

**Keywords:**

pyobacteriophage, two-year-olds, red tilapia, fish-breeding biological parameters, morphobiochemical blood parameters

## Опыт применения пиобактериофага поливалентного очищенного (*Pyobacteriophagum polyvalentum purum*) в аквакультуре

DOI

Канд. с.-х. наук, доцент **А.Д. Жандалгарова** – кафедра «Аквакультура и рыболовство»; д-р с.-х. наук, доцент, профессор **А.А. Бахарева** – заведующий кафедрой «Аквакультура и рыболовство»; д-р с.-х. наук, доцент, профессор **Ю.Н. Грозеску** – кафедра «Аквакультура и рыболовство»; канд. биол. наук **А.Б. Ахмеджанова** – ведущий инженер НИЛ «Осетроводство и перспективные объекты аквакультуры» – Астраханский государственный технический университет (ФБГОУ ВО «АГТУ»)

@ zhandalgarova@mail.ru;  
bahareva.anya@yandex.ru;  
grozesku@yandex.ru;  
aliyaakhmed14@gmail.com

**Ключевые слова:** пиобактериофаг, двухгодовики, красная тилapia, рыбоводно-биологические показатели, морфобioхимические показатели крови

### EXPERIENCE OF USING POLYVALENT PURIFIED PYOBACTERIOPHAGE (*PYOBACTERIOPHAGUM POLYVALENTUM PURUM*) IN AQUACULTURE

Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor **A.D. Zhandalgarova** – The Department of Aquaculture and Fisheries; Doctor of Agricultural Sciences, Docent, Professor **A.A. Bakhareva** – Head of the Department of Aquaculture and Fisheries; Doctor of Agricultural Sciences, Docent, Professor **Yu.N. Grozesku** – The Department of Aquaculture and Fisheries; Candidate of Biological Sciences **A.B. Akhmedzhanova** – Leading Engineer of the RL Sturgeon Breeding and promising objects of Aquaculture – Astrakhan State Technical University

The article presents experimental data on the use of pyobacteriophage in the cultivation of two-year-olds of red tilapia. It was found that bacteriophages during fish rearing improves fish-breeding and biological indicators, expressed in an increase in weight gain. The obtained morphobiochemical blood parameters indicate the absence of physiological changes in the organism of the farmed fish.

#### ВВЕДЕНИЕ

Одним из ведущих направлений современной биотехнологии являются исследования в области изучения бактериофагов, что связано с возрастающим интересом к их практическому применению с целью диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний в различных отраслях сельского хозяйства [1].

В настоящее время наблюдается растущая тенденция использования бактериофагов в аквакультуре, которая несет

огромные убытки из-за бактериальных заболеваний рыб. При использовании бактериофагов необходимо учитывать их специфичность, бактериальную устойчивость, безопасность, иммунный ответ организма хозяина, состав, стабильность фаговых препаратов, а также их влияние на окружающую среду [2; 3].

В современной аквакультуре бактериофаги применяются для увеличения линейно-весового прироста [4], стабилизации физиологического состояния

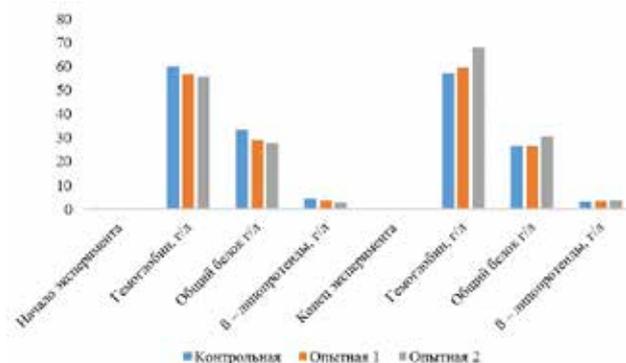
выращиваемых рыб, уничтожения патогенных микроорганизмов, нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта с целью формирования и поддержания в нем колонизационной резистентности. Данные препараты свободно проникают в ткани организма, оказывают иммуностимулирующее действие, не обладая иммуносупрессивным эффектом [5]. Несмотря на то, что применение бактериофагов в аквакультуре еще мало изучено, данное направление является перспективным и актуальным.

На основании вышеизложенного, цель данной работы заключалась в оценке влияния пиобактериофага поливалентного на рыбоводно-биологические показатели и морфобиохимические показатели крови красной тилапии.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальные работы проводились на базе ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет» (Инновационный центр «Биоаквапарк – НТЦ аквакультуры»). Объектом исследования послужили двухгодовики красной тилапии (*Oreochromis mossambicus* × *O. Niloticus*). Выращивание рыб осуществлялось в аквариумах объемом 400 л при плотности посадки 25 экземпляров на аквариум с постоянной фильтрацией, аэрацией и стабилизацией температурного режима. Температура воды за время эксперимента составила 23,5–26,5°C, при этом содержание кислорода поддерживали на уровне не ниже 6,2 мг/л.

Для проведения экспериментальных работ использовали препарат пиобактериофага поливалентного очищенного (*Pyobacteriophage polyvalentum purum*) производства АО НПО «Микроген» (Россия), представляющий собой смесь стерильных очищенных фильтратов фаголизатов бактерий *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* – до 1 мл.



**Рисунок 1.** Биохимические показатели крови двухгодовиков красной тилапии при выращивании с применением бактериофага

**Figure 1.** Biochemical blood parameters of two-year-olds of red tilapia when grown using a bacteriophage

В статье представлены экспериментальные данные по применению пиобактериофага при выращивании двухгодовиков красной тилапии. Установлено, что использование бактериофагов при выращивании рыб улучшает рыбоводно-биологические показатели, выраженные в повышении весового прироста. Полученные морфобиохимические показатели крови свидетельствуют об отсутствии физиологических изменений в организме выращиваемых рыб.

Экспериментальное выращивание осуществляли в течение 14 суток. Для это выращиваемые рыбы были разделены на опытные группы и контроль: в первой опытной группе рыб выращивали в воде с добавлением бактериофага в концентрации 1 мл/л воды, во второй – с добавлением бактериофага в концентрации 1 мл/л воды и обработкой препаратом комбикорма из расчета 5 мл на суточную норму кормления. Кратность введения пиобактериофага составила 1 раз в сутки в течение 14 дней.

Суточная норма кормления определялась в соответствии с массой тела рыб и температурой воды, на основании общепринятой технологии выращивания [6].

Схема измерений рыб проводилась по методике И.Ф. Правдина [7].

Абсолютный прирост вычисляли по формуле:

$$P_{аб} = m_k - m_0, \quad (1)$$

где  $m_k$  – конечная масса молоди, г;  $m_0$  – начальная масса молоди, г.

Среднесуточный прирост вычисляли по формуле:

$$P_{ср.сут.} = (m_k - m_0) / t, \quad (2)$$

где  $m_k$  – конечная масса молоди, г;  $m_0$  – начальная масса молоди, г;  $t$  – продолжительность эксперимента, сут.

Среднесуточную скорость роста вычисляли по формуле Castell [8]:

$$A = [(m_k / m_0)^{1/t} - 1] \times 100 (\%), \quad (3)$$

где  $m_k$  – конечная масса молоди, г;  $m_0$  – начальная масса молоди, г;  $t$  – продолжительность эксперимента, сут.

Коэффициент упитанности определяли по формуле Фультона [9]:

$$КФ = (m \times 100) / l^3 (\%), \quad (4)$$

где  $m$  – масса рыбы, г;  $l$  – длина от начала рыла до конца чешуйного покрова, см.

Коэффициент массонакопления определяли по формуле Купинского и др. [10]:

$$Км = ((M_k^{1/3} - M_0^{1/3}) \times 3) / t, \quad (5)$$

где  $Км$  – общий продукционный коэффициент скорости роста;  $M_k$  и  $M_0$  – масса рыбы конечная и начальная, г;  $t$  – период выращивания, сут.

Для проведения гематологических исследований кровь отбирали прижизненно из хвостовой артерии в пробирки Эппендорфа. Были изучены следующие показатели: концентрация гемоглобина, общего сывороточного белка, β-липопротеидов, СОЭ, лейкоцитарная формула.

Температуру воды и содержание, растворённого в воде, кислорода определяли ежедневно при помощи термооксиметра «OXYGUARD Handy Polaris», уровень pH – портативным pH-метром «Checker-1».

Результаты экспериментальных работ анализировали методами биологической статистики с помощью компьютерных программ Statistica v 6.0, Excel 2010. Уровень различий оценивали с помощью критерия достоверности Стьюдента [11].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эффективность применения пиобактериофага оценивали на основании экспериментального выращивания красной тилапии в течение 14 суток. За период проведенных исследований рыбы второй опытной группы имели наиболее высокие рыбоводно-биологические показатели (табл. 1).

Величина абсолютного прироста в данной группе составила 24,1 г, что в 4,0 и 4,7 раза выше, чем в первой опытной и контрольной группах, соответственно. Показатель среднесуточной скорости

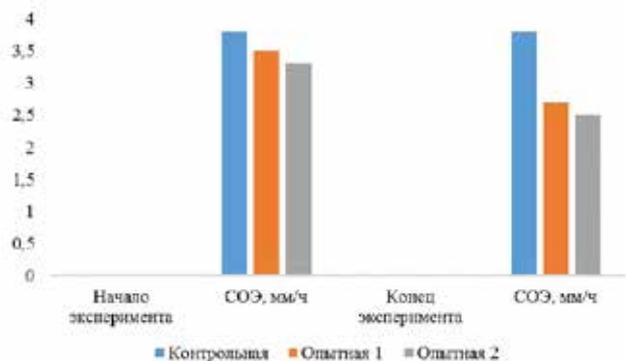
роста был также выше во второй опытной группе и составлял 1,72%. Коэффициент упитанности по Фульгону, отражающий связь между средней массой тела и длиной рыбы, не отличался достоверно и варьировал в пределах 1,81-2,21. Наиболее высокое значение коэффициента массонакопления было характерно для рыб второй опытной группы (0,06 ед.), в то время как в остальных группах данный показатель не превышал 0,02 ед.

Таким образом, по данным рыбоводно-биологических показателей, можно судить о положительном действии пиобактериофага на двухгодовиков красной тилапии, выраженном в более высоких показателях прироста.

Оценку физиологического состояния рыб в экспериментальных условиях выращивания проводили по морфобиохимическим показателям крови, характеризующим метаболическую функцию крови и, в частности, динамику транспортируемых кровью белков и липидов [12]. Исследование гематологических показателей крови двухгодовиков красной тилапии в начале и после эксперимента не выявило отклонений от нормативных значений (рис. 1) [12].

Важнейшим элементом реализации дыхательной функции является уровень гемоглобина. Анализируя данные, полученные после завершения экспериментальных работ, установлено достоверное повышение уровня концентрации гемоглобина на 10,8 г/л у второй опытной группы по сравнению с контрольным вариантом, что может быть связано с более интенсивным обменом веществ. Содержание общего сывороточного белка в крови рыб второй опытной группы было выше контрольной на 18,58% и находилось в пределах референсных значений [12]. Уровень  $\beta$ -липопротеидов, на протяжении всего периода выращивания, находился на одном уровне, что подтверждено статистически ( $p > 0,05$ ).

При анализе СОЭ установлено, что в двух опытных группах выявлена тенденция к снижению показателя к концу экспериментальных работ (рис. 2). Так, у рыб второй опытной группы ско-



**Рисунок 2.** Уровень СОЭ

при выращивании двухгодовиков красной тилапии с применением бактериофага

**Figure 2.** The level of ESR in the cultivation of two-year-old red tilapia with the use of a bacteriophage

**Таблица 1.** Рыбоводно-биологические показатели двухгодовиков красной тилапии при выращивании с применением пиобактериофага / **Table 1.** Fish-breeding and biological indicators of red tilapia billets when grown with the use of piobacteriophage

Показатель	Группа		
	Контрольная n=25	Опытная 1 n=25	Опытная 2 n=25
Масса начальная, ( $m_n$ ) г	156,2±2,1	148,8±1,6	154,3±1,4
Масса конечная, ( $m_k$ ) г	161,3±1,8	154,8±1,9	178,4±2,3
Длина начальная, ( $l_n$ ) см	19,3±0,4	20,2±0,5	20,3±0,4
Длина конечная, ( $l_k$ ) см	19,3±0,7	20,5±0,3	20,4±0,5
Абсолютный прирост, г	5,1	6,0	24,1
Среднесуточный прирост, г	0,36	0,43	1,72
Коэффициент упитанности по Фульгону, %	2,21	1,81	2,10
Среднесуточная скорость роста, %	0,23	0,28	1,04
Коэффициент массонакопления, ед.	0,01	0,02	0,06
Выживаемость, %	100	100	100
Длительность выращивания, (t) сут.	14	14	14

**Таблица 2.** Лейкоцитарная формула крови двухгодовиков красной тилапии при выращивании с применением пиобактериофага, % / **Table 2.** Leukocyte formula of the blood of two-year-old red tilapia when grown with the use of piobacteriophage, %

Показатель	Группа		
	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2
Нейтрофилы сегментоядерные	7,5±0,1	7,0±0,8	10,0±0,3*
Нейтрофилы палочкоядерные	6,4±0,7*	6,1±0,1	4,1±0,2
Лимфоциты	77,8±1,4	78,2±1,2	78,8±0,3
Моноциты	2,5±0,7	2,7±0,4	2,5±0,2
Базофилы	4,0±0,6	4,6±0,4	3,5±0,2
Эозинофилы	1,8±0,3	1,4±0,2	1,0±0,1

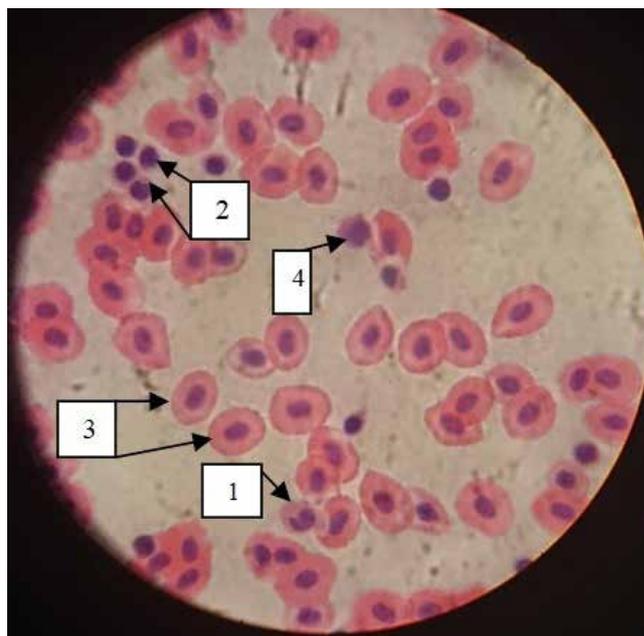
Примечание: различия достоверны при \* $p \leq 0,05$

рость оседания эритроцитов снизилась с 3,25 до 2,5 мм/ч, в то время как в контрольном варианте данный показатель остался на прежнем уровне и составил 3,8 мм/ч. Необходимо отметить, что во всех вариантах выращивания СОЭ не превышала нормативные показатели, что может свидетельствовать об отсутствии воспалительных процессов и физиологических изменений в организме выращиваемых рыб.

Одним из информативных показателей физиологического состояния рыб является лейкоцитарная формула крови. Соотношение лейкоцитов в лейкоцитарной формуле крови отражает не только их клеточный иммунитет, но и является характеристикой физиологического состояния организма рыб. Анализ лейкоцитарной формулы крови красной тилапии представлен в таблице 2.

Результаты исследования лейкоцитарного профиля в крови показали, что в составе лейкоцитов преобладают лимфоциты. Известно, что бактериофаги оказывают положительное влияние на иммунный статус организма, стимулируя фагоцитоз и вызывая кратковременное повышение функциональной активности лимфоцитов [4]. Количество лимфоцитов у двухгодовиков красной тилапии не отличалось достоверно и варьировало в пределах 77,8-78,8% (рис. 3). В сравнении с опытными группами и контролем разница между содержанием лимфоцитов составляла от 0,51 до 1,27% и не была статистически достоверной.

В лейкоцитарном профиле крови рыб второй опытной группы отмечено, что значительную часть лейкоцитов составляют сегментоядерные нейтрофилы (10±0,3%), а также наблюдается более низкий процент содержания палочкоядерных нейтрофилов (4,1±0,2%). В результате число сегментоядерных нейтрофилов в опытной группе 2 было выше в 1,4 раза, в сравнении с контрольным вариантом, что, вероятно, указывает на активацию гранулопоэза в организме рыб в ответ на патологическое состояние организма, при котором нейтрофилы выделяют в кровь вещества, обладающие бактерицидными и антитоксическими свойствами. Количество моноцитов в контроле и обеих опытных



**Рисунок 3.** Микроскопия мазка крови двухгодовиков красной тилапии

**Figure 3.** Microscopy of a blood smear of two-year-olds of red tilapia

группах находилось на одном уровне и не превышало 2,7% от общего объема просчитанных клеток. Низкий процент моноцитов в лейкоцитарной формуле свидетельствует о хорошем физиологическом состоянии выращиваемых рыб [13].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования позволили сделать вывод о том, что применение бактериофагов при выращивании рыб оказывает положительное влияние на показатели весового прироста и морфобиохимические показатели крови, выраженные повышением концентрации гемоглобина, общего сывороточного белка, а также снижением и нормализацией СОЭ. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о хорошем физиологическом состоянии исследуемых рыб и благоприятных условиях их выращивания.



### ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ

1. Иванова И.А. Бактериофаги и иммунная система макроорганизма / И.А. Иванова, А.А. Труфанова, А.В. Филиппенко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ). – 2019. – №6. – С. 79-85. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-79-85>
1. Ivanova I.A. Bacteriophages and the immune system of the macroorganism / I.A. Ivanova, A.A. Trufanova, A.V. Filippenko // *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology (ZHMEI)*. – 2019. – No. 6. – Pp. 79-85. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-79-85>
2. Kowalska J.D. Growing Trend of Fighting Infections in Aquaculture Environment – Opportunities and Challenges of Phage Therapy / J.D. Kowalska, J. Kazimierzczak, P.M. Sowinska, E.A. Wojcik, A.K. Siwicki, J. Dastyh // *Antibiotics*. – 2020. – Vol. 9. – 301 p.
3. Sharma S. Bacteriophages and its applications: An overview / S. Sharma, S. Chatterjee, S. Datta, R. Prasad, D. Dubey, R.K.R. Prasad, M.G. Vairale // *Folia Microbiol.* – 2016. – Vol. 62. – P. 17-55.
4. Kazimierzczak J. Complete genome sequences of *Aeromonas* and *Pseudomonas* phages as a supportive tool for development of antibacterial treatment in aquaculture / J. Kazimierzczak, E.A. Wójcik, J. Witaszewska, A. Guziński, E.Górecka, M. Stańczyk, Edyta Kaczorek, A.K. Siwicki, J. Dastyh // *Virology Journal*. – 2019. – Vol. 9.
5. Silva Y.J. Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture / Y.J. Silva, L. Costa, C. Pereira, A. Cunha, R. Calado, N.C.M.M. Gomes, A. Almeida // *Microb. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 7. – P. 401-413.
6. Пономарев С.В. Технологии выращивания и кормления объектов аквакультуры юга России / С.В. Пономарев, Е.А. Гамыгин, С.И. Никоноров, Е.Н. Пономарева, Ю.Н. Грозеску, А.А. Бахарева. – Астрахань: Нова плюс, 2002. – 264 с.
6. Ponomarev S.V. Technologies of cultivation and feeding of aquaculture objects in the south of Russia / S.V. Ponomarev, E.A. Gamygin, S.I. Nikonorov, E.N. Ponomareva. - Astrakhan: Nova plus, 2002. - 264 p.
7. Правдин П.Ф. Руководство по изучению рыб / П.Ф. Правдин. – М.: Пищевая промышленность, 1966. – 250 с.
7. Pravdin P.F. *Guide to the study of fish* / P.F. Pravdin. - M.: Food industry, 1966. - 250 p.
8. Castell J.D. Report of the EIFAC, IUNS and ICES Working Group on the standardization of the methodology in fish nutrition research / J.D. Castell, K. Tiews. – Hamburg (Federal Republic of Germany, March 21 –23, 1979) EIFAC Tech. pap. 36. – 1979. – P. 1 –24.
9. Fulton T. Rate of growth of sea fish / T. Fulton // *Fish. Scotl. Sci. Invest. Report*. – 1902. – Vol. 20. – P. 226- 334.
10. Купинский С.В. Радужная форель – предварительные параметры стандартной модели массонакопления / С.В. Купинский, С.А. Баранов, В.Ф. Резников // *Индустриальное рыбководство в замкнутых системах : сб. науч. тр. ВНИИПРХ. – М. : ВНИИПРХ, 1986. – Вып. 46. – С. 109-115.*
10. Kupinsky S.V. *Rainbow trout – advanced parameters of the standard model of masonically* / S.V. Kupinsky, S.A. Baranov, V.F. Reznikov // *Industrial fish farming in closed systems : collection of scientific works. Tr. IFF. – М. : IFF, 1986. – Vol. 46. – Pp. 109-115.*
11. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 293 с.
11. Lakin G.F. *Biometrics* / G. F. Lakin. – M.: Higher school, 1990. – 293 p.
12. Mastoi A.M. Differences in Haematological Parameters in Normal, Infected and Immune-Primed Fingerlings of Red Tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*) / A.M. Mastoi, M. Sukumaran, A. Mastoi, A. Hussan, F. Shaharom, A. Chatterji // *Biological Forum*. – 2012. - Vol. 4. – P. 90-97.
13. Волков И.В. Экспериментальное исследование физиологии крови рыб при действии на них неблагоприятных факторов внешней среды: диссертация ... канд. биол. наук: 03.00.00. – Петрозаводск, 1971. – 232 с.
13. Volkov I.V. *Experimental study of the physiology of fish blood under the influence of unfavorable environmental factors on them: dissertation ... cand. biol. nauk: 03.00.00. - Petrozavodsk, 1971 - 232 p.*