

ГРИНЮК ЕКАТЕРИНА СЕРГЕЕВНА

**ГИСТОГЕНЕЗ *CLARIAS GARIEPINUS* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ
БИОТИЧЕСКИХ И АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ**

4.2.1. Патология животных, морфология, физиология,
фармакология и токсикология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена на кафедре биологии, экологии и гистологии
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»

Научный руководитель – Мкртчян Маня Эдуардовна,
доктор ветеринарных наук, доцент.

Официальные оппоненты: Глазунова Лариса Александровна,
доктор ветеринарных наук, доцент, ФГБОУ ВО
«Государственный аграрный университет
Северного Зауралья», кафедра анатомии и
физиологии, доцент;

Берестов Дмитрий Сергеевич,
кандидат биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО
«Удмуртский государственный аграрный
университет», кафедра анатомии и физиологии,
заведующий кафедрой.

**Ведущая организация – ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный
университет им. П. А. Столыпина».**

Защита состоится «18» апреля 2024 г. в 13:00 часов на заседании
диссертационного совета 35.2.034.02 на базе Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-
Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по
адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5, тел 8 (812) 388-36-31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СПбГУВМ
по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5, и на официальном
сайте <http://spbguvm.ru>

Автореферат разослан « » _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Хватов
Виктор Александрович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Изучение эмбрионального и раннего постэмбрионального развития рыб является актуальным и малоизученным направлением морфологии животных.

Оценка морфологического состояния рыб отражает эффективность отрасли, которая является одним из перспективных направлений и активно поддерживается на государственном уровне.

В Ленинградской области за 2021 год объем производства продукции рыбоводства составил 12,6 тыс. тонн. В основном на товарных рыбоводческих хозяйствах региона выращивается радужная форель (97%), сиг, осетр, карп, клариевый сом, нельма, паляя, судак, креветка.

Согласно данным Комитета по агропромышленному и рыбохозяйственному комплексу Ленинградской области, объем средств государственной поддержки, доведенных до предприятий данной отрасли за 2021 год, составил 80 млн. рублей.

В Российской Федерации у населения особый интерес вызывают экзотические животные и объекты рыборазведения из других климатических зон, для обеспечения гисто- и органогенеза которых в ранние периоды онтогенеза, а также развития и роста товарной рыбы, необходимые условия можно создать только в установках замкнутого водоснабжения.

Нас заинтересовал африканский клариевый сом, который получил достаточно широкое распространение в последние годы и успел завоевать большую популярность за свои вкусовые качества. Мясо *Clarias gariepinus* характеризуется высоким содержанием легкоусвояемых жиров и белков, насыщено совокупностью макро- и микроэлементов, обладает нежным, сочным вкусом и является диетическим (Денисенко, О. С., 2013).

Согласно научной литературе, данный вид рыб подвержен существенному воздействию факторов внешней среды, которые влияют не только на микроструктуру органов, но и на их морфометрические показатели (Любомирова, В. Н. с соавт., 2020; Мухитова, М. Э. с соавт., 2017; Шленкина, Т. М. с соавт., 2020).

Период эмбрионального развития рыбы считается самым главным в формировании организма, так как именно этот этап влияет на дальнейшую продуктивность объектов аквакультуры. Полноценное формирование органов пищеварительной, дыхательной и выделительной систем является залогом реализации данными видами животных своего биотического потенциала.

Одним из критических этапов при органогенезе для рыб является период перехода их на внешнее питание. Важно помнить, что в момент выклева желудочно-кишечный канал рыб содержит незначительную популяцию бактерий и увеличение как количества, так и разнообразия микроорганизмов происходит при поступлении их с водой и кормом при переходе на внешнее питание. Для активного и полноценного завершения органогенеза в постэмбриональный период применяются пробиотические препараты,

стимулирующие формирование микробиоты в первые дни жизни (Карпенко, Л. Ю. с соавт., 2022).

В связи с этим изучение процессов гисто- и органогенеза, а также микроструктуры органов африканского клариевого сома под действием биотических и абиотических факторов является актуальным.

Степень разработанности темы. В условиях современного стратегического развития рыбохозяйственного комплекса и необходимости импортозамещения особо значима проблема получения жизнеспособного потомства.

В настоящее время исследований, посвященных изучению эмбрионального развития *C. gariepinus*, а также воздействию пробиотиков на ранние периоды их онтогенеза, как в иностранной, так и отечественной научной литературе недостаточно.

Многие авторы (Бовкун, Г. Ф. с соавт., 2002; Дудикова, Г. Н. с соавт., 2016) указывают на благоприятное воздействие на организм кормовых добавок, в частности пробиотиков, которые способствуют формированию органов и систем в ранние периоды онтогенеза и улучшают процессы переваривания кормов и всасывания питательных веществ. Важной особенностью клариевого сома является то, что за счет активного обмена веществ происходит ускоренная конверсия кормов.

Данные, которые приводятся в литературе (Медникова, Б. М. с соавт., 2000; Артеменкова, Д. В. с соавт., 2017; Пономаревой, Е. И. с соавт., 2020) относительно оптимальных условий содержания и разведения *C. gariepinus* в установках замкнутого водоснабжения, противоречивы.

На процессы эмбриогенеза и формирования предличинок, личинок и мальков *C. gariepinus* при выращивании рыбы в установках замкнутого водоснабжения существенную роль оказывают абиотические факторы, в частности температура, освещенность и водородный показатель. Нарушение условий инкубации икры и выращивания рыбы может привести к нарушению процессов гисто- и органогенеза рыб, а в последующем к снижению продуктивности, развитию патологий и вплоть до гибели животных.

Цель и задачи исследований. Цель исследования - изучить морфологические особенности гисто- и органогенеза *C. gariepinus* при воздействии биотических и абиотических факторов в ранние периоды онтогенеза.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) определить гистологические особенности органов и тканей *C. gariepinus* в ранние периоды онтогенеза под влиянием лакто- и бифидобактерий;
- 2) дать оценку размерно-весовым показателям африканского клариевого сома в зависимости от возраста и состава кормовых добавок;
- 3) изучить скорость развития клариевого сома в ранние периоды онтогенеза при различных значениях освещенности и температуры воды;
- 4) определить влияние pH среды обитания на эмбриональное развитие *C. gariepinus*.

Научная новизна и ценность полученных результатов. Впервые определены размерно-весовые показатели личинок и мальков *C. gariepinus* в зависимости от возраста и состава кормовых добавок.

Доказано положительное влияние комплекса лакто- и бифидобактерий на микроструктуру органов пищеварительной, мочевыделительной и дыхательной систем клариевого сома.

Изучен эмбриогенез и морфология предличинок *C. gariepinus* при различных режимах температуры, освещенности и значений pH среды обитания.

Применена разработанная и запатентованная гистологическая кассета для исследования микроструктуры предличинок, личинок рыб, позволяющая изготавливать качественные и информативные микропрепараты в спинно-брюшных и латеральных плоскостях (Патент на полезную модель РФ №213986 U1).

Усовершенствован классический протокол изготовления гистологических препаратов личинок и мальков *C. gariepinus*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в ходе эксперимента данные о морфологии и гистологическом строении личинок и мальков при добавлении в рацион лакто- и бифидобактерий вносят значительный вклад в изучение эмбриологии и морфологии. Они позволяют подробно изучить микроструктуру внутренних органов клариевого сома в сравнительном видовом аспекте. Результаты исследования используются в научно-исследовательской работе в ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» на кафедре биологии, экологии и гистологии, ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный аграрный университет» на кафедре анатомии и физиологии факультета ветеринарной медицины и ФГБОУ ВО «Смоленская государственная сельскохозяйственная академия», на кафедре биотехнологии и ветеринарной медицины факультета технологий животноводства и ветеринарной медицины.

Подобран режим, обеспечивающий полноценное формирование органов африканского клариевого сома в эмбриональный период развития, позволяющий повысить сохранность личинок и мальков, а также получить качественную продукцию для рентабельного ведения рыбоводческого хозяйства, о чем свидетельствует справка о внедрении результатов в производство. Проведенные исследования важны для изучения эмбриогенеза и морфологии африканского клариевого сома при различных условиях инкубации икры и содержания данного вида животных.

Методология и методы исследования. Методология исследований основана на анализе и изучении информации по морфологическому строению органов *C. gariepinus*, представленной в отечественных и зарубежных источниках литературы.

Для решения поставленных задач и выполнения научной работы применялись морфометрические, микроскопические, клинические, патологоанатомические и гистологические методы исследования. В ходе проведенных экспериментов был осуществлен сравнительный анализ

эффективности разных методов окраски гистологических препаратов. При комплексной диагностике использованы современные и традиционные методы исследований, включающие: измерение длины тела и головы животных в разные сроки, определение живой массы, процента выклева и выживаемости, а также изучение гистологического строения внутренних органов личинок и мальков рыб.

Изучено воздействие лактобактерий, бифидобактерий и комплекса лакто- и бифидобактерий на развитие пищеварительного канала, а также печени, поджелудочной железы, почек и жаберного аппарата клариевого сома в ранние периоды онтогенеза. Результаты, полученные на основании исследований динамики морфометрических показателей, а также сравнительного анализа, подвергнуты статистической обработке.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным для биологических исследований и анализа фактическим материалом и применением современных методов исследования, проведенных на сертифицированном оборудовании. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием критерия по Пирсону.

Апробация результатов научной работы проведена на 75-й юбилейной международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ, посвященной объявленному в 2021 году президентом РФ Путиным В. В. году науки и технологий» (г. Санкт-Петербург, 5-9 апреля 2021 г.); Московском ветеринарном конгрессе - участие в конкурсе «Серебряный микроскоп» (г. Москва, 31 марта - 2 апреля 2021 г.); международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня рождения профессора Ю. Ф. Юдичева (г. Тюмень, 26-28 мая 2021 г.); международной научно-практической конференции - СXXXII Международные научные чтения памяти Лосева А. Ф. (г. Москва, 28 декабря 2021 г.); 76-й международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ (г. Санкт-Петербург, 04-11 апреля 2022 г.); национальной конференции «Актуальные проблемы экологии и природопользования» (г. Санкт-Петербург, 12-13 мая 2022 г.); Третьей международной конференции «Эколого-биологическое благополучие растительного и животного мира» (г. Благовещенск, 20-21 октября 2022 г.); национальной научно-практической конференции «Интеграция науки и образования в аграрных вузах для обеспечения продовольственной безопасности России» (г. Тюмень, 1-3 ноября 2022 г.); в международной научно-практической конференции «Место и роль аграрной науки в обеспечении продовольственной безопасности страны» (г. Смоленск, 9 декабря 2022 г.); 77-й международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ, посвященной 80-летию прорыва блокады Ленинграда (г. Санкт-Петербург, 3-10 апреля 2023 г.), Международной научной конференции «Интеграция аграрной науки, практики и образования как условие продовольственной безопасности» (г. Смоленск, 27 апреля 2023 г.). Научные положения и выводы, оформленные в докладах, получили одобрение, что подтверждается полученными дипломами.

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 10 работ: в сборниках материалов национальных и международных конференций, центральных журналах и отдельных изданиях. Из них в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ для публикации основных результатов диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук - 3 статьи. Получен Патент РФ на полезную модель «Кассета для гистологических исследований предличинки и личинки гидробионтов» (RU 213986 U1 от 06.10.2022 года).

Основные положения, выносимые на защиту:

- гистогенез органов пищеварительной системы в ранние периоды постэмбрионального развития *C. gariepinus* наиболее интенсивно протекает на фоне применения комплекса лакто- и бифидобактерий;
- размерно-весовые показатели африканского клариевого сома на фоне применения комплексной кормовой добавки существенно превышают показатели других подопытных групп;
- инкубация икры при температуре +240С сопровождается увеличением процента выклева предличинки африканского клариевого сома;
- процессы дробления в икре *C. gariepinus* нарушаются в кислой (pH 5,5) и щелочной (pH 8,5) средах.

Личный вклад. Научная работа является результатом самостоятельного исследования диссертанта и проведена в период с 2020-2023 гг. Автором лично определены цель и задачи, разработан план проведения производственных и лабораторных исследований, самостоятельно осуществлен всесторонний анализ полученных результатов, подготовлены научные статьи к публикациям, доклады и презентации для участия в конференциях. Соавторы выражают согласие по использованию результатов, приведенных в совместных статьях. Личный вклад автора составляет - 75%.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 4.2.1. Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология: пункты 1, 2, 18.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 158 страницах компьютерного текста, содержит 11 таблиц и 69 рисунков, в том числе 3 диаграммы и 145 авторских фотографий макро- и микропрепаратов. Она состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, практических предложений, рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы, списка литературы и приложения. Список использованной литературы включает 203 источника, из них 158 - отечественных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Научные исследования по теме диссертационной работы проводились в период с 2020 по 2023 годы на кафедре биологии, экологии и гистологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», а также на базе рыбоводческого хозяйства «SOMOFF», расположенного в г. Красное Село.

Объектом исследований являлся африканский клариевый сом (*C. gariepinus*) в ранние периоды онтогенеза. Были изучены икра, предличинки, личинки и мальки *C. gariepinus*. Всего за период исследований было заложено на инкубацию около 900 тыс. икринок, из которых исследовано 18600 особей. Исследования проводили с трехкратной повторностью. Из каждой подопытной группы для морфометрии были отобраны по 100 образцов и для изготовления гистологических препаратов 50 особей разных возрастных групп.

Икра была получена от самок в возрасте от 1,5 до 2-х лет. Оплодотворение икры в данном хозяйстве проводят путем искусственного осеменения. Инкубация икры в рыбоводстве осуществляется на инкубационных рамках, а выращивание ранних стадий изучаемых гидробионтов проводится в малогабаритных секционных бассейнах объемом 45 литров. После выклева на ранних стадиях постэмбрионального развития животным задавали корм премиум-класса LARVIVA PRO-START с высоким содержанием протеина. Корм специально разработан с помощью технологии, которая обеспечивает хорошую его плавучесть в толще воды.

В ходе изучения объектов аквакультуры были применены морфологические, морфометрические, патоморфологические и гистологические методы исследований. Изготовление гистологических препаратов проводилось в гистологической лаборатории кафедры биологии, экологии и гистологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины».

В первой серии опытов с применением биотических факторов проведены исследования с добавлением в корм лактобактерий, бифидобактерий, а также комплекса лакто- и бифидобактерий. В ходе эксперимента были сформированы контрольная и три подопытные группы из личинок в возрасте 5 дней, которые содержались в бассейнах замкнутого водоснабжения.

С 5-го дня личинки контрольной группы получали корм премиум-класса LARVIVA PRO-START, который обладает высокой плавучестью, а гидробионтам подопытных групп скармливали аналогичный корм с кормовыми добавками. Состав пробиотиков первой подопытной группы был представлен *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, второй - *Bifidobacterium lactis* и третьей - *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Bifidobacterium lactis*. Сухие монокультуры и комплексная биологическая добавка задавались от 4 до 8 раз в сутки в зависимости от возраста животных в смеси с кормом в количестве 2 г на 100 г корма.

Морфометрические исследования, патологоанатомическое вскрытие, а также получение материала для изготовления гистологических препаратов проводили на 7-й, 14-й, 21-й, 30-й и 60-й день после выклева. Морфометрия личинок и мальков осуществлялась с применением цифрового электронного штангенциркуля (ИЧЦ) с точностью до 0,1 мм, структур микропрепаратов – в программе ImageJ. Взвешивание изучаемых животных производили с применением лабораторных весов M-ER 122 ACF-1500.

Материалом для гистологического исследования служили цельные личинки и мальки в возрасте до 21-го дня, а у более старших возрастных групп отбирались отделы пищеварительного канала (передняя, средняя и задняя кишки), а также печень, почки, поджелудочная железа и жабры.

Гистологические препараты личинок помещались в разработанную и запатентованную гистологическую кассету для исследования предличинок и личинок гидробионтов (Патент РФ на полезную модель № 213986 U1).

При обезвоживании личинок и мальков применялась усовершенствованная методика, адаптированная к исследуемому материалу, с изопропиловым спиртом в четырех разных концентрациях: 60%-й, 70%-й, 80%-й и 90%-й спирт, без использования 100%-го спирта. Данный метод позволяет осуществить постепенную дегидратацию образца, сохранить гистоструктуру тканей и органов, не подвергая их травматизации, и предупредить пересушивание пробы.

Срезы толщиной 3,0–3,5 мкм изготавливали на ротационном моторизованном микротоме РОТМИК-2М. Окраска гистологических срезов осуществлялась различными методами для определения оптимального протокола для визуализации всех интересующих структур.

Гистологическую окраску проводили следующими методами согласно указанным в инструкциях протоколам: гематоксилин Майера и 1,0% спиртовой эозин; гематоксилин Джилла и 1,0% спиртовой эозин; альциановый синий (гистохимический метод); толуидиновый синий (гистохимический метод); по Ван-Гизон трихром (стандартизированный набор); окраска по Перльсу (гистохимический метод); окраска по Маллори (гистохимический метод); окраска для выявления возраста фибрина.

Микроскопировали гистологические препараты при помощи светоптического микроскопа Микмед-5 при увеличении x40, x100, x400, x600 и x1000 мкм. Фотофиксацию проводили при помощи цифровой камеры Lomo MC-3 № ХС 1272.

Оценка количественного анализа содержания микробиоты (группы микроорганизмов и их общего числа) проводилась в молекулярно-генетической лаборатории ООО «БИОТРОФ» методом ПЦР с использованием амплификатора детектирующего ДТ Lite-4 (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Вторая серия опытов по изучению абиотических факторов включала определение физиологических параметров, таких как процент выклева и морфометрических показателей. Инкубация икры проводилась при четырех температурных режимах: +28⁰С, +26⁰С, +24⁰С и +22⁰С. Во время исследования

применяли три режима освещенности: темный световой режим, люминесцентное и светодиодное освещение, а также изменяли рН от 5,5 до 8,5. Для изменения показателей рН использовали ортофосфорную кислоту и гидрокарбонат натрия. Концентрацию определяли с помощью рН метра и лакмусовых индикаторных полосок.

Оценка жизнеспособности в ранние периоды эмбрионального развития проводилась путем микроскопии икры и подсчета процента активных эмбрионов клариевого сома, размещенных под крышку чашки Петри.

Достоверность результатов исследований подтверждается применением статистической обработки морфометрических данных с использованием критерия по Пирсону. Общая схема исследований представлена на рисунке 1.

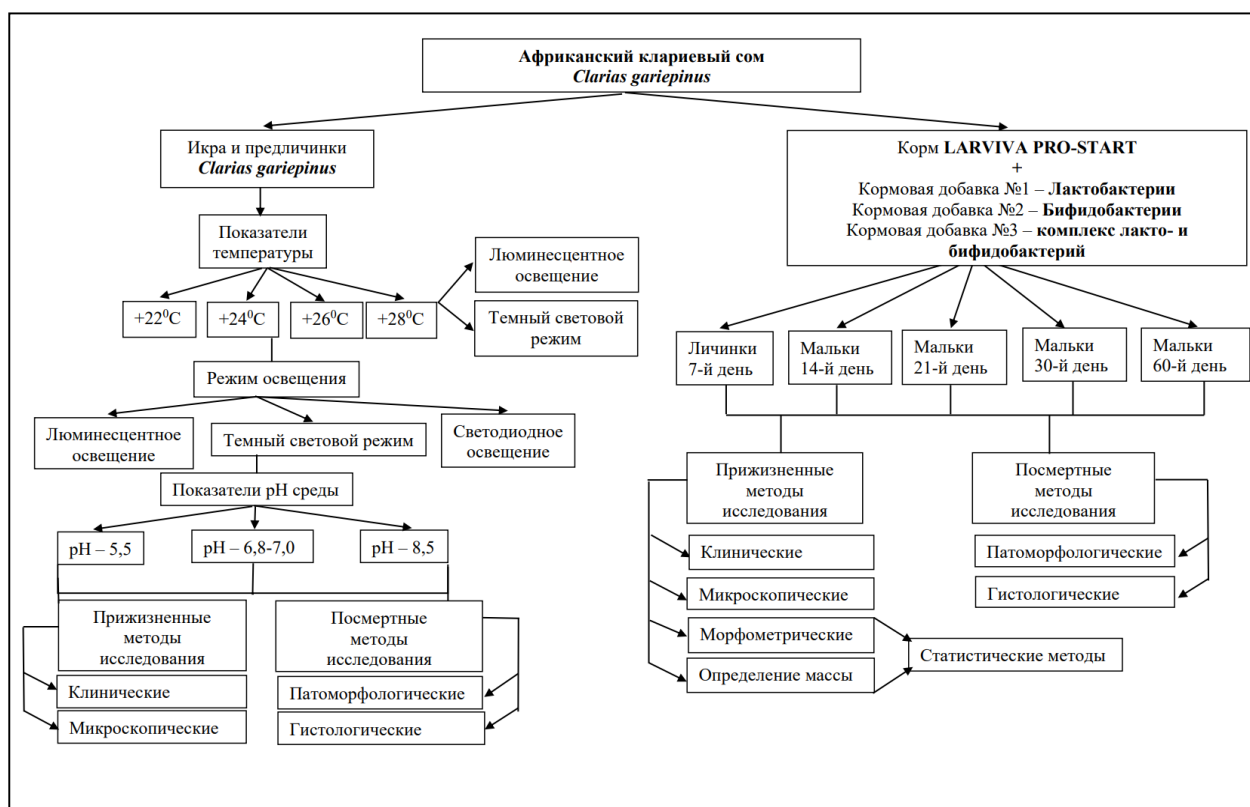


Рисунок 1 - Схема исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Морфологическая оценка развития органов *C. gariepinus* на фоне применения кормовых добавок

Для изучения влияния пробиотиков на ранние периоды онтогенеза, были проведены опыты с оценкой воздействия лактобактерий, бифидобактерий, комплекса лакто- и бифидобактерий на рост и развитие африканского клариевого сома.

После оплодотворения икру африканского сома размещали на специальные сетчатые поддоны для инкубации.

На пятый день после выклева, согласно рационам, приведенным в таблице 1, были сформированы 4 подопытные группы *C. gariepinus*.

Таблица 1 – Рационы кормления личинок и мальков подопытных групп

Опытные группы	Корм	Состав кормовой добавки
1.1 (контроль)	Корм LARVIVA PRO- START	–
1.2		<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>
1.3		<i>Bifidobacterium bifidum</i>
1.4		<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i>

Пробиотические добавки для вскармливания личинок и мальков африканского клариевого сома применялись в течение одного месяца.

На 7-й, 14-й, 21-й, 30-й и 60-й дни после выклева были проведены измерения длины тела и головы данных животных.

В эти же периоды осуществляли морфологический анализ и исследовали гистологические препараты органов пищеварительной, выделительной и дыхательной систем африканского сома.

Морфология личинок *C. gariepinus* на 7-й день после выклева

На 7-й день после выклева провели макроскопическое исследование личинок подопытных групп и установили уменьшение размеров желточного мешка, смещение ротовой полости вниз и увеличение подвижности, что указывает на адаптацию к условиям среды обитания.

При изучении гистологических препаратов органов желудочно-кишечного тракта личинок *C. gariepinus* было обнаружено, что к 7-дневному возрасту у животных всех подопытных групп полностью завершается процесс формирования пищеварительного канала и все его отделы хорошо дифференцируются (рисунок 2).

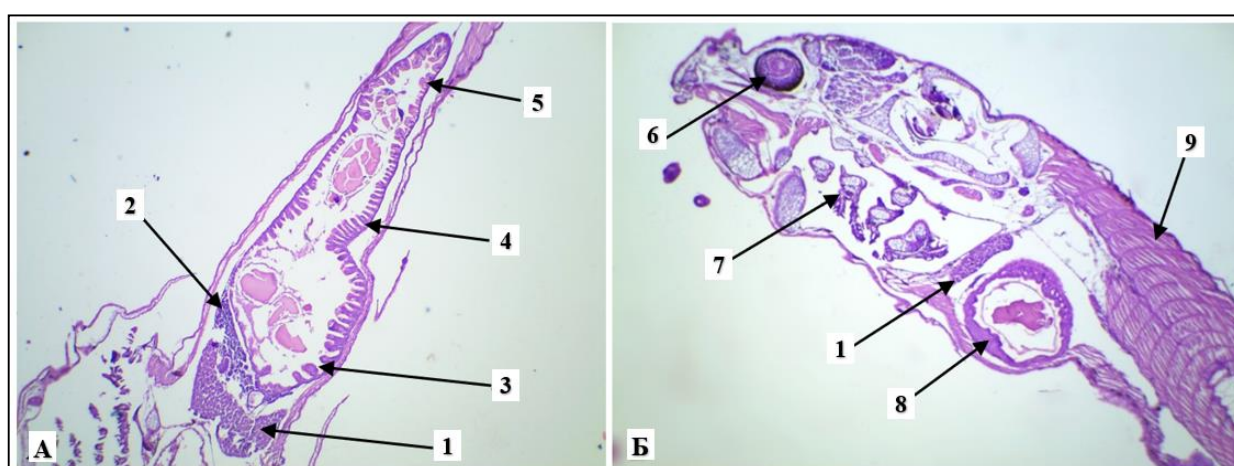


Рисунок 2 – Личинки *C. gariepinus* на 7-й день после выклева (А - фронтальная и Б - сагиттальная плоскости). Стрелками обозначены: 1 – печень; 2 – поджелудочная железа; 3 – передний отдел кишки; 4 – средний отдел кишки; 5 – задний отдел кишки; 6 – глаз; 7 – глоточные хрящи; 8 – желудок; 9 – поперечно-исчерченная мышечная ткань. Окраска гематоксилином Джилла и 1,0% спиртовым раствором эозина. Увеличение x40.

У личинок всех подопытных групп визуализируется участок перехода многослойного плоского эпителия слизистой пищевода, имеющего эктодермальное происхождение, в однослойный однорядный призматический эпителий желудка энтодермального происхождения (рисунок 3).

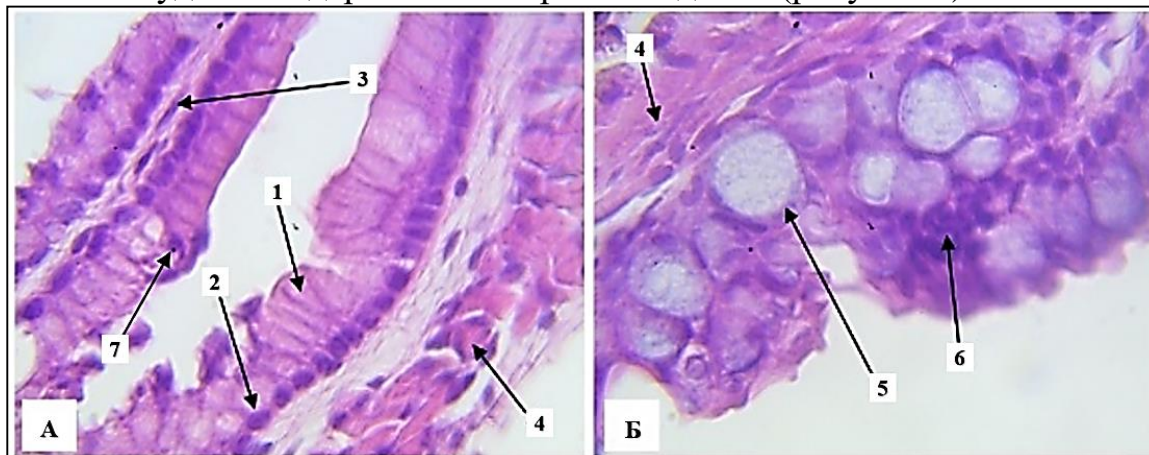


Рисунок 3 – Переход пищевода в желудок (А - ув. х600) и стенка пищевода (Б – ув. х1000) личинки *C. gariepinus* на 7-й день после выклева. Стрелками обозначены:

- 1 – однослойный однорядный призматический эпителий желудка; 2 – базофильно окрашенные ядра эпителиальных клеток; 3 – рыхлая волокнистая соединительная ткань; 4 – мышечная оболочка; 5 – секреторные клетки стенки пищевода; 6 – многослойный плоский эпителий пищевода; 7 – участок перехода пищевода в желудок.

Окраска гематоксилином Джилла и 1,0% спиртовым раствором эозина.

Морфология мальков *C. gariepinus* на 14-й день после выклева

К концу личиночной стадии развития (к 14-му дню после выклева) наблюдается полное завершение процесса формирования органов желудочно-кишечного тракта. Спустя 14 дней после выклева у рыб 1.1 (контрольной) группы в паренхиме печени повышено количество вакуолизированных клеток, тогда как у мальков четвертой (1.4) подопытной группы их численность значительно меньше, а также более четко видны границы гепатоцитов.

Было отмечено, что на 14-й день после выклева в почках мальков подопытных групп обнаружено увеличение количества проксимальных почечных канальцев.

Морфология мальков *C. gariepinus* на 21-й день после выклева

На 21-й день у исследованных особей наблюдается резкое увеличение размеров тела и головы, а также более выражены опорные структуры, в частности грудные и хвостовой плавники (таблица 2).

Таблица 2 – Параметры *C. gariepinus* на 21-й день после выклева, n=100 (M±m)

№ группы	Кормовая добавка	Длина тела, мм	Длина головы, мм
1.1	Контроль (без кормовой добавки)	25,60±0,76	6,20±0,16
1.2	Лактобактерии	26,50±0,67	5,50±0,14
1.3	Бифидобактерии	26,30±0,79**	5,30±0,19
1.4	Комплекс лакто- и бифидобактерий	31,10±0,75***	7,10±0,19

Примечание: **P≤0,01 (0,99); ***P≤0,001 (0,999)

Как видно из результатов измерения параметров тела, представленных в таблице 2, наибольшее увеличение длины тела достоверно ($P \leq 0,001$) и длины головного отдела наблюдалось у трехнедельных мальков 1.4 (четвертой) подопытной группы, которым скармливали комплекс лакто- и бифидобактерий, и составляло $31,10 \pm 0,75$ мм и $7,10 \pm 0,19$ мм соответственно. Анализ гистологических срезов подтверждает активный рост органов пищеварения.

На 21-й день у мальков всех подопытных групп был проведен анализ структурных элементов жаберного аппарата и отмечена соответствующая данному возрасту степень развития.

Морфология мальков *C. gariepinus* на 30-й день после выклева

Анализ данных, полученных на 30-й день исследования, показал, что наибольшее увеличение длины тела и головы отмечалось у мальков 1.4 (четвертой) подопытной группы с применением комплекса лакто- и бифидобактерий ($55,40 \pm 1,83$ мм и $13,30 \pm 0,36$ мм соответственно).

У мальков 1.1 (контрольной) группы по сравнению с исследуемыми объектами подопытных групп, получавшими кормовые добавки, длина тела была меньше на 5,4–16,3 мм, а длина головного отдела – на 2,0–4,96 мм.

Исследования гистологических препаратов печени африканского клариевого сома, показали, что у группы месячных мальков, которым в корм добавляли комплекс лакто- и бифидобактерий, сохраняется положительная динамика развития данного органа (рисунок 4).

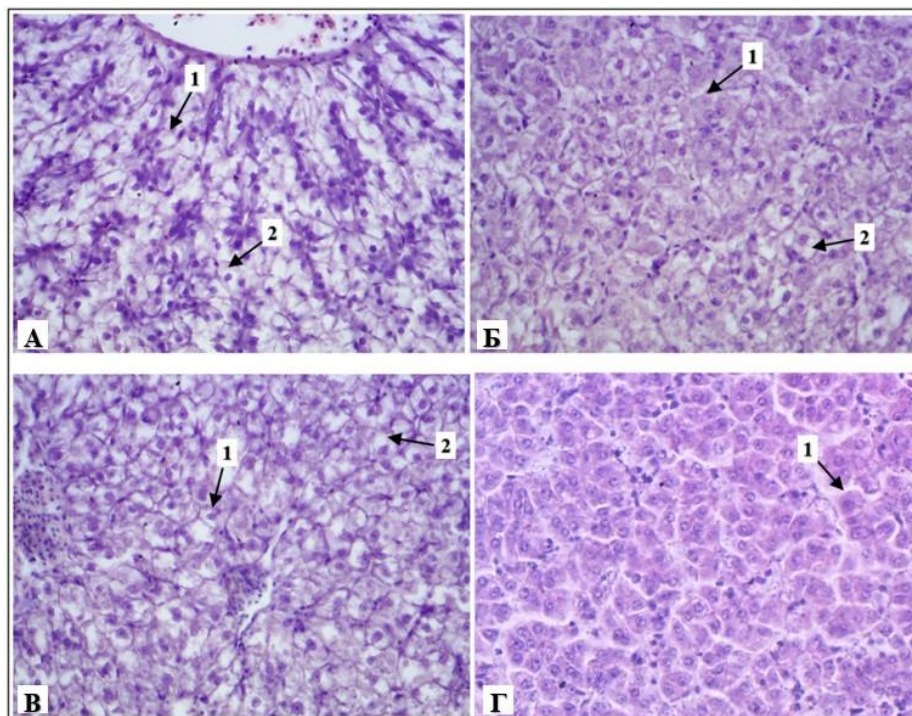


Рисунок 4 – Печень *C. gariepinus* мальков (А – группа 1.1; Б – группа 1.2; В – группа 1.3; Г – группа 1.4) подопытных групп на 30-й день после выклева. Стрелками обозначены: 1 – гепатоциты; 2 – вакуолизирующая цитоплазма гепатоцита.

Окраска гематоксилином Джилла и 1,0% спиртовым раствором эозина. Увеличение: $\times 400$.

Как видно на рисунке 4, у *C. gariepinus* в 1.2 (второй) и 1.4 (четвертой) подопытных группах наблюдается значительное уменьшение вакуолизированных клеток паренхимы печени, в отличие от мальков контрольной группы и получавших с кормом *Bifidobacterium bifidum* (группа 1.3). При больших увеличениях микроскопа синусный полюс гепатоцитов хорошо выражен, капиллярная сеть четко прослеживается.

Не менее интересные данные получены при исследовании органов дыхательной системы *C. gariepinus*, которые представлены на рисунке 5.

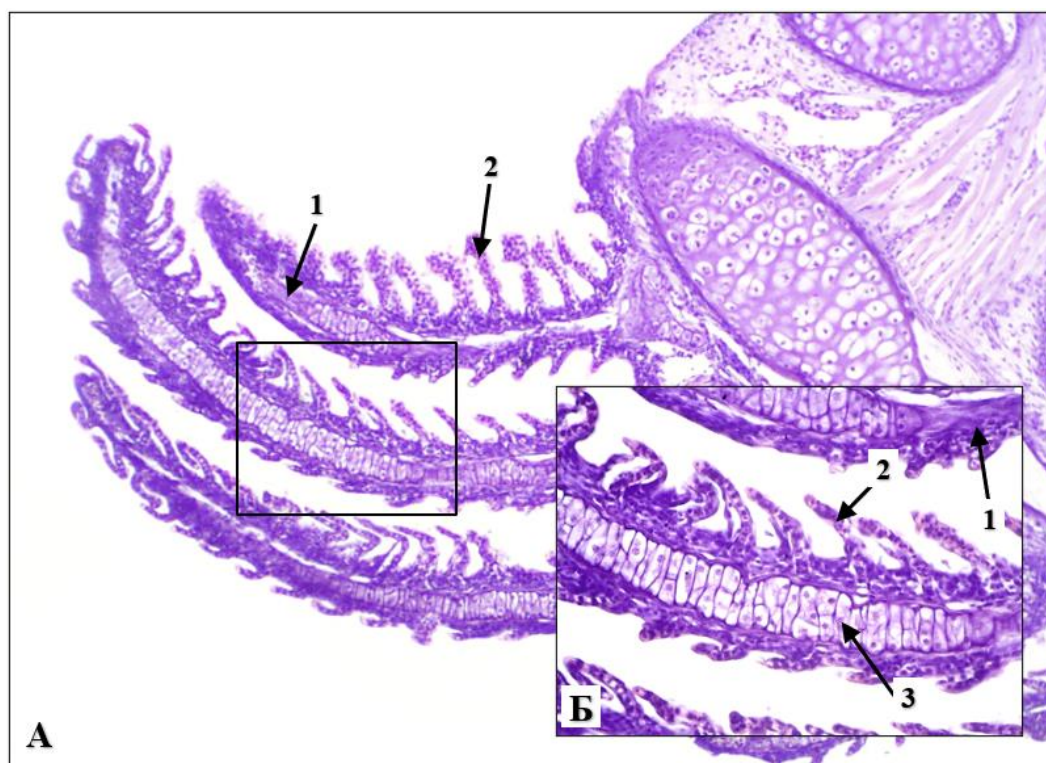


Рисунок 5 – Жабры *C. gariepinus* мальков 1.4 (четвертой) подопытной группы на 30-й день после выклева А (x100) и Б (x400). Стрелками обозначены: 1 – первичные ламеллы; 2 – вторичные ламеллы; 3 – хрящевая ткань.

Окраска гематоксилином Джилла и 1,0% спиртовым раствором эозина.

С помощью селективной для этих целей окраски установлено, что жабры и окружающие их ткани развиваются равномерно и имеют характерное строение для данного возраста. Для визуализации структур органов дыхательной системы наиболее эффективной оказалась окраска гематоксилином Джилла и 1,0% спиртовым раствором эозина.

Морфология мальков *C. gariepinus* на 60-й день после выклева

На второй месяц после выклева у представителей четвертой подопытной группы на фоне применения комплексной кормовой добавки отмечается увеличение количества ионоцитов (хлоридных клеток) в пищеводе по сравнению с мальками остальных подопытных групп.

При этом в области пищевода у африканского клариевого сома удалось визуализировать наличие вкусовых луковиц (рисунок 6).

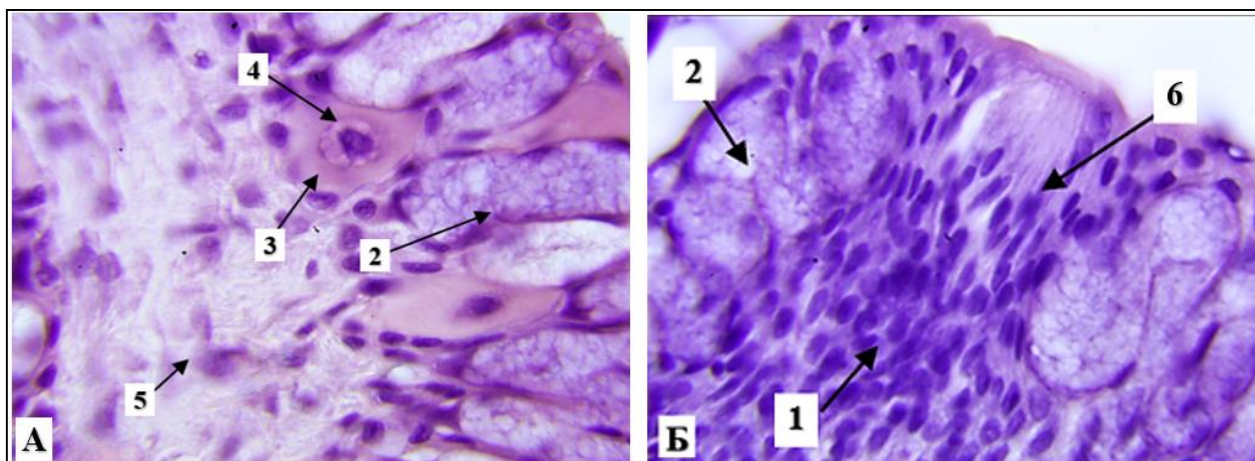


Рисунок 6 – Фрагменты эпителия (А и Б) слизистой оболочки пищевода 1.4 (четвертой) подопытной группы на 60-й день после выклева. Стрелками обозначены: 1 – многослойный плоский эпителий; 2 – слизистые клетки; 3 – ионоциты (хлоридные клетки); 4 – ядра ионоцитов; 5 – рыхлая волокнистая соединительная ткань; 6 – вкусовая луковица. Окраска гематоксилином Джилла и 1,0% спиртовым раствором эозина. Увеличение: x1000.

Данная структура представлена в виде образования округлой формы, с четко различимыми границами. Хорошо дифференцируются поддерживающие клетки веретеновидной формы с палочковидными ядрами и вкусовые клетки. На поверхности многослойного эпителия визуализируются пучки дендритных отростков, которые направлены к афферентному нервному волокну.

По итогам проведенных серий опытов был произведен анализ микробиоты кишечной микрофлоры африканского клариевого сома на 30-й и 60-й дни после выклева.

Спустя месяц после выклева максимальное количество бактерий родов *Prevotella spp.* и *Porphyromonas spp.*, которые способствуют конверсии кормов и защите организма от патогенных факторов, были обнаружены у мальков *C.gariepinus* 1.4 (четвертой) подопытной группы. Содержание данных микроорганизмов в пробах из трех серий опытов варьировало от $7,9 \times 10^5$ до $5,0 \times 10^7$ клеток/г. В ходе исследований только у мальков, которым задавали комплексную кормовую добавку, были выделены лактобациллы рода *Lactobacillus spp.* ($1,6 \times 10^3$ клеток/г), которые повышают иммуномодулирующую активность и участвуют в синтезе витаминов и незаменимых аминокислот. К двухмесячному возрасту сравнительно высокая концентрация микроорганизмов родов *Prevotella spp.* и *Porphyromonas spp.* сохраняется в 1.4 (четвертой) подопытной группе.

Динамика параметров *C. gariepinus* в ранние периоды онтогенеза под действием биотических факторов

Результаты исследований морфометрических параметров у двухмесячных мальков сомообразных разных экспериментальных групп показали существенные отличия. Доказано положительное влияние *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и комплекса лакто- и бифидобактерий на рост клариевого сома, что подтверждено гистологическими исследованиями.

Согласно полученным данным, максимальные значения массы к двухмесячному возрасту отмечаются у *C. gariepinus* 1.2 (второй) - (16,412±0,195) и 1.4 (четвертой) - (17,306±0,016) подопытных групп. При этом прирост массы за весь период наблюдений составляет у изучаемых гидробионтов группы 1.1 (контроля) 12,72 г; группы 1.2 (второй) – 16,412 г; группы 1.3 (третьей) – 11,48 г и группы 1.4 (четвертой) – 17,306 г.

Гистогенез органов *C. gariepinus* под действием абиотических факторов

Все живые организмы находятся в тесном контакте с условиями среды обитания, важнейшими из которых являются освещение, температура и водородный показатель.

Результаты оценки жизнеспособности эмбрионов африканского клариевого сома в зависимости от температуры среды обитания представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Жизнеспособность *C. gariepinus* в ранние периоды онтогенеза при разных температурных режимах, n=100
(M±m)

Сроки после оплодотворения, час	Температура воды, °С			
	28	26	24	22
1	73,33±0,67	83,00±1,00	86,33±0,33	83,33±0,88
2	70,33±0,88	83,33±0,67	82,33±0,88	81,66±1,20
3	67,66±1,45	80,33±0,33	81,00±0,58	80,00±0,58
12	69,66±0,88	81,00±0,58	80,00±0,58	78,66±0,67
24	69,00±0,58	77,33±1,76	80,66±0,67	77,66±1,20
36	66,66±1,15	78,00±2,00**	81,33±1,76**	72,00±2,52**

Примечание: **P≤0,01 (0,99).

Как видно из таблицы, при температуре 24⁰С к концу опыта отмечается увеличение процента выклева предличинок на 14,67% по сравнению с контрольной группой и составляет 81,33%±1,76%, сопровождаясь активным развитием.

К 36-ти часам у личинок первых трех подопытных групп отмечается одинаковая степень формирования органов и систем (рисунок 7).

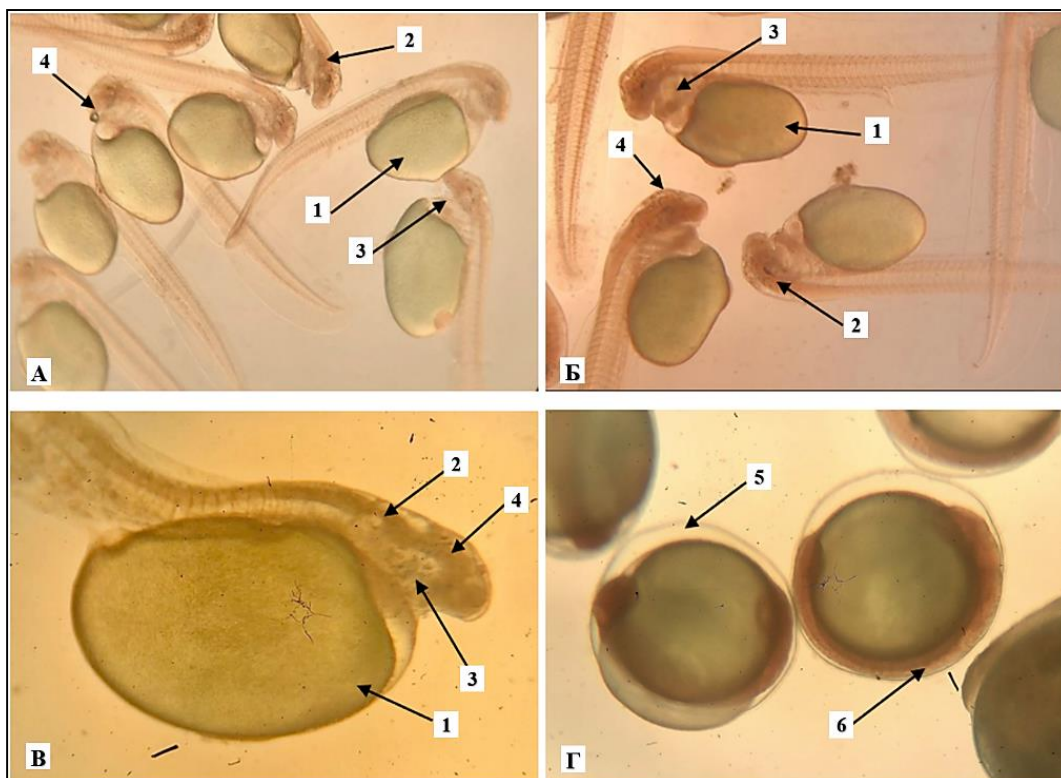


Рисунок 7 – Предличинки и икра *C. gariepinus* через 36 часов после оплодотворения (А – группа 3.1 и Б – группа 3.2 (увеличение $\times 20$), В – группа 3.3 и Г – группа 3.4 (увеличение $\times 40$)). Стрелками обозначены: 1 – желточный мешок; 2 – нервная трубка; 3 – сердце; 4 – формирование глаза; 5 – оболочка икры, 6 – дифференцировка головного и туловищного отделов зародыша. Без окрашивания.

В последующем темпы роста у животных, инкубацию которых проводили при температуре 24°C , протекают более интенсивно, что подтверждается результатами морфометрических и гистологических исследований.

Результаты исследований показали, что режим освещения (темный, светодиодный и люминесцентный), при согласно полученной нами оптимальной температуре (24°C), не оказывают существенного влияния на количество сохранивших жизнеспособность предличинок (от $72,00 \pm 2,52$ до $79,00 \pm 1,0$). При микроскопии предличинок, личинок и мальков установлено отсутствие изменений в интенсивности гисто- и органогенеза *C. gariepinus* под действием изменения режима освещенности.

Следующая серия опытов доказала, что изменение рН среды как в щелочную, так и кислую сторону негативно влияет на развитие оплодотворенной икры *Clarias gariepinus*. Установлено, что при значениях рН 8,5 наблюдается мелкая зернистость на оболочке икры, сопровождающаяся гибелью эмбриона на вторые сутки после оплодотворения. А снижение водородного показателя в кислую сторону (рН 5,5) вызывает гибель икры в первые часы после оплодотворения. Установлено, что оптимальной является нейтральная среда с показателем рН 6,9-7,0 при которой наблюдается положительная динамика в росте и развитии изучаемых гидробионтов.

Таким образом, полученные результаты позволили установить, что оптимальной как с точки зрения биологических процессов, так и снижения

энергозатрат, является температура 24⁰С при значениях рН 6,9–7,0. Режим освещенности не оказывает существенного воздействия и может быть скорректирован с учетом производственных процессов в цехе инкубации икры и выращивания предличинок, личинок и мальков *Clarias gariepinus*.

Усовершенствование метода изготовления гистологических препаратов в ранние периоды онтогенеза

Специфика данной работы требует адаптации гистологической техники к изменяющемуся гетероморфизму тканей.

Разработанная нами полезная модель для изготовления качественных и информативных микропрепаратов позволяет получить четкие срезы в спинно-брюшных и латеральных плоскостях (рисунок 8).

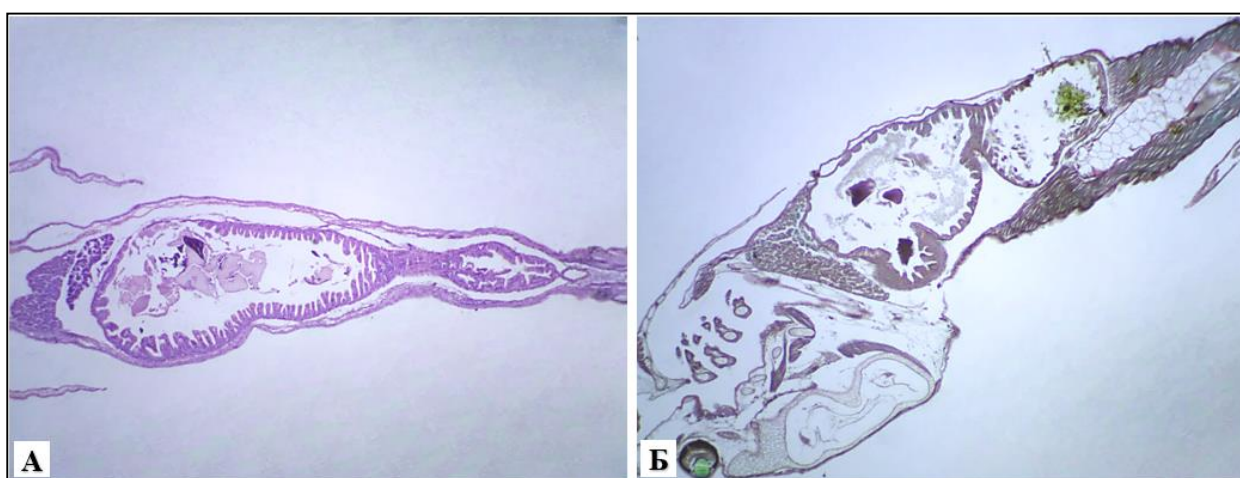


Рисунок 8 - Гистологический срез личинки *C. gariepinus*: А – в фронтальной (окраска гематоксилином Джилла и 1,0% спиртовым раствором эозина) и Б – в сагиттальной (окраска по Ван-Гизон трихром) плоскостях. Увеличение х40.

При этом следует указать, что разработанная гистологическая кассета может быть применена не только для исследования ранних периодов онтогенеза рыб, но и других небольших биологических объектов.

Оценка эффективности различных методов окраски гистологических препаратов *C. gariepinus*

При исследовании микропрепаратов личинок, мальков и органов африканского клариевого сома были применены различные методы окраски для селективного выявления гистологических структур.

Для тканей и органов *C. gariepinus* наиболее эффективными с точки зрения визуализации большинства структур являются следующие красители: гематоксилин Джилла и 1% спиртовой раствор эозина, толуидиновый синий, а также окраска по Ван-Гизон трихром. Однако, следует отметить, что и другие изученные селективные методы окраски также можно применять, но для выявления конкретных тканей и органов на определенных этапах онтогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Период эмбрионального развития считается самым главным в формировании организма, так как именно этот этап влияет на дальнейшую продуктивность *C. gariepinus*. Установленные морфологические данные с точки зрения, как теоретической, так и практической значимости, вносят существенный вклад в изучение динамики гисто- и органогенеза в пренатальные и ранние постнатальные периоды развития африканского клариевого сома.

При выращивании рыбы в установках замкнутого водоснабжения существенную роль играют биотические и абиотические факторы: температура, водородный показатель, освещенность и кормовые добавки. Все эти параметры имеют важное значение для роста и развития африканского клариевого сома.

По результатам, полученным в ходе научного эксперимента, сделаны следующие выводы:

1. В ранние периоды онтогенеза наблюдается положительная динамика гисто- и органогенеза, а также отмечается интенсификация развития органов пищеварительной, дыхательной и мочевыделительной систем личинок и мальков *C. gariepinus* при добавлении в корм пробиотиков с содержанием лактобактерий и комплекса лакто- и бифидобактерий. Это проявляется на 14-й день после выклева снижением количества вакуолизированных клеток в печени.

2. К двухмесячному возрасту на фоне применения комплексной кормовой добавки отмечается увеличение количества желудочных желез и ионоцитов (хлоридных клеток) в пищевode, по сравнению с мальками остальных подопытных групп.

3. Применение комплекса *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и *Bifidobacterium lactis* сопровождается максимальным увеличением длины тела и головы по сравнению с остальными подопытными группами и к двухмесячному возрасту составляет $137,62 \pm 2,82$ мм и $29,72 \pm 0,87$ мм соответственно. Максимальный прирост массы *C. gariepinus* отмечается на фоне применения комплекса пробиотических препаратов и к двухмесячному возрасту составляет 17,306 г, что выше показателей животных контрольной группы на 36,05%.

4. Результаты исследований показали, что образование бластодиска у эмбриона *C. gariepinus* происходит в течение первых 21-40 минут после оплодотворения. Спустя 35-80 минут после оплодотворения можно наблюдать начало процесса дробления и образования 4-8 бластомеров. Через 24 часа после оплодотворения в группах, где температура воды составляет +280С и +260С, наблюдается выклев предличинок, а при +240С и +220С он происходит через 36 и 48 часов соответственно. Результаты исследований в течение первых суток показали, что на фоне снижения температурных режимов с увеличением возраста эмбриона отставание в развитие становится менее заметным.

5. При инкубации икры при температуре +240С отмечается увеличение процента выклева предличинок на 14,67% и более активное их развитие к 36-и часам после оплодотворения. Таким образом, температурный режим влияет как на длительность эмбрионального развития, на процент выклева, так и на активность органогенеза изучаемых животных.

6. Повышение водородного показателя рН до 8,5 негативно влияет на развитие оплодотворенной икры африканского клариевого сома, что проявляется мелкой зернистостью на поверхности икры, с последующей гибелью зародыша на вторые сутки после оплодотворения. Снижение показателя рН до 5,5 приводит к разрушению оболочки икры в первые часы после оплодотворения. Оптимальной является нейтральная среда с показателем рН 6,9-7,0. При использовании данных параметров наблюдается положительная динамика в росте и развитии изучаемых гидробионтов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Применение комплекса лакто- и бифидобактерий в виде сухой пробиотической добавки в рыбоводческих хозяйствах повышает прирост массы и ускоряет процессы завершения органогенеза *C. gariepinus* в постэмбриональный период.

Полученные данные могут быть использованы при выборе оптимальной температуры и значений рН для разведения африканского клариевого сома в эмбриональный и постэмбриональные периоды развития. Это поможет снизить себестоимость содержания данного вида животных и повысить рентабельность производства.

Режим освещенности может быть скорректирован с учетом производственных процессов в цехе инкубации икры и выращивания предличинок, личинок и мальков мраморного сома, так как он не оказывает существенного воздействия на их рост и развитие.

РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные оригинальные данные позволяют рекомендовать добавление в рацион в первый месяц после выклева кормовой добавки, состоящей из комплекса лакто- и бифидобактерий, которая оказывает положительное влияние на процент выклева, а также развитие предличинок, личинок и мальков африканского клариевого сома.

Исследование влияния различных кормовых добавок и факторов среды обитания на эмбриональное развитие и ранние периоды онтогенеза *C. gariepinus* перспективно и требует дальнейшего изучения при промышленном разведении рыбы в установках замкнутого водоснабжения.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

*Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях,
рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования
РФ:*

1. Гринюк, Е. С. Гистологическая оценка строения почек африканского клариевого сома (*Clarias gariepinus*) на фоне применения пробиотической закваски / Е. С. Гринюк, М. Э. Мкртчян, Д. И. Сафронов // Иппология и ветеринария. – 2023. – № 2(48). – С. 52–59.

2. Гринюк, Е. С. Микроструктура органов пищеварительного канала *Clarias gariepinus* на фоне применения пробиотиков / Е. С. Гринюк, М. Э. Мкртчян, Д. И. Сафронов, Л. А. Ильина // Международный вестник ветеринарии. – 2023. - № 3. – С. 211–217.

3. Гринюк, Е. С. Морфологические особенности строения вкусовой почки у африканского клариевого сома / Е. С. Гринюк, М. Э. Мкртчян // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. – 2023. – № 4. – С. 170–173.

Публикации в журналах, сборниках научных трудов и материалах конференций:

4. Гринюк, Е. С. Влияние световых показателей на развитие *Clarias gariepinus* в период раннего онтогенеза / Е. С. Гринюк, М. Э. Мкртчян, Н. А. Сладкова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2021. – № 4. – С. 111–114.

5. Гринюк, Е. С. Гистологическая кассета для исследований ранних стадий онтогенеза *Clarias gariepinus* / Е. С. Гринюк, М. Э. Мкртчян // Эколого-биологическое благополучие растительного и животного мира: Тезисы докладов международной научно-практической конференции, Благовещенск, 20-21 октября 2022 года /. – Благовещенск: Дальневосточный государственный аграрный университет, 2022. – С. 88.

6. Гринюк, Е. С. Гистологическое строение печени *Clarias gariepinus* под воздействием пробиотиков в постэмбриональном периоде / Е. С. Гринюк, М. Э. Мкртчян, Д. И. Сафронов // Интеграция науки и образования в аграрных вузах для обеспечения продовольственной безопасности России: сборник трудов национальной научно-практической конференции, Тюмень, 01-03 ноября 2022 года /. – Тюмень: Государственный аграрный университет Северного Зауралья, 2022. – С. 17–24.

7. Гринюк, Е. С. Влияние абиотических факторов на рост и развитие *Clarias gariepinus* в ранний период онтогенеза / Е. С. Гринюк // Актуальные проблемы экологии и природопользования: материалы национальной научно-практической конференции студентов, аспирантов, молодых ученых и специалистов, Санкт-Петербург, 12-13 мая 2022 года /. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2022. – С. 15–17.

8. Гринюк, Е. С. Особенности морфометрических и морфологических изменений развития *Clarias gariepinus* на фоне применения пробиотиков / Е. С. Гринюк, М. Э. Мкртчян // Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства: Материалы международной научно-практической конференции, Йошкар-Ола, 23-24 марта 2023 года /. Том Выпуск XXV. – Йошкар-Ола: Марийский государственный университет, 2023. – С. 648–650.

9. Гринюк, Е. С. Морфологические изменения печени *Clarias gariepinus* на фоне применения кормовой добавки / Е. С. Гринюк, М. Э. Мкртчян // Ветеринарная лабораторная практика: I международная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых, Санкт-Петербург, 17-21 апреля 2023 года /. – Санкт-Петербург: – Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2023. – С. 105–108.

Патенты РФ на изобретения:

10. Патент № 213986 U1 Российская Федерация, МПК G01N 1/28. Кассета для гистологических исследований предличинки и личинки гидробионтов: № 2022120138: заявл. 21.07.2022: опубл. 06.10.2022 / Е. С. Гринюк, М. Э. Мкртчян, Д. И. Сафронов [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины».