



Природні механізми захисту корошових риб за ураження бактерійним аеромонозом і за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін»

Х. Я. Солопова

khrystyna.solopova@gmail.com

Інститут біології тварин НААН,
вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

Аеромоноз корошових риб є одним з найпоширеніших захворювань ставкових риб, яке завдає значної шкоди рибництву: загибель риби становить від 10 до 90 %. Для лікування хворих риб застосовують антибактерійні препарати: нітрофурани, антибіотики, кормові антибіотики, а також барвники. Незважаючи на значні переваги від використання антибіотиків, сьогодні вважають, що надмірне використання будь-яких антибіотичних речовин упродовж певного періоду часу може призвести до появи локальної популяції бактерій, стійкої до їх дії. Тому пробіотики мають низку переваг перед наявними вітамінними і антибіотичними препаратами: технологічні в застосуванні тваринам; малотоксичні; їх виробництво просте і екологічно чисте; ці препарати дешеві; економічна ефективність їх застосування висока. Наведено результати досліджень впливу синбіотичного препарату «Ентеронормін» у комплексі з Йодом і Селеном на показники неспецифічної резистентності організму корошових, уражених бактерійним аеромонозом. Дослідження проводили в умовах акваріумів у Львівській дослідній станції Інституту рибного господарства НААН. Контрольна група, до якої входили клінічно здорові риби, впродовж 7 днів через зонд отримувала 3 % крохмальну суспензію; перша дослідна група (Д1) — хворі на аеромоноз короши, яким аналогічно задавали лише 3 % крохмальну суспензію; другій дослідній групі (Д2), яку сформували з хворих на аеромоноз корошових, задавали препарат «Ентеронормін» з розрахунку 2 мг на 1 кг маси риби у складі 3 % крохмальної суспензії. Перед введенням корошам досліджуваній препарат активували 14–16 год. водою, збагаченою іонами біологічно активного йоду та селену у формі «Йодіс+Se» (ТУ У 15.7-30631018-011:2011). Дослідження показали, що захворювання корошових асоційованою бактеріальною формою аеромонозу спричиняло імуносупресивний вплив на показники природної резистентності організму. Зокрема, зафіксовано зниження фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів і лізоцимної активності сироватки крові на тлі збільшення вмісту циркулюючих імунних комплексів і фагоцитарного індексу. Констатовано реабілітаційну дію синбіотичного препарату «Ентеронормін» у комплексі з Йодом і Селеном на досліджувані показники клітинної і гуморальної ланок неспецифічної резистентності організму риб, уражених бактерійним аеромонозом.

Ключові слова: риби, короп, аеромоноз, синбіотики, «Ентеронормін», циркулюючі імунні комплекси, лізоцимна активність сироватки крові, фагоцитарна активність, фагоцитарний індекс, фагоцитарне число

Хвороби риб наносять значні економічні збитки світовій аквакультури. Вивчення закономірностей їх виникнення та поширення, розробка заходів профілактики є важливою проблемою сучасного рибництва, оскільки від її вирішення залежить ефективність відтворення та вирощування рибних об'єктів, збереження рибної продукції [15].

Аеромоноз корошових риб (краснуха, геморагічна септицемія, інфекційна черевна водянка) належить до одного з найпоширеніших захворювань

ставкових риб, яке завдає значної шкоди рибництву. Відхід риби внаслідок цього захворювання становить 10–90 %. Виникнення аеромонозу може бути спровоковане стрес-факторами: рибоводні маніпуляції, різке підвищення температури, органічне забруднення водного середовища, зниження резистентності організму риб [15]. Для лікування хворих риб застосовують антибактерійні препарати: нітрофурани, антибіотики, кормові антибіотики, а також барвники [11].

Речовини, що застосовуються в іхтіопатології, — переважно канцерогени і мутагени (формалін, хлопрофос, купрум сульфат) або з незначним терапевтичним індексом (фунгіциди, певні антибіотики), які вже давно не використовуються у більшості країн.

Для підвищення неспецифічної резистентності організму риб найчастіше застосовують імуномодулятори (задають рибі із кормом), які сприяють формуванню повноцінної імунної відповіді, у тому числі клітинної і гуморальної ланок. До них належать пробіотики, препарати комплексної дії, а також вітаміни С, Е та А, що підвищують резистентність організму [3, 9, 10, 15].

Пробіотики і пребіотики мають низку переваг перед наявними вітамінними і антибіотичними препаратами: технологічні в застосуванні тваринам; малотоксичні; їх виробництво просте й екологічно чисте; ці препарати дешеві; економічна ефективність їх застосування висока. Комбіновані препарати з пробіотиків і пребіотиків називаються синбіотиками [5].

Ентеронормін — синбіотичний препарат, що складається з комплексу бактерій — *Enterococcus* spp., *Bacillus subtilis* spp., *Lactobacillus* spp. та допоміжних речовин — хітозану, пептону ферментативного і меленого цукру (РП № ВВ-00427-02-12 від 13.04.2012). Він проявляє антагоністичну активність до широкого спектру патогенних бактерій і грибів. Формуючи нормальну мікрофлору, тим самим нормалізує секреторний імунітет, обмін речовин, стабілізує захисні сили організму, збільшує продуктивність тварин, птиці та бджіл, їх збереженість і продуктивність, зменшує витрати кормів на одиницю приросту живої ваги. Препарат не має кумулятивної здатності, не вимагає захисних засобів в умовах виробництва і застосування та не викликає забруднення довколишнього середовища [3].

Водночас на рибі такі дослідження фрагментарні. На сьогодні недостатньо вивченим є вплив пробіотичних препаратів на активність захисних систем організму риб. Насамперед з'ясування вимагає дослідження впливу синбіотичних препаратів на стан природних механізмів захисту у коропових риб за умов їх захворювання.

З огляду на це, значне наукове і практичне зацікавлення становить вивчення впливу препарату «Ентеронормін» на показники неспецифічної резистентності у коропів, хворих на аеромоноз.

Матеріали і методи

Експериментальну частину роботи виконували на дворічках коропа у Львівській дослідній станції Інституту рибного господарства НААН. Було сформовано 3 групи риб по 5 особин у кожній. Контрольна група, до якої входили клінічно здорові риби, отримувала лише 3 % крохмальну суспензію; перша дослідна група (Д1) — хворі на аеромоноз коропа, яким задавали лише 3 % крохмальну суспензію; друга дослідна група (Д2) — хворі на аеромоноз коропа, яким через зонд упродовж 7 днів у складі 3 % крохмальної суспензії задавали препарат «Ентеронормін» з розрахунку 2 мг на 1 кг маси риби. Перед введенням коропам досліджуваній препарат активували 14–16 год. водою, збагаченою іонами біологічно активного йоду

та селену у формі «Йодіс+Се» (ТУ У 15.7-30631018-011:2011). Аеромоноз діагностували за результатами бактеріологічного дослідження (проведено виділення та ідентифікацію збудника — *Aeromonas Hydrophila*) з урахуванням епізоотологічних даних, клінічних ознак і патологоанатомічних змін.

Матеріалом для дослідження слугувала кров, яку брали з серця риб за допомогою піпетки Пастера, попередньо застосовували наркоз з використанням ефірної олії гвоздики (*Eugenia caryophyllus*). У сироватці крові визначали лізоцимну активність (ЛАСК) до добової культури *Micrococcus Lysodeikticus*; вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) середньої молекулярної маси. У стабілізованій гепарином крові визначали показники фагоцитозу: фагоцитарну активність (ФА), фагоцитарне число (ФЧ) та фагоцитарний індекс (ФІ). З метою вивчення інтенсивності фагоцитозу, вираховували ФІ та ФЧ. Фагоцитарний індекс характеризує кількість захоплених мікроорганізмів одним активним фагоцитом. Фагоцитарне число виражає кількість фагоцитованих мікробних клітин на 100 підрахованих лейкоцитів [13]. Визначення ЛАСК і ФА проводили з врахуванням специфіки досліджень на гідробіонтах, використовуючи відповідні добові культури лабораторних штамів і температурний режим культивування [7].

Одержані цифрові дані опрацьовано статистично за допомогою загальноприйнятих методів варіаційної статистики з визначенням середніх величин (М), їх квадратичної похибки (m) та достовірності різниць, які встановлювали за *t*-критерієм Стьюдента.

Результати й обговорення

Циркулюючі імунні комплекси (ЦІК) характеризують рівень антитілоутворення в організмі, спрямований на елімінацію патогенних антигенів. З наведених у табл. 1 даних бачимо, що захворювання коропів на аеромоноз призводить до вірогідного зростання вмісту ЦІК на тлі зниження лізоцимної активності сироватки крові. Відомо, що утворення імунних комплексів в організмі є результатом специфічної взаємодії антигенів з антитілами. Циркулюючі імунні комплекси належать до високомолекулярних білкових сполук, структура та функція яких залежить від фізико-хімічних та біологічних властивостей антигену й антитіла.

Таблиця 1. Вміст циркулюючих імунних комплексів та лізоцимна активність крові досліджуваних коропів (M±m, n=4)
Table 1. Content of circulating immune complexes and serum lysozyme activity in blood of experimental carps (M±m, n=4)

Показники Parameters	Групи / Groups		
	Контроль Control	Д1 / E1	Д2 / E2
ЦІК, ммоль/л / CIC, mmol/L	42±1,8	58±2,4**	44,2±1,9
ЛАСК / SLA, %	30,5±2,4	27,25±1,8	27,2±2,2

Примітка. Тут і надалі різниці статистично вірогідні порівняно з контролем: * — P<0,05, ** — P<0,01, *** — P<0,001.

Note. In this and next tables the significance of differences with the control is: * — P<0.05, ** — P<0.01, *** — P<0.001.

Вміст ЦІК у сироватці крові короїв, хворих на асоційовану форму аеромонозу, збільшився в 1,3 рази ($P < 0,01$) порівняно з їх рівнем у риб контрольної групи. Застосування короїам другої дослідної групи 3 % крохмальної суспензії і препарату «Ентеронормін» спричиняло нормалізуючий вплив на вміст досліджуваних високомолекулярних білкових сполук. Про це вказує зменшення вмісту ЦІК у сироватці крові короїв другої дослідної групи та відсутність вірогідних різниць стосовно контрольної групи.

Лізоцим — універсальний ензим, який має неспецифічну бактерицидну дію [4]. Як низькомолекулярний білок, він має здатність піддавати лізису стінки бактерій, стимулює синтез антитіл і нейтралізує бактеріальні токсини, присутній у сироватці крові, слизі риб, тканинах внутрішніх органів [12]. Найбільша його концентрація виявлена у нирках риб, менша — у селезінці, слизі шкіри і кишечнику. У сироватці крові лізоциму дуже мало, його активність прямо пропорційно пов'язана зі станом імунної системи. У деяких видів риб цей ензим зовсім не знайдений [6].

При дослідженні гуморальної ланки неспецифічної резистентності організму короїв, зокрема лізоцимної активності сироватки крові, констатовано тенденцію до зниження цього показника природного захисту у хворих на аеромоноз риб і підвищення за дії синбіотичного препарату. Це, ймовірно, пов'язано з тим, що титр лізоциму значно залежить від багатьох факторів.

Імунологічна реактивність організму визначається за його здатністю розпізнавати та знешкоджувати генетично чужорідне. Клітинну ланку неспецифічної резистентності організму риб, як і ссавців, характеризує фагоцитарна активність крові. Фагоцитоз — це процес активного поглинання клітинами організму патогенних живих і вбитих мікроорганізмів, а також інших чужорідних часток з подальшим перетравленням їх за допомогою внутрішньоклітинних ензимів. Основними клітинами, які беруть участь у процесі фагоцитозу, є нейтрофільні гранулоцити [13].

Проведені дослідження показали, що захворювання короїв на асоційовану форму аеромонозу спричиняло зростання фагоцитарного індексу та фагоцитарного числа на тлі зниження фагоцитарної активності нейтрофілів крові (табл. 2). Необхідно зауважити, що фагоцитарний індекс, який характеризує кількість захоплених мікроорганізмів одним активним фаго-

цитом, у крові хворих короїв був на 21,1 % ($P < 0,05$) більший, ніж у клінічно здорової риби. Результати цих досліджень свідчать, що захворювання короїв на асоційовану форму аеромонозу спричиняє імуносупресивний вплив на фагоцитарну активність нейтрофілів крові, водночас потужність фагоцитозу зростає. У короїв другої дослідної групи, якій застосовували препарат «Ентеронормін», показники фагоцитозу гранулоцитів крові за значеннями були на рівні контрольної групи, тобто здорових риб.

Отже, результати проведених досліджень вказують на те, що у короїв, уражених асоційованою бактеріальною формою краснухи, зафіксовано збільшення вмісту циркулюючих імунних комплексів та зниження показників клітинної і гуморальної ланок неспецифічної резистентності, а саме фагоцитарної та лізоцимної активності крові. З цих даних можна зробити припущення, що у короїв, хворих на асоційовану бактеріальну форму краснухи, ця ланка захисту функціонально менш активна, ніж у здорових риб. Цей фактор може бути або одним з провідних у патогенезі їх захворювання краснухою або її наслідком.

Застосування хворим на аеромоноз короїам препарату «Ентеронормін» у комплексі з Йодом і Селеном спричиняло нормалізуючий вплив на досліджувані показники природного захисту. Ці зміни, ймовірно, зумовлені комплексною адитивною дією молочнокислих бактерій (*Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. та *Bacillus subtilis* spp.) і допоміжних компонентів хітозану та пептону, що є у досліджуваному препараті, а також Селену та Йоду. Разом з цим, препарат проявляє антагоністичну активність до широкого спектру патогенних бактерій і грибів. Формуючи нормальну мікрофлору, «Ентеронормін» цим стабілізує захисні сили організму короїв.

Висновки

За захворювання короїв на асоційовану бактеріальну форму краснухи спричиняє імуносупресивний вплив на показники природної резистентності організму. Зокрема, зафіксовано зниження фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів і лізоцимної активності сироватки крові на тлі збільшення вмісту циркулюючих імунних комплексів і фагоцитарного індексу ($P < 0,05-0,01$).

Констатовано реабілітаційну дію синбіотичного препарату «Ентеронормін» у комплексі з Йодом і Селеном на показники клітинної і гуморальної ланок неспецифічної резистентності організму риб, хворих на асоційовану бактеріальну форму краснухи.

Перспективи подальших досліджень

Актуальним є з'ясування впливу синбіотика «Ентеронормін» на стан системи антиоксидантного захисту короїв. Також доцільним є дослідження інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів та рівня окиснювального пошкодження білків у короїв за ураження аеромонозом і за лікування вказаним препаратом.

Таблиця 2. Показники неспецифічної резистентності (фагоцитарна активність, фагоцитарний індекс і фагоцитарне число) у крові досліджуваних короїв ($M \pm m$, $n=4$)

Table 2. Indicators of nonspecific resistance (phagocytic activity, neutrophil phagocytic index and phagocytic neutrophil count) in the blood of the experimental fish ($M \pm m$, $n=4$)

Показники Parameters	Групи / Groups		
	Контроль Control	Д1 / E1	Д2 / E2
ФА / PA, %	40,5±3,3	38,0±1,05	39,5±1,1
ФІ, од. / NPI, units	10,4±0,4	12,6±0,6*	11,2±0,4
ФЧ, од. / PNC, units	4,2±0,1	4,8±0,2	4,4±0,08

1. Davydov ON, Abramov AV, Kurovskaja LJ. *Biological preparations and chemicals in aquaculture*. Kyiv, Logos. 2009: 21–39. (in Russian)
2. Gryga NP, Bohdan VP. Exedieny and necessity of using of probiotic for animals. *Scientific and Technical Bulletin of State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives*, 2017; 18(1): 310–313. Available at: http://www.scivp.lviv.ua/images/files/Naukovo_tekhnichny_byuleten/2017_18_1/53.pdf (in Ukrainian)
3. Hai NV. The use of probiotics in aquaculture. *Journal of applied microbiology*. 2015; 119(4): 917–935. DOI: 10.1111/jam.12886.
4. Jakobisjak M. Immunology. Vinnytsya, Nova Knyga, 2004: 672 p. (in Ukrainian)
5. Kotsiumbas IY, Gunchak VM, Stetsko TI. The problem of using antimicrobials to promote growth of productive animals and alternatives their using. *Scientific and Technical Bulletin of State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives*, 2013; 14(3–4): 381–389. Available at: http://www.scivp.lviv.ua/images/files/Naukovo_tekhnichny_byuleten/NTB_2013_14_3_4/71.pdf (in Ukrainian)
6. Lie Ø, Evensen Ø, Sørensen A, Frøysadal E. Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*. 1989; 6: 1–5. DOI: 10.3354/dao006001.
7. Mikryakov VR. *Fish immune system response to water contamination by toxicants and acidification of the environment*. Moscow, Nauka. 2001: 126 p. (in Russian)
8. Official Journal of the European Union L276/33, 2010. Directive 2010/63/EU of The European Parliament and of The Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 86/609/EC. 20.10.2010.
9. Pandiyan P, Balaraman D, Thirunavukkarasu R, George EGJ, Subaramaniyan K, Manikkam S, Sadayappan B. Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today*. 2013; 5(1): 55–59. DOI: 10.1016/j.dit.2013.03.003.
10. Pérez-Sánchez T, Ruiz-Zarzuola I, de Blas I, Balcázar JL. Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Reviews in Aquaculture*. 2014; 6(3): 133–146. DOI: 10.1111/raq.12033.
11. Roberts RJ. *Fish Pathology*. 4th ed. Wiley-Blackwell. 2012: 590 p. DOI: 10.1002/9781118222942.
12. Saurabh S., Sahoo PK. Lysozyme: an important defense molecule of fish innate immune system. *Aquaculture research*. 2008; 39(3): 223–239. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x.
13. Vishchur OI, Kychun IV, Leshovska NM, Mamchuk NA, Yamroz VY, Matlakh IY, Rokita IM. Natural resistance of some fish species. Scientific and technical bulletin of Institute of animal biology and State scientific research control institute of veterinary medical products and fodder additives. 2008; 9(3): 343–347. (in Ukrainian)
14. Vlizlo VV, Fedoruk RS, Ratysh IB. *Laboratory Methods of Investigation in Biology, Stockbreeding and Veterinary Medicine: a reference book*. Lviv, 2012: 764 p. (in Ukrainian)
15. Vovk NI, Bozhik VJ. *Ichthyopathology*. Kyiv, Agrama osvita. 2014: 308 p. (in Ukrainian)

Natural defense mechanisms in carp infected by bacterial aeromonosis and after treatment with the synbiotic drug "Enteronormin"

Kh. Ya. Solopova

khystyna.solopova@gmail.com

Institute of Animal Biology NAAS,
38 V. Stus str., Lviv, 79034, Ukraine

Aeromonosis of carp fish is one of the most common diseases of pond fish, which causes significant loss for fisheries: fish mortality is from 10 to 90 %. For fish treatment antibacterial drugs such as nitrofurans, antibiotics, feed antibiotics, as well as dyes are used. Despite the significant benefits of using antibiotics, it is now believed that overuse of any antibiotic substance over a period of time can lead to a local population of bacteria resistant to them. Therefore, probiotics have several advantages over existing vitamin and antibiotic drugs: they are technological in animal use; low toxic; cheap; simple and environmentally friendly production; high economic efficiency of application. Here are the results of studies of the influence of the synbiotic drug "Enteronormin" with iodine and selenium on the indices of nonspecific resistance to the organism of carp affected by bacterial aeromonosis. The research was conducted under the conditions of aquariums at the Lviv Research Station of the Institute of Fisheries of NAAS. The control group, which consisted of clinically healthy fish, received only 3 % starch suspension, the 1st experimental group (E1) — aeromonosis affected carps who were given only 3 % starch suspension, the 2nd experimental group (E2), which consisted of carps affected aeromonosis, through the probe within 7 days was administered the drug "Enteronormin" at the rate of 2 mg per 1 kg of fish weight in the composition of 3 % starch suspension. Before feeding for the carp drug was activated for 14–16 hours water enriched with iodine and Selenium ions in the Iodis + Se form (TU U 15.7-30631018-011:2011). Studies have shown that a disease associated with the bacterial form of aeromonosis has an immunosuppressive effect on the body's natural resistance. In particular, there was a decrease in the phagocytic activity of neutrophilic granulocytes and lysozyme activity of the blood serum against the background of an increase in the content of circulating immune complexes and phagocytic index. The rehabilitative effect of the enteronormin synbiotic drug on the investigated indices of cellular and humoral setions of nonspecific resistance of fish organisms affected by bacterial aeromonosis was ascertained.

Key words: fish, carp, aeromonosis, synbiotics, "Enteronormin", circulating immune complex, lysocimic activity, phagocytal activity, neutrophil phagocytic index, phagocytic neutrophil count