

ВЛИЯНИЕ ЭЛЛАГОТАНИНОВ И ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА “ЭКОФЛОР” НА ПОКАЗАТЕЛИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА СТЕРЛЯДИ

Д. В. Микряков *, Т. А. Суворова, С. В. Кузьмичева

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

152742 пос. Борок, Ярославская область, Некоузский р-н, e-mail: *daniil@ibiw.ru

Поступила в редакцию 9.10.2023

Проведено экспериментальное исследование влияния кормовой добавки на основе эллаготанинов и иммобилизованного пробиотика на некоторые параметры неспецифического иммунитета стерляди. В пробах определяли уровень бактериостатической активности сыворотки крови и С-реактивного белка, а также неспецифических иммунных комплексов в сыворотке крови, почке, селезенке и печени. Исследованием установлены высокие показатели антимикробных свойств сыворотки крови у всех исследуемых рыб и отсутствие иммунодефицитных особей. Более низкие показатели БАСК в опытных группах и нулевой процент ИМД особей свидетельствуют об отсутствии влияния препаратов на бактерицидную активность. У большинства изученных рыб зафиксирован положительный уровень С-реактивного белка. Содержание неспецифических иммунных комплексов в печени в несколько раз превышало показатели других тканей, что может быть связано с нейтрализацией компонентов, входящих в состав препаратов. Полученные результаты указывают на незначительное содержание в воде патогенных микроорганизмов.

Ключевые слова: *Acipenser ruthenus*, гуморальный иммунитет, антимикробные свойства сыворотки крови, С-реактивный белок, неспецифические иммунные комплексы.

DOI: 10.47021/0320-3557-2024-50-59

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время аквакультура – надежный источник увеличения объемов пищевой рыбопродукции и служит гарантом продовольственной безопасности [Богерук, 2005 (Bogoruk, 2005)]. Одна из основных задач индустриального выращивания – быстрое достижение объектами аквакультуры товарной массы. Однако кормление искусственным кормом, высокие плотности посадки и другие негативные факторы промышленного рыбоводства неизбежно ведут к увеличению стрессовых нагрузок. Это отражается на физиологическом состоянии рыб. Нарушения в функционировании иммунной системы приводят к вспышкам инфекционных заболеваний и эпизоотическому неблагополучию рыбоводных хозяйств, что приносит большой экономический ущерб при культивировании рыб. Инфекционные заболевания представляют серьезную опасность и могут привести к значительным потерям и проблемам с запасами рыбной продукции [Серова, 2017 (Serova, 2017)]. Борьба с бактериальными заболеваниями рыб в нашей стране в основном базируется на применении медикаментозных лекарственных средств. Для терапии инфекций, наносящих большой экономический ущерб рыбоводным хозяйствам, в том числе аэромоноза, в производственной практике применяют антибактериальные препараты [Головин и др., 2006 (Golovin et al., 2006); Гончарова, 2009 (Goncharova, 2009); Юхименко и др., 2021 (Yukhimenko et al., 2021)]. Однако успехи антибиотикотерапии

привели к их широкому бесконтрольному применению, в том числе с профилактической целью, что привело к резкому снижению их эффективности, нарушению экосистем и микробиоценозов со всеми вытекающими последствиями [Юхименко и др., 2021 (Yukhimenko et al., 2021)].

Современное состояние антибиотикорезистентности рыб делает необходимым поиск альтернативных, физиологически обоснованных и безопасных способов профилактики и лечения инфекций [Noga, 1995; Мирзоева, 2000 (Mirzoeva, 2000); Шульга, 2009 (Shulga, 2009)]. В настоящее время интенсивно разрабатываются средства, позволяющие сократить использование в рыбоводных хозяйствах антибиотиков и химиотерапевтических препаратов, применяя их только в исключительных случаях для быстрого купирования вспышек бактериальных заболеваний. Альтернатива применению антибиотиков – использование пробиотических препаратов из бактерий, обладающих антагонистическим действием в отношении возбудителей заболевания. Механизм действия пробиотиков, прежде всего, направлен на вытеснение патогенной микрофлоры кишечника и, как следствие, на нормализацию обмена веществ у рыб, улучшение усвоения корма, повышение резистентности организма [Смирнов и др., 1993 (Smirnov et al., 1993)]. Не менее важная функция пробиотиков – продуцирование комплекса биологически активных веществ, способных нейтрализовать опасные метаболиты, токсины бактерий.

Большинство бактерий, обладающих пробиотическими свойствами – представители родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, однако в последнее время используют и спорообразующие бактерии, в особенности из рода *Bacillus* [Бычкова, 2007 (Bychkova, 2007); Лукьянова, 2007 (Lukyanova, 2007)]. Показано, что добавление в корм растительных препаратов улучшает рост, иммунную активность и защиту от возбудителей различных заболеваний, выживаемость рыб [Immanuel et al., 2009; Masalhy et al., 2010; Tkachenko et al., 2018]. Исследована активность пищеварительных ферментов стерляди и карпа под воздействием пробиотических препаратов на основе *Bifidobacterium subtilis* [Kuzmina et al., 2011; Зуенко и др., 2017 (Zuenko et al., 2017)]. Ранее проведенные исследования показали положительное влияние на рост, массонакопление, антибактериальные и антиоксидантные свойства, устойчивость к возбудителям инфекционных заболеваний и, как следствие, выживаемость рыб в условиях аквакультуры [Склярков и др., 2004 (Sklyarov et al., 2004); Pavlov et al., 2014; Жандалгарова, Бахарева, 2015 (Zhandalgarova, Bakhareva, 2015); Coccia et al., 2019; Mişe Yonar Serpil, 2019; Зеков и др., 2021 (Zekov et al., 2021); Романова и др., 2021 (Romanova et al., 2021)]. Кроме симбионтных бактерий, используют энтеросорбенты, обеспечивающие высокую биодоступность и доставку пробиотических бактерий в кишечник рыб. В связи с этим возрастает потребность изучения иммобилизованных форм пробиотических препаратов для дальнейшего использования в условиях индустриальной аквакультуры. Однако исследования воздействия различных по составу пробиотиков на процессы пищеварения у рыб противоречивы, немногочисленны данные по влиянию антибактериальных и пробиотических препаратов на иммунный статус рыб [Суворова, Силкина, 2019 (Suvorova, Silkina, 2019); Нечаева и др., 2023 (Nechaeva et al., 2023)].

Кормовые добавки на основе эллаготанинов – одни из многочисленных препаратов природного происхождения. Эти вещества способны связываться с белками, благодаря обратимым ионным и слабым водородным

связям. В отличие от другой группы танинов – конденсированных, содержащихся в большинстве травянистых и древесных растений, эллаготанины не обладают антипитательными свойствами [Использование..., 2020 (Ispol'zovanie..., 2020)]. Эллаготанины связываются с мембранами бактериальных клеток и выводят выделяемые ими токсины за счет комплексобразования. Кроме этого, эллаготанины разрушают “чувство кворума” патогенных микроорганизмов, что ведет к дезориентации бактерий, получению ложной информации об их количестве и, как следствие, к сокращению численности колонии. Кормовая добавка “Акватан” (“Фарматан Аква”) на основе эллаготанинов из древесины сладкого каштана фирмы “Танин Севница” (Словения), по данным производителя, стимулирует здоровье кишечника, служа цитопротекторным агентом, обладает способностью связываться с белками, действует антибактериально и обладает иммуностимулирующими свойствами [Использование..., 2020 (Ispol'zovanie..., 2020)].

Используемый в эксперименте препарат “Экофлор” используется как биологически активная добавка – пробиотик нового поколения. Микробиологическая основа препарата “Экофлор” – консорциум антагонистически активных бифидобактерий видов – *B. bifidum* и *B. longum*, а также лактобактерий видов – *Lactobacillus casei*, *L. plantarum* и *L. acidophilus*, иммобилизованных на энтеросорбенте. Бифидо- и лактобактерии подавляют размножение патогенной микрофлоры, участвуют в пищеварительном процессе, нормализуют содержание и обмен биологически активных веществ, обладают иммуностимулирующей активностью. Бактерии методом обратимой иммобилизации закреплены на углеродминеральном сорбенте, который используется для детоксикации организма путем выведения из кишечника токсинов и тяжелых металлов, не нарушая при этом водно-солевого баланса желудочно-кишечного тракта.

Цель работы – исследование влияния различных дозировок “Акватан” и “Экофлор” на некоторые гуморальные факторы иммунитета стерляди *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в августе-сентябре 2022 на стерляди в возрасте 2+ средней массой 305.50 ± 27.47 г и длиной 36.95 ± 0.93 . Рыб разделили на 3 группы: контрольная и 2 опытных с добавлением препаратов. Каждую группу по 30 особей рассадили в проточные пластиковые бассейны, объемом 2.5 м^3 . Всего было исследовано, включая контроль перед опытом, 85 особей. На протяже-

нии эксперимента температура воды колебалась незначительно (от 18.7 до 20.4°C), содержание кислорода на выходе из бассейна от 7.5 до 9.9 мг/л, уровень pH и азотистых метаболитов (NH_4/NH_3 ; NO_2 ; NO_3) соответствовал норме для осетровых рыб. Стерлядь кормили 6 раз в сутки кормом для рыб (SUPREME-15 3.0 мм) фирмы “Alltech Coppens” одной серии. Согласно данным производителя в состав это-

го вида корма входят белки (46%), жиры (15%), клетчатка (1.4%), зола (5.1%), фосфор (0.85%) и витамин А (10000 МЕ/кг). Контрольная группа (I) – корм без добавок, опытные группы: II – препарат “АКВАТАН” на основе эллаготанинов производства компании “Танин” г. Севница (Словения) из расчета 2 г/кг корма, III – биологически активная добавка “Экофлор” (АО “Вектор-БиАльгам”) из расчета 5 г/кг корма. Препараты в корм добавляли согласно инструкциям.

Отбор проб проводили перед началом эксперимента, на 7, 14, 30, 45 и 60 сут. Материал для исследования отбирали у 5 особей из каждой группы. У рыб для исследования отбирали периферическую кровь из хвостовой вены, а после вскрытия рыб – кусочки почки, селезенки и печени, которые помещали в сухие стерильные пробирки. Для получения сыворотки пробирку с кровью оставляли в штативе на 1 ч при комнатной температуре, а потом выдерживали 1 сут в холодильнике при 4°C для свертывания крови и ретракции сгустка. После этого сыворотку забирали шприцем с тонкой иглой и переносили в пробирку Эппендорфа. Для дальнейших исследований из почки, селезенки и печени готовили гомогенат с физиологическим раствором в соотношении 1:6.

В сыворотке крови изучали бактериостатическую активность (БАСК), уровень С-реактивного белка и содержание неспецифических иммунных комплексов (ИК), в гомогенатах тканей почки, селезенки и печени – содержание ИК.

БАСК оценивали нефелометрическим методом в модификации В.Р. Микрякова [1991]. Данный показатель определяли

по влиянию разведенной в 5 раз рыбопептонным бульоном сыворотки крови на рост и развитие 50 млн. тест-микробов вида *Aeromonas hydrophila*. Выбор *A. hydrophila* обусловлен тем, что этот вид относится к условно-патогенным и широко распространенным в природе микроорганизмам, а также является одним из этиологических факторов краснухи – аэромонадной инфекции пресноводных и морских костистых рыб [Schäperclaus, 1979]. Тест-культура была получена из лаборатории ихтиопатологии Филиала по пресноводному рыбному хозяйству Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии (“ВНИИПРХ”). Скорость роста бактерий в рыбо-пептонном бульоне в присутствии сыворотки (опыт) и без нее (контроль) определяли после 5–6-часовой инкубации при температуре 26°C. Скорость роста тест-микробов оценивали по изменению оптической плотности бульона до и после инкубации бактерий в опыте по сравнению с таковой в контроле. При нулевом уровне БАСК особи считали иммунодефицитными (ИМД).

Уровень СРБ определяли визуально по реакции агглютинации латекс-реагента с сывороткой крови, используя набор реагентов СРБ-Ольвекс.

Содержание ИК определяли спектрофотометрически при длине волны 450 нм методом селективной преципитации с 4% полиэтиленгликолем молекулярной массой 6000 [Гриневиц, Алферов, 1981 (Grinevich, Alferov, 1981)].

Статистическая обработка результатов исследования выполнена с помощью пакета программ Statistica v. 6.0 с использованием *t*-теста Стьюдента. Различия считали значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

БАСК – интегральный показатель функционального состояния врожденных факторов гуморального иммунитета: систем комплемента, лизоцима, иммуноглобулинов, противомикробных пептидов, лектинов, преципитинов, β -лизина, пропердина, дефензина и др. [Микряков, 1984, 1991 (Mikryakov, 1984, 1991); Ройт и др., 2000 (Royt et al., 2000); Van Muiswinkel, Vervoorn-Van der Wal, 2006; Койко и др., 2008 (Koyko et al., 2008); Van der Marel, 2012; Campoverde et al., 2017 и др.]. На протяжении всего эксперимента уровень БАСК менялся под влиянием исследуемых препаратов (табл. 1).

На 7 сут эксперимента бактерицидная активность снизилась во всех группах по сравнению с данными, полученными до начала

опыта. Причем в 1 и 2 группе зафиксированы достоверные отличия. Через 2 нед уровень БАСК в 1 и 3 группе повысился до начальных значений. У стерляди, получавшей с кормом эллаготанины, показатель был ниже. В конце месяца наблюдений во всех группах бактерицидная активность незначительно снизилась, а в дальнейшие сроки эксперимента постепенно повысилась до начального уровня. Более низкие показатели БАСК в опытных группах по сравнению с контролем, а также нулевой процент ИМД особей во все сроки наблюдения свидетельствуют об отсутствии положительного или отрицательного влияния препаратов на бактерицидную активность.

Таблица 1. Уровень БАСК, СРБ в сыворотке крови и процент ИМД особей**Table 1.** Level of BABS, CRP in blood serum and percentage of IMI of individuals

Время отбора проб Sampling time	БАСК, % BAS, %	ИМД особи, % IMI specimen, %	СРБ, мг/л CRP, mg/l
контроль перед опытом * control before experiment *	66.57±3.34	0	(>6) 100%
7 сут 7 days			
Контроль ^a Control ^a	46.92±1.57*	0	(>6) 75% (6) 25%
опыт с добавкой эллаготанинов ^б experiment with ellagitannin supplement ^b	48.12±3.28*	0	(>6) 100%
опыт с добавкой пробиотика ^б experiment with probiotic supplement ^B	55.97±4.50	0	(>6) 100%
14 сут 14 days			
Контроль ^a Control ^a	69.35±2.68	0	(>6) 75% (<6) 25%
опыт с добавкой эллаготанинов ^б experiment with ellagitannin supplement ^b	60.12±2.90	0	(>6) 100%
опыт с добавкой пробиотика ^б experiment with probiotic supplement ^B	67.47±2.77	0	(>6) 75% (6) 25%
30 сут 30 days			
Контроль ^a Control ^a	58.27±2.84	0	(>6) 100%
опыт с добавкой эллаготанинов ^б experiment with ellagitannin supplement ^b	55.00±2.49	0	(>6) 50% (6) 50%
опыт с добавкой пробиотика ^б experiment with probiotic supplement ^B	54.45±3.34	0	(>6) 100%
45 сут 45 days			
Контроль ^a Control ^a	64.12±1.92*	0	(>6) 75% (6) 25%
опыт с добавкой эллаготанинов ^б experiment with ellagitannin supplement ^b	61.80±2.50	0	(>6) 75% (6) 25%
опыт с добавкой пробиотика ^б experiment with probiotic supplement ^B	57.87±2.29	0	(>6) 75% (6) 25%
60 сут 60 days			
Контроль ^a Control ^a	62.07±2.42	0	(>6) 100%
опыт с добавкой эллаготанинов ^б experiment with ellagitannin supplement ^b	63.32±2.61	0	(>6) 75% (6) 25%
опыт с добавкой пробиотика ^б experiment with probiotic supplement ^B	66.07±2.12	0	(>6) 75% (6) 25%

Примечание. Здесь и далее “*” - достоверно относительно контроля перед опытом, а–в – достоверные отличия между группами рыб.

Note. Here and below “*” - is significant relative to the control before the experiment, а–в are significant differences between groups of fish.

С-реактивный белок рыб (СРБ) – белок острой фазы, наиболее чувствительного лабораторного маркера инфекции, воспаления и тканевого повреждения [Назаров, 2010 (Nazarov, 2010)]. Его уровень повышается при воспалительных процессах в организме. СРБ – один из ключевых компонентов гуморального врожденного иммунитета, обеспечивает связь между врожденной и адаптивной иммунной

системами [Назаров, 2010 (Nazarov, 2010)], способный распознавать микробы и способствовать их поглощению фагоцитами [Bottazzi et al., 2010; Lee et al., 2017]. В сыворотке здорового организма СРБ отсутствует, но его уровень быстро и многократно увеличивается при инфекционных и паразитарных заболеваниях. Исследования уровня СРБ указывают на наличие воспалительных процессов в организме

большинства рыб. Установлено, что у 75% особей зафиксирован положительный (>6 мг/л), а у остальных слабо положительный (6 мг/л) показатель (табл. 1). Положительный уровень С-реактивного белка у большинства рыб указывает на воспалительные процессы в организме,

что может быть обусловлено с содержанием в воде патогенных микроорганизмов. Возможно, с этим связан высокий (более 50%) уровень БАСК у исследованных особей стерляди.

Таблица 2. Содержание ИК в крови, печени, почке и селезенке

Table 2. IC content in the blood, liver, kidney and spleen

Время отбора проб Sampling time	ИК, у. е. IC, arb. units			
	Кровь Blood	Печень Liver	Почка Kidney	Селезенка Spleen
контроль перед опытом * control before experiment *	6.12±2.50	28.20±12.63	8.15±2.09	3.95±0.22
7 сут 7 days				
Контроль ^a Control ^a	0.90±0.20	12.82±6.49	4.27±1.47	1.82±0.63*
опыт с добавкой эллаготанинов ^б experiment with ellagitannin supplement ^b	2.07±0.17 ^a	17.10±9.04	5.50±0.55	2.27±0.61*
опыт с добавкой пробиотика ^б experiment with probiotic supplement ^B	2.05±0.71	22.90±3.52	5.07±1.70	2.17±0.41*
14 сут 14 days				
Контроль ^a Control ^a	2.40±0.99	10.40±4.82	6.70±0.39	2.47±0.90
опыт с добавкой эллаготанинов ^б experiment with ellagitannin supplement ^b	4.15±0.47	13.40±3.36	5.82±0.33	3.17±0.48
опыт с добавкой пробиотика ^б experiment with probiotic supplement ^B	5.70±1.37	21.67±5.81 ^б	4.00±0.75 ^a	2.42±0.92
30 сут 30 days				
Контроль ^a Control ^a	5.37±2.01	32.67±17.14	5.15±1.02	5.67±1.47
опыт с добавкой эллаготанинов ^б experiment with ellagitannin supplement ^b	3.27±1.06	41.50±9.68	3.07±0.20	1.97±0.29 ^a
опыт с добавкой пробиотика ^б experiment with probiotic supplement ^B	4.05±1.07	26.77±6.09	3.80±0.48	2.72±0.67
45 сут 45 days				
Контроль ^a Control ^a	3.42±0.58	21.15±8.31	4.30±1.02	2.55±0.42*
опыт с добавкой эллаготанинов ^б experiment with ellagitannin supplement ^b	2.30±0.43	37.25±8.54	2.75±0.40	1.92±0.27
опыт с добавкой пробиотика ^б experiment with probiotic supplement ^B	0.4±0.25 ^{аб}	31.35±13.03	4.20±1.46	2.80±0.82
60 сут 60 days				
Контроль ^a Control ^a	3.05±0.48	37.97±7.51	4.97±1.25	4.17±0.51
опыт с добавкой эллаготанинов ^б experiment with ellagitannin supplement ^b	7.00±2.26	33.22±3.14	7.47±1.07	3.92±1.51
опыт с добавкой пробиотика ^б experiment with probiotic supplement ^B	5.37±1.41	33.55±8.24	4.87±1.55	0.92±0.25 ^{*a}

ИК состоят из антигена, антител и связанных с ними компонентов системы комплемента. Они играют важную роль в процессах регуляции иммунных реакций, элиминации антигенов из организма и поддержания имму-

нофизиологического гомеостаза. На макрофагах, нейтрофилах и эритроцитах экспрессирован рецептор CR1, который через компоненты комплемента C4b и C3b связывает растворимые ИК и доставляет их к макрофагам селе-

зенки и печени. Это обеспечивает клиренс крови, однако при нарушении данного механизма происходит избыточное образование ИК. В результате комплексы выпадают в осадок, прежде всего в почках, что может приводить к развитию патологии и супрессии клиринговой функции клеток фагоцитарной системы [Ройт и др., 2000 (Royt et al., 2000); Койко и др., 2008 (Coiko et al., 2008)]. На всем протяжении опыта наиболее высокие показатели зафиксированы в печени, а низкие в селезенке. Это связано со структурно-функциональной организацией тканей и органов. Во всех опытных группах уровень ИК в почках, считающийся основным звеном в иммунной системе рыб [Микряков, 1984, 1991 (Mikryakov, 1984, 1991); Кутырев, 2011

(Kutyrev, 2011)], был ниже данных, полученных перед началом эксперимента (табл. 2). Значимых отличий между опытными и контрольными особями не зафиксированы, кроме данных третьей группы на 14 сут. В селезенке на 7 и 14 сут эксперимента показатели уровня ИК в обеих опытных группах были выше, а на 30 сут ниже контрольных. Уровень ИК в крови повысился на 7 и 14 сут эксперимента, к 30-м и 45 сут – снизился, особенно у стерляди, которой добавляли в корм пробиотик. В печени уровень ИК на 7, 14 и 45 сут эксперимента был выше контрольных значений. Более высокий уровень ИК в печени рыб может быть связан с нейтрализацией поступивших в организм компонентов, входящих в состав препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных результатов показал, что за время эксперимента показатели опытных групп стерляди изменялись относительно контрольных и данных полученных перед началом опыта. У большинства изученных рыб зафиксированы высокие показатели бактериостатической активности сыворотки крови, положительный уровень С-реактивного белка, а также установлено отсутствие иммунодефицитных особей. Полученные результаты указывают на отсутствие влияния исполь-

зуемых в эксперименте дозировок эллаготанинов и пробиотика на исследуемые параметры неспецифического иммунитета стерляди. Высокий уровень антибактериальной активности и С-реактивного белка в сыворотке крови могут быть связаны с содержанием в воде патогенных микроорганизмов. Высокое содержание иммунных комплексов в тканях печени опытных рыб, вероятно, обусловлено активацией процессов нейтрализации поступивших в организм компонентов препаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет средств гранта РФФИ (проект № 22-26-20111).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Богерук А.К. Аквакультура России: история и современность // Рыбное хозяйство. 2005. № 4. С. 14–18.
- Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н., Ходак А.Г. Пробиотический препарат “Суб-Про” (Субалин): профилактика и лечение бактериальных болезней рыб // Рыбоводство. 2007. № 2. С. 33–35.
- Головин П.П., Головина Н.А., Щелкунов И.С., Юхименко Л.Н. Профилактика и терапия болезней рыб // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2006. № 3. С. 62–63.
- Гончарова М.Н. Антимикробный препарат для лечения бактериальных болезней рыб // Вестн. Рос. акад. с.-х. наук. 2009. № 2. С. 77–78.
- Гриневиц Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лаб. дело. 1981. № 8. С. 493–496.
- Жандалгарова А.Д., Бахарева А.А. Пробиотики нового поколения как средство улучшения рыбоводно-биологических показателей молоди осетровых рыб // Вестник ветеринарии. 2015. № 1 (72). С. 59–61.
- Зеков Д.Д., Ульянов М.В., Микряков Д.В., Суворова Т.А. Определение эффективных норм введения кормовой добавки Акватан в рацион радужной форели с биологической оценкой влияния на рыбохозяйственные показатели // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2021. № 11. С. 66–77.
- Зуенко В.А., Лактионов К.С., Правдин И.В., Кравцова Л.З., Ушакова Н.А. Влияние кормового пробиотика на основе бактерий *Bacillus subtilis* на пищеварение рыб при садковом выращивании // Вопросы ихтиологии. 2017. Т. 57, № 1. С. 112–117.
- Использование эллаготанинов в рационах аквакультуры. 2020. URL: <https://apknnews.su/article/213/2594/> (дата обращения 04.08.2021).
- Койко Р., Саншайн Д., Бенджамини Э. Иммунология. М.: Изд. центр “Академия”, 2008. 368 с.
- Кутырев И.А., Пронин Н.М., Дугаров Ж.Н. Лейкоцитарный состав головного отдела почки карася серебряного *Carassius auratus gibelio* (Cypriniformes: Cyprinidae) и влияние на него инвазии цестоды *Digamma interrupta* (Cestoda: Pseudophyllidae) // Изв. РАН. Сер. биол. 2011. № 6. С. 759–763.
- Лукьянова Н.А. Пробиотические препараты и микроорганизмы, обладающие пробиотическими свойствами, применяемые в рыбоводстве // Рациональное использование пресноводных экосистем – перспективное направление реализации национального проекта “Развитие АПК” (2007, Москва). Международная научно-

- практическая конференция, Москва, 17–19 декабря 2007 г.: материалы и доклады / ГНУ ВНИИР Россельхозакадемии. М.: Изд-во Россельхозакадемии. 2007. С. 177–180.
- Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. 154 с.
- Микряков В.Р. Закономерности функционирования иммунной системы пресноводных рыб: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: ИЭМиЭЖ АН СССР, 1984. 37 с.
- Мирзоева Л.М. Применение пробиотиков в аквакультуре // Рыбное хозяйство. Сер.: Болезни гидробионтов в аквакультуре. 2001. Вып. 2. С. 23–30.
- Назаров П.Г. Пентраксины в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета, организации матрикса, фертильности // Медицинский академический журн. 2010. Т. 10, № 4. С. 107–124. DOI: 10.17816/MAJ104107-124.
- Нечаева Т.А., Назаров В.А., Ковальчук М.И., Пронина Г.И., Микряков Д.В., Суворова Т.А., Кузьмичева С.В. Выращивание арктического гольца с применением иммуномодулятора “Ронколейкина” в ИП Романов (Ленинградская область) // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2023. № 6. С. 412–424. DOI: 10.33920/sel-09-2306-03.
- Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. Пер. с англ. М.: Мир, 2000. 592 с.
- Романова Е.М., Спирина Е.В., Любомирова В.Н. Адаптивная реакция тканей желудка африканского сома на микробиоту с пробиотическими свойствами // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2021. № 1 (53). С. 117–123.
- Серова Е.С. Альтернативы применению антибиотиков в аквакультуре // Наука через призму времени. 2017. № 8. С. 30–33.
- Скляр В.Я., Микряков В.Р., Кулаков Г.В., Кудряшова Е.Б., Вайнштейн М.Б. Перспективы применения препарата пробиотик “Субтилис” в рыбоводстве для обработки икры, эмбрионов и личинок рыб на примере карася *Carassius carassius* и карпа *Cyprinus carpio* (отряд карпообразные *Cypriniformes*, семейство карповые *Cyprinidae*) // Вопросы рыболовства. 2004. Т. 5. № 3 (19). С. 514–521.
- Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. и др. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков и бактерий рода *Bacillus* // Микробиологический журнал. 1993. Вып. 55 (4). С. 92–112.
- Суворова Т.А., Силкина Н.И. Влияние антибактериального и пробиотического препаратов на специфический и неспецифический иммунитет и окислительные процессы в организме рыб // Труды Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. 2019. № 87 (90). С. 62–70.
- Шульга Е.А. Пробиотики в кормлении осетровых рыб при товарном выращивании. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Астрахань. 2009. 24 с.
- Юхименко Л.Н., Токарева С.Б., Кукин М.С., Бычкова Л.И. Лечебные и профилактические мероприятия против бактериозов в рыбоводстве // Ветеринария и кормление. 2021. № 6. С. 67–69. DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-6-18.
- Bottazzi B., Doni A., Garlanda C., Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm // Ann. Rev. Immun. 2010. Vol. 28. P. 157–183.
- Campoverde C., Milne D.J., Estévez A., Duncan N., Secombes C.J., Andree K.B. Ontogeny and modulation after PAMPs stimulation of β -defensin, hepcidin, and piscidin antimicrobial peptides in meagre (*Argyrosomus regius*) // Fish Shellfish Immun. 2017. Vol. 69. P. 200–210.
- Coccia E., Siano F., Grazia Volpe M., Varricchio E., Tufan Eroldogan O., Paolucci M. Chestnut Shell Extract modulates immune parameters in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* // Fishes. 2019. Vol. 4(1). P. 18. DOI: 10.3390/fishes4010018
- Immanuel G., Uma R.P., Iyapparaj P., Citarasu T., Punitha Peter S.M., Michael Babu M., Palavesam A. Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromis mossambicus* // J. Fish Biol. 2009. Vol. 74, № 7. P. 1462–1475.
- Kuzmina V.V., Semenova E.M., Rusanova P.V., Mikryakov D.V. The influence of testosterone on activity of glycosidases and proteinases in the intestine of the sterlet (*Acipenser ruthenus*) // Biology Bulletin. 2011. Vol. 38, № 5. P. 487–492.
- Lee P.T., Bird S., Zou J. Martin S.A.M. Phylogeny and expression analysis of C-reactive protein (CRP) and serum amyloid-P (SAP) like genes reveal two distinct groups in fish // Fish & Shellfish Immunology. 2017. Vol. 65. P. 42–51.
- Masalhy Aly Salah, El Naggar Gamal Osman, Mohamed Mohamed Fathi, Mohamed Waheed Elwan. Effect of garlic, echinacea, organic green and vet-yeast on survival, weight gain, and bacterial challenge of overwintered Nile tilapia fry (*Oreochromis niloticus*) // J. Appl. Aquacult. 2010. Vol. 22. № 3. P. 210–215.
- Mişe Y.S. Growth performance, haematological changes, immune response, antioxidant activity and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diet supplemented with ellagic acid // Fish & Shellfish Immunology. 2019. Vol. 95(5). P. 391–398. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.10.056.
- Noga E.J. Fish disease: diagnosis and treatment. N.Y.: Mosby-Year Book. 1995. 321 p.
- Pavlov D.S., Ushakova N.A., Pravdin V.G. et al. The ProStor and Ferm KM-1 complex probiotic additives – innovation biotechnological preparations for enhancing the quality of domestic fish mixed feed // Nova Sci. Publ. 2014. Vol. 20. P. 239–244.
- Schaperclaus W. Fischkrankheiten. Berlin: Academic-Verlag, 1979. 317 p.

- Tkachenko H., Buyun L., Kasiyan O., Terech-Majewska E., Osadowski Z. The antibacterial activity of the ethanolic leaf extract of *Ficus Pumilla* L. (MORACEAE) against Fish Bacterial Patogens // Scientific Journal of the Far East State Technical Fisheries University. 2018. Vol. 45. № 2. P. 20–30.
- Van der Marel M.C. Carp mucus and its role in mucosal defense: PhD Thesis, Wageningen University. The Netherlands. 2012. 189 p.
- Van Muiswinkel W., Vervoorn-Van Der Wal B. The immune system of fish // Fish Diseases Disorders. 2006. Vol. 1. P. 678–701.

REFERENCES

- Bogeruk A.K. Akvakul'tura Rossii: istoriya i sovremennost' [Aquaculture in Russia: history and modernity]. *Rybnoe hozyajstvo*, 2005, no. 4, pp. 14–18. (In Russian)
- Bottazzi B., Doni A., Garlanda C., Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Ann. Rev. Immun.*, 2010, vol. 28, pp. 157–183.
- Bychkova L.I., YUhimenko L.N., Hodak A.G. Probioticheskiy preparat “Sub-Pro” (Subalin): profilaktika i lechenie bakterial'nyh boleznej ryb [Probiotic preparation “Sub-Pro” (Subalin): prevention and treatment of bacterial fish diseases]. *Rybovodstvo*, 2007, no. 2, pp. 33–35. (In Russian)
- Campoverde C., Milne D.J., Estévez A., Duncan N., Secombes C.J., Andree K.B. Ontogeny and modulation after PAMPs stimulation of β -defensin, hepcidin, and piscidin antimicrobial peptides in meagre (*Argyrosomus regius*). *Fish Shellfish Immun.*, 2017, vol. 69, pp. 200–210.
- Coccia E., Siano F., Grazia Volpe M., Varricchio E., Tufan Eroldogan O., Paolucci M. Chestnut Shell Extract modulates immune parameters in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fishes*, 2019, vol. 4(1), pp. 18. doi: 10.3390/fishes4010018.
- Golovin P.P., Golovina N.A., Shchelkunov I.S., Yuhimenko L.N. Profilaktika i terapiya boleznej ryb [Prevention and therapy of fish diseases]. *Rybovodstvo i rybnoe hozyajstvo*, 2006, no. 3, pp. 62–63. (In Russian)
- Goncharova M.N. Antimikrobnij preparat dlya lecheniya bakterial'nyh boleznej ryb [Antimicrobial drug for the treatment of bacterial diseases of fish]. *Vestn. Ros. akad. s.-h. nauk.*, 2009, no. 2, pp. 77–78. (In Russian)
- Grinevich Yu.A., Alferov A.N. Opredelenie immunnyh kompleksov v krovi onkologicheskikh bol'nyh [Determination of immune complexes in the blood of cancer patients]. *Lab. delo*, 1981, no. 8, pp. 493–496. (In Russian)
- Immanuel G., Uma R.P., Iyapparaj P., Citarasu T., Punitha Peter S.M., Michael Babu M., Palavesam A. Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromis mossambicus*. *J. Fish Biol.*, 2009, vol. 74, no. 7, pp. 1462–1475.
- Ispol'zovanie ellagotantinov v racionah akvakul'tury [Use of ellagitannins in aquaculture diets]. 2020. Available at: <https://apknews.su/article/213/2594/> (access date 08/04/2021).
- Kojko R., Sanshaj D., Bendzhamini E. Immunologiya. M., Izd. centr “Akademiya”, 2008. 368 s.
- Kutyrev I.A., Pronin N.M., Dugarov Zh.N. Lejkocitarnyj sostav golovnogo otdela pochki karasya serebryanogo Carassius auratus gibelio (Cypriniformes: Cyprinidae) i vliyanie na nego invazii cestody Digamma interrupta (Cestoda: Pseudophyllidae) [Leukocyte composition of the head section of the kidney of the silver crucian carp Carassius auratus gibelio (Cypriniformes: Cyprinidae) and the influence on it of the invasion of the cestode Digamma interrupta (Cestoda: Pseudophyllidae)]. *Izv. RAN. Ser. biol.*, 2011, no. 6, pp. 759–763. (In Russian)
- Kuzmina V.V., Semenova E.M., Rusanova P.V., Mikryakov D.V. The influence of testosterone on activity of glycosidases and proteinases in the intestine of the sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Biology Bulletin*, 2011, vol. 38, no. 5, pp. 487–492.
- Lee P.T., Bird S., Zou J. Martin S.A.M. Phylogeny and expression analysis of C-reactive protein (CRP) and serum amyloid-P (SAP) like genes reveal two distinct groups in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, vol. 65, pp. 42–51.
- Luk'yanova N.A. Probiotic preparations and microorganisms with probiotic properties used in fish farming. Racional'noe ispol'zovanie presnovodnyh ekosistem – perspektivnoe napravlenie realizacii nacional'nogo proekta “Razvitie APK” (2007, Moskva). *Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferenciya, Moskva, 17–19 dekabrya 2007 g.: materialy i doklady* [Rational use of freshwater ecosystems is a promising direction in the implementation of the national project “Development of the Agro-Industrial Complex” (2007, Moscow). International scientific and practical conference, Moscow, December 17–19, 2007: materials and reports]. M., Izd-vo Rossel'hozakademii, 2007, pp. 177–180. (In Russian)
- Masalhy Aly Salah, El Naggat Gamal Osman, Mohamed Mohamed Fathi, Mohamed Waheed Elwan Effect of garlic, echinacea, organic green and vet-yeast on survival, weight gain, and bacterial challenge of overwintered Nile tilapia fry (*Oreochromis niloticus*). *J. Appl. Aquacult.*, 2010, vol. 22, no. 3, pp. 210–215.
- Mikryakov V.R. Patterns of formation of acquired immunity in fish. Rybinsk, IBVV RAN, 1991. 154 p. (in Russian)
- Mikryakov V.R. Zakonomernosti funkcionirovaniya immunoj sistemy presnovodnyh ryb. *Extended Abstract of PhD. Biol. Sci. Diss.* Moscow, 1984. 37 p. (In Russian)
- Mirzoeva L.M. Primenenie probiotikov v akvakul'ture [Application of probiotics in aquaculture]. *Rybnoe hozyajstvo. Ser.: Bolezni gidrobiontov v akvakul'ture*, 2001, vol. 2, pp. 23–30. (In Russian)
- Mişe Y.S. Growth performance, haematological changes, immune response, antioxidant activity and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diet supplemented with ellagic acid. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, vol. 95(5), pp. 391–398. doi: 10.1016/j.fsi.2019.10.056.

- Nazarov P.G. Pentraxiny v reakciyah vrozhdennogo i priobretyonnogo immuniteta, organizacii matriksa, fertil'nosti [Pentraxins in the Reactions of Innate and Acquired Immunity, Matrix Organization, and Female Fertility]. *Medicinskij akademicheskij zhurn.*, 2010, vol. 10, no. 4, pp. 107–124. (In Russian)
- Nechaeva T.A., Nazarov V.A., Koval'chuk M.I., Pronina G.I., Mikryakov D.V., Suvorova T.A., Kuz'micheva S.V. Vy-rashchivanie arkticheskogo gol'ca s primeneniem immunomodulyatora "Ronkolejkina" v IP Romanov (Leningradskaya oblast') [Growing Arctic char using the immunomodulator "Ronkolejkina" in IP Romanov (Leningrad region)]. *Rybovodstvo i rybnoe hozyajstvo*, 2023, no. 6, pp. 412–424. (In Russian)
- Noga E.J. Fish disease: diagnosis and treatment. N.Y., Mosby-Year Book, 1995. 321 p.
- Pavlov D.S., Ushakova N.A., Pravdin V.G. et al. The ProStor and Ferm KM-1 complex probiotic additives – innovation biotechnological preparations for enhancing the quality of domestic fish mixed feed. *Nova Sci. Publ.*, 2014, vol. 20, pp. 239–244.
- Rojt A., Brostoff Dzh., Mejl D. Immunology. M., Mir, 2000. 592 p.
- Romanova E.M., Spirina E.V., Lyubomirova V.N. Adaptivnaya reakciya tkanej zheludka afrikanskogo soma na mikro-biotu s probioticheskimi svojstvami [Adaptive response of stomach tissues of African catfish to microbiota with probiotic properties]. *Vestnik Ul'yanovskoj gosudarstvennoj sel'skohozyajstvennoj akademii*, 2021, no. 1 (53), pp. 117–123. (In Russian)
- Schaperclaus W. Fischkrankheiten. Berlin, Academic-Verlag, 1979. 317 p.
- Serova E.S. Alternativy primeniyu antibiotikov v akvakul'ture [Alternatives to the use of antibiotics in aquaculture]. *Nauka cherez prizmu vremeni*, 2017, no. 8, pp. 30–33. (In Russian)
- Shul'ga E.A. Probiotiki v kormlenii osetrovyh ryb pri tovarnom vyrashchivanii [Probiotics in feeding sturgeon fish during commercial cultivation] *Extended Abstract of Cand. Biol. Sci. Diss.* Astrahan', 2009. 24 p.
- Sklyarov V.YA., Mikryakov V.R., Kulakov G.V., Kudryashova E.B., Vajnshtejn M.B. Perspektivy primeneniya preparata probiotik "Subtilis" v rybovodstve dlya obrabotki ikry, embrionov i lichinok ryb na primere karasya *Carassius carassius* i karpa *Cyprinus carpio* (otryad karpooobraznye *Cypriniformes*, semejstvo karpovye *Cyprinidae*) [Prospects for the use of the probiotic drug "Subtilis" in fish farming for the treatment of eggs, embryos and larvae of fish using the example of crucian carp *Carassius carassius* and carp *Cyprinus carpio* (order *Cypriniformes*, family *Cyprinidae*)]. *Voprosy rybolovstva*, 2004, vol. 5, no. 3 (19), pp. 514–521. (In Russian)
- Smirnov V.V., Reznik S.R., Sorokulova I.B. i dr. Sovremennye predstavleniya o mekhanizmah lechebno-profilakticheskogo dejstviya probiotikov i bakterij roda *Bacillus* [Modern ideas about the mechanisms of therapeutic and prophylactic action of probiotics and bacteria of the genus *Bacillus*]. *Mikrobiologicheskij zhurnal*, 1993, vol. 55 (4), pp. 92–112. (In Russian)
- Suvorova T.A., Silkina N.I. Vliyanie antibakterial'nogo i probioticheskogo preparatov na specificheskij i nespecificheskij immunitet i oksislitel'nye processy v organizme ryb [The influence of antibacterial and probiotic drugs on specific and nonspecific immunity and oxidative processes in the body of fish]. *Transactions of Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS*, 2019, issue 87 (90), pp. 62–70. (In Russian)
- Tkachenko H., Buyun L., Kasiyan O., Terech-Majewska E., Osadowski Z. The antibacterial activity of the ethanolic leaf extract of *Ficus Pumilla* L. (MORACEAE) against Fish Bacterial Patogens. *Scientific Journal of the Far East State Technical Fisheries University*, 2018, vol. 45, no. 2, pp. 20–30.
- Van der Marel M.C. Carp mucus and its role in mucosal defense: PhD Thesis, Wageningen University. The Netherlands, 2012. 189 p.
- Van Muiswinkel W., Vervoorn-Van Der Wal B. The immune system of fish. *Fish Diseases Disorders*, 2006, vol. 1, pp. 678–701.
- Yuhimenko L.N., Tokareva S.B., Kukin M.S., Bychkova L.I. Lechebnye i profilakticheskie meropriyatiya protiv bakteriozov v rybovodstve [Therapeutic and preventive measures against bacteriosis in fish farming]. *Veterinariya i kormlenie*, 2021, no. 6, pp. 67–69. (In Russian)
- Zekov D.D., Ul'yanov M.V., Mikryakov D.V., Suvorova T.A. Opredelenie effektivnyh norm vvedeniya kormovoj dobavki Akvatan v racion raduzhnoj foreli s biologicheskoy ocenкой vliyaniya na rybohozyajstvennyye pokazateli [Determination of effective rates of introduction of the feed additive Aquatan into the diet of rainbow trout with a biological assessment of the effect on fishery indicators]. *Rybovodstvo i rybnoe hozyajstvo*, 2021, no. 11, pp. 66–77. (In Russian)
- Zhandalgarova A.D., Bahareva A.A. Probiotiki novogo pokoleniya kak sredstvo uluchsheniya rybovodno-biologicheskikh pokazatelej molodi osetrovyh ryb [New generation probiotics as a means of improving fish farming and biological parameters of juvenile sturgeon fish]. *Vestnik veterinarii*, 2015, no. 1 (72), pp. 59–61. (In Russian)
- Zuenko V.A., Laktionov K.S., Pravdin I.V., Kravcova L.Z., Ushakova N.A. Vliyanie kormovogo probiotika na osnove bakterij *Bacillus subtilis* na pishchevarenie ryb pri sadkovom vyrashchivanii [The effect of a feed probiotic based on the bacteria *Bacillus subtilis* on the digestion of fish during cage rearing]. *Voprosy ihtiologii*, 2017, vol. 57, no. 1, pp. 112–117. (In Russian)

EFFECT OF ELLAGOTANINS AND PROBIOTIC “ECOFLOR” ON STERLET NONSPECIFIC IMMUNITY INDICES

D. V. Mikryakov^{*}, T. A. Suvorova, S. V. Kuzmicheva

Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences

*152742 Borok, Russia, e-mail: *daniil@ibiw.ru*

Revised 9.10.2023

The experimental study of the effect of feed additive based on ellagotannins and immobilized probiotic “Ecoflor” on some parameters of non-specific immunity of sterlet *Acipenser ruthenus* was carried out. Feed additives based on ellagotannins are one of the numerous preparations of natural origin. They have antibacterial and immunostimulating properties. Biologically active additive “Ecoflor” is a consortium of live antagonistically active strains of bifido- and lactobacilli immobilized on enterosorbent. During the experiment, control and experimental groups were kept in flow-through plastic pools. Sterlets were fed 6 times a day. Drugs were added to the feed according to the instructions. Sampling was carried out before the start of the experiment, on 7, 14, 30, 45 and 60 days. Material for the study was taken from 5 individuals from each group. Peripheral blood was taken from the tail vein. After autopsy, tissue pieces of immunocompetent organs (kidney, spleen and liver) were taken from the fish into dry sterile tubes. Blood coagulation and clot retraction were waited for to obtain serum. The serum was then withdrawn with a syringe with a fine needle and transferred into an Eppendorf tube. For further studies, the homogenate was prepared from kidney, spleen and liver with physiological solution in the ratio of 1:6. The level of bacteriostatic activity, C-reactive protein and nonspecific immune complexes was determined in blood serum samples. In homogenates of kidney, spleen and liver the content of immune complexes was determined. The study established high indices of antimicrobial properties of blood serum in all studied fish and the absence of immunodeficient individuals. Lower indices of bacteriostatic activity in experimental groups and zero percent of immunodeficient individuals indicate insignificant influence of preparations on nonspecific antibacterial defense. The majority of the studied fish had a positive level of C-reactive protein, which indicates the presence of inflammatory processes in the body. The content of nonspecific immune complexes in the liver was several times higher than in other tissues, which may be due to the neutralization of components included in the preparations.

Keywords: *Acipenser ruthenus*, humoral immunity, antimicrobial properties of blood serum, C-reactive protein, nonspecific immune complexes