54	71	-	8	356
2000-2009	126	29	350	253	126	42	64	84	3	-	1077
2010-2019	87	2	80	17	-	21	-	-	12	13	232
2020-2023	29	-	72	16	-	13	15	-	4	13	162
Итого	309	103	544	317	146	79	133	155	19	34	1839

Как видно из результатов исследований, наряду с этиологическим разнообразием подвижных аэромонад, выделяющихся из организма осетровых рыб увеличивались и показатели сопутствующей микрофлоры. Результатом таких изменений стал переход с прудовой технологии выращивания на индустриальные методы – садковое, бассейновое и в УЗВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя результаты бактериологических исследований, следует отметить, что при индустриальном выращивании рыб водная среда не всегда соответствует нормативным параметрам. Её бактериальный фон не должен быть более 3000 КОЕ/мл. Однако в хозяйствах он нередко превышает данные показатели, а составляющие его микроорганизмы часто становятся этиологически значимыми для рыб. При этом наиболее опасными становятся миксобактерии, аэромонады и цитробактеры. В условиях замкнутой системы водообеспечения бактериальные показатели воды бывают значительно выше, чем на проточной воде. В первом случае развитие бактериальной флоры происходит за счёт большого количества субстрата, который составляют взвешенные частицы размытого корма в воде. При проточном водоснабжении эти взвеси быстрее выносятся из бассейна.

Наиболее важным условием при выращивании рыб должны быть мероприятия по санации рыбоводных ёмкостей, уменьшению взвешенных частиц в воде, дезинфекции воды. Систематический бактериологический контроль за микробиоценозом воды, мероприятия по повышению иммунофизиологического статуса рыбы в условиях индустриальной аквакультуры приведёт к снижению бактериальных заболеваний и потерь выращиваемой рыбы [Юхименко и др., 2009].

ВЫВОДЫ

1. Ослабление иммуно-физиологического статуса рыб способствует контаминации их внутренних органов водной микрофлорой, что при ухудшении ситуации может привести к развитию бактериальной геморрагической септицемии.

2. Представители сем. Enterobacteriaceae, такие как цитробактеры, энтеробактеры, клебсиеллы, высоковирулентные аэромонады, моракселлы, ацинетобактеры и энтерококки, могут вызывать заболевания не только у гидробионтов, но и у теплокровных животных, в том числе и у человека.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Методические указания по определению патогенности аэромонад по степени ДНКазной активности // Сб. инструкций по борьбе с болезнями рыб. Ч. 1. М.: Отдел маркетинга АМБ-агро, 1999. – 150 с.

Мусселиус В.А., Ванятинский В.Ф., Вихман А.А. и др. Лабораторный практикум по болезням рыб. – М.: Лёгкая и пищевая промышленность, 1983. – 296 с.

Дж. Хоулта и др. Определитель бактерий Берджи: в 2-х т. – М.: Мир, 1997. – 800 с.

Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И. Этиологическая структура возбудителей БГС рыб // Расширенные материалы Международной науч.- практ. конференции, Борок, 17-20 июля, 2007. М., 2007. – С.95-98.

Юхименко Л.Н., Климов А.В., Бычкова Л.И., Головин П.П. Специфическая иммунопрофилактика аэромоназа (бактериальной геморрагической септицемии – БГС) рыб в условиях индустриального рыбоводства // Сб. трудов Междунар. науч.-практ. форума «Стратегия 2020: интеграционные процессы образования, науки и бизнеса как основа инновации развития аквакультуры России» 23.12.2008-15.02.2009. – М.: 2009. – С. 44-48.

EPIZOOTIC SITUATION IN STURGEON FARMS

L.N. Yukhimenko, S.B. Tokareva, P.V. Kudinov, O.V. Sekhina
Branch for the Freshwater Fisheries of VNIRO («VNIIPRKh»)
E-mail: yln1937@mail.ru

The results of the epizootic survey of sturgeon farms are presented. The main groups of etiologically significant microorganisms capable of reducing the quality of fish products have been identified. During the summer period of fish cultivation, the total microbial number (PMF) on erythritol agar was from the minimum (1180 CFU/ml) to the maximum (8400 CFU/ml) indicators. In the microflora of the aquatic environment, bacteria of the *Escherichia coli* group (BGCP), aeromonads, non-fermenting alkali-forming agents (NSF) - moraxella and acinetobacteria, myxobacteria and proteus were detected. When seeding samples from the internal organs of fish, aeromonads and NSF were detected, and in crops scraped from the surface of the gills - aeromonads, myxobacteria and NSF.

Key words: sturgeon farms, epizootic examination, microbiocenosis of fish and water.

ПРИМЕНЕНИЕ ГНЕЗДОВОГО ВАРИАНТА ПЦР (ОТ-ПЦР) ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ СЕПТИЦЕМИИ У ЛОСОСЕВЫХ РЫБ

В.А. Пыльнов, И.В. Бурлаченко, Л.И. Бычкова
ФГБНУ «ВНИРО»
E-mail: pylnov@vniro.ru

Приведены результаты разработки способа детекции вируса геморрагической септицемии (ВГС) применением обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). Предложен вариант выделения РНК вируса для постановки ОТ-ПЦР.

Ключевые слова: ВГС – вирус геморрагической септицемии, ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с полимеразной цепной реакцией.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусная геморрагическая септицемия (ВГС) – контагиозное заболевание, характеризующееся септическими процессами у лососевых рыб. Этиологический агент заболевания ВГС – РНК-содержащий вирус рода *Novirhabdovirus*, семейства *Rhabdoviridae*. Геном вируса ВГС представлен одноцепочечной РНК отрицательной полярности, размером 11200 н.о., содержит 6 ОРС, которые кодируют один неструктурный белок Nv с неизвестной функцией и 5 структурных белков: нуклеокапсидный (N), фосфопротеин (P), мембранный (M), гликопротеин (G) и (L) РНК-полимеразы [Schutze, 1999].

Вспышки ВГС наносят большой экономический урон рыбным хозяйствам. Вирусной геморрагической септицемией болеет радужная форель, а также другие лососевые; вирус выделен у палтуса, щуки. Вспышки бывают у молодняка пресноводных рыб [Wolf, 1988], хотя вирус выявляли и у взрослых особей радужной форели, выведенной на морских фермах [Gastric and Kinkelin, 1980; Horlyck et.al., 1984]. Смертность молоди достигает 100%, а у старших рыб до 70%. По литературным данным наличие вируса ВГС в настоящее время подтверждается во многих обследованных рыбоводных хозяйствах Европы, Азии, Северной и Центральной Америки. В 2005-2021 гг. в мире, по официальным данным МЭБ, неблагополучными в отношении ВГС являлись европейские и азиатские страны [WANIS, Interface, electronic resource, 2021]. По данным проведенных исследований наличие вируса ВГС подтверждается в обследованных рыбных хозяйствах Республики Карелия, что указывает на распространение этой инфекции [Пыльнов и др., 2013]. Проявление ВГС возможно на фоне других болезней вирусной и бактериальной природы, что значительно осложняет постановку диагноза. Система

лабораторной диагностики вируса ВГС включает выделение вируса на нескольких перевиваемых клеточных линиях рыб, постановку биопробы на рыбах, идентификацию выделенного вируса в серологических и иммунологических реакциях, а также обнаружение характерных гистологических изменений в органах и тканях.

В Российской Федерации лабораторная диагностика этого заболевания в основном проводится исследованием сывороток крови от больных рыб в реакции нейтрализации (РН), различных вариантах иммуноферментного анализа (ИФА), в непрямой реакции иммунофлуоресценции (НРИФ). Периодические сообщения о появлении новых изолятов или штаммов вируса ВГС в разных странах мира, а также штаммов, способных вызывать заболевание у вакцинированных рыб, определяют актуальность работы в направлении совершенствования имеющихся средств индикации вируса, а также разработки новых методов его детекции и идентификации. В настоящее время всё большее внимание уделяется совершенствованию диагностических тестов, основанных на широком использовании методов молекулярной биологии. Необходимой предпосылкой этих разработок является информация, получаемая при изучении нуклеотидных последовательностей различных областей генома вируса ВГС. Основной целью разработки молекулярных методов диагностики ВГС является повышение чувствительности и специфичности, а также сокращение времени проведения анализа. Уже несколько десятков лет в диагностике многих инфекционных заболеваний широко применяется полимеразная цепная реакция (ПЦР), основанная на амплификации фрагментов вирусного генома с использованием термостабильной ДНК-полимеразы и специфических праймеров. ПЦР обладает высокой специфичностью и чувствительностью, что позволяет выявлять даже единичные копии вирусного генома. Поэтому разработка и использование ПЦР как метода для обнаружения и идентификации вируса ВГС является актуальной научной задачей.

Основная цель исследований – разработка методов и способов детекции геномного материала вируса ВГС с помощью молекулярно-биологических методов и анализ полученных данных. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: 1) провести филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей открытых рамок считывания различных генов американских, европейских штаммов вируса ВГС, которые будут получены из базы данных EMBL; 2) разработать метод индикации вируса ВГС на основе ПЦР в различных вирусосодержащих материалах; 3) исследовать профили вариабельности открытых рамок считывания для выбора праймеров; 4) провести подбор химических реагентов и ферментов для проведения ПЦР; 5) отработать метод выделения суммарной РНК; 6) отработать постановку обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции; 7) отработать учёт результатов амплификации; 8) отработать метод индикации вируса ВГС на основе ПЦР в различных вирусосодержащих материалах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для филогенетического анализа использовали нуклеотидные последовательности гена G американских, европейских штаммов вируса ВГС, которые были получены из базы данных EMBL. При выборе оптимальных для праймеров участков генома, а также для выявления переменных участков генома вируса ВГС использовали программы Geneious version 8.1 created by Biomatters [EMBL, electronic resource, 2021].

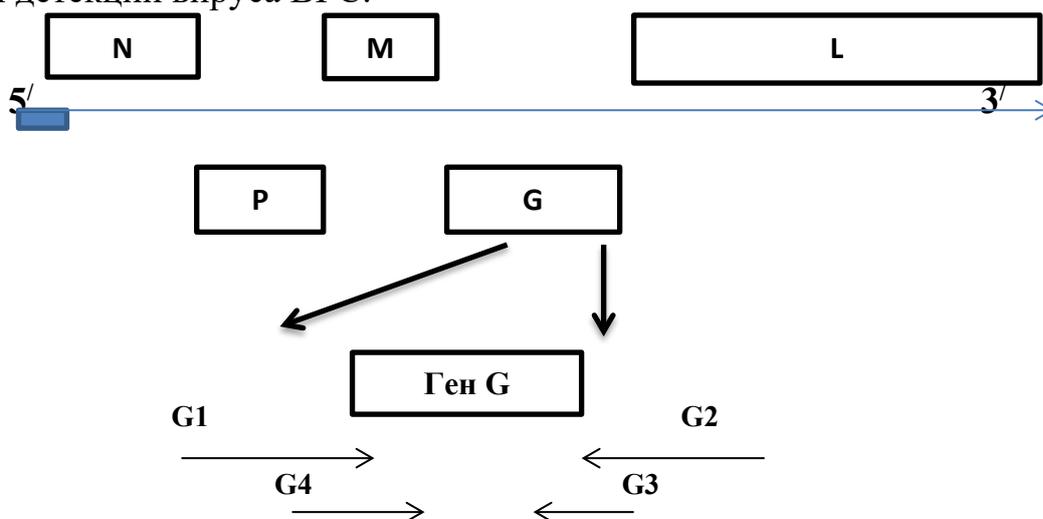
В экспериментах по выделению РНК вируса ВГС использовали первоначально метод Chomcynski [Chomcynski, Sacchi 1987]. В качестве исходного материала использовали 10-20 % суспензию из тканей органов рыбы (кусочки жабр, мозга, головного отдела почки, селезёнки, сердца, печени) в STE буфере (0,01 М трис-НСI; 0,1 М NaCl; 1 мМ ЭДТА, рН 7,2-7,4). Суспензию центрифугировали при 4-5 тыс. об./мин. в течение 30 минут. Супернатант, содержащий вирус, хранили при температуре – 70°C. Далее выделение суммарной РНК проводили по методу Грибанова в модификации Щербакова [Scherbakov et.al., 1998]. Из приготовленной 20% суспензии отбирали 100 мкл суспензии смешивали с 200 мкл 6М ГТЦ и инкубировали при комнатной температуре 5 мин. Затем добавляли 300 мкл 96% этанола, перемешивали и пропускали через фильтры (GF/F (GF/C) (Whatman), диаметр 6 мм). Фильтры промывали дважды 1 мл 80% этанола, центрифугировали при 12000 об./мин. 1 мин. и элюировали РНК в 40-50 мкл H₂O – 5 минут. Фильтр переносили в 1,5 мл пробирку и центрифугировали при 12000 об./мин. 30 сек. на микроцентрифуге. Полученные препараты должны использоваться для ОТ ПЦР.

ПЦР проводили на программируемом амплификаторе «БИС» (Россия). Для обратной транскрипции использовали праймер G1. Реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей буфер (5XBuffer AMV RT), 10mM dNTP, ингибитор РНК-аз (Promega Corp., Madison, WI, USA), праймер G1, 10 ед. ревертазы. Полученную смесь инкубировали при температуре 42°C в течение 30-40 минут. Далее проводили полимеразную цепную реакцию с внешней (G1, G2) парой праймеров. Реакционную смесь ПЦР, содержащую 10X буфер, 25 мМ Mg, 2 мМ dNTP, праймеры G1 и G2, 1 ед. Taq-полимеразы, смешивали с 4-5 мкл продукта обратной транскрипции и минеральным маслом. ПЦР проводили при следующем режиме: 1 этап – при температуре 95°C – 1 мин.; 2 этап – при температуре 95°C – 30 с., при 72°C – 30 с. в 3 цикла; 3 этап – при температуре 95°C – 30 с., при 55°C – 30 с., при 72°C – 30 с. в 30 циклов; 4 этап – при температуре 72°C – 3 мин. Для повышения чувствительности реакции в случае невыявления вирусспецифических фрагментов кДНК после первого этапа ПЦР использовали «гнездовой вариант» с парой внутренних праймеров G3 и G4. Для этого переносили 4 мкл смеси в пробирку с реакционной смесью, содержащей внутренние праймеры, и проводили 25-30 циклов при тех же температурных условиях. Для контроля возможной контаминации компонентов реакции фрагментами вирусной РНК или ДНК, начиная с этапа выделения РНК, ставили отрицательный контроль, используя суспензию органов или H₂O. В качестве

положительного контроля брали РНК, выделенную из очищенного и концентрированного вируса ВГС. ПЦР-продукты проверяли электрофорезом в 2%-м агарозном геле. Буфер для электрофореза использовали на основе трис-гидроксиметилгидрохлорида, агарозный гель готовили с добавлением этидия бромистого [Дейвис, 1990]. Электрофорез для учета результатов амплификации проводили при напряжении 15 В/см длины геля в течение 30 минут. Результаты электрофореза учитывали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 Нм на трансиллюминаторе. Продукты ПЦР выявлялись в виде светящихся полос. Положительными, то есть содержащими геном вируса ВГС, считали пробы, в которых имелись полосы ДНК расчётного размера. Исследуемые пробы считали отрицательными, если в них не выявляли никаких полос, или они не соответствовали размеру фрагмента в контрольной пробе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для разработки тест-системы выявления генома вируса с помощью ПЦР необходимо было определить участок генома вируса ВГС, пригодный для конструирования праймеров. Структура этого участка с одной стороны должна быть вариабельной для надёжной дифференциации выделяемых изолятов, а с другой стороны достаточно консервативной, чтобы фиксировать структурными изменениями наиболее общие пути и существенные этапы генетической модификации вируса, обусловленные различными селективными факторами. По литературным данным наиболее подходящим кандидатом с этой точки зрения являлся ген G, кодирующий белок G вируса ВГС [Stone, Way, Dixon, 1997; Sigríður Guðmundsdóttir et.al., 2019; Dale et.al., 2009; Guillou et.al., 1999]. Объём имеющейся структурной информации по этому участку генома и уровень его консервативности явились основным критерием для выбора его в качестве мишени амплификации при конструировании универсальных праймеров. На рисунке 1 изображена схема расположения гена G и праймеров для детекции вируса ВГС.



Для определения участка, оптимального для дифференциации изолятов вируса ВГС было проведено выравнивание нуклеотидных последовательностей гена G и окружающих его фрагментов генома штаммов, опубликованных Европейским биоинформационным институтом (EMBL). Анализ выровненных последовательностей генома, принадлежащих различным штаммам вируса, является базовым методом при определении структуры праймеров [Великов, 2013; Viacchesi, 2011]. В результате проведенного анализа последовательностей гена G и соседних участков генома выбраны 2 пары праймеров для «гнездовой» ПЦР, гомологичные сравнительно консервативным участкам, фланкирующим область гена G. Была выполнена основная задача при выборе праймеров – обеспечить их специфическое взаимодействие с возможно большим числом матриц различных изолятов вируса ВГС. Для выявления генома вируса ВГС при исследовании полевых проб рассчитаны две пары праймеров, ограничивающих область гена G, расположенной на 3' - конце генома вируса. Расположение праймеров на геноме приведено в таблице.

Таблица – Структура праймеров для амплификации гена G

Праймер	Длина	Позиция на геноме ВГС
G1	23	257
G2	23	566
G3	20	284
G4	23	502

Примечание: G1 – внешний прямой праймер, G2 – внешний обратный праймер
G3 – внутренний прямой праймер, G4 – внутренний обратный праймер

Основными требованиями на этапе получения вирионной РНК является высокий выход геномного материала и воспроизводимость метода. Для выбора оптимальных условий постановки реакции обратной транскрипции (ОТ ПЦР) необходимо получение качественных препаратов вирусной РНК, пригодной для проведения реакций ОТ ПЦР. Геном вируса ВГС представлен линейной одноцепочечной молекулой РНК положительной полярности размером около 15000 нуклеотидов, которая связана нуклеокапсидным белком в рибонуклеопротеидный комплекс. Данный метод позволяет из 300 мкл суспензии тканей из органов рыбы выделить количество РНК, достаточное для проведения ОТ ПЦР и реамплификации. Этот метод даёт высокий количественный выход РНК по сравнению с методом Chomczynski, который является в определённой степени трудоёмким и продолжительным по времени. В настоящее время разработаны методы выделения нуклеиновых кислот с использованием стекловолокнистых фильтров (Whatman) [Грибанов и др., 1997]. Предложенный метод основан на способности стекловолокнистых фильтров обратимо сорбировать одноцепочечные молекулы РНК в растворе ГТЦ (гуанидинтиоцианат). В наших исследованиях при оптимизации процесса выделения РНК исследовали влияние концентрации ГТЦ (2 – 6 М), этилового спирта (25 – 75%) – для промывки фильтра, а также прогрева пробы и времени

инкубации при определённой температуре на количественный выход РНК после сорбции и элюирования.

В результате был оптимизирован модифицированный метод выделения РНК с использованием 6 М ГТЦ и 75% этилового спирта, который пригоден для выделения суммарной РНК из различных материалов. Этот способ выделения РНК не уступает методу Chomczynski по количественному выходу, и превосходит по скорости и технической простоте.

Процедура выявления генома вирусов, содержащих одноцепочечную РНК, включает реакцию обратной транскрипции – синтез кДНК на вирусной РНК-матрице с использованием обратного праймера, и амплификацию кДНК в ПЦР. Внешняя пара праймеров ограничивала фрагмент размером 309 п.н. С целью повышения чувствительности проводили второй этап – «гнездовую» ПЦР с парой внутренних праймеров, в результате чего синтезировался продукт размером 218 п.н. При постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР синтез первой цепи кДНК на РНК вируса проводили с использованием AMV РНК-зависимой ДНК-полимеразы (Promega). В ходе проводимых исследований для повышения чувствительности и специфичности были оптимизированы следующие параметры реакции: концентрация dNTP и праймеров, количество реакционной смеси и фермента, температурно-временной режим. Затем проводили ПЦР в оптимизированном варианте. Продукты амплификации анализировали электрофорезом в 2% агарозном геле с бромистым этидием. Вирусспецифическая полоса (ДНК) выявлялась, как правило, только после постановки «гнездовой» ПЦР с использованием внутренней пары праймеров. На рисунке 2 представлена электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных методом ОТ-ПЦР

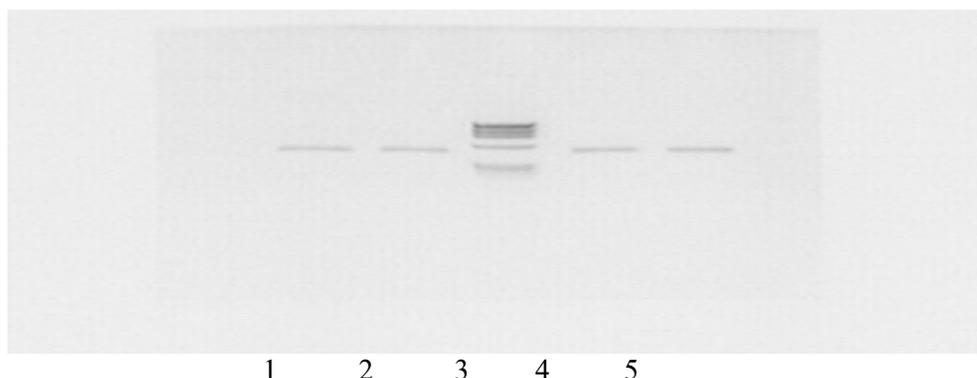


Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных методом ОТ и ПЦР

Примечание: 1– штамм ВГС, 2 – головной мозг, 3 – маркер фХ174 DNA/HaeIII, 4 – селезёнка, 5 – головной отдел почки

Наибольший выход продукта наблюдался в пробах, полученных из следующих органов: головного мозга, селезёнки, печени, головного отдела почки, взятых у рыб в период острого проявления признаков заболевания. Для анализа было достаточно 100 мкл вирусосодержащей суспензии. С целью повышения чувствительности реакции, в случае невыявления вирусспецифических фрагментов кДНК из-за низкого содержания РНК вируса

проводили второй этап ПЦР с парой внутренних праймеров. Для этого 4 мкл смеси переносили в пробирку с реакционной смесью, содержащей внутренние праймеры G2 и G3 и проводили 20-25 циклов реакции при тех же температурных режимах. Чувствительность ПЦР была определена с использованием десятикратных разведений вируса ВГС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённых исследований выбран консервативный участок в геноме вируса ВГС, пригодный для конструирования универсальных праймеров с целью выявления генома возбудителя в вирусосодержащих материалах. С помощью компьютерной программы был рассчитан нуклеотидный дизайн праймеров. Сравнение метода, предложенного Chomczynski и метода выделения РНК на стекловолкнистых фильтрах продемонстрировало преимущество второго метода, главным образом, с точки зрения сокращения этапов и общего времени, необходимого для осуществления процедуры при примерно тех же показателях количества и качества выделяемой вирусной РНК. Оптимизированы условия выделения РНК для индикации вируса ВГС в различных вирусосодержащих материалах. На основе ОТ-ПЦР с праймерами, фланкирующими участок гена G, будет разработан метод индикации генома вируса ВГС, который позволит выявлять вирусный геном ВГС в различных вирусосодержащих образцах в течение 3-4 часов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство. Саратов: Издательство «Саратовский источник». – 2013. – 84 С.

Грибанов О.Г., Щербаков А.В., Перевозчикова Н.А. Простой метод выделения и очистки РНК // Биоорганическая химия. – 1997. – Т. 23. – № 9. – С. 763-766.

Дейвис К. Анализ генома: Методы. – Москва: Мир. – 1990. – 246 с.

Пыльнов В.А., Мороз Н.В., Рыбаков С.С., Павлов Д.К., Метлин А.Е., Егоров А.А. Вирусвыделение возбудителя вирусной геморрагической септицемии лососевых // Материалы XXIX междунар. конференции «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоёмов Европейского Севера» – Мурманск, 27-30 марта 2013г.

Chomczynski P., Sacchi N. Single-stop method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chlorophorm extraction // *Analyt. Biochem.* – 1987. – V. 162. – P. 156-159.

Dale, Ørpetveit I, Lyngstad T. M., Kahns S., Skall H. F., Olesen N. J., Dannevig B. H. Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. *Dis. Aquatic Organism.* 2009. June 10; 85(2). – P. 93-103.

EMBL [Электронный ресурс] – URL: <http://www.geneious.com> (дата обращения 02.04.2021)

Gastric J., Kinkelin P. Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson reared in sea water. *J. Fish Dis.* 3. – 1980. – P. 21-27.

Guðmundsdóttir Sigríður, Vendramin Niccoló, Cuenca Argelia, Sigurðardóttir Heiða, Kristmundsson Arni, Moesgaard Iburg Tine, Olesen Niels Jørgen. Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) in Iceland caused by VHS virus genotype IV. *J. Fish of diseases.* 2019. Jan; 42(1). – P. 47-62.

Horlyck V., Møllergaard S., Dalsgaard I., Jørgensen. Occurrence of VHSV in Danish maricultured rainbow trout. *Bull.Eur.Fish Pathol.* 4(1). – 1984. – P.11-13.

OIE. int WAHIS Interface [Электронный ресурс] – URL: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/ (дата обращения 10.02.2022).

Scherbakov A., Lomakina N., Drygin V., Gusev A. Application of RT-PCR and nucleotide sequencing in foot-and-mouth disease diagnosis // *J. Clin. Sci. Epidemiol.* – 1998. – S 2. –V. 20. – P. 32-34.

Schütze H., Mundt E., Mettenleiter T.C. Complete genomic sequence of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes* 19.1999. P59-65.

Stone D.M., Way K., Dixon P.F. Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) viruses from different geographical areas: a link between VHS in farmed fish species and viruses isolated from North Sea cod (*Gadus morhua* L.). *J. Gen. Virol.* – 1997. 78. – P. 1319-1326.

Biacchesi Stéphane. The reverse genetics applied to fish RNA viruses. *Veterinary Research.* – 2011. – P. 12

Guillou J. P., Merle G., Hénault S., Hattenberger A. M. Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by reverse transcription followed by polymerase chain reaction. *Vet. Res.* 1999. Jan-Feb. 30(1). – P. 49-60.

Wolf K. Viral haemorrhagic septicaemia. In *fish viruses and Fish Viral Diseases*. Ithaca, NY: Cornell University Press. – 1988. – P.217-249.

APPLICATION OF THE NEST PCR VARIANT (RT-PCR) FOR THE DIAGNOSIS OF HEMORRHAGIC SEPTICEMIA VIRUS IN SALMON FISH

V.A. Pylnov, I.V. Burlachenko, L.I. Bychkova

VNIRO All-Russian Scientific Research Institute of Fisheries and Oceanography,
E-mail: pylnov@vniro.ru

Abstract. The results of the development of a method for detecting hemorrhagic septicemia virus (HCV) using reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) are presented. A variant of virus RNA isolation for RT-PCR is proposed.

Keywords: VHS – virus hemorrhagic septicemia, RT-PCR – reverse transcription with polymerase chain reaction.

СЕЗОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОБИОЦЕНОЗА ВОДЫ И РЫБ ВОДОХРАНИЛИЩ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

А.С. Сафронова¹, М.С. Кукин², С.Б. Токарева³, О.В. Сехина³

¹ ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет –МСХА
имени К.А.Тимирязева (РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева)

²ООО «ГОРОС21.РУ»

³Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО»
(«ВНИИПРХ»)

E-mail: anya-vovk-97@mail.ru

В работе представлена эпизоотическая ситуация в естественных водоемах Московской области – Икшинском, Пестовском, Пяловском, Клязьминском водохранилищах, Шатурских озерах и озере Сенеж. Отбор проб воды и отлов рыбы для исследований осуществляли в весенне-осенний период 2019-2020 гг. В течение всего периода обследования значения общего микробного числа в пробах воды составляли от 20 до 52800 КОЕ/мл. Микробиоценоз был представлен патогенными и условно-патогенными для рыб микроорганизмами. Многие из выделенных бактерий, имели как эпизоотическое, так и эпидемиологическое значение. У рыб во внутренних органах была выявлена контаминация условно-патогенными бактериями. В результате проведенной работы были получены результаты, которые позволят наметить пути дальнейшего проведения научно-исследовательских работ и разработки мероприятий по улучшению среды обитания водных биоресурсов в водоемах Московской области.

Ключевые слова: бактериологический анализ, вода, водоемы, микробиоценоз, Московская область, рыба, эпизоотическая ситуация.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с наблюдаемым в настоящее время ухудшением экологической и эпизоотической ситуации на естественных водоемах страны, в том числе водоемах Московской области, является актуальным изучение и оценка микробиоценоза (видового разнообразия бактериальных контаминантов) водной среды и гидробионтов. Бактериологические исследования необходимы также для выявления вирулентных возбудителей заболеваний, опасных как для здоровья рыб, обитающих в водоемах, так и для человека.

Не являются редкими случаи неблагоприятного антропогенного влияния на природную среду. Наиболее значимым можно считать попадание в поверхностные водоемы и грунтовые воды используемых в избыточном количестве минеральных удобрений, сточных вод от промышленных объектов и предприятий коммунального хозяйства, в большинстве случаев –

недостаточно очищенных, а порой – и вовсе без очистки. Ущерб водоемам несут так же попадание в воду отходов из близлежащих свалок и несанкционированные сбросы мусора при стихийном возникновении производств.

Присутствие в микробиоценозе воды, а также у рыб с низким иммунофизиологическим статусом бактерий, не являющихся представителями нормофлоры водоёмов (БГКП с бронзовым блеском, высоковирулентные аэромонады, ацинетобактеры, моракселлы, энтерококки, цитробактер), может стать причиной возникновения инфекционных заболеваний не только у представителей ихтиофауны, но и у теплокровных, в том числе у человека [Кукин и др., 2018].

Отсутствие достоверной системы эпизоотического мониторинга естественных водоёмов является наиболее значимой проблемой для рыбохозяйственной отрасли. Под воздействием антропогенных факторов у рыб снижается общая резистентность к возбудителям болезней, следствием этого является возникновение вспышек инфекционных и инвазионных болезней и даже гибель рыб, и возникает опасность для здоровья людей. Мониторинговые бактериологические исследования воды и рыбы предполагают выявление общего микробного загрязнения, определения состава бактерий и выявление потенциально опасных для ихтиофауны и эпидемиологически значимых для населения микроорганизмов.

Качество воды, эпизоотическая и эпидемиологическая ситуация в водоемах являются составной частью их экологического состояния [Rijnsdorp et al., 2009].

Цель работы – оценить эпизоотическую ситуацию на естественных водоемах Московской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор проб воды и отлов рыбы для исследований осуществляли в весенне-осенний период 2019-2020 гг. из Икшинского, Пестовского, Пяловского, Клязьминского водохранилищ, группы Шатурских озер и озера Сенеж (рисунок 1) Московской области. Всего было отобрано 78 проб воды из 27 точек и 54 пробы паренхиматозных органов (печень, почки) от 27 рыб (таблица 1). Видовой состав обследованных рыб был представлен лещом, густерой, плотвой, красноперкой, окунем и судаком.

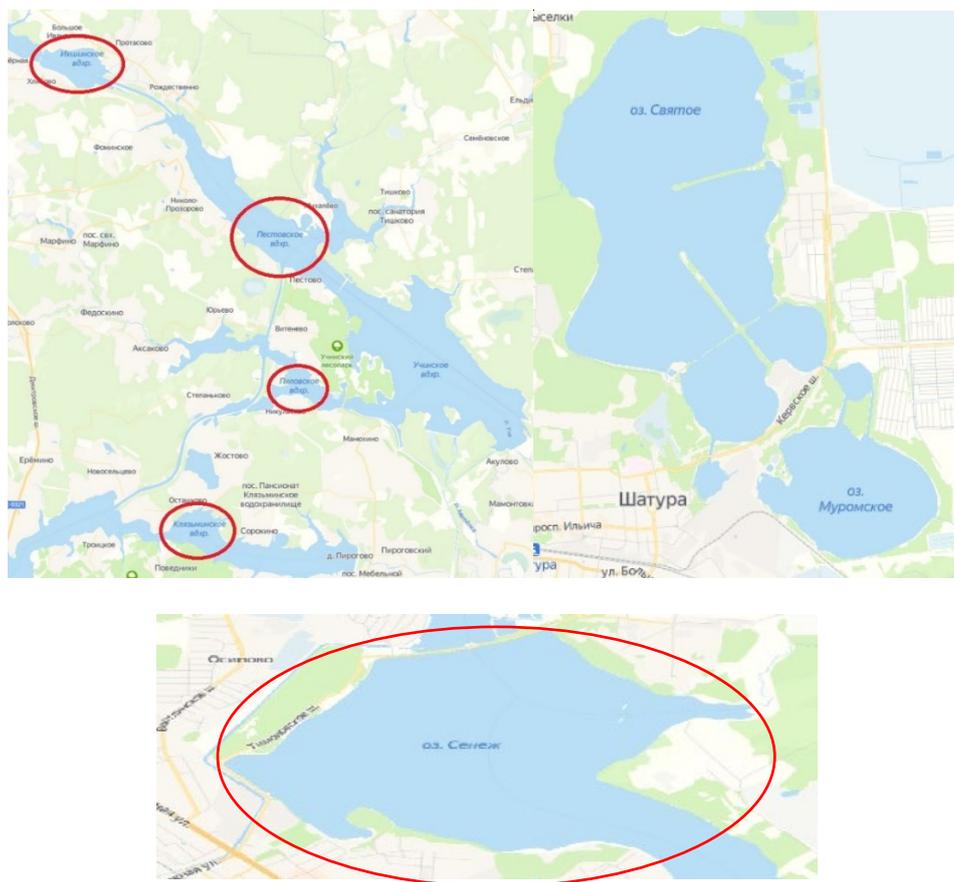


Рисунок 1 – Водные объекты, в которых проводились исследования

Таблица 1 – Количество исследованных проб воды и рыбы

Водные объекты	Количество точек отбора проб	Количество проб воды	Количество рыб
Икшинское вдхр.	3	12	6
Пестовское вдхр.	5	14	15
Пяловское вдхр.	3	10	-
Клязьминское вдхр.	3	9	-
оз. Сенеж	5	15	6
Шатурские озера	8	18	-
ВСЕГО	27	78	27

Количественный посев проб воды проводили на среды: эритритагар – для определения общего микробного числа (ОМЧ, КОЕ/мл), Эндо – для выявления энтеробактерий, в том числе бактерий группы кишечных палочек (БГКП), неферментирующих щелочеобразователей (НФЩ) – ацинетобактеров, моракселл, псевдомонад, Анакера-Ордала – для выявления миксобактерий и плесневых грибов, энтерококкагар – для выявления энтерококков, висмут-сульфитный агар – для выявления бактерий тифо-паратифозной группы (сальмонеллы) [Берджи, 1997; Головина и др., 2016].

На эти же среды осуществляли первичные посевы проб паренхиматозных органов – печени и почек рыб (при массовых исследованиях они являются

репрезентативными). Вирулентность (ДНКазную активность) выделенных из посевов аэромонад проверяли на чашках с ДНК-тест агаром по ширине зоны деполимеризации ДНК, мм (0 мм – авирулентные штаммы, 0 мм – авирулентные штаммы, 1,0-2,0 мм – слабовирулентные, 2,5-4,0 мм – вирулентные, > 4,0 мм – высоковирулентные штаммы) [Методические указания..., 1999; Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб, 1998].

На основании многолетних бактериологических исследований воды и рыбы, проведенных сотрудниками лаборатории ихтиопатологии, было установлено и подтверждено, что при значениях ОМЧ воды до 3000 КОЕ/мл (допустимые) рыба, обитающая в водоеме, не испытывает прессинга микробиоценоза. В случае усиления бактериальной нагрузки (увеличении ОМЧ) – при возрастании температуры, увеличении степени органического загрязнения, антропогенном влиянии и др. факторах патогены, присутствующие в воде, способны преодолевать защитные барьеры рыб и проникать в организм и кровяное русло. Это может создавать опасность снижения иммунно-физиологического статуса рыб и увеличивать вероятность возникновения болезни, а также усиливать подверженность рыб воздействию неблагоприятных факторов абиотической природы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В Икшинском водохранилище в зависимости от сезона года значения ОМЧ в исследованных пробах воды варьировали от 100 до 2160 КОЕ/мл, что не превышало допустимых значений бактериальной обсемененности воды для рыбохозяйственных водоемов. Микробиоценоз проб был представлен авирулентными и слабовирулентными аэромонадами с ДНКазной активностью 0-2,5 мм зоны деполимеризации ДНК, БГКП, энтерококками, стафилококками, ацинетобактерами, моракселлами, миксобактериями и сапрофитами. В посевах из органов 67% обследованных рыб (лещ, плотва) был выявлен единичный (≤ 10 КОЕ на чашке) и умеренный рост (от 11 до 100 КОЕ на чашке) бактерий – представителей микробиоценоза воды: моракселл, ацинетобактеров, слабовирулентных аэромонад и БГКП. Паренхиматозные органы 33% обследованных рыб (окунь) были свободны от бактериальной контаминации.

В Пестовском водохранилище значения ОМЧ в пробах воды в период проведения исследований находились в пределах нормы и составляли 60-1860 КОЕ/мл. Многократное превышение допустимых значений ОМЧ – до 52800 КОЕ/мл было зафиксировано в единственном случае – в пробе, отобранной осенью у д. Драчево, что, вероятно являлось следствием временного локального органического загрязнения воды в данной точке. Микробиоценоз воды представляли моракселлы, ацинетобактеры, аэромонады (от авирулентных до высоковирулентных с ДНКазной активностью ≥ 5 мм), БГКП, энтерококк, миксобактерии, плесневые грибы, бациллы, сапрофиты. Паренхиматозные органы 100% обследованных рыб из Пестовского водохранилища (густера, лещ, окунь, красноперка, плотва, судак) были контаминированы условно-патогенной водной микрофлорой: слабовирулентными аэромонадами, БГКП и

ацинетобактерами; характер бактериального роста на эритритагаре определялся от единичного до сливного, не поддающегося подсчету.

В Пяловском водохранилище в пробах воды значения ОМЧ в течение всего периода находились в допустимых пределах – от 100 до 700 КОЕ/мл. Микробиоценоз водной среды был представлен моракселлами, ацинетобактерами, миксобактериями, БГКП (в том числе, с бронзовым блеском – они являются санитарно-показательными микроорганизмами воды, указывающими на санитарное неблагополучие водоема), аэромонадами, ДНКазная активность которых имела значения от 0 до 3,5 мм зоны деполимеризации ДНК, бациллами и сапрофитами. Присутствие бацилл указывает на протекание в водоеме естественных процессов самоочищения.

На Клязьминском водохранилище значения ОМЧ в пробах в течение весенне-летнего периода были в пределах нормы – от 40 до 300 КОЕ/мл, в осенний период эти значения колебались от невысоких – 600 КОЕ/мл до многократно превышающих допустимые значения – 32960 КОЕ/мл. Микробиоценоз воды составляли БГКП, ацинетобактеры, моракселлы, аэромонады различной вирулентности (ДНКазная активность от 1,0 мм – слабовирулентные) до 7,0 мм (высоковирулентные), энтерококк, бациллы, миксобактерии, плесневые грибы и сапрофитная микрофлора.

В озере Сенеж в пробах воды значения ОМЧ находились в пределах от 60 до 4180 КОЕ/мл. Микробиоценоз водной среды был представлен аэромонадами с ДНКазной активностью 0-3,0 мм, БГКП, ацинетобактерами, моракселлами, шеванеллами, стафилококком, цитробактером, миксобактериями, плесневыми грибами и сапрофитами. В посевах паренхиматозных органов рыб был выявлен рост единичных колоний бактерий группы кишечных палочек и ацинетобактеров (*Ac. baumannii*, *Ac. calcoaceticus*) – на среде общего назначения – эритритагаре, а также в единственном случае – энтерококк.

В группе Шатурских озер в пробах воды значения ОМЧ варьировали от 20 до 12300 КОЕ/мл. Максимальные значения бактериологической обсемененности фиксировались в весенний период. В посевах из проб присутствовали аэромонады (ДНКазная активность от 0 до 3,5 мм), ацинетобактеры, моракселлы, псевдомонады, бациллы, БГКП (в том числе с бронзовым блеском), энтерококк, стафилококк, шеванеллы, флавобактерии, плесневые грибы и сапрофиты.

Уровень обсемененности проб воды из Икшинского и Пяловского водохранилищ в течение всего периода мониторинговых исследований не превышал допустимых значений ОМЧ для рыбохозяйственных водоемов. Наибольшие его значения отмечали летом.

На Пестовском и Клязьминском водохранилищах значения общего микробного числа исследованных проб увеличивались со сменой сезонов, наибольшие показатели ОМЧ, превышающие норму, были зафиксированы в осеннее время.

На Шатурских озерах и озере Сенеж максимальные показатели бактериологической обсемененности воды, превышающие допустимые значения, отмеченные в весенний период, уменьшались к осени (таблица 2).

Таблица 2 – Уровень обсемененности и микробиоценоз проб воды

Водные объекты	ОМЧ, КОЕ/мл			Микробиоценоз
	Весна	Лето	Осень	
Икшинское вдхр.	140 – 560	100 – 2160	320 – 840	<i>Moraxella</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp. (0-2,5), БГКП, <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Staphylococcus</i> sp., энтерококк, миксобактерии, сапрофиты
Пестовское вдхр.	60 – 480	60 – 1860	200 – 52800	<i>Moraxella</i> sp., <i>Ac. calcoaceticus</i> , <i>A. sp.</i> (0-6,0), <i>Ac. baumannii</i> , БГКП, <i>Bacillus</i> sp., энтерококк, миксобактерии, плесневые грибы, сапрофиты
Пяловское вдхр.	100 – 440	280 – 700	120 – 160	<i>Moraxella</i> sp., <i>Ac. calcoaceticus</i> , <i>Ac. baumannii</i> , миксобактерии, БГКП, <i>A. sp.</i> (0-3,5), <i>Bacillus</i> sp., сапрофиты
Клязьминское вдхр.	40 – 300	60 – 160	600 – 32960	БГКП, <i>Ac. calcoaceticus</i> , <i>Ac. baumannii</i> , <i>Moraxella</i> sp., <i>A. sp.</i> (1,0-7,0), <i>Bacillus</i> sp., энтерококк, миксобактерии, плесневые грибы, сапрофиты
оз. Сенеж	100 – 4180	320 – 3840	60 – 840	<i>A. sp.</i> (0-3,0), БГКП, <i>Ac. calcoaceticus</i> , <i>Ac. baumannii</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Moraxella</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp., миксобактерии, плесневые грибы, сапрофиты
Шатурские озера	20 – 12300	2100 – 5960	160 – 560	<i>A. sp.</i> (0-3,5), <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., БГКП, <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Ac. baumannii</i> , <i>Ac. calcoaceticus</i> , <i>Moraxella</i> sp., энтерококк, миксобактерии, плесневые грибы, сапрофиты

Примечание: (0) – ширина зоны деполимеризации ДНК, мм (0 мм – авирулентные штаммы, 1,0-2,0 мм – слабовирулентные, 2,5-4,0 мм – вирулентные, >4,0 мм – высоковирулентные штаммы).

В рамках эпизоотического мониторинга был проведен клинический осмотр и бактериологический анализ проб паренхиматозных органов (печень, почки) от рыб, выловленных из обследуемых водоемов.

Из Пестовского водохранилища были обследованы 15 рыб: густера – 6, лещ – 3, окунь – 3, красноперка, плотва, судак – по 1.

У густеры были отмечены клинические признаки: серповидное кровоизлияние в глаза – у 2 экз., гиперемия брюшка и нижнего края жаберной крышки – у 1 экз.; у 1 экз. обнаружена травма хвостового стебля. При исследовании паренхиматозных органов были зафиксированы патологические изменения в печени и почках: гидремичная печень – у 2-х рыб, темная, мажущая – у 1 рыбы, глинистого цвета – у 1 рыбы; гидремичные почки отмечены у 2-х рыб, рыхлые, мажущие – у 3-х. Лишь у двух экземпляров густеры печень и почки находились в состоянии, близком к норме. Селезенка у всех рыб не имела патологии. У леща клинические признаки – кровоизлияние в глаза (серповидное и круговое) присутствовали у 2-х рыб; печень, почки были в норме у 2-х экз., селезенка – у 3-х экз., мажущая печень – у 1 экз., мажущие почки – у 1 экз. У всех экземпляров окуня клинические признаки отсутствовали, отмечалась лишь гидремичность почек – у всех рыб. У красноперки при отсутствии клинических признаков наблюдались мажущие печень и почки. У плотвы были зафиксированы гидремичная, мажущая печень и отежные почки. У судака отсутствовали и клинические признаки, и патология паренхиматозных органов.

Органы почти у всех рыб всех видов были высоко контаминированы, в пробах отмечался умеренный и обильный рост преимущественно слабовирулентных аэромонад (таблица 3, рисунок 2).

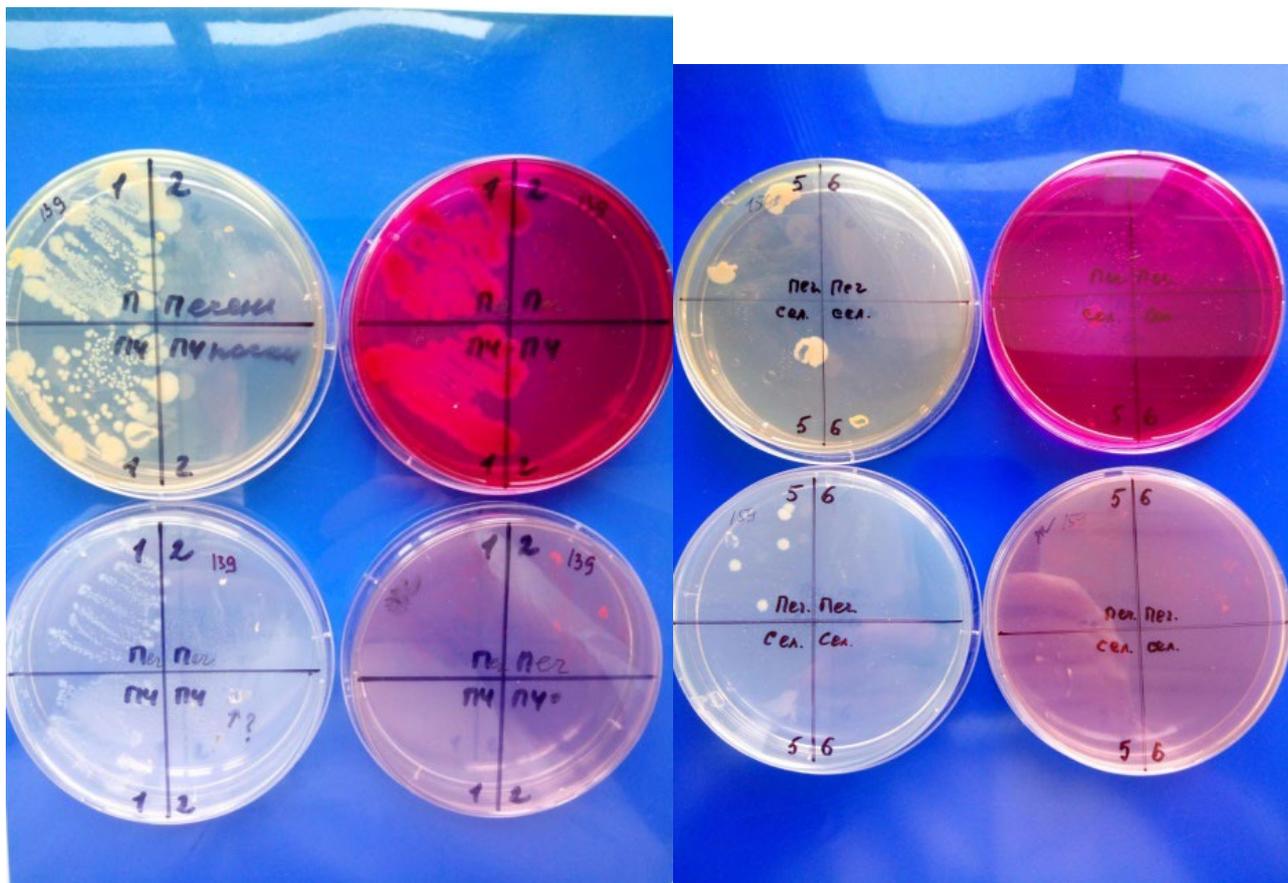


Рисунок 2 – Посевы проб паренхиматозных органов рыб на чашках Петри

Таблица 3 – Микробиоценоз паренхиматозных органов рыб из Пестовского вдхр.

Рыба	Орган	Уровень обсемененности					Микробиоценоз
		эритрит агар	Эндо	Анакера-Ордала	э/к	ВСА	
Густера	п	единичный	единичный	р/н	р/н	р/н	<i>Aeromonas</i> sp. (1,0-2,5)
	пч	р/н	р/н	р/н	р/н	р/н	не обнаружено
Густера	п	умеренный	единичный	р/н	р/н	р/н	<i>Aeromonas</i> sp. (1,0-2,5)
	пч	единичный	единичный	р/н	р/н	р/н	
Густера	п	сливной	сливной	р/н	р/н	р/н	<i>Aeromonas</i> sp. (1,5-2,0)
	пч	обильный	обильный	р/н	р/н	р/н	
Густера	п	обильный	обильный	р/н	р/н	р/н	<i>Aeromonas</i> sp. (1,5-2,0), БГКП
	пч	единичный	единичный	р/н	р/н	р/н	
Густера	п	умеренный	единичный	р/н	р/н	р/н	<i>Aeromonas</i> sp. (1,0-1,5)
	пч	умеренный	умеренный	р/н	р/н	р/н	
Густера	п	умеренный	умеренный	р/н	р/н	р/н	<i>Aeromonas</i> sp. (2,0)
	пч	умеренный	единичный	р/н	р/н	р/н	
Красноперка	п	умеренный	обильный	р/н	р/н	р/н	<i>Aeromonas</i> sp. (1,5-2,0)
	пч	единичный	умеренный	р/н	р/н	р/н	
Лещ	п	умеренный	единичный	р/н	р/н	р/н	<i>Aeromonas</i> sp. (1,0-2,0)
	пч	обильный	обильный	р/н	р/н	р/н	
Лещ	п	единичный	р/н	р/н	р/н	р/н	<i>Aeromonas</i> sp. (0)
	пч	единичный	р/н	р/н	р/н	р/н	
Лещ	п	умеренный	умеренный	р/н	р/н	р/н	<i>Aeromonas</i> sp. (1,5-2,0)
	пч	умеренный	умеренный	р/н	р/н	р/н	
Окунь	п	обильный	умеренный	р/н	р/н	р/н	<i>Aeromonas</i> sp. (1,5-2,0), БГКП
	пч	р/н	р/н	р/н	р/н	р/н	не обнаружено
Окунь	п	обильный	обильный	р/н	р/н	р/н	<i>Aeromonas</i> sp. (0-2,0), БГКП
	пч	умеренный	умеренный	р/н	единичный	р/н	
Окунь	п	единичный	умеренный	р/н	р/н	р/н	<i>Aeromonas</i> sp. (2,0)
	пч	р/н	р/н	р/н	р/н	р/н	не обнаружено
Плотва	п	обильный	обильный	р/н	р/н	р/н	<i>Aeromonas</i> sp. (2,0-2,5)
	пч	умеренный	умеренный	р/н	р/н	р/н	
Судак	п	единичный	р/н	р/н	р/н	р/н	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ,
	пч	единичный	р/н	р/н	р/н	р/н	<i>Acinetobacter baumannii</i>

Примечание: э/к – энтерококкагар, ВСА – висмут-сульфитный агар, п – печень, пч – почка, р/н – роста нет, единичный рост – ≤10 колоний на чашке; умеренный рост – 11-100 колоний на чашке, обильный рост – более 100 колоний на чашке; **(1,0)** – ширина зоны деполимеризации ДНК, мм, (0 мм – авирулентные штаммы, 1,0-2,5 мм – слабовирулентные штаммы).

Проведенные клинический осмотр и бактериологический анализ печени и почек у 6 рыб из озера Сенеж (судак – 3, лещ – 2, плотва – 1) выявили

отсутствие клинических признаков и патологических изменений органов только у лещей. У плотвы отмечались гиперемия и ерошение чешуи на хвостовом стебле; у 2-х экземпляров судака было выявлено воспаление ануса с истечением выделений желтого цвета – в одном из случаев.

В посевах проб органов судака и плотвы был выявлен единичный рост колоний ацинетобактеров и БГКП. Печень и почки леща были свободны от бактериальных контаминантов (таблица 4).

Таблица 4 – Микробиоценоз паренхиматозных органов рыб из оз. Сенеж

Рыба	Орган	Уровень обсемененности					Микробиоценоз
		эритрит агар	Эндо	Анакера-Ордала	э/к	ВСА	
Лещ	п	р/н	р/н	р/н	р/н	р/н	не обнаружено
	пч	р/н	р/н	р/н	р/н	р/н	
Лещ	п	р/н	р/н	р/н	р/н	р/н	не обнаружено
	пч	р/н	р/н	р/н	р/н	р/н	
Плотва	п	единичный	единичный	р/н	единичный	р/н	БГКП, энтерококк
	пч	р/н	р/н	р/н	р/н	р/н	
Судак	п	единичный	р/н	р/н	р/н	р/н	<i>Ac. baumannii</i>
	пч	р/н	р/н	р/н	р/н	р/н	
Судак	п	единичный	р/н	р/н	р/н	р/н	<i>Ac. calcoaceticus</i> , <i>Ac. baumannii</i> , БГКП
	пч	единичный	р/н	р/н	р/н	р/н	
Судак	п	единичный	р/н	р/н	р/н	р/н	<i>Ac. calcoaceticus</i> , <i>Ac. baumannii</i> , БГКП
	пч	единичный	р/н	р/н	р/н	р/н	

Примечание: э/к – энтерококкагар, ВСА – висмут сульфитный агар, п – печень, пч – почка, р/н – роста нет, единичный рост – ≤ 10 колоний на чашке.

У 6 рыб из Икшинского водохранилища (окунь – 2, лещ – 2, плотва – 2) клинические признаки отсутствовали у всех рыб всех видов. Патологические изменения органов были выявлены у 1 окуня – гидремичность почек, у лещей – рыхлость и гидремичность почек (у 2-х экз.), рыхлая, мажущая печень (у 1 экз.), у плотвы – рыхлая, мажущая печень (у 1 экз.).

Степень бактериальной контаминации печени и почек леща и плотвы варьировала от единичных колоний (≤ 10 колоний) до умеренного роста (11 – 100 колоний на чашке) на средах. Наличие в посевах условно-патогенных микроорганизмов: ацинетобактеров, слабовирулентных аэромонад, бактерий группы кишечной палочки, шеванелл, а также сапрофитов отражало сниженный иммуно-физиологический статус данных видов рыб. В материалах от окуня рост бактериальной флоры отсутствовал (таблица 5).

Таблица 5 – Микробиоценоз паренхиматозных органов рыб из Икшинского вдхр.

Рыба	Орган	Уровень обсемененности					Микробиоценоз
		эритрит агар	Эндо	Анакера - Ордала	э/к	ВСА	
Окунь	п	р/н	р/н	р/н	р/н	р/н	не обнаружено
	пч	р/н	р/н	р/н	р/н	р/н	
Окунь	п	р/н	р/н	р/н	р/н	р/н	не обнаружено
	пч	р/н	р/н	р/н	р/н	р/н	
Лещ	п	умеренный	единичный	р/н	р/н	р/н	<i>Moraxella</i> sp., <i>Ac. calcoaceticus</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , сапрофиты
	пч	умеренный	единичный	р/н	р/н	р/н	
Лещ	п	умеренный	единичный	р/н	р/н	р/н	<i>Ac. calcoaceticus</i> , <i>Ac. baumannii</i> , <i>Aeromonas</i> sp. (1,0), БГКП, сапрофиты, плесневые грибы
	пч	единичный	единичный	р/н	р/н	р/н	
Плотва	п	умеренный	р/н	р/н	р/н	р/н	<i>Ac. calcoaceticus</i> , сапрофиты
	пч	р/н	р/н	р/н	р/н	р/н	
Плотва	п	единичный	р/н	р/н	р/н	р/н	<i>Ac. calcoaceticus</i> , <i>Ac. baumannii</i> , <i>A. sp.</i> (2,0;2,5), сапрофиты
	пч	единичный	р/н	р/н	р/н	р/н	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В течение всего периода обследования на большинстве водоемов Московской области отмечались факторы, указывающие на напряженную эпизоотическую ситуацию. Значения ОМЧ в пробах воды из различных точек отбора значительно варьировали и составляли от 20 до 52800 КОЕ/мл.

Микробиоценоз исследованных проб воды был представлен патогенными и условно-патогенными для рыб микроорганизмами: аэромонадами разных видов с различной вирулентностью (от авирулентных до высоковирулентных), псевдомонадами, неферментирующими щелочеобразующими бактериями (ацинетобактерами, моракселлами, шеванеллами), бактериями группы кишечной палочки, бациллами, стафилококками, энтерококками, цитробактером, миксобактериями, флавобактериями, плесневыми грибами, а также сапрофитной микрофлорой. Многие из выделенных бактерий, имеют как эпизоотическое, так и эпидемиологическое значение.

Удовлетворительные по степени бактериального загрязнения пробы воды были отобраны на Икшинском и Пяловском водохранилищах, где значения ОМЧ не превышали допустимых значений в течение всего периода обследования.

При этом у 67% рыб из Икшинского водохранилища была выявлена незначительная и умеренная контаминация внутренних органов бактериями –

представителями микробиоценоза воды. У 33% обследованных рыб паренхиматозные органы были свободны от бактериальной контаминации.

В Пестовском водохранилище внутренние органы у 100% обследованных рыб были контаминированы условно-патогенной водной микрофлорой в различной степени – от слабой до обильной.

В посевах паренхиматозных органов рыб из озера Сенеж были выделены единичные условно-патогенные бактерии.

Анализ результатов бактериологических исследований проб воды и проб внутренних органов рыб из естественных водоемов Московской области отразил неравномерный характер влияния сезонности и антропогенного воздействия на уровень бактериологического загрязнения водной среды и гидробионтов.

Для рационального использования этих водоемов необходимо продолжить углубленное всестороннее изучение состояния и среды обитания водных биологических ресурсов для оценки тенденций и динамики происходящих изменений.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Головина Н.А, Авдеева Е.В., Евдокимова Е.Б., Казимирченко О.В., Котлярчук М.Ю. 2016. Практикум по ихтиопатологии: учебное пособие. – М.: МОРКНИГА. – 417 с.

Кукин М. С., Токарева С. Б., Юхименко Л. Н., Дружинина А. А. 2018. Микробиоценоз воды и рыбы как показатель экологической ситуации на водоемах // Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры: сборник науч. тр. – Вып. 89. – М. – С. 32–44.

Методические указания, по санитарно-бактериологической оценке, рыбохозяйственных водоемов, утв. Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода РФ от 27 сентября 1999 г. N 13-4-2/1742

Хоулт Дж., Криг Н., Снит П. 1997. Определитель бактерий Берджи. Москва: – Мир. – Том 1. 9-е изд. – 429 с.

Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. Часть 1. – М.: Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998. – 310 с.

Rijnsdorp A.D, Peck M.A., Engelhard G.H., Mollmann C., Pinnegar J.K. 2009. Resolving the effect of climate change on fish populations // ICES Journal of Marine Science. – Vol. 66. – Pp. 1570-1583.

SEASONAL CHARACTERISTICS OF MICROBIOCENOSIS OF WATER AND FISH RESERVOIRS OF THE MOSCOW REGION

A.S. Safronova¹, M.S. Kukin², S.B. Tokareva³, O.V. Sekhina³

¹*Russian State Agrarian University –K.A.Timiryazev Agricultural Academy (RGAU-K.A.Timiryazev Agricultural Academy)*

²*GOROS21.RU - Russian chemical and pharmaceutical company*

³*Branch for the Freshwater Fisheries of VNIRO («VNIIPRKh»)*

E-mail: anya-vovk-97@mail.ru

Abstract. The paper presents the epizootic situation in the natural reservoirs of the Moscow region - Ikshinsky, Pestovsky, Pyalovsky, Klyazma reservoirs, Shatura lakes and Lake Senezh. Water sampling and fishing for research were carried out in the spring-autumn period of 2019 – 2020. During the entire examination period, the values of the total microbial number in water samples ranged from 20 to 52,800 CFU/ml. Microbiocenosis was represented by pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms for fish. Many of the isolated bacteria had both epizootic and epidemiological significance. Contamination with opportunistic bacteria was detected in the internal organs of fish. As a result of the work carried out, results were obtained that will allow us to outline ways for further research and development of measures to improve the habitat of aquatic biological resources in the reservoirs of the Moscow region.

Keywords: bacteriological analysis, water, reservoirs, microbiocenosis, Moscow region, fish, epizootic situation.

ЗООПЛАНКТОН ПРОНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА В 2023 Г.

Д.Ю. Тюлин, А.И. Никитенко, И.А. Жернаков, Г.И. Христенко, С.С. Ерёмкин
Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО»
(«ВНИИПРХ»)
E-mail: hidra@vniiprh.ru

Целью настоящей работы являлось исследование зоопланктона Пронского водохранилища в 2023 г. Отбор и обработку гидробиологических проб зоопланктона выполняли по общепринятым методикам на шести станциях учёта. Всего в Пронском водохранилище в 2023 г. было выявлено 29 таксонов зоопланктона: 16 таксонов коловраток, 7 таксонов ветвистоусых и 6 таксонов веслоногих. Из коловраток на всех станциях присутствовали виды *Brachionus angularis*, *Asplanchna priodonta*, *Trichocerca elongata*, *Keratella quadrata*, *Keratella cochlearis* (только в осенних пробах), *Kellicottia longispina*, а также – коловратки рода *Polyarthra*, из ветвистоусых – рачки родов *Bosmina* и *Daphnia*, а кроме того – рачок вида *Chydorus sphaericus*, из веслоногих – представители отряда Cyclopoida. Наиболее высокие численность и биомасса зоопланктона в Пронском водохранилище (928,1 тыс. экз/м³ и 3,41 г/м³ в среднем) отмечены летом, наиболее низкие – весной (73,8 тыс. экз/м³ и 0,29 г/м³ в среднем). В целом по водохранилищу, если брать средние значения за все сезоны, доминировали коловратки (261,3 тыс. экз/м³ и 0,7 г/м³), субдоминировали веслоногие (105,2 тыс. экз/м³ и 0,4 г/м³). При этом ветвистоусые (39,6 тыс. экз/м³ и 0,6 г/м³) субдоминировали по биомассе. Согласно классификации Пидгайко, Пронское водохранилище по показателю зоопланктона за вегетационный сезон 2023 г. может быть охарактеризовано как средnekормный водоём. При этом в весенний период Пронское водохранилище было малокормным водоёмом, в летний период имело кормность выше средней, а в осенний – среднюю.

Ключевые слова: Пронское водохранилище, естественная кормовая база, зоопланктон, коловратки, ветвистоусые, веслоногие, кормность водоёма

ВВЕДЕНИЕ

Естественная кормовая база является одним из важнейших факторов, определяющих эффективность воспроизводства рыб. На это обстоятельство указывают как отечественные, так и зарубежные учёные [Nelson, Walburg, 1977; Beck et al., 2001; Atabak, 2011; Чавычалова, 2013]. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что для большинства рыб на ранних стадиях онтогенеза зоопланктон оказывается практически единственной доступной по размерам пищей [Науменко и др., 2020; Decima, 2022]. С другой стороны, зоопланктон влияет на биомассу фитопланктона, являющегося

основой трофической пирамиды водоёма [Панасенко и др., 2020]. При этом от фитопланктона зависит кислородный режим водной экосистемы. Количество кислорода, поступающего из атмосферы воздуха, в сотни раз меньше количества кислорода, выделяемого фитопланктоном. Отдельно следует отметить, что физические и химические свойства водоёма, его трофность и кормность могут различаться даже в пределах одного озера [Пронина и др., 2016].

Целью настоящей работы являлось исследование зоопланктона Пронского водохранилища в 2023 г. Ранее аналогичных исследований в данной акватории не проводилось. Таким образом, работа представляется актуальной и содержащей научную новизну.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Отбор и обработка гидробиологических проб зоопланктона выполнялись по общепринятым методикам [Методика изучения ..., 1975; Винберг, Лаврентьева, 1982] на Пронском водохранилище весной, летом и осенью 2023 г. на шести станциях учёта. Первые две станции расположены в нижней части водоёма, отделённой от верхней узким перешейком (рисунок 1). Пробы отбирали батометром Паталаса, ёмкостью 6 литров, с последующим процеживанием сетью Джели из газ-сита № 49, фиксировали 4% раствором формалина. Далее пробы просматривали под бинокулярным микроскопом Микромед МС-4-ZOOMLED в камере Богорова. Захват изображения с бинокуляра производился при помощи видеоокуляра TourCam UCMOS05100KPA, длину планктонных организмов измеряли при помощи прилагающейся программы TourView. Для установления таксономической принадлежности организмов использовали бинокулярный микроскоп Микромед 3 вар. 3-20 и определитель [Цалолихин, 2004].

Для исследования доминирования среди таксонов зоопланктона рассчитывали индекс доминирования по Бродской и Зенкевичу [Количественные методы ..., 2005] по формуле:

$$ID = \sqrt{B * P}$$

где В – биомасса, г/м², Р – встречаемость, %.

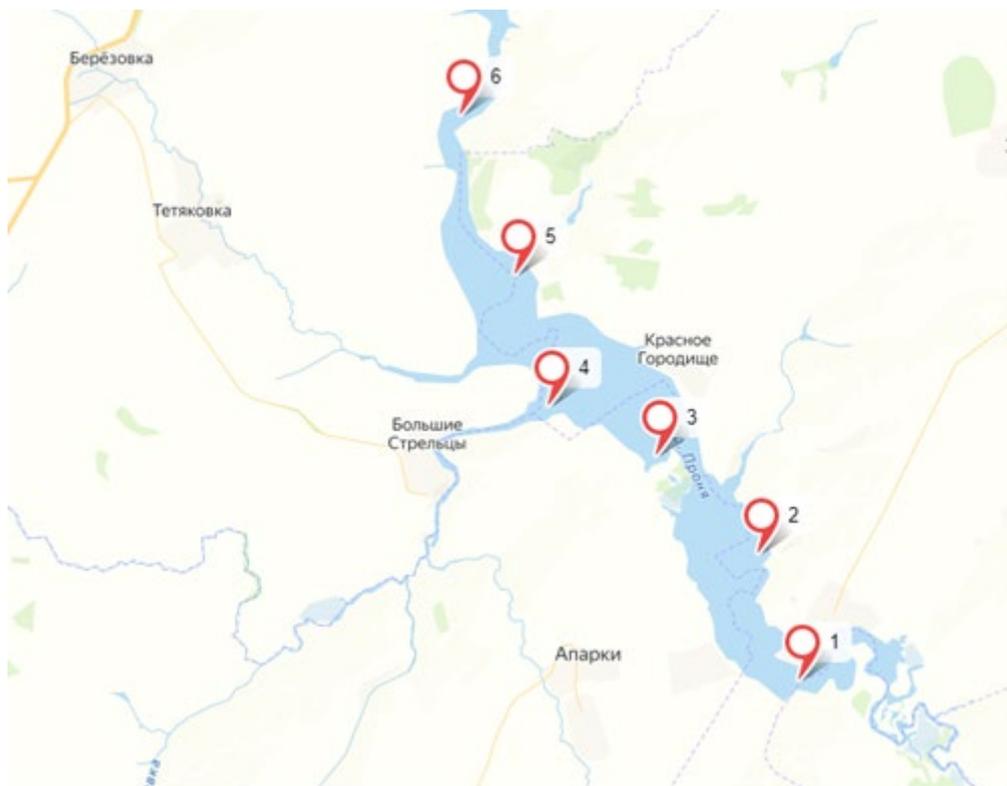


Рисунок 1 – Карта-схема отбора проб зоопланктона на Пронском водохранилище в 2023 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Абиотические условия на станциях отбора проб, расположенных в нижней части Пронского водохранилища (станции 1 и 2) и в его верхней части (станции 3, 4, 5 и 6) были различны.

Станции нижней части водоёма характеризовались более низкими значениями температуры воды у поверхности летом (24,3°C) и осенью (16,5-16,7°C) и более высокими – весной (12,8–13,4°C), в сравнении с верхней частью. В целом, в период отбора проб, наиболее низкие температуры приходится на весну, вместе с повышением температуры падает средняя по водохранилищу концентрация кислорода в воде (от 6,5 мг O₂/л у поверхности в летний период до 17,7 мг O₂/л у поверхности в весенний период). Распределение температуры на поверхности воды и концентрации кислорода в воде по станциям в различные сезоны 2023 г. отражены в таблице 1.

Всего в Пронском водохранилище в 2023 г. было выявлено 29 таксонов зоопланктона: 16 таксонов коловраток, 7 таксонов ветвистоусых и 6 таксонов веслоногих. Таксономический состав зоопланктона оказался сходным для разных станций водохранилища. Из коловраток на всех станциях присутствовали виды *Brachionus angularis*, *Asplanchna priodonta*, *Trichocerca elongata*, *Keratella quadrata*, *Keratella cochlearis* (только в осенних пробах), *Kellicottia longispina*, а также – коловратки рода *Polyarthra*. Коловратки рода *Notholca* обнаружены лишь в верхней части водохранилища в осенних пробах. Коловратки вида *Filinia longiseta* обнаружены лишь в весенних пробах, а вида *Brachionus diversicornis* – лишь в осенних пробах на первой станции.

Таблица 1 – Температура на поверхности воды и концентрация кислорода в воде на Пронском водохранилище в 2023 г. в период отбора проб

№ станции	Температура, °С	О ₂ , мг/л	
		Дно	Поверхность
Весна			
1	13,4	13,2	14,5
2	12,8	14,7	15,9
3	10,5	13,6	15,6
4	10,7	12,9	13,9
5	12,1	17,0	17,7
6	12,2	15,7	16,9
<i>В среднем</i>	<i>12,0</i>	<i>14,5</i>	<i>15,8</i>
Лето			
1	24,3	6,7	6,6
2	24,3	6,6	6,5
3	24,9	8,4	8,4
4	24,9	10,1	10,0
5	25,3	10,6	10,0
6	26,1	11,6	10,4
<i>В среднем</i>	<i>25,0</i>	<i>9,0</i>	<i>8,7</i>
Осень			
1	16,5	10,8	10,8
2	16,7	11,4	11,4
3	17,1	12,0	12,0
4	17,2	10,1	10,1
5	17,5	13,8	13,8
6	18,2	14,3	14,3
<i>В среднем</i>	<i>17,2</i>	<i>12,1</i>	<i>12,1</i>

Из ветвистоусых на всех станциях отмечены рачки родов *Bosmina* и *Daphnia*, а также – рачок вида *Chydorus sphaericus*. Рачки рода *Alona* обнаружены лишь в весенний период на первой станции, расположенной в нижней части водохранилища. На четырёх станциях из шести обнаружен крупный ветвистоусый рачок вида *Leptodora kindtii*. Веслоногие были представлены отрядами Cyclozoidea, Calanoidea и Harpacticzoidea. Cyclozoidea обнаружены на всех станциях, Calanoidea и Harpacticzoidea – лишь в верхней части водохранилища, в осенних пробах (таблица 2).

Таблица 2 – Таксономическое распределение наиболее распространённых зоопланктонных организмов на Пронском водохранилище в 2023 г. по станциям

Таксон	№ станции					
	1	2	3	4	5	6
Rotifera	+	+	+	+	+	+
<i>Brachionus calyciflorus</i>	+	+	+	+	-	+
<i>Brachionus angularis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Brachionus diversicornis</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Asplanchna priodonta</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Trichocerca elongata</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Polyarthra sp.</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Keratella quadrata</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Keratella cochlearis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Filinia longiseta</i>	-	+	-	-	-	+
<i>Kellicottia longispina</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Notholca sp.</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Philodina sp.</i>	-	-	+	-	-	-
Cladocera	+	+	+	+	+	+
Chydoridae	+	+	+	+	+	+
<i>Chydorus sphaericus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Alona sp.</i>	+	-	-	-	-	-
Bosminidae	+	+	+	+	+	+
Daphniidae	+	+	+	+	+	+
Moinidae	+	-	+	+	+	+
Sididae	+	-	+	+	+	+
Leptodoridae	+	+	+	-	+	-
<i>Leptodora kindtii</i>	+	+	+	-	+	-
Copepoda	+	+	+	+	+	+
Cyclopoida	+	+	+	+	+	+
Calanoida	-	-	+	+	+	+
Harpacticoida	-	-	-	-	+	+
Nauplii	+	+	+	+	+	+

Наиболее высокая численность зоопланктона в Пронском водохранилище (928,1 тыс. экз/м³ в среднем) отмечена летом, наиболее низкая – весной (73,8 тыс. экз/м³ в среднем). Доминировали по численности во все сезоны коловратки, субдоминировали веслоногие (рисунок 2).

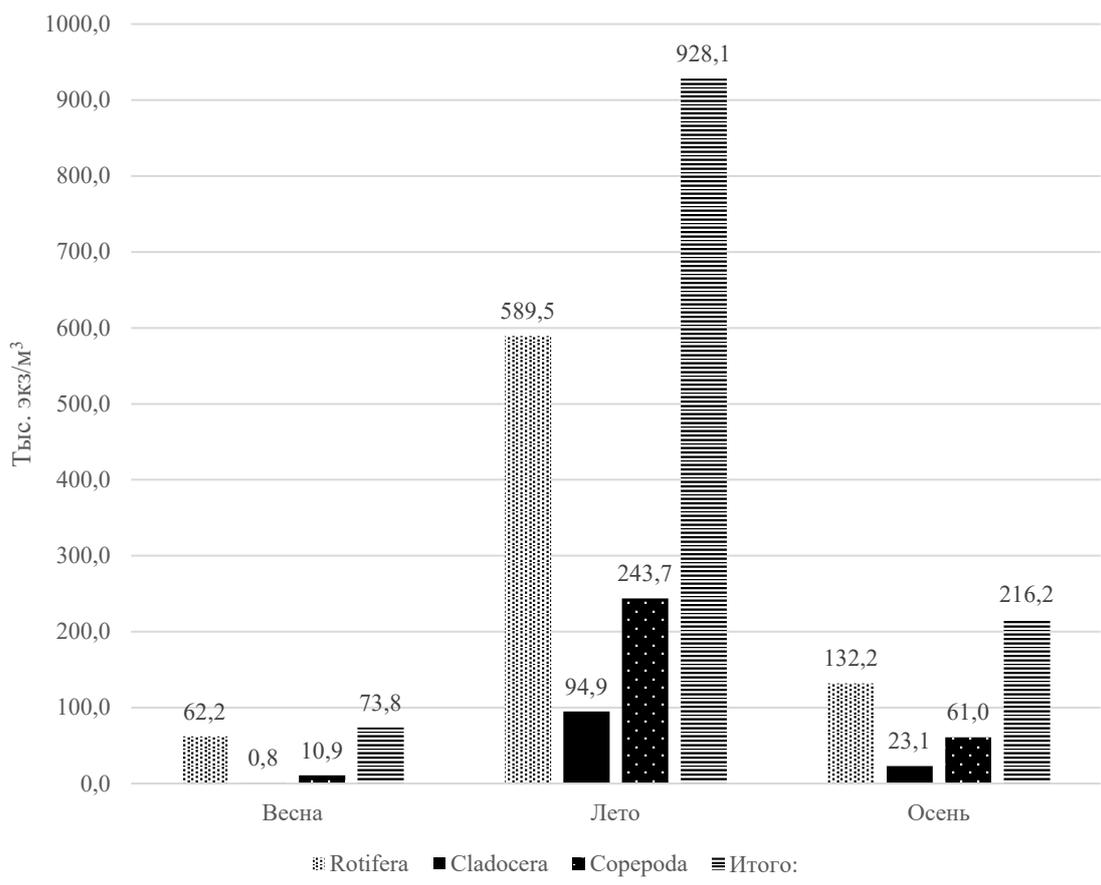


Рисунок 2 – Численность зоопланктона в Пронском водохранилище в 2023 г.

Наиболее высокая биомасса зоопланктона также отмечена в летний период (3,41 г/м³ в среднем), а наиболее низкая – весной (0,29 г/м³ в среднем). Доминировали по биомассе весной и осенью коловратки, летом – ветвистоусые. Субдоминировали по биомассе весной и летом веслоногие, осенью – ветвистоусые (рисунок 3).

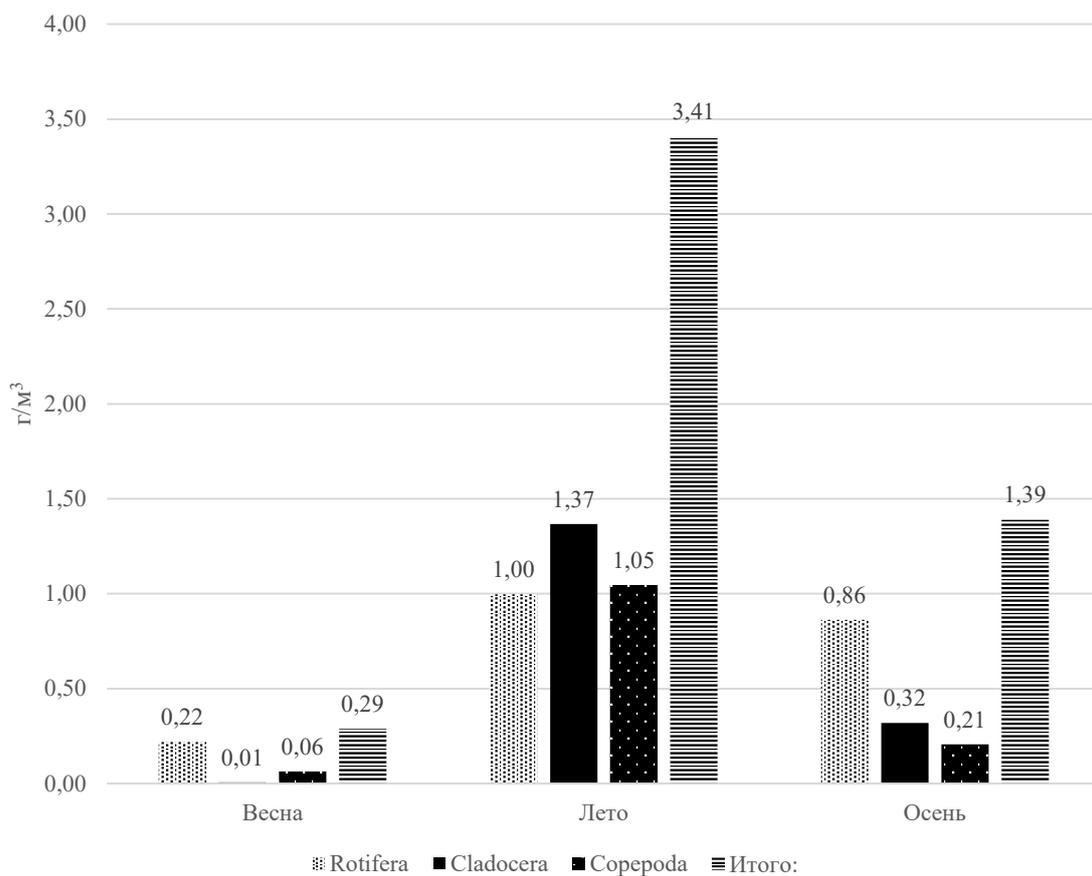


Рисунок 3 – Биомасса зоопланктона в Пронском водохранилище в 2023 г.

В летний период численность зоопланктона значительно различалась в нижней и верхней части Пронского водохранилища. Высокая средняя численность в нижней части водоёма (1631,4 тыс. экз/м³) в летний период возникла, в первую очередь, из-за массового размножения коловраток вида *Brachionus angularis* (1527,2 тыс. экз/м³ в среднем), но также – из-за веслоногих (418,6 тыс. экз/м³ в среднем) и ветвистоусых (303,8 тыс. экз/м³ в среднем) рачков. В верхней части водохранилища средняя численность зоопланктона в летний период составила: для коловраток – 68,6 тыс. экз/м³, для веслоногих – 156,2 тыс. экз/м³, для ветвистоусых – 74,4 тыс. экз/м³. Средняя биомасса основных групп зоопланктона летом также оказалась выше для нижней части Пронского водохранилища: для коловраток – 1,5 г/м³ в нижней и 0,7 г/м³ в верхней, для веслоногих – 1,6 г/м³ в нижней и 0,8 г/м³ в верхней, для ветвистоусых – 2,1 г/м³ в нижней и 1,0 г/м³ в верхней.

В целом по водохранилищу, если брать средние значения за все сезоны, в 2023 г. доминировали коловратки (261,3 тыс. экз/м³ и 0,7 г/м³), субдоминировали веслоногие (105,2 тыс. экз/м³ и 0,4 г/м³). При этом ветвистоусые (39,6 тыс. экз/м³ и 0,6 г/м³) субдоминировали по биомассе (таблица 3).

Таблица 3 – Средняя численность и биомасса зоопланктона Пронского водохранилища в 2023 г.

Таксон	Численность, тыс. экз./м ³	Биомасса, г/м ³	ID
<i>Rotifera</i>	261,3	0,7	6,7
<i>Cladocera</i>	39,6	0,6	2,3
<i>Copepoda</i>	105,2	0,4	3,4
Зоопланктон в целом	406,1	1,7	-

Согласно классификации Пидгайко (1968), Пронское водохранилище по показателю зоопланктона за вегетационный сезон 2023 г. может быть охарактеризовано как средnekормный водоём. При этом в весенний период Пронское водохранилище было малокормным водоёмом, в летний период имело кормность выше средней, а в осенний – среднюю. Первую станцию в летний период следуют охарактеризовать даже как высококормную (7,3 г/м³).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пронское водохранилище в 2023 г. по показателю зоопланктона являлось средnekормным водоёмом, что должно удовлетворять рыбохозяйственные потребности. Летом численность и биомасса зоопланктона по всем основным группам зоопланктона (коловратки, ветвистоусые и веслоногие) была выше для нижней части водохранилища, отделённой от верхней узким перешейком. Верхняя и нижняя части водоёма различаются по видовому составу зоопланктона. Очевидно, абиотические факторы определяют численность и биомассу зоопланктона. Среди этих факторов – температура воды и зависящая от неё концентрация растворённого кислорода в воде.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Винберг Г.Г. Методические рекомендации по сбору и обработке материалов при гидробиологических исследованиях на пресноводных водоемах. Зоопланктон и его продукция / Г.Г. Винберг, Г.М. Лаврентьева. // Л.: ГосНИОРХ. – Зоолог. ин-т АН СССР. – 1982. – 33 с.

Количественные методы экологии и гидробиологии (сборник научных трудов, посвящённый памяти А.И. Баканова) / Тольятти: СамНЦ РАН. – 2005. – 412 с.

Методика изучения биоценозов внутренних водоёмов / под ред. Ф.Д. Мордухай-Болтовского. – М.: Наука. – 1975. – 240 с.

Науменко Е.Н. Питание сеголеток рыб Куршского залива Балтийского моря в 2016 году / Е.Н. Науменко, А.Ю. Ушакова, Т.А. Голубкова // Труды ВНИРО. – 2020. – Т. 179. – С. 60-77.

Панасенко Н.Д. Обработка и усвоение данных космического зондирования для осуществления мониторинга текущего состояния

разнородных объектов на поверхности водоемов / Н.Д. Панасенко, А.М. Атаян, Н.С. Мотуз // Инженерный вестник Дона. – 2020. – №12. – URL: ivdon.ru/ru/magazine/archive/n12y2020/6701 (дата обращения: 11.09.2023).

Пидгайко М.Л. Краткая биолого-продукционная характеристика водоемов Северо-Запада СССР / М.Л. Пидгайко, Б.А. Александров, Ц.И. Иоффе, А.А. Салазкин // Известия ГосНИОРХ. – Л. – 1968. – Т. 67. – С. 205–225.

Пронина Г.И. Воздействие фитопланктона на кислородный режим рыбохозяйственного водоема в условиях низких температур / Г.И. Пронина, Н.Ю. Корягина, П.В. Терентьев // Вестник Астраханского ГТУ. – 2016. – № 1. – С. 52–61.

Цалолихин С.Я. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий / С.Я. Цалолихин. – СПб.: Наука. – 2004. – 528 с.

Чавычалова Н.И. Современные проблемы естественного воспроизводства рыб в низовьях Волги / Н.И. Чавычалова. // Инженерно-строительный вестник Прикаспия. – Астрахань: АГТУ. – 2013. – № 2 (5). – С. 80-87.

Atabak N. Survey on natural feeding of Juvenile *Cynoglossus arel* and *Solea elongata* fishes (Cynoglossidae and Soleidae) in the northwest of Persian Gulf coastal water /N. Atabak// Fisheries Research. – 2011. – № 108. – P. 9–14.

Beck M.W. The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates / M.W. Beck, K.L. Heck, K.W. Able [et al.] // Bioscience, 2001. – № 51. – P. 633-641.

Decima M. Zooplankton trophic structure and ecosystem productivity / M. Decima// Marine ecology progress series. – 2022. – Vol. – P. 23–42.

Nelson W.R. Population dynamics of yellow perch (*Perca flavescens*), sauger (*Stizostedion canadense*), and walleye (*S. vitreum vitreum*) in four main stem Missouri River reservoirs /W.R. Nelson, C.H. Walburg// J. Fish. Res, 1977. – Board Can. 34 (10). – P. 1748–1763.

ZOOPLANKTON OF THE PRONSKOYE RESERVOIR IN 2023

D.Yu. Tyulin, A.I. Nikitenko, I.A. Zhernakov, G.I. Kristenko, S.S. Eremkim
Branch for the Freshwater Fisheries of VNIRO («VNIIPRKh»)
E-mail: hidra@vniiprh.ru

Abstract. The purpose of this study was to investigate the zooplankton of Pronskoye reservoir in 2023. Zooplankton hydrobiological sampling and processing were carried out according to standard methods at Pronskoye Reservoir in 2023 at six audit stations. A total of 29 zooplankton taxa were identified: 16 *rotifer* taxa, 7 taxa of *cladocerans*, and 6 taxa of copepods. Among the *rotifers*, species like *Brachionus angularis*, *Asplanchna priodonta*, *Trichocerca elongata*, *Keratella quadrata*, *Keratella cochlearis* (only in autumn samples), *Kellicottia longispina* was present at all stations, also *rotifers* of the genus *Polyarthra*, among *cladocerans* – crustaceans of the genera *Bosmina* and *Daphnia*, and also crustacean species *Chydorus sphaericus*, among *copepods* – representatives of the *Cyclopoida* order. The highest abundance and biomass of zooplankton in Pronskoye Reservoir (928,1 thousand ind/m³ and 3,41 g/m³ on average) were observed in summer, the lowest – in spring (73,8 thousand ind/m³ and 0,29 g/m³ on average). In general, taking the average values for all seasons, *rotifers* dominated (261,3 thousand ind/m³ and 0,7 g/m³), *copepods* subdominated (105,2 thousand ind/m³ and 0,4 g/m³). *Cladocerans* (39,6 thousand ind/m³ and 0,6 g/m³) subdominated by biomass. According to Pidgayko's classification, Pronskoye Reservoir, in terms of the zooplankton indicator for the growing season of 2023, can be characterized as an average fodder body of water. Meanwhile, in the spring period, Pronskoye Reservoir was a low-feed water body, in the summer it had above-average feed, and in the autumn it had average.

Keywords: Pronskoye Reservoir, natural food base, zooplankton, rotifers, cladocerans, copepods, productivity of the water body.

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ДИНАМИКА ЗАПАСОВ
ПРОМЫСЛОВЫХ ВИДОВ РЫБ РЕКИ ДНЕПР.
1. СЕМЕЙСТВО КАРПОВЫЕ CYPRINIDAE**

А.И. Никитенко¹, Д.В. Горячев¹, Н.Н. Клец¹, И.В. Зингис¹, А.С. Назаров¹,
В.А. Карпов¹, В.Ю. Жарикова^{1,2}

¹Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО»
(«ВНИИПРХ»)

²Дмитровский рыбохозяйственный технологический институт (филиал)
Астраханский государственный технический университет (ДРТИ АГТУ)
E-mail: alexey_nikitenko90@mail.ru, wbr@vniiprh.ru

По результатам исследований 2019-2022 гг. выделены массовые рыбы реки Днепр. Из 16 видов, отмеченных в сетных уловах, 6 видов, принадлежащих к трём семействам, являлись массовыми, среди которых абсолютно доминировали рыбы семейства карповые (Cyprinidae). Для леща *Abramis brama*, плотвы *Rutilus rutilus*, густеры *Blicca bjoerkna*, белоглазки *Ballerus sapa*, голавля *Squalius cephalus*, ельца *Leuciscus leuciscus*, краснопёрки *Scardinius erythrophthalmus*, язя *Leuciscus idus*, обыкновенного подуста *Chondrostoma nasus*, обыкновенного усача *Barbus barbus* проанализированы размерно-возрастные и весовые характеристики, а также рассчитаны промысловые запасы. Отмечено, что максимальные значения биомассы были получены в аномально теплые годы – 2019 и 2021 гг.

Ключевые слова: лещ *Abramis brama*, плотва *Rutilus rutilus*, густера *Blicca bjoerkna*, длина, масса, р. Днепр.

ВВЕДЕНИЕ

Река Днепр – четвертая по длине река Европы после Волги, Дуная и Урала. Крупнейший трансграничный водоток, между Республикой Беларусь и Российской Федерацией. Длина Днепра от истока до устья в естественном состоянии составляла 2285 км, а после постройки каскада водохранилищ (1975 г.), когда во многих местах выпрямили фарватер – 2201 км. Площадь водосборного бассейна – 504 000 км². Средний расход воды в устье – 1670 м³/с. Уклон реки – 0,09 м/км.

В современный период были проведены исследования, включающие определение видового состава ихтиофауны реки Днепр [Быков и др., 2011; Быков и др., 2017; Никитенко и др., 2021], оценку качества воды и эпизоотической ситуации [Романова и др., 2022].

Актуальность данного исследования состоит в необходимости знаний о состоянии запасов, динамике численности и биологических показателях рыб,

обитающих в реке Днепр, для подготовки рекомендаций по эффективному освоению биоресурсов реки.

Целью настоящей статьи является анализ состояния запасов основных промысловых видов рыб и их биологические показатели реки Днепр за 2019-2022 гг. Данное сообщение дополняет работы 2011-2021 гг. результатами по оценке динамики численности промысловых запасов рыб реки Днепр.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Сбор биологического материала на реке Днепр проводили в 2019–2022 гг. в рамках мониторинговых исследований водных биоресурсов. Станции отбора проб расположены на всем протяжении реки от п. Издешково (станция № 1) до деревни Хлыстовка (станция № 10) (рисунок 1).

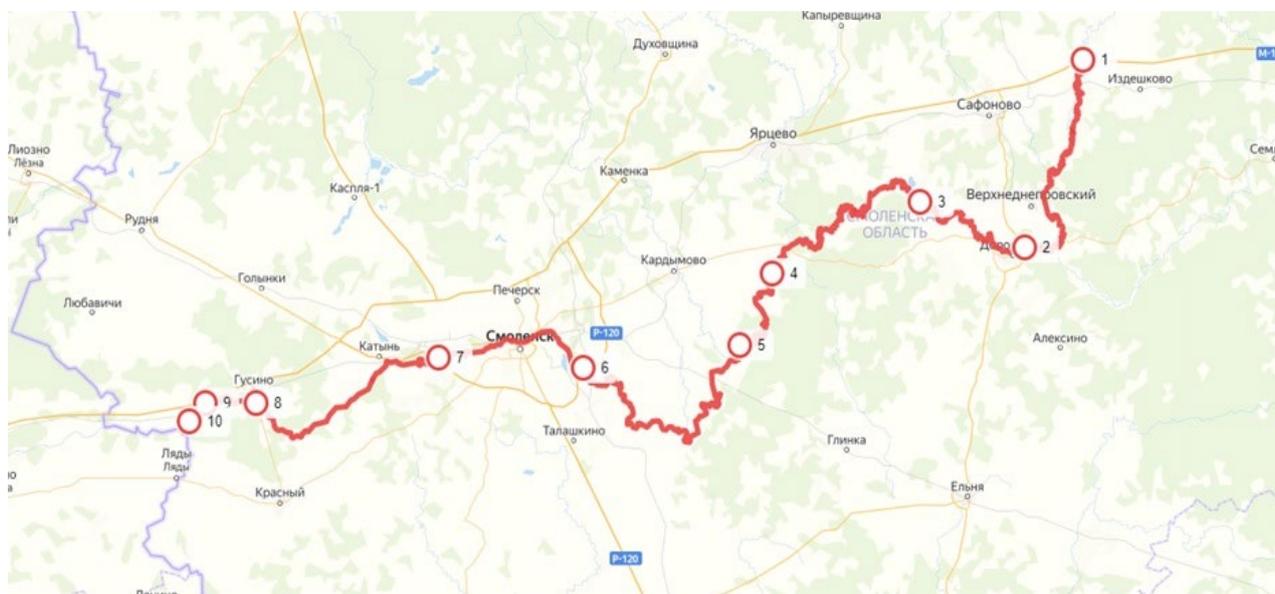


Рисунок 1 – Станции отбора проб на р. Днепр: № 1 – п. Издешково; № 2 – г. Дорогобуж; № 3 – карьер д. Леявино; № 4 – д. Березок; № 5 – Надвинские виры; № 6 – СНТ Соколя гора; № 7 – Окружная дорога г. Смоленск; № 8 – д. Лучково; № 9 – д. Бодуны; №10 – д. Хлыстовка

При осуществлении рыболовства в научно-исследовательских целях произведено 40 сетепостановок ставными сетями длиной 30 м, с шагом ячеи от 30 до 70 мм. Улов на усилие рассчитывали для стандартной сети (30 м) на 12 ч застоя.

Сбор и обработку ихтиологического материала осуществляли ежегодно согласно общепринятым методическим руководствам [Чугунова, 1959; Правдин, 1966].

Для расчёта численности промыслового запаса рыб использовали «немодельные» методы прямого учёта [Бабаян и др., 2019].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Отличительной особенностью реки Днепр является высокая численность леща и плотвы в водоёме. Промышленный лов отсутствует. Для реки Днепр утверждены объёмы рекомендованного вылова водных биоресурсов. Осуществляется только любительское рыболовство, а также рыболовство в научно-исследовательских и контрольных целях.

Промысловый запас водных биоресурсов реки Днепр в течение 2019-2022 гг. колебался от 46,8 до 140,3 т (рисунок 2). Наибольшие значения получены для 2019 и 2021 гг., которые были аномально теплыми.

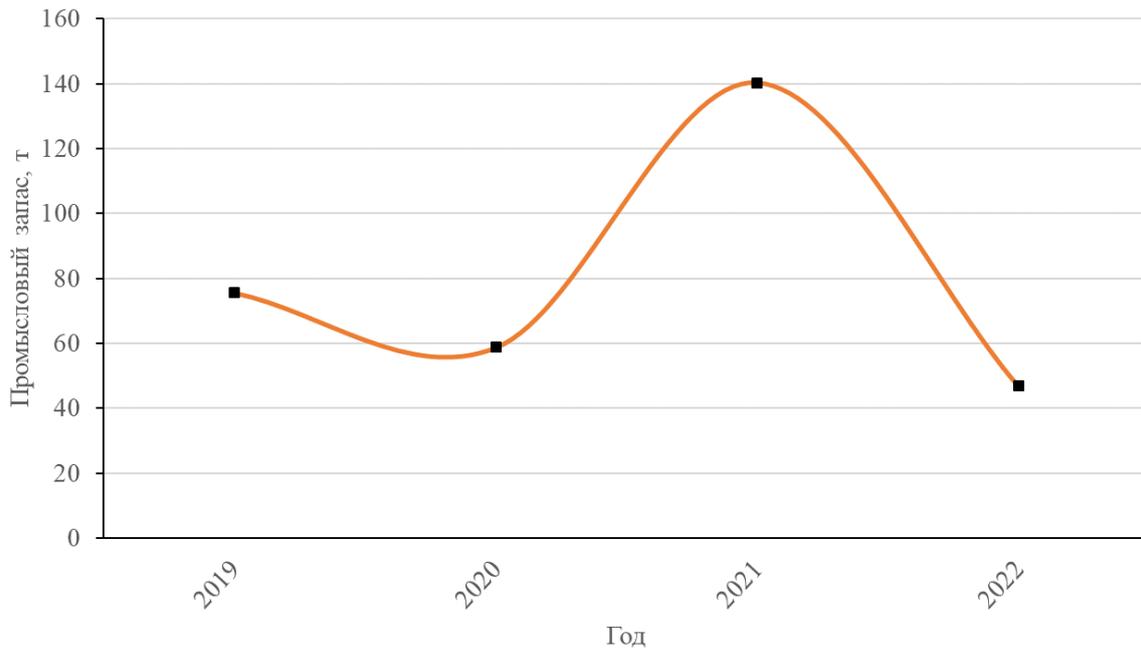


Рисунок 2 – Промысловый запас (т) водных биоресурсов реки Днепр за 2019-2022 гг.

Основными видами рыб реки Днепр, которые вылавливаются в рамках любительского рыболовства в настоящее время являются: лещ *Abramis brama*, судак *Sander lucioperca*, щука *Esox lucius*, плотва *Rutilus rutilus*, окунь пресноводный *Perca fluviatilis* и густера *Blicca bjoerkna*. Наиболее многочисленными среди малоценных недоиспользуемых видов являются: налим *Lota lota*, язь *Leuciscus idus*, краснопёрка *Scardinius erythrophthalmus*, белоглазка *Ballerus sapa*, голавль *Squalius cephalus*, елец *Leuciscus leuciscus*, подуст *Chondrostoma nasus*, обыкновенный усач *Barbus barbus*, обыкновенный ёрш *Gymnocephalus cernuus*, донской ёрш *Gymnocephalus acerinus*.

Плотва – самый многочисленный вид. Обитает на различных биотопах реки, на всем протяжении Днепра и его придаточной системы. Биологический анализ структуры её популяции в реке показал, что в научных уловах присутствуют рыбы в основном в возрасте 2+ – 5+, единично встречаются особи в возрасте 1+ и 6+.

В научных уловах плотва встречалась с длиной тела от 9,5 до 30,5 см, численно преобладали рыбы от 17,5 до 22,5 см (68%), средний размер составлял 20,4 см. Масса тела колебалась от 16 до 706 г, доминировали особи от 100 до 200 г (60%), средняя масса составила 190,8 г.

Половой зрелости самцы достигают в 5-6 лет, самки в 4 летнем возрасте, масса рыб при этом колеблется от 94 до 706 г. Промысловой меры (17 см) рыбы достигают, в основном, на 4 году жизни. Особи промысловых размеров (17 и более см) в уловах составляют более 90%.

Промысловый запас плотвы с 2019 по 2022 гг. характеризовался большими значениями в нечетные годы, что может быть связано с аномальными высокими температурами в эти годы (рисунок 3).

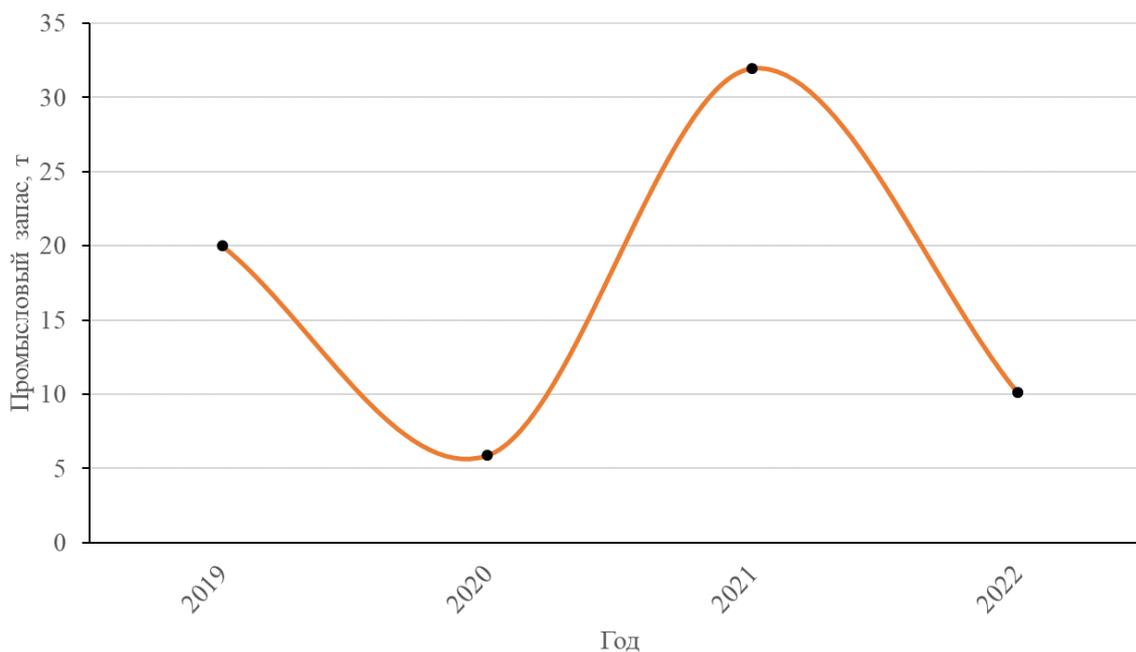


Рисунок 3 – Промысловый запас (т) плотвы реки Днепр за 2019-2022 гг.

Лещ. По материалам наших исследований, возрастной состав леща в научно-исследовательских уловах представлен особями от 2+ до 8+ лет, особи 7+ – 8+ лет немногочисленны, преобладающими являются рыбы 4-6 лет, составляющие ежегодно от 65 до 95%.

В научных уловах лещ встречается с длиной тела от 15 до 46,6 см, численно преобладали рыбы от 15 до 20 см (56%), средний размер составлял 25,1 см. Масса тела колебалась от 77 до 2044 г, доминировали особи от 200 до 550 г (88%), средняя масса составила 458 г.

Половой зрелости, лещ реки Днепр достигает у самцов при длине 25,1 см, в возрасте 6+ – 7+ лет. Самки, как правило, начинают созревать раньше самцов, в возрасте 5+ – 6+ лет при длине 24,5 см.

За последние четыре года промысловый запас леща в реке Днепр варьируется от 5,96 до 15 т, и наблюдается положительный тренд после падения в 2020 г. (рисунок 4).

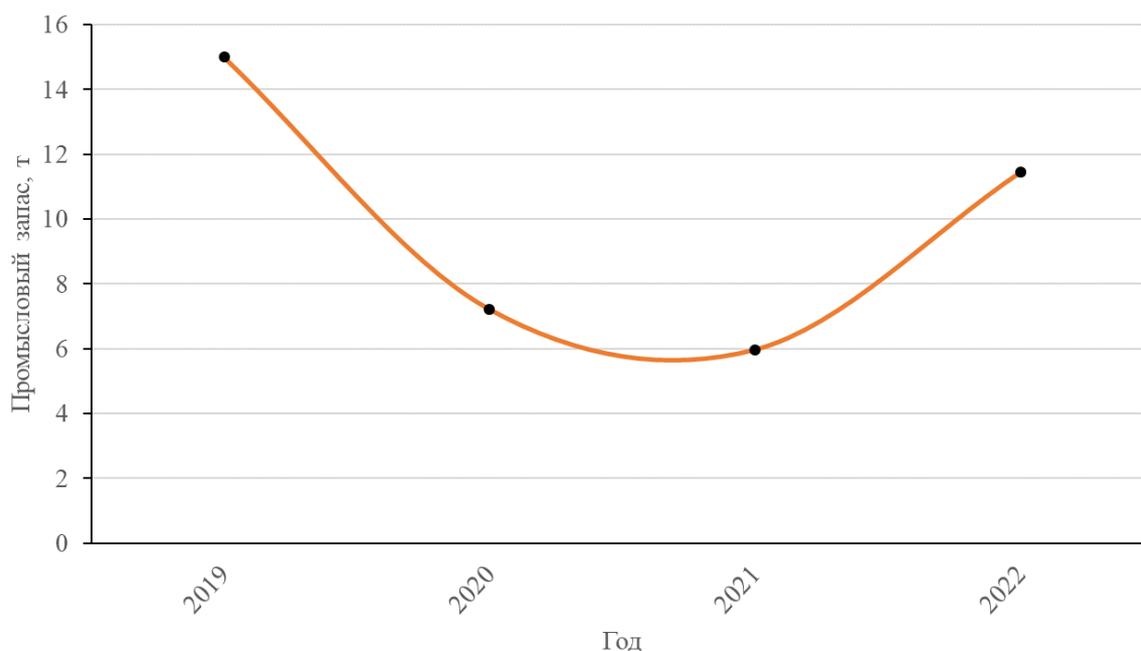


Рисунок 4 – Промысловый запас (т) леща реки Днепр за 2019-2022 гг.

Густера. По материалам наших исследований, возрастной состав густеры представлен особями от 3+ до 6+ лет, особи 6+ немногочисленны, все остальные возрастные группы представлены равнозначно.

В научно-исследовательских уловах густера встречается с длиной тела от 14,6 до 28 см, численно преобладали рыбы от 18 до 22 см (42%), средний размер составлял 19,3 см. Масса тела колебалась от 80 до 430 г, доминировали особи от 80 до 100 г (52,3%), средняя масса составила 156,5 г.

Половой зрелости самцы и самки достигают в 3-4 года, масса рыб при этом колеблется от 86 до 276 г. Промысловой меры (15 см) рыбы достигают, в основном на 4 году жизни. Особи промысловых размеров (15 и более см) в уловах составляют более 90%.

Биомасса густеры в 2020 г. показала заметный рост, однако затем наблюдается снижение запаса с 13,8 до 6,89 т в 2022 г. (рисунок 5).

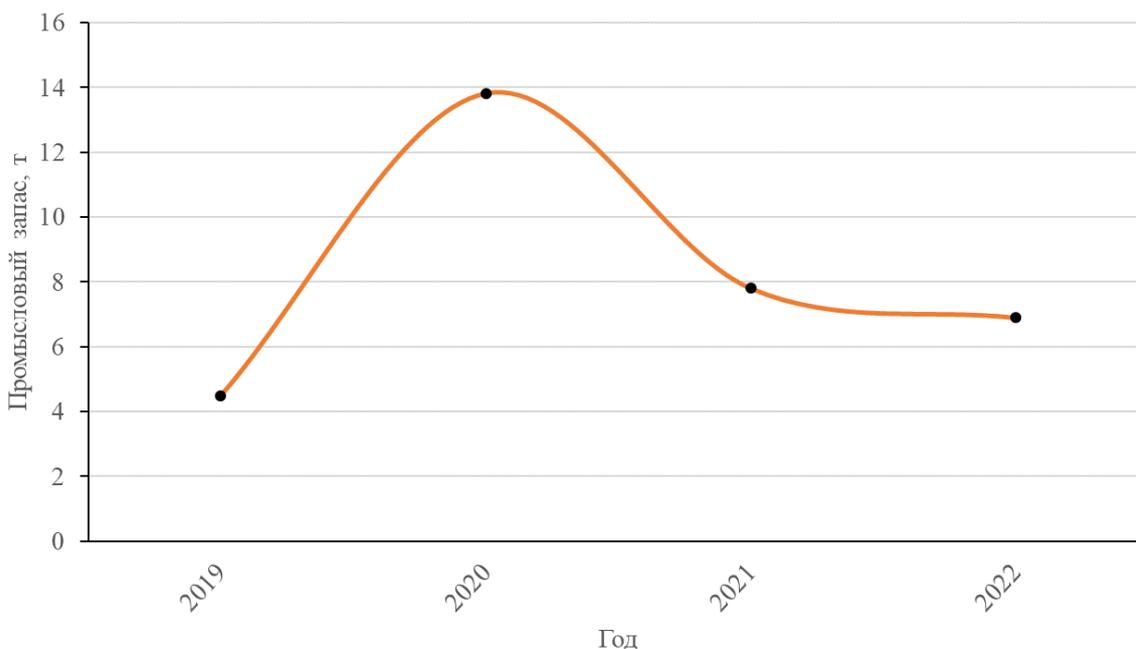


Рисунок 5 – Промысловый запас (т) густеры реки Днепр за 2019-2022 гг.

Белоглазка. По материалам наших исследований, возрастной состав белоглазки представлен особями от 3+ до 6+, особи 6+ лет немногочисленны, преобладающими являются рыбы 4-5 лет, составляющие до 80%.

В научно-исследовательских уловах белоглазка встречается с длиной тела от 16 до 31,5 см, численно преобладали рыбы от 22 до 27 см (60%), средний размер составлял 23,5 см. Масса тела колебалась от 60 до 435 г, доминировали особи от 150 до 250 г (60%), средняя масса составила 203,1 г.

Половой зрелости самцы достигают в 4-5 лет, самки в 5-6 лет, масса рыб при этом колеблется от 165 до 435 г. Промысловый меры (20 см) рыбы достигают, в основном на 3-4 году жизни. Особи промысловых размеров (20 и более см) в уловах составляют более 82%.

С 2019 по 2020 гг. наблюдался рост биомассы почти в 3 раза. В научно-исследовательских уловах белоглазка в 2021 г. не встречалась, поэтому промысловый запас не рассчитан. В 2022 г. отмечено максимально низкое значение запаса за последние 4 года (рисунок 6).

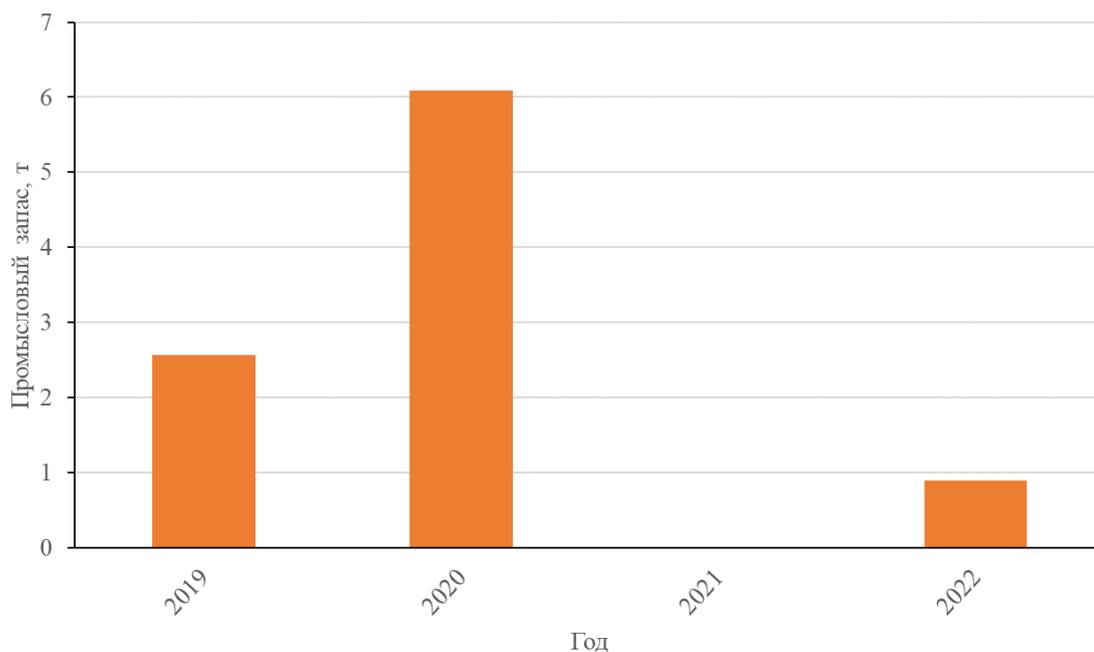


Рисунок 6 – Промысловый запас (т) белоглазки реки Днепр за 2019-2022 гг.

Голавль. По материалам наших исследований, возрастной состав голавля представлен особями от 2+ до 6+, особи 2+ – 4+ лет немногочисленны, преобладающими являются рыбы 4-6 лет, составляющие 90%.

В научно-исследовательских уловах голавль встречается с длиной тела от 21,5 до 37 см, численно преобладали от 23 до 28 см (58%), средний размер составлял 26,8 см. Масса тела колебалась от 147 до 850 г, доминировали особи от 147 до 300 г (58%), средняя масса составила 352,3 г.

Половой зрелости самцы и самки достигают в 2-3 года, масса рыб при этом колеблется от 226 до 326 г. Промысловой меры (20 см) рыбы достигают на 3 году жизни. Особи промысловых размеров (20 и более см) в уловах составляют 100%.

Биомасса голавля в исследованный период в среднем составляла около 7-8 т. Однако, сильно выделяется оценка 2021 г. Она схожа с динамикой запаса плотвы, когда максимальное значение зафиксировано в аномально теплый год (рисунок 7).

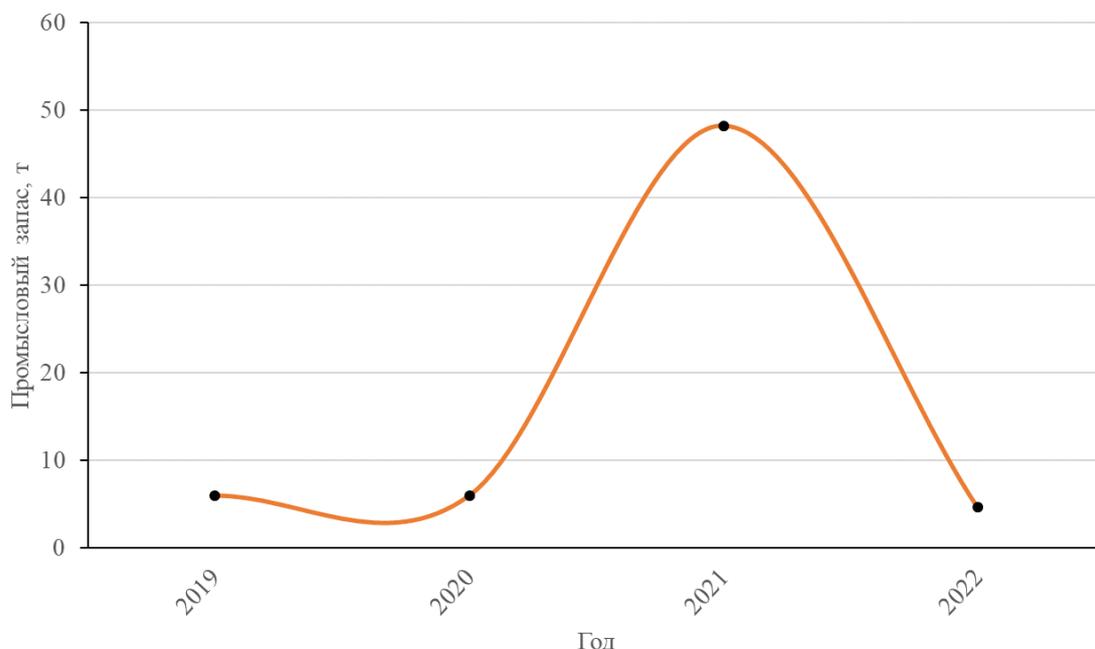


Рисунок 7 – Промысловый запас (т) голавля реки Днепр за 2019-2022 гг.

Елец. За весь период исследований, была поймана 1 особь ельца (половозрелая самка). Возраст составил 4+, с длиной тела 22 см и массой 204 г. Промысловой меры (15 см) рыба достигла.

Биомасса в 2021 г. оценена в 2,85 т.

Краснопёрка. В период с 2019 по 2022 гг. в уловах отмечена 1 особь краснопёрки (половозрелая самка). Возраст составил 4+, длина тела 19 см и масса 120 г. Промысловой меры (17 см) рыба достигла.

Биомасса в 2019 г. составила 0,2 т.

Язь. За весь период исследований, было поймано 2 особи язя. Их возраст 4+-5+, с длиной тела от 30,6 и 35 см. Масса тела составила 650 и 732 г соответственно. Все особи были половозрелыми. Промысловой меры (25 см) рыбы достигли.

Биомасса язя была оценена в 2019 и 2022 гг. Она немного уменьшилась с 0,66 до 0,43 т.

Обыкновенный подуст. По материалам наших исследований, возрастной состав подуста в научно-исследовательских уловах представлен особями 4+ – 5+ лет, преобладающими являются рыбы 5+, составляющие 75%.

В научных уловах подуст встречается с длиной тела от 21 до 33 см, численно преобладали рыбы от 25 до 28 см (46,2%), средний размер составил 27,8 см. Масса тела колебалась от 162 до 591 г, доминировали особи от 200 до 400 г (54,5%), средняя масса составила 379,2 г.

Половой зрелости самцы достигают в возрасте 3-4 года, а самки в 4-5 лет, масса рыб при этом колеблется от 336 до 542 г.

Запас подуста был определен в 2020-2022 гг. и варьировал в этот период от 0,22 до 10,4 т (рисунок 8).

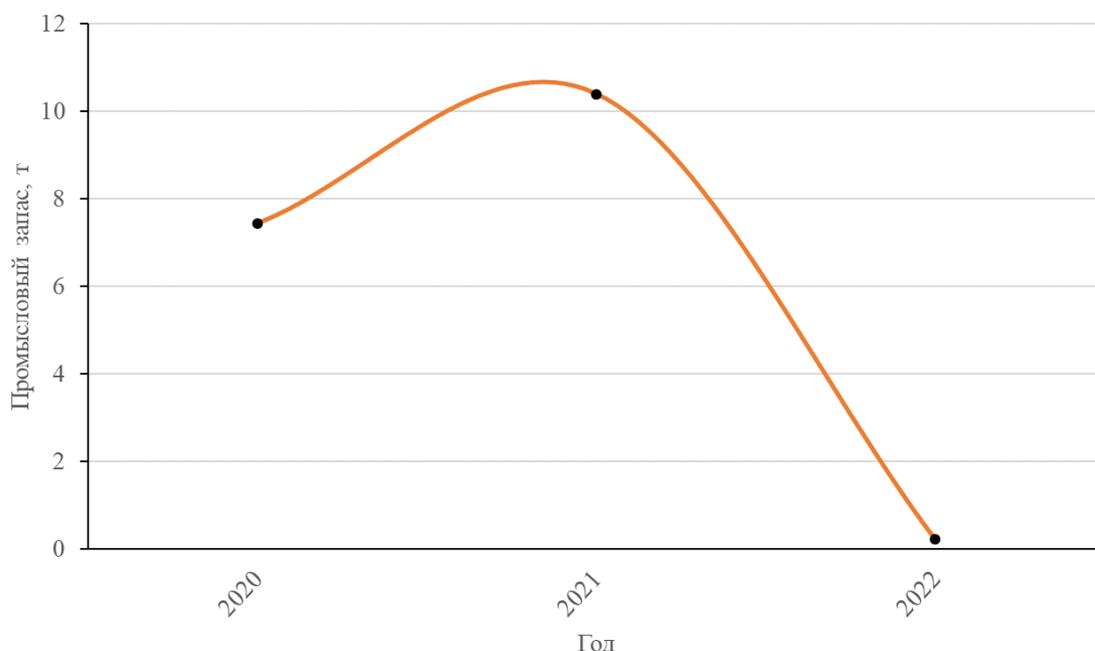


Рисунок 8 – Промысловый запас (т) подуста реки Днепр за 2020-2022 гг.

Также в научно-исследовательских уловах в 2022 г. был отмечен обыкновенный усач (половозрелый самец). Его длина составила 35,3 см, масса 762 г с возрастом 4+ лет. Промысловой меры (52 см) рыба не достигла.

Для Cyprinidae улов на усилие в период исследований составил 0,17 кг/сетепостановку. Минимальные значения получены для язя, белоглазки и обыкновенного подуста, максимальные для густеры и плотвы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Бабаян В.К., Бобырев А.Е., Булгакова Т.И., Васильев Д.А., Ильин О.И., Ковалев Ю.А., Михайлов А.И., Михеев А.А., Петухова Н.Г., Сафаралиев И.А., Четыркин А.А., Шереметьев А.Д. 2018. Методические рекомендации по оценке запасов приоритетных видов водных биологических ресурсов. – М.: ВНИРО. – 312 с.

Быков А.Д., Митенков Ю.А., Меньшиков С.И. и др. Современное состояние ихтиофауны верхнего течения реки Днепр в границах Смоленской области // Вопросы рыболовства. – 2017. – Т. 18. – № 1. – С. 65-76.

Быков А.Д., Митенков Ю.А., Пшеничный К.В. Современный состав ихтиофауны верхнего течения реки Днепр в пределах Смоленской области // Всерос. науч. конф. с междунар. участием «Экологические проблемы пресноводных рыбохозяйственных водоемов России». Санкт-Петербург, 2011. – С. 55-58.

Никитенко А.И., Горячев Д.В., Костоусов В.Г., Прищепов Г.П., Ризевский В.К., Корабельникова О.В., Клец Н.Н. Современное состояние водных биоресурсов трансграничного участка реки Днепр в пределах Смоленской области Российской Федерации и Республики Беларусь / А.И. Никитенко, Г.Д. Горячев, В. Г. Костоусов, Г.П. Прищепов, В.К. Ризевский,

О.В. Корабельникова, Н.Н. Клец // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2021. – № 7(186). – С. 8-21. – DOI 10.33920/sel09210701.

Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. М.: Пищевая промышленность, 1966. – 376 с.

Романова Н.Н., Никитенко А.И., Здрок А.В., Кукин М.С., Корабельникова О.В. Оценка качества воды и эпизоотической ситуации на реке Днепр в современный период / Н.Н. Романова, А.И. Никитенко, А.В. Здрок, М.С. Кукин, О.В. Корабельникова // Вопросы рыболовства. – 2022. – Т. 23, № 1. – С. 16-31. – DOI 10.36038/0234-2774-2022-23-1-16-31

Чугунова Н.И. Руководство по изучению возраста и роста рыб. М.: Изд. АН СССР, 1959. – 163 с.

BIOLOGICAL INDICATORS AND DYNAMICS OF STOCKS OF COMMERCIAL FISH SPECIES OF THE DNEPER RIVER.

1. CYPRINIDAE FAMILY

A.I. Nikitenko¹, D.V. Goraychev¹, N.N. Klets¹, I.V. Zingis¹, A.S. Nazarov¹, V.A. Karpov¹, V.Y. Zharikova^{1,2}

¹*Branch for the Freshwater Fisheries of VNIRO («VNIIPRKh»)*

²*Dmitrov Fisheries Technological Institute (branch of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Astrakhan State Technical University»)*

E-mail: alexey_nikitenko90@mail.ru, wbr@vniiprh.ru

Abstract. According to the results of research in 2019-2022, mass fish of the Dnieper River were identified. Of the 16 species recorded in net catches, 6 species belonging to three families were massive, among which the Cyprinidae family absolutely dominated. Size-age and weight characteristics were analyzed for bream *Abramis brama*, roach *Rutilus rutilus*, guster *Blicca bjoerkna*, white-eyed *Ballerus sapa*, chub *Squalius cephalus*, spruce *Leuciscus leuciscus*, rudd *Scardinius erythrophthalmus*, ide *Leuciscus idus*, common podust *Chondrostoma nasus*, common barbel *Barbus barbus*, and commercial stocks are also calculated. It is noted that the maximum values of biomass were obtained in abnormally warm years – 2019 and 2021.

Keywords: *Abramis brama*, roach *Rutilus rutilus*, guster *Blicca bjoerkna*, length, weight.

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ДИНАМИКА ЗАПАСОВ
ПРОМЫСЛОВЫХ ВИДОВ РЫБ РЕКИ ДНЕПР.
2. СЕМЕЙСТВА ОКУНЕВЫЕ PERCIDAЕ, ЩУКОВЫЕ ESOCIDAЕ,
ТРЕСКОВЫЕ GADIDAЕ**

А.И. Никитенко¹, Д.В. Горячев¹, Н.Н. Клец¹, И.В. Зингис¹, А.С. Назаров¹,
В.А. Карпов¹, В.Ю. Жарикова^{1,2}

¹Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО»
(«ВНИИПРХ»)

²Дмитровский рыбохозяйственный технологический институт (филиал)
Астраханский государственный технический университет (ДРТИ АГТУ)
E-mail: alexey_nikitenko90@mail.ru, wbr@vniiprh.ru

По результатам исследований 2019-2022 гг. выделены массовые рыбы реки Днепр. Из 16 видов, отмеченных в сетных уловах, 6 видов, принадлежащих к трём семействам окуневые Percidae, щуковые Esocidae, тресковые Gadidae являлись массовыми после семейства карповые Cyprinidae. Проведен анализ размерно-возрастной структуры и весовых характеристик для обыкновенного окуня *Perca fluviatilis*, обыкновенного ерша *Gymnocephalus cernuus*, судака *Sander lucioperca*, донского ерша *Gymnocephalus acerinus*, щуки *Esox lucius*, налима *Lota lota*, а также рассчитаны промысловые запасы.

Ключевые слова: окунь *Perca fluviatilis*, обыкновенный ёрш *Gymnocephalus cernuus*, судак *Sander lucioperca*, донской ёрш *Gymnocephalus acerinus*, щука *Esox lucius*.

В первом сообщении представлены многолетние материалы по промысловой биомассе пресноводных рыб и особенностям биологии представителей семейства карповые Cyprinidae. Для массовых видов этого семейства проанализированы размерно-возрастные, весовые характеристики рыб. Также рассчитаны промысловые запасы. В данной статье приведены аналогичные данные по отдельным видам семейств окуневые Percidae, щуковые Esocidae, тресковые Gadidae.

Информацию о материале и методике, а также о промысловой биомассе массовых рыб в целом приведена в первом сообщении. Отметим, что основой послужили материалы, собранные в рамках мониторинговых исследований с 2019 по 2022 гг. на реке Днепр, в ходе которых выполнено 40 сетепостановок. В целом, в период исследований была охвачена значительная акватории реки Днепр в границах Смоленской области.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Семейство окуневые Percidae.

Окунь обыкновенный, наряду с плотвой, является одним из самых востребованных объектов любительского рыболовства. В научно-исследовательских уловах представлен особями от 2+ до 7+ лет, особи 2+ и 7+ лет немногочисленны, преобладающими являются рыбы 3+ и 5+ составляющие ежегодно от 65 до 84%.

В научных уловах окунь встречается с длиной тела от 11 до 30 см, численно преобладали рыбы от 18 до 23 см (60%), средний размер составлял 21,1 см. Масса тела колебалась от 26 до 636 г, доминировали особи от 100 до 200 г (53,1%), средняя масса составила 178,9 г.

Половой зрелости самцы достигают в 3-4 года, самки 3-3+ летнем возрасте, масса рыб при этом колеблется от 62 до 228 г.

Промысловый запас окуня, как и у плотвы, максимально отмечен в нечетные года, в которые наблюдались аномально высокие температуры (рисунок 1).

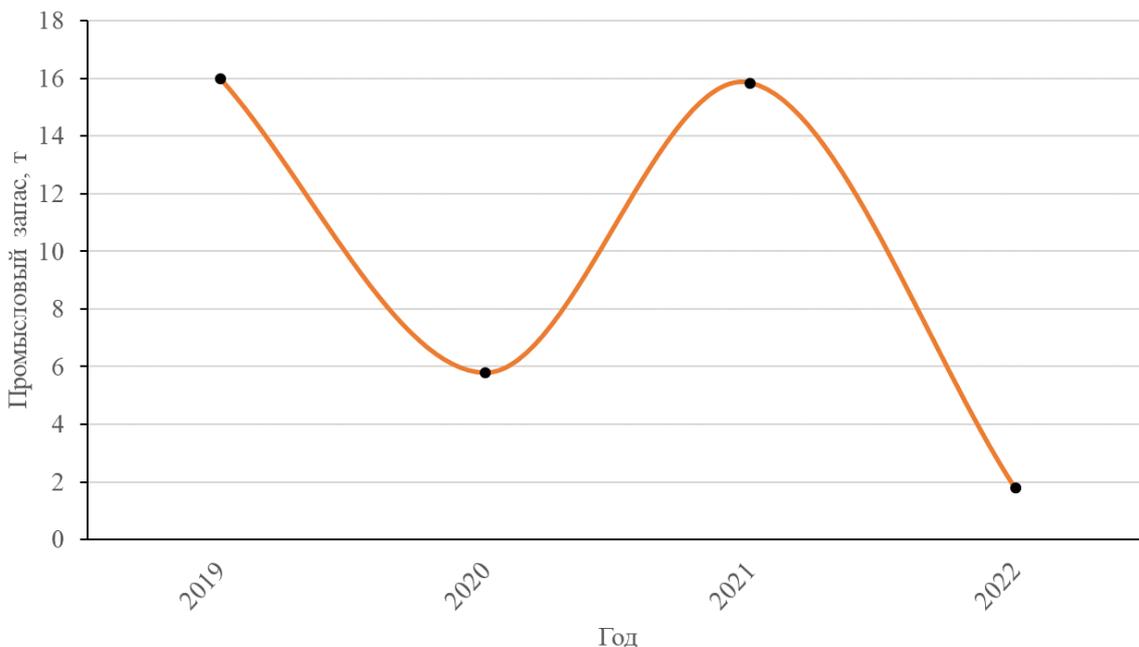


Рисунок 1 – Промысловый запас окуня в реке Днепр за 2019-2022 гг.

Обыкновенный ёрш. По материалам наших исследований, возрастной состав ерша в научно-исследовательских уловах представлен особями от 2+ до 7+ лет, особи 2+ и 7+ лет немногочисленны, преобладающими являются рыбы 3+ – 5+, составляющие 85%.

В научных уловах ёрш встречался с длиной тела от 9 до 30 см, численно преобладали рыбы от 18 до 23 см (55,9%), средний размер составил 20,4 см. Масса тела колебалась от 14 до 636 г, доминировали особи от 100 до 300 г (73,5%), средняя масса составила 169,3 г.

Половой зрелости самцы и самки достигают в возрасте 2-3 года, масса рыб при этом колеблется от 62 до 214 г. Промысловая мера для ерша не установлена.

Промысловый запас был рассчитан в 2019-2020 гг. и фактически не различался (0,05 т).

Судак является одним из самых ценных видов водных биоресурсов реки Днепр.

По материалам наших исследований, возрастной состав судака в научно-исследовательских уловах представлен особями от 2+ до 5+ лет, с равнозначным присутствием всех возрастов.

В научных уловах судак встречается с длиной тела от 24 до 53,5 см, численно преобладали особи от 26 до 29 см (80%), средний размер составил 29,8 см. Масса тела колебалась от 182 до 1862 г, доминировали особи от 100 до 300 г (70%), средняя масса составила 554,4 г.

Половой зрелости самцы и самки судака достигают в 5+ –6+ лет, масса рыб при этом колеблется от 1680 до 1862 г. Промысловой меры (40 см) рыбы достигают, в основном, на 5 году жизни. Особи промысловых размеров (40 и более см) в уловах составляют чуть более 15%.

Промысловый запас в аномально теплые годы 2019 и 2021 гг. был минимален, в отличие от окуня (рисунок 2).

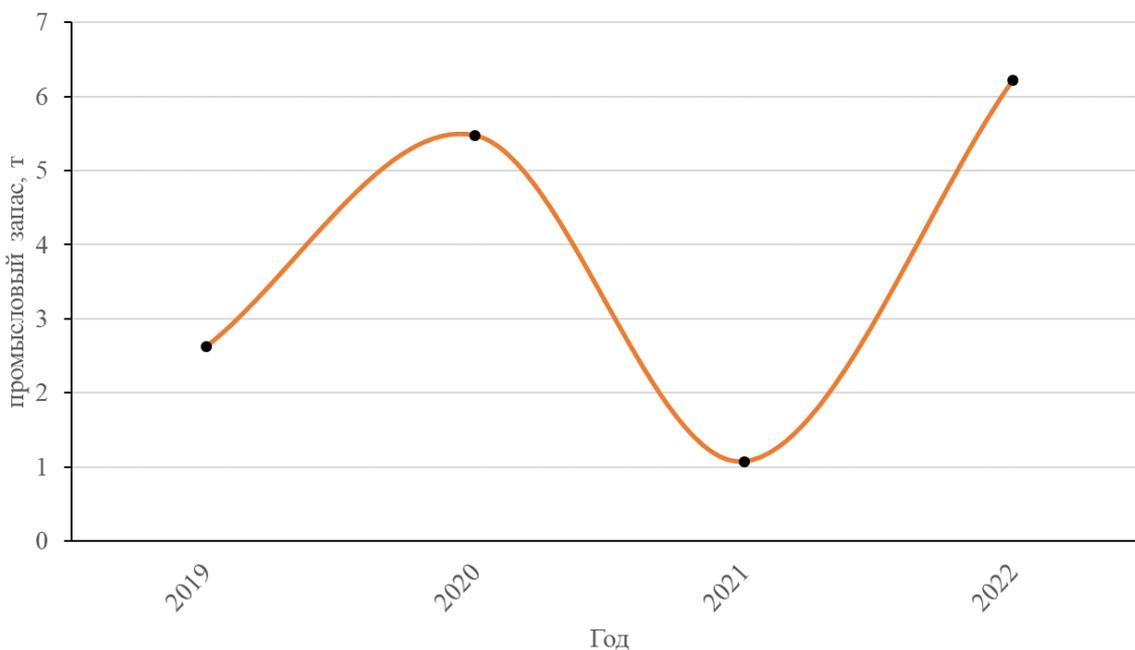


Рисунок 2 – Промысловый запас судака в реке Днепр за 2019-2022 гг.

Донской ёрш, очень редкий вид, встречающийся в бассейне северной части Чёрного и Азовского морей: в реках Днестр, Южный Буг, Днепр, Припять, Десна, Дон, Кубань. За весь период исследований, было поймано 2 особи (самки). Длина тела составила 21,5-22 см, масса варьировала от 146 до 151 г. Промысловая мера для ерша отсутствует.

Биомасса в 2020 г. оценена в 1,05 т. Улов на усилие для *Percidae* в период исследований составил 0,1 кг/сетепостановку.

Семейство щуковые *Esocidae*.

За весь период исследований, была поймана 1 особь щуки (половозрелый самец). Возраст составил 3+ лет, с длиной тела 42 см и массой 734. Промысловой меры (32 см) рыба достигла.

Улов на усилие для щуки составил 0,06 кг/сетепостановку. Наблюдается рост биомассы щуки на 4,84 т (55%) в 2021 г. по сравнению с 2019 г. (рисунок 3).

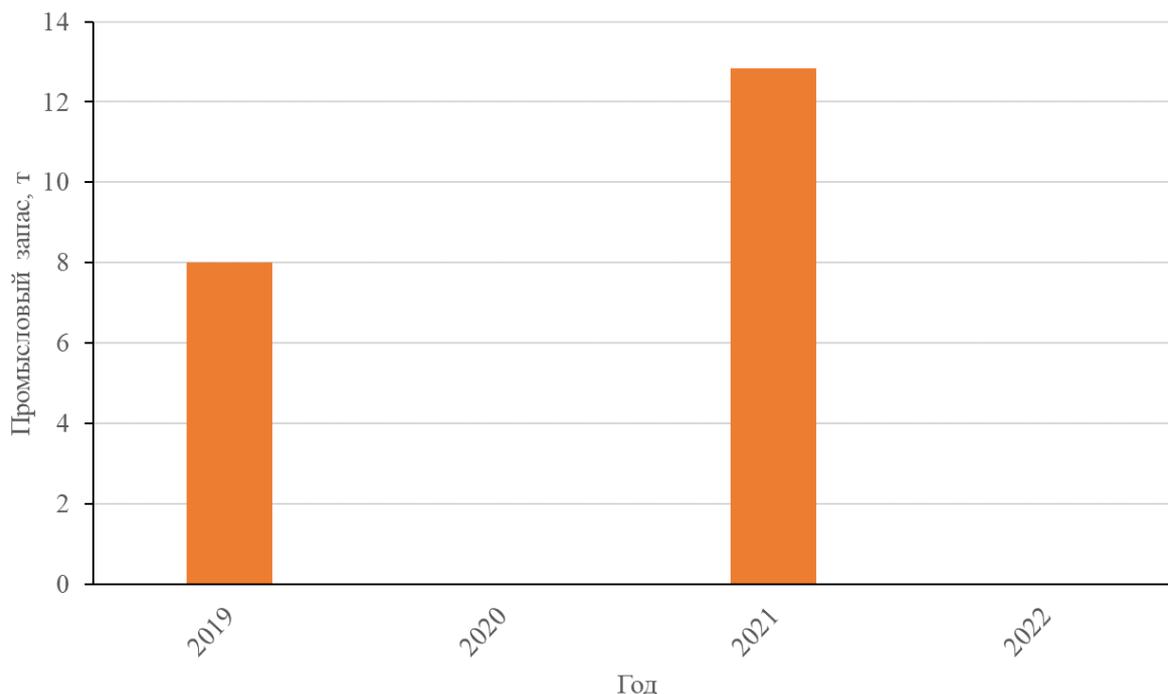


Рисунок 3 – Промысловый запас щуки в реке Днепр за 2019-2021 гг.

Семейство трескообразные *Gadidae*.

Налим. За весь период исследований было поймано 2 особи (самцы). Длина тела составила 27,5-42 см, масса варьировала от 204 до 648 г. Промысловой меры (30 см) достигла половина выборки. Улов на усилие для налима составил 0,03 кг/сетепостановку. Биомасса в 2021 г. оценена в 3,44 т.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По материалам многолетних (2019-2022 гг.) мониторинговых исследований на реке Днепр подготовлен обзор динамики запасов, биологических показателей основных видов рыб водоема.

Ихтиофауна, в пределах исследуемого участка в границах Смоленской области, отличается значительным видовым разнообразием. По результатам исследований размерной-возрастной структуры выловленных видов рыб, отмечена динамика с хорошим воспроизводственным потенциалом, как и в предыдущих исследованиях [Никитенко и др., 2021; Романова и др., 2022].

Состояние популяций большинства ресурсных видов характеризуется как стабильное. Необходимо продолжать исследование водных биологических ресурсов и среды их обитания реки Днепр для увеличения временных рядов и прослеживания динамики биологических показателей.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Никитенко А.И., Горячев Д.В., Костоусов В.Г., Прищепов Г.П., Ризевский В.К., Корабельникова О.В., Клец Н.Н. Современное состояние водных биоресурсов трансграничного участка реки Днепр в пределах Смоленской области Российской Федерации и Республики Беларусь / А.И. Никитенко, Г.Д. Горячев, В. Г. Костоусов, Г.П. Прищепов, В.К. Ризевский, О.В. Кораельникова, Н.Н. Клец // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2021. – № 7(186). – С. 8-21. – DOI 10.33920/sel09210701.

Романова Н.Н., Никитенко А.И., Здрок А.В., Кукин М.С., Корабельникова О.В. Оценка качества воды и эпизоотической ситуации на реке Днепр в современный период / Н.Н. Романова, А.И. Никитенко, А.В. Здрок, М.С. Кукин, О.В. Корабельникова // Вопросы рыболовства. – 2022. – Т. 23, № 1. – С. 16-31. – DOI 10.36038/0234-2774-2022-23-1-16-31.

BIOLOGICAL INDICATORS AND DYNAMICS OF STOCKS OF COMMERCIAL FISH SPECIES OF THE DNIEPER RIVER.

2. FAMILIES OF PERCH PERCIDAE, PIKE ESOCIDAE, COD GADIDAE

A.I. Nikitenko¹, D.V. Goraychev¹, N.N. Klets¹, I.V. Zingis¹, A.S. Nazarov¹,
V.A. Karpov¹, V.Y. Zharikova^{1,2}

¹*Branch for the Freshwater Fisheries of VNIRO («VNIIPRKh»)*

²*Dmitrov Fisheries Technological Institute (branch of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Astrakhan State Technical University»)*

E-mail: alexey_nikitenko90@mail.ru, wbr@vniiprh.ru

Abstract. According to the results of research in 2019-2022, mass fish of the Dnieper River were identified. Of the 16 species recorded in net catches, 6 species belonging to three families perch Percidae, pike Esocidae, cod Gadidae were massive after the Cyprinidae family. The analysis of the size-age structure and weight characteristics for the common perch *Perca fluviatilis*, common ruff *Gymnocephalus cernuus*, walleye *Sander lucioperca*, Don ruff *Gymnocephalus acerinus*, pike *Esox lucius*, burbot *Lota lota* was carried out, and the fishing stocks were calculated.

Keywords: *Perca fluviatilis*, common ruff *Gymnocephalus cernuus*, walleye *Sander lucioperca*, Don ruff *Gymnocephalus acerinus*, pike *Esox Lucius*.

РЫБОВОДНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ, ВЫРАЩЕННОЙ В УСЛОВИЯХ УЗВ НА КОМБИКОРМАХ С ЗАДАНЫМ ЖИРНОКИСЛОТНЫМ СОСТАВОМ

С.В. Биндюков¹, Ю.А. Новоселова², М.В. Арнаутов¹, Ю.А. Баскакова¹,
О.А. Бондаренко², Е.Ю. Козлова²

¹ФГБНУ «ВНИРО»

² Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО»
(«ВНИИПРХ»)

E-mail: Bindyukov@vniro.ru

В работе изучали влияние замены в комбикормах рыбьего жира растительными маслами с высоким содержанием линолевой и альфа-линоленовой кислоты на темпы роста и морфофизиологические показатели радужной форели породы стальноголовой лосось. По результатам исследований ростовые показатели, коэффициенты упитанности, индекс печени форели в экспериментальных и контрольной группах были стабильными, характерными для рыб данного возраста группы и не зависели от жирнокислотного состава корма.

Ключевые слова: радужная форель *Oncorhynchus mykiss*, комбикорма для рыб, ростовые и морфометрические показатели.

ВВЕДЕНИЕ

Радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*) – быстрорастущая рыба отряда лососеобразных (Salmoniformes), которая характеризуется высокой экологической пластичностью. Она является эвригалинной рыбой способной переносить высокие градиенты солености, температур; в процессе онтогенеза значительно меняется её кормовая база, что позволяет успешно акклиматизировать форель в водоёмах с широким спектром гидрохимических показателей воды. Благодаря этим факторам объемы выращивания форели и семги в России в 2022 г. по отношению к 2015 г. увеличились в 4,3 раза с 35,4 тыс. т до 154 тыс. т и впервые превысили объемы традиционно культивируемых в нашей стране карповых [Российские рыбоводы в 2022 году ..., электронный ресурс].

Интенсивный рост форелеводства связан с применением экструдированных комбикормов. В качестве основной липидной составляющей в кормах для лососевых рыб традиционно использовали рыбий жир в связи с его высокой переваримостью и присутствием полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Известно, что рыбе, как и всем позвоночным животным для нормального роста и оптимального физиологического состояния необходимо определенное количество длинноцепочечных ПНЖК семейства омега-3, а

именно эйкозапентаеновой (ЭПК) и докозагексаеновой (ДГК), получаемое в основном из корма [Trushenski et al, 2012].

С другой стороны, в настоящее время экономически выгодным альтернативным источником липидов для аквакультуры выступают растительные масла, которые используются для частичной или полной замены жира. Однако, включение растительных масел в комбикорма приводит к изменению жирнокислотного состава как самих кормов, так и мышечной ткани лососевых рыб, что в свою очередь влияет на органолептические характеристики конечного продукта и уменьшает содержание ЭПК и ДГК [Turchini et al, 2018; Биндюков и др., 2022].

Перспективным является включение в состав кормов растительных масел, богатых альфа-линоленовой кислотой (АЛК), которая может быть метаболизирована рыбами для синтеза ЭПК и ДГК с помощью ферментов элонгаз и десатураз. К компонентам с высоким содержанием АЛК относятся рыжиковое (30-35%) и льняное (до 65%) масло; конопляное и рапсовое масла обладают средним уровнем АЛК – до 20%. Однако, следует учитывать, что линолевая кислота (ЛК), относящаяся к семейству омега-6 и содержащаяся в растительных маслах в количестве от 15 до 65%, вступает в конкуренцию с АЛК за указанные ферменты и таким образом ингибирует синтез ЭПК и ДГК. Кроме того, согласно литературным данным, интенсивность синтеза ЭПК и ДГК увеличивается при минимальном содержании этих длинноцепочечных ПНЖК в корме [Гладышев, 2021].

Целью данной работы было оценить влияние различных количеств АЛК, ЛК, ЭПК и ДГК в составе продукционных комбикормов на ростовые показатели радужной форели.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения биологических испытаний разработаны рецепты комбикормов (таблица 1) с различным соотношением рыбьего жира (источника ЭПК и ДГК), рапсового и льняного масел - источников ЛК и АЛК кислот, необходимых для процессов биосинтеза. В рецептах варьировали, как суммой ЭПК и ДГК от 0,3 до 1,2 г/100 г корма, так и соотношением ЛК и АЛК. Такие модельные рецепты разработаны для того, чтобы определить пороговые концентрации жирных кислот для запуска синтеза в мышечной ткани ЭПК и ДГК. В качестве контроля использовали корм только с рыбьим жиром.

Экспериментальные комбикорма изготавливали в Филиале по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ») на опытно-производственной линии Amandus Kahl (Германия) методом экструдирования с использованием матрицы с отверстиями диаметром 4,5 мм.

Биологические испытания проводили в цехе инкубации и выращивания рыбы Филиала по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ») на форели породы стальноголовый лосось. Диплоидная икра поступила с племенного форелеводческого завода «Адлер» на стадии глазка. Сумма градусо-дней при поставке икры и закладке на доинкубацию – 253.

Продолжительность доинкубации и выклева – 21 день. Возраст рыбы на момент начала эксперимента – 6 месяцев.

Таблица 1 – Модельные рецепты комбикормов

Шифр комбикормов	Содержание, %			Расчетная сумма ЭПК и ДГК в корме, г/100 г	Отношение ЛК к АЛК
	Рыбий жир	Рапсовое масло	Льняное масло		
КРФР 0.3 1/1	-	16,3	4,5	0,3	1:1
КРФР 0.3 1/2	-	9	11,8	0,3	1:2
КРФР 0.3 1/3	-	3,4	17,4	0,3	1:3
КРФР 0.6 1/3	1,3	2,9	16,6	0,6	1:3
КРФР 0.9 1/3	2,9	2,6	15,6	0,9	1:3
КРФР 1.2 1/1	4,1	12,9	3,8	1,2	1:1
КРФР 1.2 1/2	4,1	7,1	9,6	1,2	1:2
КРФР 1.2 1/3	4,1	2,1	14,6	1,2	1:3
КРФР РЖ	20,8	-	-	Максимальная	Не менее 1:3

Форель содержали в проточных прямоугольных бассейнах объемом 1,3 м³ со средней начальной плотностью посадки 11 кг/м³ (160 шт./бассейн). Расход воды составлял 17,1 л/мин при полном водообмене 76 минут. Суточный рацион кормления составлял 1,5% от биомассы; кормили рыб вручную 5 раз в светлое время суток. Отход рыбы учитывали ежедневно. Чистку рыбоводных емкостей проводили по мере загрязнения. Гидрохимические параметры среды выращивания рыб (температуру, содержание кислорода, рН) фиксировали 2 раза в сутки.

Каждые 30 суток проводили тотальную бонитировку и осуществляли отбор проб на исследования различных показателей. Жирнокислотный профиль липидов мышечной ткани на хроматографе «Кристалл 5000.2» («Хроматэк»).

Эффективность комбикормов оценивали по следующим рыбоводно-биологическим показателям: абсолютный, относительный, среднесуточный прирост, кормовой коэффициент, выживаемость [Винберг, 1956; Правдин, 1966; Щербина, Гамыгин, 2006]. Коэффициент упитанности определяли по формуле Фультона. Индекс печени и сердца определяли по Шварцу в процентах от массы рыбы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Температура воды в бассейнах за весь период эксперимента колебалась в пределах от 15,2 до 17,0°С. Средняя температура составила 16,3°С, что является оптимальной для выращивания форели [Титарев, 2007]. Содержание растворенного в воде кислорода колебалось от 5,6 до 10,4 мг О₂/л и в среднем за период выращивания составило 7,9 мг О₂/л, что является удовлетворительным значением для выращивания форели. Значения рН регистрировали в пределах 6,5-7,5, в среднем 7,3. Содержания нитритов в

системе подвергалось значительным изменениям по ходу эксперимента и в период с 85 по 118 день средний показатель был 1,8 мг/л, что было связано с повышенной нагрузкой на биофильтры рыбоводного цеха. Однако, эти значения не превышали пороговой величины нитритов соответствуют для выращивания форели, установленной на уровне 2 мг/л.

Химический состав комбикормов значительно не отличался между собой по основным показателям питательной ценности: содержание жира варьировало от 20,4 до 21,7% а сырого протеина от 44,6 до 46,3%.

При исследовании жирнокислотного состава комбикормов для радужной форели установлено, что содержание и соотношение жирных кислот было близко к расчетному. Сумма ЭПК И ДГК в кормах варьировала от 0,19 до 1,14 г/100 г корма. По мере увеличения в рецептурах рыбьего жира шел рост количества длинноцепочечных ПНЖК, достигая максимума (5,34 г/100 г) в корме, не содержащем растительных масел. Путем правильного подбора соотношения растительных масел и рыбьего жира удалось достичь заданных соотношений линолевой и альфа-линоленовой жирных кислот практически во всех кормах.

В процессе проведения испытаний комбикормов с различным уровнем замены рыбьего жира изучены изменения массы и рыбоводно-биологические показатели радужной форели (таблица 2).

Таблица 2 – Биологические показатели радужной форели при выращивании на комбикормах с заменой рыбьего жира растительными маслами

Шифр корма	Средняя начальная масса, г	Средняя конечная масса, г	Абсолютный прирост, г	Среднесуточный прирост, Св, %	Относительный прирост, В, %	Отход, шт	Кормовые затраты
КРФР 0.3 1/1	90,8	606,6	509,8	3,40	561,45	5	1,4
КРФР 0.3 1/2	95,6	549,8	454,28	3,03	475,39	2	1,4
КРФР 0.3 1/3	95,1	525,0	429,94	2,87	452,19	4	1,5
КРФР 0.6 1/3	97,2	639,4	542,16	3,61	557,78	3	1,3
КРФР 0.9 1/3	93,1	611,5	518,42	3,46	556,72	6	1,4
КРФР 1.2 1/1	96,8	578,2	481,42	3,21	497,33	3	1,5
КРФР 1.2 1/2	91,3	560,2	468,80	3,13	513,36	2	1,4
КРФР 1.2 1/3	93,4	701,9	608,54	4,06	651,82	3	1,2
КРФР РЖ	99,4	505,2	405,88	2,71	408,49	7	1,7

Согласно результатам рыбоводно-биологических испытаний обнаружена тенденция замедления скорости роста рыб, получавших корм КРФР РЖ, содержащий только рыбий жир. Умеренными ростовыми показателями отличалась форель на кормах КРФР 0.3 1/2, КРФР 0.3 1/3 и КРФР 1.2 1/2. Наиболее высокие темпы роста отмечались у форели на корме КРФР 1.2 1/3,

содержавшем 4,1% рыбьего жира, 2,1% рапсового масла и 14,6% льняного масла. Отход рыбы для 150-дневного эксперимента был незначительным. Максимальный отход – 7 особей на контрольном корме КРФР РЖ, минимальный – 2 рыбы в бассейнах КРФР 0.3 1.2 и КРФР 1.2 1/2. Кормовые затраты приведенные в табл. 2 варьируются от 1,23 до 1,71 для бассейнов КРФР 1,2 1/3 и КРФР РЖ, соответственно, в среднем составляя 1,4.

Замена рыбьего жира растительными маслами закономерно изменяет нагрузку на органы, в которых осуществляется липидный метаболизм в том числе печень. Величины индекса печени (рисунок 1) различались от 1,06 до 1,57, при норме 1,1 до 1,4. В контрольной группе КРФР РЖ без растительных масел и с высоким содержанием ДЦ-ПНЖК гепатосоматический индекс был одним из самых низких на протяжении всего эксперимента. При этом заметно, что с уменьшением доли рыбьего жира в корме, и увеличением доли растительных масел индекс печени рос. Размеры печени могут изменяться в зависимости от возраста, сезона кормления, а также физиологического состояния рыбы. Увеличивающийся индекс печени вместе с накапливающимся внутривисцеральным жиром, может быть свидетельством негативного влияния использованных комбикормов на форель [Князева, 2007]. В нашем эксперименте гепатосоматический индекс во всех группах был в пределах нормы.

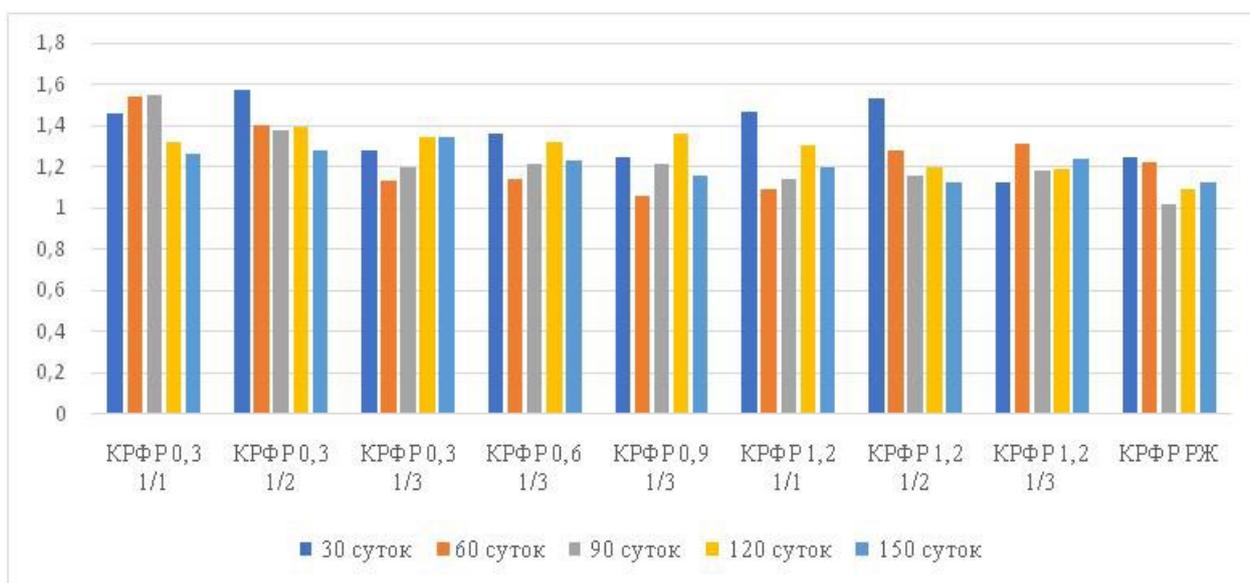


Рисунок 1 – Динамика изменений гепатосоматического индекса в течении 150 дней эксперимента

Значения коэффициента упитанности всех групп форели значительно не отличались между собой, составляя вначале в среднем 1,29. К концу выращивания коэффициент упитанности был в диапазоне норм и чуть ниже (в среднем 1,45) для отечественных пород форели близких размерно-массовых характеристик [Породы радужной форели, 2006].

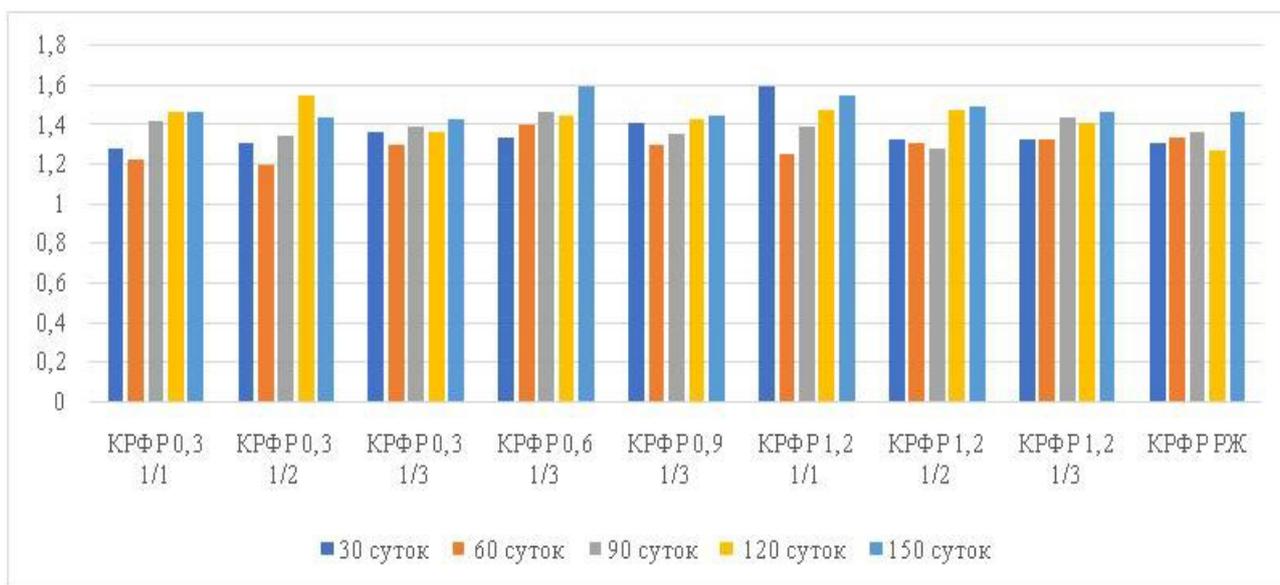


Рисунок 2 – Динамика изменений коэффициента упитанности в течении 150 дней эксперимента

Результаты исследования мышечной ткани форели радужной и комбикорма на содержание ПНЖК, показали, что количество ЛК и АЛК в рыбе, стремится к их содержанию в корме. При низком содержании ЭПК и ДГК в кормах, количество этих жирных кислот в рыбе увеличивается благодаря присутствию в достаточном количестве АЛК в качестве субстрата для элонгации. Причем 0,3 г суммы ЭПК и ДГК в корме недостаточно для активного накопления их в мышечной ткани рыбы. При 0,9 г суммы ЭПК и ДГК в корме на фоне соотношения линолевой и альфа-линоленовой кислоты 1:3 (корм КРФР 0,9 1:3) происходит увеличение количества ДЦ ПНЖК в филе форели до 0,6 г. При дальнейшем увеличении в кормах рыбного жира и варьировании соотношения омега-6 к омега-3, содержание ЭПК и ДГК в мышечной ткани форели практически не меняется. У форели, потреблявшей корм КРФР 44/23 РЖ без растительных масел, количество незаменимых жирных кислот велико, однако для их получения было израсходовано в 3 раза больше тех же жирных кислот из кормов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные подтверждают возможность продолжительного выращивания радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) на кормах без использования или с минимальным количеством рыбьего жира. Рыбоводные результаты показали высокую эффективность таких комбикормов и отсутствие нарушений со стороны обмена веществ. Ввод в состав комбикормов растительных масел, содержащих альфа-линоленовую кислоту, за счёт процессов элонгации и десатурации в тканях радужной форели обеспечил накопление необходимых для питания человека эйкозапентаеновой и докозагексаеновой жирных кислот.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Биндюков С. В., Бурлаченко И.В., Баскакова Ю.А., Артемов Р.В., Арнаутов М.В., Новоселова Ю.А., Гершунская В.В. Опыт замены рыбьего жира растительными маслами в комбикормах для радужной форели// Труды ВНИРО. – 2022. – Т. 187. – С. 138-148.

Винберг Г.Г. Интенсивность обмена и пищевые потребности рыб. – Минск: Белорусский ун-т, 1956. – 251 с.

Гладышев М.И. Наземные источники полиненасыщенных жирных кислот для аквакультуры // Вопросы ихтиологии. – 2021. – Т. 61. – № 4. – С. 471-485.

Породы радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* W.) – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2006. – 316 с.

Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. М.: Пищевая промышленность, 1966. – 96 с.

Российские рыбоводы в 2022 году увеличили производство рыбы и морепродуктов (Электронный ресурс) – URL: <http://aquacultura.org/news/rossiyskie-rybovody-v-2022-godu-uvelichili-roizvodstvo-ryby-i-moreproduktov/> (дата обращения 21.04.2023 г.).

Титарев Е.Ф. Холодноводное форелеводство. М.: Пищевая промышленность, 2007. – 280 с.

Щербина, М.А., Гамыгин Е. А. Кормление рыб в пресноводной аквакультуре. – М.: Изд-во ВНИРО, 2006. – 360 с.

Trushenski J., Schwarz M., Bergman A., Rombenso A.N., Delbos B. 2012. DHA is essential, EPA appears largely expendable, in meeting the n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid requirements of juvenile coho salmon *Oncorhynchus kisutch* // Aquaculture. – V. 326-329. – P. 81-89.

Turchini G.M., Hermon K.M., Francis D.S. 2018. Fatty acids and beyond: Fillet nutritional characterisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed different dietary oil sources// Aquaculture. – V. 491. – P. 391-397

FISH-BREEDING AND MORPHOPHYSIOLOGICAL INDICATORS OF RAINBOW TROUT AT RECIRCULATING AQUACULTURE SYSTEMS FED COMPOUND DIETS WITH THE SPECIFIED FATTY ACID COMPOSITION

S.V. Bindyukov¹, Yu.A. Novoselova², M.V. Arnautov¹, Yu. A. Baskakova¹, O.A. Bondarenko², E.Yu. Kozlova²

¹*VNIRO All-Russian Scientific Research Institute of Fisheries and Oceanography*

²*Branch for the Freshwater Fisheries of VNIRO («VNIIPRKh»)*

E-mail: Bindyukov@vniro.ru

Abstract. The effect of fish oil replacement in compound feeds with vegetable oils rich of linoleic and alpha-linolenic acid on the growth rates and morphophysiological parameters of rainbow trout of the steelhead breed was studied. According to the research results, growth indicators, fatness coefficients, trout liver

index in the experimental and control groups were stable, characteristic of fish of this age and did not depend on the fatty acid composition of the feed.

Keywords: rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, compound fish feed, feed components, growth performance, morphometric indices.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

НАУЧНОЕ ИЗДАНИЕ

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПРЕСНОВОДНОЙ АКВАКУЛЬТУРЫ**

Выпуск 94

Авторский перевод и ООО «АЛС»
Компьютерная верстка Жариковой В.Ю., Клец Н.Н.

Издатель: Сорокин Роман Васильевич
414040, Астрахань, пл. К. Маркса, 33, 1-й этаж

Подписано в печать 27.11.2023 г. Формат 60×90/16
Гарнитура Times New Roman. Усл. печ. л. 11,0
Тираж 100 экз.

Отпечатано в Астраханской цифровой типографии
(ИП Сорокин Роман Васильевич)
414040, Астрахань, пл. К. Маркса, 33, 1-й этаж
Тел.: (8512) 54-00-11, E-mail: RomanSorokin@list.ru