

УДК 579.62:(612.11:597.442):[615.33+669.35.5]

Гематологические параметры молоди стерляди на фоне совместного использования культуры *Bacillus subtilis* и наночастиц сплава Cu-Zn**Е.П. Мирошникова¹, А.Е. Аринжанов¹, Ю.В. Килякова¹, М.С. Мирошникова¹, К.А. Маленкина¹, И.С. Мирошников²**¹ ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет»² ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук»

Аннотация. В статье представлены результаты исследований морфологических и биохимических параметров крови молоди стерляди при использовании в кормлении культуры *Bacillus subtilis* и наночастиц сплава Cu-Zn. В качестве объектов исследований использовали 60 особей молоди стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758), которых методом аналогов разделили на 4 группы (n=15). По истечении подготовительного периода (15 суток) подопытных рыб перевели на режим основного учётного периода (45 суток), предполагавшего кормление контрольной группы основным рационом, I опытная группа дополнительно к основному рациону получала пробиотический препарат, II опытная – наночастицы сплава Cu-Zn, III опытная – пробиотический препарат совместно с НЧ сплава Cu-Zn. В качестве пробиотического препарата в эксперименте использована культура клеток *Bacillus subtilis* (штамм ВКПМ В-7092) в составе препарата Ветом 1.1.

Анализ гематологических параметров молоди стерляди показал, что включение в рацион стерляди НЧ и пробиотика положительно влияет на физиологическое состояние рыб. Достоверных различий по уровню гемоглобина и эритроцитов не зафиксировано, за исключением III группы – повышение содержания эритроцитов на 39 % (P<0,05) и гемоглобина – на 37,1 % (P<0,05) по сравнению с контрольной группой, кроме того зафиксирован максимум гематокритного числа (20,9 %), что связано с повышением содержания эритроцитов в данной группе. Концентрация тромбоцитов имела схожую динамику изменений с числом эритроцитов, так наибольшее количество тромбоцитов зафиксировано в III группе, но разница с контролем недостоверна. В остальных опытных группах наблюдали снижение тромбоцитов: в I опытной – на 39,8 % (P<0,05) и во II опытной группе – на 46,7 % (P<0,05). Анализ морфологического состава крови выявил повышение содержания лейкоцитов при введении в рацион стерляди пробиотика и сплава НЧ Cu-Zn (III группа) на 30,2 % (P<0,05) по сравнению с контролем.

Клетки белой крови были представлены агранулоцитами и гранулоцитами. Агранулоциты представлены в основном лимфоцитами (85,7-92,1 %), что свидетельствует о высоком иммунном статусе подопытной рыбы. Уровень моноцитов во всех группах был низким (4,5-6,7 %), причём зафиксированы достоверно низкие значения по сравнению с контролем в I и III опытных группах на 32,8 % (P<0,05) и 25,4 % (P<0,05) соответственно. Уровень гранулоцитов во всех опытных группах находился на одном уровне (6-7 %), за исключением I опытной группы – значительное снижение числа гранулоцитов – в 3,3 раза (P<0,001) по сравнению с контрольной группой. Анализ содержания креатинина показал, что при введении в рацион стерляди пробиотика его уровень повышается в 2,5 раза (P<0,001) относительно контроля, а при введении НЧ – снижается на 20 % (P<0,05), при совместном же введении пробиотика и НЧ достоверных различий не отмечено. Содержание холестерина во всех группах находилось в пределах нормы. Анализ триглицеридов показал снижение его концентрации на 13,6 % (P<0,05) во II группе и повышение на 39 % (P<0,001) – в III группе по сравнению с контролем. Во всех опытных группах зафиксировано повышение активности АСТ и ЛДГ по сравнению с контролем: в I группе – на 100 % (P<0,001) и 37,6 % (P<0,001), во II – на 88,2 % (P<0,01) и 31,3 % (P<0,001), в III – на 20,4 % (P<0,05) и 18,8 % (P<0,001) соответственно и снижение активности АЛТ: в I группе – на 16,4 % (P<0,01), во II – на 24,4 % (P<0,001) и в III – на 10,7 % (P<0,05).

Основываясь на полученных гематологических данных, установили, что наилучшие показатели были получены на фоне совместного введения пробиотика и НЧ сплава Cu-Zn в рацион стерляди.

Ключевые слова: стерлядь, *Bacillus subtilis*, наночастицы меди и цинка, кормление, гематологические параметры.

Введение.

Важной задачей совершенствования биотехники выращивания осетровых является создание новых технологических решений в области кормления и технологии кормов, что становится возможным за счёт использования минеральных веществ в виде ультрадисперсных частиц в сочетании с пробиотическими препаратами.

Современные препараты наночастиц металлов-микроэлементов отличаются меньшей токсичностью, высокой биологической активностью, усиливают обмен веществ и способствуют повышению естественной резистентности организма, увеличению темпов роста и обменных процессов [1, 2].

Пробиотики подавляют патогенную и условно патогенную микрофлору, обеспечивают организм хозяина незаменимыми веществами, повышающими его иммунитет [3, 4].

Совместное же использование наночастиц и пробиотиков перспективно, так как обеспечивает улучшение физиологического состояния рыбы, в том числе и гематологической картины (увеличение концентрации эритроцитов, гемоглобина, общего белка), повышение интенсивности роста. Химические элементы в составе наночастиц характеризуются выраженным стимулирующим действием на пробиотики [5, 6].

Наращение объёма и разнообразие научных исследований отечественными и зарубежными разработчиками в области создания новых пробиотических препаратов, манипуляции с наночастицами, дальнейшее изучение механизмов их действия даёт основание утверждать, что данные препараты смогут занять одно из центральных мест на мировом рынке [7].

Цель исследований.

Изучение морфологических и биохимических параметров молоди стерляди при использовании в кормлении культуры *Bacillus Subtilis* и наночастиц сплава Cu-Zn.

Материалы и методы исследования.

Объект исследования. Молодь стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758).

Обслуживание животных и экспериментальные исследования были выполнены в соответствии с инструкциями и рекомендациями Russian Regulations, 1987 (Order No. 755 on 12.08.1977 the USSR Ministry of Health) and «The Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press Washington, D.C. 1996)». При выполнении исследований были предприняты усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных и уменьшения количества используемых образцов.

Схема эксперимента. Для проведения исследований методом пар-аналогов были сформированы 4 группы (n=15) молоди стерляди. Исследования проводили в условиях аквариумного стенда кафедры «Биотехнологии животного сырья и аквакультуры» Оренбургского государственного университета. По истечению подготовительного периода (15 суток) стерлядь была переведена на условия основного учётного периода, предполагавшего кормление контрольной группы основным рационом (ОР), I опытной – с добавлением пробиотического препарата, II опытной – препараты наночастиц (НЧ) (Cu+Zn), III опытной – пробиотического препарата с НЧ (Cu+Zn). Продолжительность основного учётного периода составила 45 суток.

В ходе эксперимента суточную норму кормления определяли в количестве 3 % от массы рыб, в соответствии с общепринятой технологией выращивания [8]. Кормление подопытной рыбы осуществлялось 3 раза в день. Контроль над ростом проводился еженедельно, путём индивидуального взвешивания утром, до кормления (± 1 г), с последующим расчётом среднесуточного прироста. Определение кислорода – ежедневно.

С целью изучения гематологических параметров производили отбор крови во время убоя подопытной рыбы.

Среди морфологических показателей крови были исследованы: эритроциты ($10^{12}/л$), лейкоциты ($10^9/л$), гемоглобин (г/л), гематокрит (%). В сыворотке крови определяли: АлАТ (Ед/л), АсАТ (Ед/л), ЛДГ (Ед/л) (оптический тест Варбурга) и др.

Препараты.

Пробиотический препарат: культура клеток *Bacillus subtilis* в составе препарата Ветом 1.1. (свидетельство госрегистрации №: 35/35-Д1-5.3/00248 № КГМ-Д1-1.8/0089 от 25.10.2013); производство ООО НПФ «Исследовательский центр» (г. Новосибирск) с содержанием не менее 10^9 клеток *Bacillus subtilis*.

Наночастицы сплава Cu и Zn (40:60) синтезировали методом плазмохимического синтеза ($d=55\pm 15$ нм; $\zeta = 31\pm 0,1$ мВ, $S_{уд} = 9\pm 0,8$ м²/г), «Передовые порошковые технологии» (г. Томск).

Оборудование и технические средства. Гематологические исследования проводились по стандартизированным методикам в Испытательном центре ЦКП ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН (аттестат аккредитации № RA.RU.21ПФ59 от 02.12.2015 г.) и включили определение морфологических и биохимических параметров крови. Образцы крови для гематологических исследований отбирали в вакуумные пробирки с ЭДТА-К3, для биохимических исследований – в вакуумные пробирки с активатором свертывания. Определение гематологических показателей крови проводили с использованием автоматического гематологического анализатора URIT-2900 Vet Plus («URIT Medical», Китай) и автоматического биохимического анализатора DIRUI CS-T240 («DIRUI industrial Co. Ltd.», КНР). Для работы на анализаторах использовали стандартные наборы реактивов.

Материаловедческая аттестация препаратов (размер частиц, полидисперсность, объёмность, количественное содержание фракций, площадь поверхности) включала электронную сканирующую, просвечивающую и атомно-силовую микроскопию с использованием LEX T OLS4100, JSM 7401F, JEM-2000FX («JEOL», Япония). Размерное распределение частиц исследовалось на анализаторе наночастиц Brookhaven 90Plus/BIMAS Zeta PALS («Brookhaven Instruments Corporation», США) и Photocor Compact («Фотокор», Россия).

Статистическая обработка. Статистический анализ проводили, используя SPSS 19.0 программного обеспечения («IBM Corporation», США) и пакет программ «Statistica 10.0» («Stat Soft Inc.», США). Проверка соответствия полученных данных нормальному закону распределения определялась при помощи критерия согласия Колмогорова. Значение с $P\leq 0,05$ считалось статистически значимым.

Результаты исследований.

Анализ морфологического состава крови стерляди показал, что совместное включение в рацион пробиотика и НЧ сплава Cu-Zn способствовало повышению содержания эритроцитов на 39 % ($P<0,05$) и гемоглобина – на 37,1 % ($P<0,05$) по сравнению с контрольной группой (табл. 1). В остальных же группах достоверных различий по содержанию гемоглобина и эритроцитов не зафиксировано, они находились на уровне, характерном для осетровых видов рыб, выращиваемых в индустриальных условиях.

Показатели среднего содержания гемоглобина в эритроците (СГЭ), среднего объёма эритроцитов и средней концентрации гемоглобина в эритроците у всех подопытных рыб не имели достоверных различий и находились в пределах 94,5-108,8 пг, 165,3-175,5 фл и 541-659,3 г/л соответственно. При изучении картины красной крови молоди стерляди зафиксирован максимум гематокритного числа в III опытной группе (20,9 %), что объяснимо с повышением содержания эритроцитов в ней.

Анализ содержания тромбоцитов показал схожую динамику изменений с числом эритроцитов. Так, наибольшее количество тромбоцитов зафиксировано в III опытной группе, но разница с контролем недостоверна. В остальных опытных группах наблюдали снижение тромбоцитов: в I опытной – на 39,8 % ($P<0,05$) и во II опытной группе – на 46,7 % ($P<0,05$).

Таблица 1. Морфологический состав крови молоди стерляди

Показатель	Группа			
	контроль	I опытная	II опытная	III опытная
Эритроциты, 10 ¹² /л	0,90±0,065	0,80±0,195	0,71±0,191	1,25±0,137*
Гемоглобин, г/л	87,3±10,2	77,0±11,1	74,3±11,0	119,7±2,5*
Гематокрит, %	15,2±1,5	13,5±2,1	11,9±2,0	20,9±2,4
Средний объём эритроцитов, фл	169,1±4,6	175,5±5,8	167,2±6,2	165,3±6,0
СГЭ, пг	96,3±7,2	94,5±7,3	108,8±12,3	96,1±8,5
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/л	568,7 ±24,0	541,0±24,6	659,3±27,6	598,0±25,5
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	167±9,2	100,6±8,8*	89,0±9,9*	193±10,1
Средний объём тромбоцитов, фл	17,6±1,3	18,1±0,1	18,1±0,3	17,7±0,8
Относительная ширина распределения тромбоцитов, фл	15,1±0,1	13,0±0,6	12,8±0,8	21,3±1,1**
Тромбоцитрит, %	0,20±0,049	0,17±0,061	0,17±0,038	0,31±0,032*
Коэффициент больших тромбоцитов, %	42,8±4,5	38,7±4,9	41,4±4,0	49,3±4,1
Количество больших тромбоцитов, 10 ⁹ /л	69,6±7,7	52,3±5,8	38,1±4,3*	80,0±5,5
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	114,0±9,9	100,1±10,3	96,4±10,9	148,4±7,8*
Лейкоцитарная формула:				
Лимфоциты, %	85,7±2,8	89,9±0,9	87,8±2,1	92,1±3,3
Число лимфоцитов, 10 ⁹ /л	79,8±5,5	46,6±3,7*	72,35±2,7	77,6±3,2
Моноциты, %	6,7±0,6	4,5±0,5*	6,5±0,7	5,0±0,2*
Число моноцитов, 10 ⁹ /л	7,6±0,7	6,7±0,6	7,5±0,9	7,5±0,4
Гранулоциты, %	7,0±1,2	6,0±0,5	6,2±0,7	6,5±0,8
Число гранулоцитов, 10 ⁹ /л	9,0±0,35	2,7±0,25***	5,7±0,4*	8,1±0,35

Примечание: * – P≤0,05; ** – P≤0,01; *** – P≤0,001

Средний объём тромбоцитов в группах был идентичен (17,6-18,1 фл), а относительная ширина распределения тромбоцитов была достоверно выше контроля на 41 % (P<0,01) только в III опытной группе.

Анализ морфологического состава крови выявил повышение содержания лейкоцитов при введении в рацион стерляди пробиотика и НЧ сплава Cu-Zn (III группа) на 30,2 % (P<0,05) по сравнению с контролем. В остальных группах разница была недостоверной. Клетки белой крови были представлены агранулоцитами и гранулоцитами. Агранулоциты представлены в основном лимфоцитами (85,7-92,1 %). Уровень моноцитов во всех группах был низким (4,5-6,7 %), причём зафиксированы достоверно низкие значения по сравнению с контролем в I и III опытных группах на 32,8 % (P<0,05) и 25,4 % (P<0,05) соответственно. Уровень гранулоцитов во всех опытных группах был одинаковым (6-7 %), но в I опытной группе при добавлении в рацион пробиотика констатировали значительное снижение числа гранулоцитов – в 3,3 раза (P<0,001) по сравнению с контрольной группой.

Одним из важных показателей при изучении физиологического состояния рыб является содержание общего белка в сыворотке крови. Содержание белка в подопытных группах (табл. 2) находилось в пределах нижней границы физиологической нормы (25 г/л), достоверных отличий не зафиксировано.

Для осетровых рыб характерны высокие колебания глюкозы (1-11 ммоль/л). В I и II опытных группах зафиксировано достоверное повышение содержания глюкозы по сравнению с контрольной группой в 3 раза (P<0,001) и 2,4 раза (P<0,001) соответственно. Повышение глюкозы создаёт энергетический запас для развития организма, а также предполагает повышение стрессоустойчивости рыб.

Таблица 2. Биохимический состав крови молоди стерляди

Показатель	Группа			
	контроль	I опытная	II опытная	III опытная
Общий белок, г/л	22,86±0,8	25,39±2,2	20,31±1,9	22,49±1,6
Глюкоза, ммоль/л	1,29±0,07	3,88±0,08***	3,08±0,11***	1,28±0,09
Альбумин, г/л	5±0,7	9±1,0*	6±0,7	7±1,0
Билирубин общий, мкмоль/л	0,08±0,020	0,39±0,055**	0,55±0,030***	1,02±0,186***
Билирубин прямой, мкмоль/л	0,7±0,050	0,61±0,055	0,29±0,060**	0,77±0,060
Холестерин, ммоль/л	2,22±0,25	2,22±0,15	1,6±0,06*	2,73±0,15
Триглицериды, ммоль/л	69,24±2,7	62,86±2,1	59,82±2,5*	96,22±2,5***
Мочевина, ммоль/л	2,2±0,10	2,3±0,15	2,7±0,15*	2,0±0,10
Креатинин, мкмоль/л	174,2±5,0	452,9±7,1***	139,4±7,6**	174,2±3,8
Мочевая кислота, мкмоль/л	41±2,5	80±3,5***	14,9±1,3***	55,5±4,1*
Железо, мкмоль/л	14,3±0,7	26,5±2,8*	11,2±0,9	9,9±1,4*
Кальций, ммоль/л	1,71±0,11	1,59±0,07	1,63±0,11	1,73±0,10
Фосфор, ммоль/л	5,43±0,09	5,66±0,13	3,85±0,15***	3,19±0,09***

Примечание: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$

Концентрация альбумина в сыворотке крови в опытных группах свидетельствует об активном питании рыб и обменных процессах, особенно в I группе – повышение альбуминов на 80 % ($P < 0,05$) по сравнению с контролем.

Анализ содержания креатинина показал, что при введении в рацион стерляди пробиотика его уровень повышается в 2,5 раза ($P < 0,001$) относительно контроля, а при введении НЧ снижается на 20 % ($P < 0,05$), при совместном же введении пробиотика и НЧ достоверных различий не отмечено. Содержание холестерина в крови в группах было на одном уровне, за исключением II опытной группы – достоверное снижение концентрации холестерина по сравнению с контролем на 18 % ($P < 0,05$). В остальных группах достоверных различий не зафиксировано. В целом же содержание холестерина во всех группах находилось в пределах нормы (1,0-2,8 ммоль/л) [9].

Во всех опытных группах повысился общий билирубин по сравнению с контролем. Так, в I опытной группе – в 5 раз ($P < 0,01$), во II – в 7 раз ($P < 0,001$) и в III – в 13 раз ($P < 0,001$).

Уровень мочевины во всех группах был на одном уровне (2,0-2,3 ммоль/л) за исключением II группы – повышение на 22,7 % по сравнению с контролем. Кроме того, во II группе наблюдали снижение концентрации мочевой кислоты на 63,7 % ($P < 0,001$), в остальных же опытных группах констатировали достоверное её повышение, в I группе – на 95,1 % ($P < 0,001$) и в III – на 35,4 % ($P < 0,05$). Анализ триглицеридов показал снижение его концентрации на 13,6 % ($P < 0,05$) во II группе и повышение на 39 % ($P < 0,001$) – в III группе по сравнению с контролем.

Концентрация кальция в крови подопытных рыб находилась на одном уровне (1,59-1,73 ммоль/л) и достоверных различий не отмечено. Содержание железа характеризовалось повышением его в I группе на 85,3 % ($P < 0,05$) и снижением в III группе на 30,8 % ($P < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, при введении в рацион рыб пробиотика и пробиотика совместно с НЧ соответственно. Фосфор достоверно понизился во II и III опытных группах на 29,1 % ($P < 0,001$) и 41,3 % ($P < 0,001$) соответственно.

Исследования состава крови выявили изменения активности целого ряда ферментативных систем (табл. 3). Во всех опытных группах зафиксировано повышение активности АСТ и ЛДГ по сравнению с контролем: в I группе – на 100 % ($P < 0,001$) и 37,6 % ($P < 0,001$), во II – на 88,2 % ($P < 0,01$) и 31,3 % ($P < 0,001$), в III – на 20,4 % ($P < 0,05$) и 18,8 % ($P < 0,001$) соответственно. Отмечено снижение активности АЛТ во всех опытных группах: в I группе – на 16,4 % ($P < 0,01$), во II – на 24,4 % ($P < 0,001$) и в III – на 10,7 % ($P < 0,05$). Анализ ГГТ показал повышенную её активность (на 64,8 %; $P < 0,001$) у рыб I группы по сравнению с контролем.

Таблица 3. Активность ферментов в крови молоди стерляди

Показатель	Группа			
	контроль	I опытная	II опытная	III опытная
АЛТ, Ед/л	314,5±6,0	262,9±7,5**	237,8±5,3***	280,9±7,6*
АСТ, Ед/л	99,9±4,5	199,8±6,6***	188±15,0**	120,3±6,4*
ГГТ, Ед/л	88±4,1	145±5,9***	67±2,5**	83±3,6
ЛДГ, Ед/л	479±8,7	659±10,5***	629±6,6***	569±6,4***
Щелочная фосфатаза, Ед/л	205±10,0	132±8,5***	115±7,4***	214±8,0
α-амилаза, Ед/л	1965±13,6	2116±14,2***	2044±9,6**	2090±10,0***
р-амилаза, Ед/л	64,5±3,3	78,6±4,1*	74,9±4,4*	58,9±4,0
Липаза, Ед/л	2,4±0,1	8,2±0,3***	4,5±0,3***	4,5±0,2***

Примечание: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$

К концу эксперимента констатировали достоверное снижение активности щелочной фосфатазы в I группе на 35,6 % ($P < 0,001$) и во II – на 44 % ($P < 0,001$), что говорит о положительном влиянии кормов на физиологическое состояние рыб. Показатели α-амилазы в опытных группах были достоверно выше контроля: в I группе – на 7,7 % ($P < 0,001$), во II – на 4 % ($P < 0,01$) и в III – на 6,4 % ($P < 0,001$). Также наблюдалось повышение р-амилазы в I и II опытных группах на 21,8 % ($P < 0,05$) и 16,1 % ($P < 0,05$) соответственно. Активность липазы в опытных группах была достоверно выше контроля: в I группе – на 41,7 % ($P < 0,001$), во II – на 18,8 % ($P < 0,001$) и в III – на 18,8 % ($P < 0,001$).

Обсуждение полученных результатов.

Анализ полученных данных показал, что включение в рацион стерляди НЧ и пробиотика положительно влияет на физиологическое состояние рыб, особенно при совместном использовании. В частности, повышение содержания эритроцитов на 39 % ($P < 0,05$) и гемоглобина на 37,1 % ($P < 0,05$) в III группе может говорить о более интенсивном обмене у рыб, является благоприятным признаком физиологического состояния, и это действие по эффекту сравнимо с витаминами С и В₁₂ – стимуляторами иммунной системы и эритропоэза. Высокий уровень гемоглобина обеспечивает более интенсивные обменные процессы и свидетельствует об усилении внутреннего дыхания организма рыб и соответственно их резистентности [10], что подтверждают данные лейкоцитов III группы – повышение на 30,2 % ($P < 0,05$), и является благоприятным фактором для роста и развития рыб. Например, в естественных условиях данный показатель увеличивается в весенний период и достигает минимума в период зимовки [11].

Во всех подопытных группах содержание эритроцитов, гемоглобина и гематокрита находилось в пределах физиологической нормы для молоди стерляди [12]. Анализ содержания тромбоцитов показал схожую динамику изменений с числом эритроцитов, так, наибольшее количество тромбоцитов зафиксировано в III опытной группе, но разница между контролем не достоверна. Установлено, что количество тромбоцитов повышается в периоды эритропоэза и свидетельствует о хорошем физиологическом состоянии, кроме того, о хорошем состоянии стерляди судят по тромбоцитру, и максимальное его содержание констатировали при введении в корм пробиотика и сплава НЧ Cu-Zn и оно было достоверно выше контроля 1,5 раза ($P < 0,05$) [13].

Зафиксированное нами содержание белка в пределах нижней границы физиологической нормы (25 г/л) часто наблюдается у молоди осетровых при выращивании в индустриальных условиях и связано с уровнем стрессовой нагрузки, которая всегда присутствует при содержании рыбы в искусственных условиях [14]. Концентрация альбумина в сыворотке крови в опытных группах свидетельствует об активном питании рыб и обменных процессах, особенно в I группе – повышение альбуминов на 80 % ($P < 0,05$) по сравнению с контролем [15].

Анализ триглицеридов показал его повышение на 39 % ($P < 0,001$) лишь в III группе по сравнению с контролем. Повышение триглицеридов в крови свидетельствует о хорошей интенсивности роста молоди – увеличивается гидролиз триглицеридов в печени, который является основным источником энергии в обеспечении роста гидробионтов [16].

Клетки белой крови были представлены агранулоцитами и гранулоцитами. Агранулоциты представлены в основном лимфоцитами (85,7-92,1 %), что свидетельствует о высоком иммунном статусе подопытной рыбы. Уровень моноцитов (4,5-6,7 %) говорит об отсутствии патологических процессов в организме рыб и, как следствие, нормальном состоянии подопытных особей во всех группах [17, 18].

Отметим, что в I опытной группе при добавлении в рацион пробиотика констатировали значительное снижение числа гранулоцитов – в 3,3 раза ($P < 0,001$) по сравнению с контролем, и это может свидетельствовать о гранулоцитозе и соответственно об аллергических реакциях рыб, которые подтверждаются снижением числа лимфоцитов на 41,7 % ($P < 0,05$) и повышением уровня креатинина в 2,5 раза ($P < 0,001$) и активности ГГТ на 64,8 % ($P < 0,001$) относительно контроля [19]. Повышение креатинина может говорить о нарушении физиологического состояния рыб – почечной недостаточности, но данные содержания холестерина не подтверждают этого [20].

Исследования состава крови выявили изменения активности целого ряда ферментативных систем. Зафиксированное повышение уровня АСТ и ЛДГ во всех опытных группах возможно связано с нарушениями процессов перекисного окисления липидов в мышечной ткани и печени, обусловленными интенсивным ростом стерляди, при котором выбрасывается большое количество продуктов метаболизма, и которое сопровождается повышением активности АЛТ [21, 22]. Но нами отмечено снижение активности АЛТ во всех опытных группах: в I группе – на 16,4 % ($P < 0,01$), во II – на 24,4 % ($P < 0,001$) и в III – на 10,7 % ($P < 0,05$).

Уровень щелочной фосфатазы и снижение её в I группе на 35,6 % ($P < 0,001$) и во II – на 44 % ($P < 0,001$) говорит о положительном влиянии кормов на физиологическое состояние рыб, которые подтверждают данные повышения активности амилазы [23, 24].

Выводы.

Таким образом, основываясь на гематологических показателях стерляди, установили, что включение в рацион молоди стерляди пробиотического препарата Ветом 1.1. и НЧ сплава Cu-Zn положительно влияет на физиологическое состояние рыб, а наилучшие показатели были получены на фоне их совместного введения – констатировали повышение содержания эритроцитов на 39 % ($P < 0,05$), гемоглобина – на 37,1 % ($P < 0,05$), триглицеридов – на 39 % ($P < 0,001$), гематокритного числа – на 5,7 % и тромбоцита – в 1,5 раза ($P < 0,05$) по сравнению с контрольной группой.

Литература

1. Биологическая активность ионов, нано- и микрочастиц Cu и Fe в тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции / Д.Г. Дерябин, Е.С. Алешина, Т.Д. Дерябина, Л.В. Ефремова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2011. № 6. С. 31-36.
2. Изучение безопасности введения наночастиц меди с различными физико-химическими характеристиками в организм животных / О.А. Богословская, Е.А. Сизова, В.С. Полякова, С.А. Мирошников, И.О. Лейпунский, И.П. Ольховская, Н.Н. Глушенко // Вестник Оренбургского государственного университета. 2009. № 2. С. 124-127.
3. Шульга Е.А. Пробиотики в кормлении осетровых рыб при товарном выращивании: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Астрахань, 2009. 24 с.
4. Жандалгарова А.Д. Пробиотики нового поколения на основе родов *Bacillus*, *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в составе стартовых комбикормов как стимуляторы роста осетровых рыб // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2016. № 3. С. 35-37.

5. Сизова Е.А., Русакова Е.А., Сизов Ю.А. Некоторые биохимические и морфологические показатели крови при введении в организм наночастиц меди // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2011. Т. 4. № 32-1. С. 308-309.
6. Обмен химических элементов в организме карпа при использовании наночастиц кобальта и железа в корме / Е.П. Мирошникова, А.Е. Аринжанов, Н.Н. Глущенко, С.П. Василевская // Вестник Оренбургского государственного университета. 2012. № 6. С. 170-175.
7. Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects / M. Sajid, M. Ilyas, C. Basheer, M. Tariq, M. Daud, N. Baig, F. Shehzad // Environmental Science and Pollution Research. 2015. V. 22. Issue 6. P. 4122-4143.
8. Пономарёв С.В., Иванов Д.И. Осетроводство на интенсивной основе. М.: Колос, 2009. 312 с.
9. Назыров А.Д. Биоаккумуляция тяжёлых металлов, диоксинов и влияние на гематологические и биохимические показатели гидробионтов р. Уфа: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2003. 23 с.
10. Эколого-физиологическая характеристика рыб малых рек Южного Урала / Н.Г. Курамшина, Э.Э. Нуртдинова, А.Д. Назыров, Г.Д. Виноградов, А.Ю. Матвеева, О.В. Богатова // Вестник Оренбургского государственного университета. 2015. № 4(179). С. 240-243.
11. Корабельникова О.В. Физиолого-биохимические показатели осетровых рыб (*Acipenseridae Bonaparte*, 1832) при выращивании в промышленных хозяйствах: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2009. 25 с.
12. Бахарева А.А. Научно-обоснованные методы повышения продуктивности ремонтно-маточных стад осетровых рыб за счет оптимизации технологии кормления и содержания в условиях рыбоводных хозяйств Волго-Каспийского бассейна: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. Усть-Кинельский, 2016. 32 с.
13. Житенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Тромбоциты рыб и других групп позвоночных. Ростов н/Д: АзНИИРХ, 2003. 72 с.
14. Atlas of blood cells: function and pathology / D. Zucker-Franklin, M. F. Greaves, C. E. Grossi et al. Milan. 1981. Vol. 1. P. 255.
15. Лукьяненко В.И., Хабаров М.В. Альбуминовая система сыворотки крови разных по экологии видов осетровых рыб: монография. Ярославль: Верхневолж. отд. РЭА, 2005. 232 с.
16. Features of the effect of a complex probiotic with bacillus bacteria and the larvae of hermetia illucens biomass on mozambique tilapia (*oreochromis mossambicus* × *o. niloticus*) and russian sturgeon (*acipenser gueldenstaedti*) fry / N.A. Ushakova, A.I. Bastrakov, A.A. Kozlova, D.S. Pavlov, S.V. Ponomarev, Y.M. Bakanova, Y.V. Fedorovykh, A.D. Zhandalgarova // Biology Bulletin. 2016. Т. 43. № 5. P. 450-456.
17. Абдуллаева Н.М., Рамазанова М.Г., Габибов М.М. Изучение физиологического состояния осетровых рыб среднего Каспия // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2016. Т. 18. № 2-1. С. 7-9.
18. Analysis of the leukogram of sturgeons (*Acipenser baerii* (Brandt) and *A. gueldenstaedtii* (Brandt)) grown in artificial reservoirs / N.M. Abdullaeva, M.M. Gabibov, P.A. Asadulaeva, M.G. Ramazanova // Inland Water Biology. 2015. Т. 8. № 4. P.421-425.
19. Лапирова Т.Б. Влияние перметрина на лейкоцитарную формулу молоди осётра // Токсикологический вестник. 2009. № 6. С. 21-24.
20. Многолетний мониторинг физиологического состояния основных видов каспийских осетровых рыб / Г.Ф. Металлов, П.П. Гераскин, В.П. Аксёнов, О.А. Левина // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. 2016. № 1. С. 88-98.
21. Р.А. Гулиев, Э.И. Мелякина. Некоторые биохимические показатели крови рыб дельты Волги // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. 2014. № 2. С. 85-91.
22. Pronina G.I. Physiological and immunological features of males and females of the immunologically resistant carp breed (*Cyprinus carpio* L.) // AACL Bioflux. 2017. Volume 10(2). P. 335-340.

23. Влияние кормовой синбиотической добавки нового поколения «ПроСтор» на рыбоводно-биологические и гематологические показатели молоди русского осётра / А.Д. Жандалгарова, А.А. Бахарева, Ю.Н. Грозеску, А.И. Правдин // Главный зоотехник. 2017. № 7. С. 30-35.

24. Опыт выращивания гибрида «русский осётр×ленский осётр» (*Acipenser queldenstadii brandt et ratzeburg*, 1833 x *Acipenser baerii, brandt* 1869) в установке замкнутого водоснабжения / О.А. Левина, И.П. Степанова, Г.Ф. Металлов, М.Н. Сорокина // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания. 2015. № 3(7). С. 17-25.

Мирошникова Елена Петровна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии животного сырья и аквакультуры факультета прикладной биотехнологии и инженерии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», 460018, г. Оренбург, просп. Победы, 13, сот.: 8-987-862-98-86, e-mail: elenaakva@rambler.ru

Аринжанов Азамат Ерсайнович, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры биотехнологии животного сырья и аквакультуры факультета прикладной биотехнологии и инженерии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», 460018, г. Оренбург, просп. Победы, 13, сот.:8-922-806-33-43, e-mail: arin.azamat@mail.ru

Киякова Юлия Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии животного сырья и аквакультуры факультета прикладной биотехнологии и инженерии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», 460018, г. Оренбург, просп. Победы, 13, сот.: 8-961-920-40-64, e-mail: fish-ka06@mail.ru

Мирошникова Мария Сергеевна, студент кафедры биотехнологии животного сырья и аквакультуры факультета прикладной биотехнологии и инженерии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», 460018, г. Оренбург, просп. Победы, 13, сот.: 8-9228-67-57-10, e-mail: mary-zayka@mail.ru

Маленкина Ксения Александровна, студент кафедры биотехнологии животного сырья и аквакультуры факультета прикладной биотехнологии и инженерии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», 460018, г. Оренбург, просп. Победы, 13, сот.: 8-922-824-71-54, e-mail: malyonkina.m@yandex.ru

Мирошников Иван Сергеевич, научный сотрудник отдела кормления сельскохозяйственных животных и технологии кормов им. С.Г. Леушина ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук», 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, тел.: 8-922-806-01-01, e-mail: sparco911@rambler.ru

Поступила в редакцию 9 июля 2018 года

UDC 579.62:(612.11:597.442):[615.33+669.35.5]

Miroshnikova Elena Petrovna¹, Arinjanov Azamat Yersainovich¹, Kilyakova Yuliya Vladimirovna¹, Miroshnikova Maria Sergeevna¹, Malenkina Ksenia Aleksandrovna¹, Miroshnikov Ivan Sergeevich^{1,2}

¹ FSBEI HE «Orenburg State University», e-mail: elenaakva@rambler.ru

² FSBSI «Federal Research Center for Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences», e-mail: sparco911@rambler.ru

Hematological parameters of young sterlet against the background of the combined use of *Bacillus subtilis* and Cu-Zn alloy nanoparticles

Summary. The article presents the results of research on morphological and biochemical parameters of blood of young sterlet after using *Bacillus subtilis* and nanoparticles of Cu-Zn alloy. 60 young sterlet individuals (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) were used, they were divided into 4 groups (n=15) by analogues method. At the end of the preparatory period (15 days), the experimental fish were transferred to the regime of the main accounting period (45 days), it supposed to feed the control group with the main diet, the I experimental group in addition to the main diet received probiotic preparation, II experimental – nanoparticles of Cu-Zn, III experimental – probiotic preparation and Cu-Zn nanoparticles. *Bacillus subtilis* (strain VKPM V-7092) was used as a probiotic in the experiment as part of the Vetom 1.1 preparation.

The analysis of hematological parameters of young sterlet showed that the inclusion of nanoparticles and probiotic in the diet of sterlet positively influences on the physiological state of fish. No significant differences in hemoglobin and erythrocytes were recorded, except for group III, an increase in erythrocyte content by 39 % ($P < 0.05$) and hemoglobin – by 37.1 % ($P < 0.05$), as compared to the control group, in addition, the maximum of the hematocrit number (20.9 %) was recorded, which is associated with an increase in the level of erythrocytes in this group. The concentration of platelets had a change in the dynamics of changes with the number of erythrocytes, so the highest number of platelets was recorded in group III, but the difference with control is insignificant. In the rest of the experimental groups, platelet counts were observed: in the I experimental group 39.8 % ($P < 0.05$) and in the II experimental group – by 46.7 % ($P < 0.05$). The analysis of the morphological composition of the blood revealed an increase in the content of leukocytes when administered into the sterility of the probiotic and the Cu-Zn nanoparticles (III group) by 30.2 % ($P < 0.05$) as compared to the control.

Cells of white blood were represented by agranulocytes and granulocytes. Agranulocytes are mainly represented by lymphocytes (85.7-92.1 %), which indicates a high immune status of experimental fish. Monocytes in all groups were low (4.5-6.7 %), with significantly lower values compared to control in I and III experimental groups by 32.8 % ($P < 0.05$) and 25.4 % ($P < 0.05$) respectively. The level of granulocytes in all experimental groups was at the same level (6-7 %), except for the I experimental group, a significant decrease in the number of granulocytes – by 3.3 times ($P < 0.001$) compared with the control group. An analysis of creatinine content showed that after probiotic was administered to the diet of sterlet, its level increases by 2.5 times ($P < 0.001$) relative to the control, and after administration of nanoparticles it decreases by 20 % ($P < 0.05$), after the joint introduction of probiotic and NPs no significant differences were registered. The content of cholesterol in all groups was within the normal range. The analysis of triglycerides showed a decrease in its concentration by 13.6 % ($P < 0.05$) in group II and an increase of 39 % ($P < 0.001$) in group III compared to control. In all experimental groups, an increase in the activity of AST and LDH was observed in comparison with control: in group I – by 100 % ($P < 0.001$) and 37.6 % ($P < 0.001$), in II – by 88.2 % ($P < 0.01$) and 31.3 % ($P < 0.001$), in III – by 20.4 % ($P < 0.05$) and 18.8 % ($P < 0.001$), respectively, and decreased ALT activity: in group I – at 16.4 % ($P < 0.01$), in II – by 24.4 % ($P < 0.001$) and in III – by 10.7 % ($P < 0.05$).

Based on the received hematological data, it was found that the best results were obtained against the background of the combined introduction of the probiotic and Cu-Zn nanoparticles into the diet of sterlet.

Key words: sterlet, *Bacillus subtilis*, copper and zinc nanoparticles, feeding, hematological parameters.