

УДК: 597.4:612.017.1:615.331

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2022.1.80-89

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКА СУБТИЛИС-С НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ И ИММУННЫЙ СТАТУС РЫБ СЕМЕЙСТВА ЦИХЛОВЫЕ

Пронина Г.И., Саная О.В., Черкалин А.И.

РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Российская Федерация

При интенсивном разведении рыб усиливается воздействие стресс-факторов, провоцирующих снижение общей резистентности. Применение иммуномодуляторов способствуют усилению иммунной устойчивости организма. Цихловые представляют ценность как объекты аквакультуры: тилапия – неприхотливая в выращивании товарная рыба с высокими потребительскими качествами; дискус – популярный объект в мировой аквариумистике. Цель работы – изучение влияния пробиотика субтилис-С, содержащего живые природные штаммы *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, на физиологическое состояние и клеточный иммунитет у дискусов и тилапий. В лейкограмме дискусов, получавших пробиотик, отмечено значительное увеличение доли моноцитов, что свидетельствует об усилении неспецифической клеточной защиты (фагоцитоза). У тилапий опытной группы в крови выявлено увеличение процентной доли лимфоцитов и появление эозинофилов и базофилов. Применение добавки пробиотика увеличивало у дискусов и тилапий содержание катионного лизосомального белка в нейтрофилах крови, что свидетельствует об увеличении потенциальной фагоцитарной активности, повышающей способность организма противостоять инфекции и инвазии. Пробиотик повышал выживаемость икры и личинок у дискусов и оплодотворяемость икры у тилапий. Заключение, что применение пробиотика способствует у рыб повышению резистентности к заболеваниям и показателей воспроизводства.

Ключевые слова: пробиотики, иммунный статус, дискус, тилапия, лактоферрин, гематология

Проблемы биологии продуктивных животных, 2022, 1: 80-89

Введение

В условиях аквакультуры рыбы подвергаются воздействию стресс-факторов, связанных с интенсивным разведением: изменение температурного режима, гидрохимических параметров, увеличение плотности посадки, кормление концентрированными кормами, в которых преобладают ингредиенты наземного происхождения (Silveira-Coffigny et al., 2004). Водная среда является хорошим субстратом для развития микроорганизмов, в т.ч. патогенных; в результате этого происходит снижение иммунитета культивируемых объектов (Martin, Krol, 2017). Поэтому повышение общей резистентности у рыб в аквакультуре является актуальной задачей. Одним из путей усиления иммунной устойчивости организма является применение иммуномодуляторов.

Пробиотики являются эффективными и безопасными иммуномодуляторами, которые стимулируют выделение хемокинов эпителиальными клетками, привлекающих клетки врождённого иммунитета к эпителию и слизистой оболочке кишечника (Бондаренко, 2005; Забодалова, 2006). Благодаря выработке хемокинов и цитокинов происходит регуляция врождённого и приобретённого иммунного ответа (Shi et al., 2007; Харченко и др., 2015).

Наиболее популярными являются бактерии рода *Bacillus* в связи с их способностью к ферментативной активности и продуцированию значительного количества аминокислот, в том числе и незаменимых: треонин, глутаминовую кислоту, аланин, валин, тирозин, гистидин, орнитин (Смирнов и др., 1988). Доказано, что уже на третьи сутки после введения спорообразующего пробиотика значительно снижается количество патогенной микрофлоры: *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, а в последующие дни происходит полная элиминация их из организма (Осипова и др., 2005). При попадании бактерий рода *Bacillus* в пищеварительный канал нормализуется

соотношение белковых фракций крови, вероятно, за счет активации синтеза специфических иммуноглобулинов (Сорокулова, 1996; Zhang et al., 2010). Доказана активация индукции эндогенного интерферона при парентеральном введении культур бактерий рода *Bacillus*, а последние исследования выявляют подобный эффект и после перорального их введения (Скрыпник, Маслова, 2009).

Цихловые (дискусы, тилапия) являются ценными культивируемыми видами: тилапию используют как быстрорастущую, неприхотливую в выращивании товарную рыбу с высокими потребительскими качествами; дискусы – популярный объект аквариумной аквакультуры. Кроме того, эти рыбы можно рассматривать как модельные объекты, демонстрирующие заботу о потомстве, позволяющие изучать физиологические механизмы размножения, выкармливания потомства и передачи ему иммунных свойств, а также для понимания эволюционных закономерностей развития колострального иммунитета (Привезенцев, 2011; Iq, Shu-Chien, 2011; Wen et al., 2018).

Исследования иммунных реакций у неклассических биомоделей (в т.ч. рыб) с успехом используются для открытия ранее неизвестных молекул и биохимических путей, участвующих в системах иммунитета у млекопитающих (Sunyer, 2013). Использование сравнительных подходов позволяет получить информацию о том, как врожденный и адаптивный иммунитет совместно влияют на постоянно развивающиеся отношения между человеком, комменсальными организмами и микробными патогенами (Litman, Cooper, 2007).

Цель данной работы – изучение влияния пробиотика Субтилис-С, содержащего живые природные штаммы микроорганизмов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, на физиологическое состояние и клеточный иммунитет у дискусов (*Symphysodon haraldi*) и тилапии (*Oreochromis niloticus*).

Материал и методы

Объектом исследования были половозрелые самцы и самки дискусов (*Symphysodon haraldi*) и тилапии (*Oreochromis niloticus*). В опыте участвовало 18 пар (самцы и самки) дискусов (9 пар в контроле и 9 пар в опыте) и 8 пар тилапий (4 пары в контроле и 4 в опыте). Взрослые дискусы содержались в 400 л. аквариумах с принудительной аэрацией и водоочисткой. Родительские пары дискусов содержались в 100-л. аквариумах; рыбы нерестились и выкармливали личинку до перехода на самостоятельное питание. Условия среды в аквариумах соответствовали нормам. Температура воды – $30 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 6,0, фотопериод – по 12 ч. света и темноты, жёсткость 1-2 гН.

Кормом для дискусов служили личинки хирономид (*Chironomus plumosus*) 2,5% от массы тела. Кормление тилапий осуществлялось комбикормом «Акварекс» 0,5% от массы тела. Рыбам опытной группы к корму добавлялся пробиотик «Субтилис-С» из расчёта 1 г/кг корма. Контрольные группы рыб (дискусов и тилапий) получали корм без пробиотика.

Длительность эксперимента с дискусами и тилапиями составляла 2 мес. В начале эксперимента самки тилапии находились отдельно от самцов. Самки тилапии по 8 голов на аквариум содержались в 600 л. аквариумах. Самцы находились в отдельных аквариумах индивидуально. Самцы и самки опытных групп получали пробиотик в качестве кормовой добавки. Через месяц от начала эксперимента самцы были подсажены к самкам (по одному самцу в каждый аквариум). После вынашивания личинку отбирали у самок и высаживали в отдельные емкости.

Температура воды в аквариумах поддерживалась на уровне $28 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 8,3, фотопериод 14 ч. света и 10 ч. темноты, жёсткость 12 гН. По окончании опыта проводили исследования крови рыб, эпидермального секрета кормящих дискусов и ротовой слизи тилапий, вынашивающих личинку. Кровь для анализа отбиралась у рыб прижизненно из хвостовой вены.

Мазки крови (по 2 шт. от каждой рыбы: один для лейкограммы, второй для цитохимической реакции определения катионного белка) изготавливали сразу после отбора крови. Эпидермальный секрет у кормящих самцов и самок дискусов получали *in vivo* спонжем, затем выдавливали в шприц (Chong et al., 2006). Ротовую слизь тилапии получали также с помощью спонжа.

Физиолого-иммунологическая оценка рыб проводилась по гематологическим и цитохимическим показателям. Гематологические показатели лабильны и подвержены изменениям,

в т.ч. сезонным. Соотношение иммунокомпетентных клеток (лейкоцитарная формула) отражает физиологическое состояние и иммунный статус рыб. Лейкоцитарная формула определялась методом дифференциального подсчёта в окрашенных по Паппенгейму мазках периферической крови. Уровень гемопоэза рыб определялся по доле незрелых форм эритроцитов и лейкоцитов.

Важным маркером иммунной устойчивости является цитохимический показатель кислород независимого фактора клеточного иммунитета. Неферментные катионные белки лизосом (дефенсины) обладают прямым киллерным действием на патогены (Pronina, 2017; Chowdhury, 2020). Фагоцитарная активность нейтрофилов рыб оценивалась с использованием лизосомально-катионного теста, адаптированного для гидробионтов, и цитохимического анализа с бромфеноловым синим (Пронина, 2014) Определялось содержание неферментного катионного белка в лизосомах нейтрофилов периферической крови. По степени фагоцитарной активности исследуемые клетки делились на 4 группы: 0 – гранулы катионного белка отсутствуют; 1 – единичные гранулы; 2 – гранулы занимают примерно 1/3 цитоплазмы; 3 – гранулы занимают 1/2 цитоплазмы и более

Средний цитохимический коэффициент (СЦК) рассчитывали по формуле:

$$\text{СЦК} = (0 \times N_0 + 1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3) / 100; \quad N_0 + N_1 + N_2 + N_3 = 100$$

где N_0, N_1, N_2, N_3 — количество нейтрофилов с активностью 0, 1, 2 и 3 балла соответственно.

Анализ биохимических показателей крови является наиболее ценным современным методом исследования, поскольку было показано, что их физиологические значения являются видоспецифичными. Такие факторы, как: возраст, пол, условия окружающей среды и диета, могут существенно влиять на биохимические и гематологические показатели крови рыб (Patriche, 2011).

Для получения сыворотки кровь рыб набиралась шприцем в сухую пробирку. Пробирка с кровью оставалась в штативе на 1 ч. при комнатной температуре. После образования сгустка крови сыворотка пастеровской пипеткой отделялась от образовавшегося сгустка и помещалась в холодильник при температуре $+3^\circ\text{C}$ на 3-5 ч. для завершения образования сыворотки. Затем сыворотка отсасывалась шприцем с тонкой иглой или пипеткой и переносилась в пробирку Эппендорфа. Для биохимического анализа сыворотка замораживалась при температуре -28°C и транспортировалась в лабораторию в замороженном виде в термоконтейнерах. Биохимический анализ сыворотки крови проводили на приборе ChemWellAwarenesTechnology с использованием реактивов VITAL.

Лактоферрин в плазме крови рыб определяли методом иммуноферментного анализа. Кровь отбирали с гепарином на льду, в течение 20 мин. после сбора крови отделяли плазму центрифугированием при 1500 g и 4°C в течение 15 мин. Перенесённую в свежую полипропиленовую пробирку плазму центрифугировали, чтобы избежать контаминацию лейкоцитами (1500 g при 4°C в течение 15 мин.). Образцы хранились при температуре -70°C в полипропиленовых пробирках.

Результаты и обсуждение

Дискусы, получавшие и не получавшие пробиотик, не различались по массе тела. Субтилис-С не оказал влияния на показатели прироста и интенсивности роста рыб (табл. 1). По показателям эритропоэза у нерестящихся и кормящих дискусов существенных различий между группами не отмечено (табл. 1). Изменения в лейкоцитарной формуле под влиянием пробиотика у нерестящихся и кормящих дискусов показали, что иммуномодулятор активизирует неспецифическую и специфическую резистентность. Доля моноцитов (макрофагов крови) у опытных дискусов более чем в два раза выше контроля. В лейкограмме дискусов опытной группы, в отличие от контрольных рыб, отсутствуют эозинофилы, что является физиологической нормой. Под действием пробиотика в крови нерестящихся и кормящих дискусов выявлено увеличение доли моноцитов.

Таблица 1. *Размерно-весовые, гематологические и цитохимические показатели дискусов в эксперименте (M±m, n =12⁺)*

Показатели	Контроль	Опыт
Размерно-весовые		
Масса тела, г	89,7±2,2	90,5±1,7
Длина тела, см	11,3±0,3	11,6±0,3
Эритропоз, %		
Гемоцитобласты, эритробласты	0,5±0,3	0,5±0,3
Нормобласты	7,1±0,9	8,8±1,2
Базофильные эритроциты	13,5±1,4	17,0±1,6
Зрелые эритроциты	78,9±2,3	73,7±4,2
Лейкоцитарная формула, %		
Миелобласты	0,3±0,3	0,3±0,2
Промиелоциты	1,0±0,7	0,7±0,3
Миелоциты	-	1,2±0,5
Метамиелоциты	0,7±0,5	0,7±0,5
Палочкоядерные нейтрофилы	2,9±0,8	4,8±0,9
Сегментоядерные	1,3±0,7	0,7±0,3
Эозинофилы	0,7±0,3	-
Базофилы	-	-
Моноциты	3,8±0,7	12,8±1,2*
Лимфоциты	89,3±2,3	78,8±1,4*
Лизосомально-катионный тест		
СЦК, ед.	1,18±0,03	1,43±0,07*

Примечание: *6 пар (самцы и самки). Здесь и далее в таблицах: *P<0,05 по *t* - критерию при сравнении с контролем.

Это согласуется с литературными данными (Dowidar et al., 2018; Шленкина и др., 2018). Показано, что пробиотики в кишечнике активизируются и выделяют продукты метаболизма, которые модулируют активность иммунокомпетентных клеток, принадлежащих к неспецифическому барьеру: моноциты, макрофаги и нейтрофилы, а также слизеобразующие (бокаловидные) клетки. В результате стимуляции эти клетки выделяют антимикробные пептиды и синтезируют дефенсины (Rook et al., 2005; Аверина и др., 2015). Выявлено, что пробиотики влияют на активность макрофагов рыб, увеличивая миграцию к местному повреждению и увеличивая их способность к фагоцитозу (Dias et al., 2020).

Результаты лизосомально-катионного теста показали, что кормление пробиотиком увеличило содержание цитотоксичного катионного белка в лизосомах нейтрофилов, на 0,25 ед (на 21%) что свидетельствует об усилении неспецифического клеточного иммунитета. Вероятно, данный факт связан со стимуляцией пробиотиком выработки дефенсинов (Бондаренко, 2005).

Применение пробиотика у дискусов снижает стрессовую реакцию и уменьшает процент пар дискусов, уничтожающих кладки (табл. 2). Выход икры у опытной группы дискусов был выше, чем в контроле на 10%; снятого малька – на 27% (P<0.05). Скармливание пробиотика родителям не оказало влияния на выживаемость потомства на стадии предличинки, так как предличинка питается за счёт желточного мешка. Увеличению выживаемости личинки и малька, по всей вероятности, способствуют свойства эпидермального секрета родителей, стимулирующие выработку иммунитета у выкармливаемого потомства.

За время эксперимента у тилипии произошло оплодотворение икры у 75% самок в опытной группе и 50% в контроле. По массе тела существенных различий в опыте и контроле у самок тилипий не отмечено (табл. 3). В работах по изучению действия пробиотиков на рост и развитие нильской тилипии описывались схожие результаты (Marzouk et al., 2015; Dowidar et al., 2018).

Таблица 2. Показатели жизнестойкости потомства дискусов
($M \pm m$, $n=18^+$)

Показатели	Контроль	Опыт
Количество уничтоженных кладок, шт	30	14
Количество уничтоженных кладок, приходящихся на одну пару	3,3	1,6
Гибель пометов, шт	7	8
Выращено и высажено пометов, шт.	10	22
Количество выращенных личинок с одного помета, шт	52,3 \pm 2,9	65,1 \pm 3,4*
Выживаемость икры, %	80,1 \pm 2,9	89,2 \pm 2,4*
Выход предличинки, %	61,8 \pm 7,2	51,4 \pm 6,8
Выход малька, %	40,3 \pm 3,3	51,0 \pm 2,3*

Примечание: +9 пар (самцы и самки).

По интенсивности эритропоза опытные и контрольные рыбы существенно не различались, что согласуется с данными, полученными другими исследователями, которые также не отмечали изменений в эритрограмме нильской тилапии при использовании пробиотика (Dowidar et al., 2018).

Таблица 3. Размерно-весовые и гематологические показатели самок тилапий ($M \pm m$, $n=8^+$)

Показатели	Контроль	Опыт
Размерно-весовые		
Масса тела, г	883 \pm 41	879 \pm 70
Длина тела TL, см	30,6 \pm 0,5	30,5 \pm 0,9
Эритропоз, %		
Гемоцитобласты, эритробласты	0,4 \pm 0,5	0,8+0,3
Нормобласты	5,5 \pm 3,5	1,8+0,4
Базофильные эритроциты	14,5 \pm 7,8	2,5+0,4
Зрелые эритроциты	80 \pm 11	95+1
Лейкоцитарная формула, %		
Миелобласты	-	0,3+0,2
Промиелоциты	-	-
Миелоциты	10,0 \pm 4,5	2,2+0,6
Метамиелоциты	8,0 \pm 3,2	2,3+0,8
Палочкоядерные нейтрофилы	9,0 \pm 0,1	0,9+0,6*
Сегментоядерные	2,0 \pm 1,4	0,5+0,3
Эозинофилы	-	0,7+0,4
Базофилы	-	0,3+0,2
Моноциты	2,0 \pm 0,5	1,0+0,5
Лимфоциты	69,0 \pm 7,2	91,8+1,5*
Лизосомально-катионный тест		
СЦК, ед.	0,97 \pm 0,04	1,45 \pm 0,05*

Примечание: +4 пары (самцы и самки)

Показатели лейкоцитарной формулы рыб в обеих группах не выходили за пределы референтных значений для рыб. В лейкограмме у тилапий, получавших пробиотик, возросла доля лимфоцитов за счёт снижения незрелых форм миелоидного ряда; для палочкоядерных нейтрофилов различия статистически существенны, что, вероятно, свидетельствует об активации специфического звена иммунной защиты. Ряд авторов также отмечают увеличение доли лимфоцитов в лейкограмме рыб (клариевого сома – *Clarias gariepinus*) при использовании пробиотика Споротермин, содержащего штаммы *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* (Шленкина и др., 2018).

В отличие от контроля, в крови у опытных тилапий присутствует небольшой процент эозинофилов и базофилов, т.е. происходит усиление резистентности за счёт активации неспецифического звена клеточного иммунитета. Аналогичная тенденция в отношении базофилов отмечена у дискусов под влиянием пробиотика. Данные изменения повышают способность организма противостоять инфекции и инвазии.

Относительно клеточного иммунитета под влиянием пробиотика у тилапий отмечаются изменения, аналогичные дискусам. В результате применения пробиотика увеличивается количество лизосомального катионного белка в нейтрофилах крови. Величина СЦК у тилапий опытной группы была на 0,48 ед. (на 49%) выше, чем в контроле ($P < 0,05$).

В крови и эпидермальном секрете у дискусов, в крови и ротовой слизи у тилапий впервые обнаружен лактоферрин. Выявлено, что пробиотик вызывает увеличение фермента в эпидермальном секрете кормящих дискусов за счёт снижения его в крови (табл. 4).

Аналогичная тенденция отмечена и у тилапий, вынашивающих личинку. Пробиотик вызвал увеличение содержания лактоферрина в ротовой слизи тилапий и снижение фермента в крови. Увеличение уровня лактоферрина в кожном секрете кормящих пар дискусов, вероятно, усиливает иммунитет вскармливаемого потомства, что проявляется в повышении его выживаемости на личиночной стадии.

Таблица 4. Содержание лактоферрина в крови и в эпидермальном секрете/ротовой слизи, нг/мл ($M \pm m$)

Показатели	Дискусы		Тилапии	
	Контроль, n=12	Опыт, n=12	Контроль, n=8	Опыт, n=8
Содержание лактоферрина в крови, нг/мл	166±26	91±5*	98±15	162±53*
Cv, %	32,4	10,5	30,1	46,4
Содержание лактоферрина в эпидермальном секрете/ротовой слизи, нг/мл	71±14	113±9*	70±9	107±11*
Cv %	26,9	21,4	31,2	14,5

Примечание: Cv – коэффициент варибельности.

Известно, что лактоферрин продуцируется клетками миелоидного ряда в костном мозге и затем локализуется во вторичных гранулах зернистых нейтрофилов, где вместе с лизоцимом и щелочной фосфатазой входит в состав компонентов бактерицидной системы. Обнаружено, что объём лактоферрин-положительных секреторных гранул в незрелых клетках миелоидного ряда значительно больше, чем в зрелых полиморфно-ядерных лейкоцитах. Выявлено, что лактоферрин содержится в комплексе Гольджи и части выростов эндоплазматического ретикулума незрелых нейтрофилов на стадии ранних метамиелоцитов и миелоцитов (Baveye et al., 2000; Kuroda et al., 2015).

Заключение

Скармливание пробиотика субтилис-С не влияет на абсолютную и относительную скорость роста половозрелых дискусов и тилапий. Применение пробиотика способствует активации фагоцитоза: увеличивается доля моноцитов в лейкограмме, однако субтилис-С не оказал влияния на количество моноцитов у тилапий, так как у них значительно возросла доля лимфоцитов, т.е. произошла активация специфического звена клеточного иммунитета. Пробиотик вызывает увеличение лактоферрина в эпидермальном секрете кормящих дискусов за счёт снижения его в крови.

Субтилис-С повышает содержание катионного лизосомального белка в нейтрофилах крови у рыб семейства Цихловые, что свидетельствует о высокой потенциальной фагоцитарной активности. В крови у цихлид при применении пробиотика субтилис-С, присутствует небольшой

процент эозинофилов и базофилов. Эти изменения повышают способность организма противостоять инфекции и инвазии. При применении пробиотика отмечено увеличение выживаемости икры и личинки у дискусов, а у тилапий – оплодотворение икры.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 20-316-90028)

Список литературы

1. Аверина О.В., Ермоленко Е.И., Ратушный А.Ю., Тарасова Е.А., Борщев Ю.Ю., Леонтьева Г.Ф., Крамская Т.А., Котылева М.П., Даниленко В.Н., Суворов А.Н. Влияние пробиотиков на продукцию цитокинов в системах *in vitro* и *in vivo*. // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17. № 5. С. 443-454.
2. Осипова И.Г., Сорокулова И.Б., Васильева Е.А., Буданова Е.В. Доклинические испытания новых споровых пробиотиков. // Вестник РАМН. 2005. № 12. С. 36-40.
3. Привезенцев Ю.А. Тилапии (биология, методы разведения и выращивания). М.: РГАУ-МСХА, 2011. 120 с.
4. Саная О.В. Влияние пробиотика-иммуномодулятора «Субтилис-С» на физиологическое состояние дискусов *Symphysodon haraldi* по биохимическим показателям. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Новейшие генетические технологии для аквакультуры». Москва, 2020. М.: Изд. Перо, 2020. С. 346-349
5. Скрыпник И.Н., Маслова А.С. Современные спорообразующие пробиотики в клинической практике. // Сучасна гастроентерологія. 2009. № 3. С. 81-90.
6. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Вьюницкая В.А. О некоторых механизмах возникновения бессимптомной бактериемии. // Микробиологический журнал. 1988. Т. 50. № 6. С. 56-59.
7. Сорокулова И.Б. Перспективы применения бактерий рода *Bacillus* для конструирования новых биопрепаратов. // Антибиотики и химиотерапия. 1996. Т. 41, № 10. С. 13-15.
8. Харченко Н. В., Чердынцева Т. А., Нетрусов А.И. Новые подходы для выделения штаммов бифидобактерий, их молекулярная диагностика и оценка пробиотического потенциала. // Микробиология. 2015. Т. 84. № 3. С. 1-8.
9. Шленкина Т.М., Романова Е.М., Мухитова М.Э. Влияние пробиотиков на лейкограмму африканского клариевого сома в условиях индустриальной аквакультуры. // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2018. № 4 С. 222-228.
10. Vaveye S., Ellass E., Fernig D.G., Blanquart C., Mazurier J., Legrand D. Human lactoferrin interacts with soluble CD 14 and inhibits expression of endothelial adhesion molecules, E-selectin and ICAM-1, induced by the CD14-lipopopolysaccharide complex. // Infection and Immunity. 2000. Vol. 68. nr12. P. 6519-6525.
11. Buckley J. Parental care and the development of the parent offspring conflict in discus fish (*Symphysodon* spp.). School Biomed. Biol. Sci., 2011. 260 p.
12. Buckley J., Maunder R.J., Foey A., Pearce J., Val A.L., Sloman K.A. Biparental mucus feeding: a unique example of parental care in an Amazonian cichlid. // J. Exp. Biol. 2010. Vol. 213. P. 3787-3795.
13. Chong, K., Shu-Chien A.C., Jin L.T., Joshi S Proteomics profiling of epidermal mucus secretion of a cichlid (*Symphysodon aequifasciata*) demonstrating parental care behavior. // Proteomics. 2006. Vol. 6. nr7. P. 2251-2258.
14. Chowdhury G., Hossain Md.S., Dey T., Akhtar S., Jinia M.A., Das B., Islam Md. J., Iqbal M.M. Effects of dietary probiotics on the growth, blood chemistry and stress response of Pabda catfish (*Ompok pabda*) juveniles. // AACL Bioflux. 2020. Vol. 13. nr 3. P. 1595-1605.
15. Dias D. de C., Tachibana L., Iwashita M.K.P., Nakandakare I.B., Romagosa E., Seriani R., Ranzani-Paiva M.J.T. Probiotic supplementation causes hematological changes and improves non-specific immunity in *Brycon amazonicus*. // Acta Sci. Biol. Sci. 2020. Vol. 42. nr 1. P. 1-9.
16. Dowidar M., Azeem S., Khater A., Awad S., Metwally S. Improvement of growth performance, immunity and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by using dietary probiotics supplementation. // J. Anim. Sci. Vet. Med. 2018. Vol. 3. P. 35-46.
17. Grant K.R. Fish hematology and associated disorders. // Clin. Labor. Med. 2015. Vol. 35. nr 3. P. 681-701.
18. Hastuti S., Subandiyono S. Aminotransferase, hematological indices and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in various stocking densities in aquaponic systems. // AACL Bioflux. 2020. Vol. 13. nr 2. P. 813-824.
19. Iq K.C., Shu-Chien A.Ch. Proteomics of buccal cavity mucus in female tilapia fish (*Oreochromis* spp.): a comparison between parental and non-parental fish. // PLoS ONE. 2011. Vol. 6. nr 4. P. 1-7.

20. Irianto A., Austin B. Probiotics in aquaculture. // J. Fish Dis. 2001. Vol. 25. nr 11. P. 633-642.
21. Jeronimo G.T., Laffitte L.V., Speck G.M., Martins M.L. Seasonal influence on the hematological parameters in cultured *Nile tilapia* from southern. // Braz. J. Biol. 2011. Vol. 71. nr 35. P. 719-725.
22. Kuroda K., Okumura K., Isogai H., Isogai E. The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 and mimics are potential anticancer drugs. // Front. Oncol. 2015. Vol. 5. nr 1. P. 144-159.
23. Litman G.W., Cooper M.D. Why study the evolution of immunity? // Nat. Immunol. 2007. Vol. 8. P. 547-548.
24. Martin S.A.M., Krol E. Nutrigenomics and immune function in fish: new insights from omics technologies. // Devel. Compar. Immun. 2017. Vol. 75. P. 86-98.
25. Marzouk M.S., Moustafa M.M., Nermeen M.M. The influence of some probiotics on the growth performance and intestinal microbial flora of *O. niloticus*. // 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Cairo, 2008. P. 1059-1071.
26. Mattos D.C., Screnci-Ribeiro R., Cardoso L.D., Vidal Junior M.V. Description of the reproductive behavior of *Symphysodon aequifasciatus* (Cichlidae) in captivity. // Acta Amazonica. 2016. Vol. 46. nr4. P. 433-438.
27. Mesquita D.R., Porto J.I.R., Feldberg E. Chromosomal variability in the wild ornamental species of *Symphysodon* (Perciformes: Cichlidae) from Amazon. // Neotrop. Ichthyol. 2008. Vol. 6. nr 2. P. 181-190.
28. Olmos J., Paniagua-Michel J. *Bacillus subtilis* a potential probiotic bacterium to formulate functional feeds for aquaculture // Journal of Microbial and Biochemical Technology. 2014. Vol. 6(7). P. 361-365
29. Önal U., Çelik İ., Cirik Ş. Histological development of digestive tract in discus, *Symphysodon* spp. Larvae. // Aquacult. Intern. 2010. Vol. 18. P. 589-601.
30. Patriche T., Patriche N., Bocioc E., Coada M.T. Serum biochemical parameters of farmed carp (*Cyprinus carpio*). // AACL Bioflux. 2011. Vol. 4. nr 2. P. 137-140.
31. Pronina G.I. Physiological and immunological features of males and females of the immunologically resistant carp breed (*Cyprinus carpio* L.). // AACL Bioflux. 2017. Vol. 10. nr 2. P. 335-340.
32. Pronina G.I., Koryagina N.Yu., Revyakin A.O., Stepanova O., Kurishenko Zh.O., Petrova N.V. Use of hydrobionts as alternative biological models. // Neurosci. Behav. Physiol. 2019 Vol. 49. nr 5. P. 584-594.
33. Rook G., Blunet L. Microbes, immunoregulation, and the gut. // Gut. 2007. Vol. 54. P. 317-320.
34. Rossoni F., Amadio S., E. Ferreira, Zuanon J. Reproductive and population parameters of discus fish *Symphysodon aequifasciatus* Pellegrin, 1904 (Perciformes: Cichlidae) from Piagaçu-Purus sustainable development reserve (RDS-PP), lower Purus River, Amazonas, Brazil. // Neotrop. Ichthyol. 2010. Vol. 8. nr 2. P. 379-383.
35. Satoh S., Tanoue H., Mohri M. Costs and benefits of biparental mucus provisioning in discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*). // Ichthyol. Res. 2018. Vol. 65. P. 510-514.
36. Shi L., Qiu D., Zhao G., Corthesy B., Lees-Miller S., Reeves W., Kao P. Dynamic binding of Ku80, Ku70 and NF90 to the IL-2 promoter in vivo in activated T-cells. // Nucl. Acids Res. 2007. Vol. 35. P. 2302-2310.
37. Silveira-Coffigny R., Prieto-Trujillo A., Ascencio-Valle F. Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus* S. // Comp. Biochem. Physiol. 2004. Vol. 139. nr 4. P. 245-250
38. Sunyer J.O. Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. // Nature America. 2013. Vol. 14. nr 4. P. 320-326.
39. Wen B., Jin S.-R., Chen Z.-Z., Gao J.-Z. Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish. // Sci. Total Environ. 2018. Vol. 640-641. P. 1372-1381.
40. Zhang Y.A., Salinas I., Li J., Parra D., Bjork S., Xu Z., LaPatra S.E., Bartholomew J., Sunyer J.O. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. // Nat. Immunol. 2010. Vol. 11. nr 9. P. 827-835.

References (for publications in Russian)

1. Averina O.V., Ermolenko E.I., Ratushnyi A.Yu., Tarasova E.A., Borshchev Yu.Yu., Leont'eva G.F., Kramskaya T.A., Kotyleva M.P., Danilenko V.N., Suvorov A.N. [Effect of probiotics on cytokine production in in vitro and in vivo systems]. *Meditinskaya immunologiya - Medical Immunology*. 2015. 17(5): 443-454.
2. Kharchenko N.V., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. [New approaches for the isolation of bifidobacteria strains, their molecular diagnostics and assessment of probiotic potential]. *Mikrobiologiya - Microbiology*. 2015. 84(3): 1-8.
3. Osipova I.G., Sorokulova I.B., Vasil'eva E.A., Budanova E.V. [Preclinical trials of new spore probiotics]. *Vestnik RAMN - Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2005. 12: 36-40.
4. Privezentsev Yu.A. *Tilyapii (biologiya, metody razvedeniya i vyrashchivaniya)*. (Tilapia: biology, breeding and cultivation methods). Moscow: RGAU-MSHA Publ., 2011. 120 p.
5. Sanaya O.V. [Influence of the probiotic-immunomodulator "Subtilis-S" on the physiological state of *Symphysodon haraldi* discus by biochemical parameters]. In: *Noveishie geneticheskie tekhnologii dlya akvakul'tury* (The latest genetic technologies for aquaculture). Proc. scientific and practical conference with international participation. Moscow: Pero Publ., 2020. P. 346-349
6. Skrypnik I.N., Maslova A.S. [Modern spore-forming probiotics in clinical practice]. *Сучасна гастроентерологія - Contemporary gastroenterology*. 2009. 3: 81-90.
7. Smirnov V.V., Reznik S.R., Sorokulova I.B., V'yunitskaya V.A. [About some mechanisms of occurrence of asymptomatic bacteremia]. *Mikrobiologicheskii zhurnal - Microbiological journal*. 1988. 50(6): 56-59..
8. Sorokulova I.B. [Perspektivy primeneniya bakterii roda *Bacillus* dlya konstruirovaniya novykh biopreparatov. // *Antibiotiki i khimioterapiya - Antibiotics and chemotherapy*. 1996. 41(1): 13-15.
9. Shlenkina T.M., Romanova E.M., Mukhitova M.E. [Effect of probiotics on the leukogram of African catfish in industrial aquaculture]. *Vestnik Ul'yanovskoi gosudarstvennoi sel'skokhozyaistvennoi akademii - Bulletin of the Ulyanovsk State Agricultural Academy*. 2018. 4: 222-228.

UDC 597.4:612.017.1:615.331

**Effect of probiotics on the physiological state
and immune status in fish of the Cichlidae family**

Pronina G.I., Sanaya O.V., Cherkalin A.I.

*Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
Moscow, Russian Federation*

ABSTRACT. With intensive breeding of fish, the impact of stress factors increases, provoking a decrease in overall resistance. The use of probiotics enhances the body's immune resistance. Cichlids are valuable as objects of aquaculture: tilapia is an unpretentious commodity fish in cultivation with high consumer qualities. The discus is a popular object in the world aquarium hobby. The aim of the work is to study the effect of the probiotic subtilis-C, containing live natural strains of *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, on the physiological state and cellular immunity in discus and tilapia. In the leukogram of discus treated with probiotic, a significant increase in the proportion of monocytes was noted, which indicates an increase in nonspecific cellular protection (phagocytosis). In tilapia of the experimental group, an increase in the percentage of lymphocytes and the appearance of eosinophils and basophils were detected in the blood. The use of a probiotic supplement increased the content of cationic lysosomal protein in blood neutrophils in discus and tilapia, which indicates an increase in potential phagocytic activity, which increases the body's ability to resist infection and invasion. The probiotic increased the survival of eggs and larvae in discus, and the fertilization of eggs in tilapia. Concluded that the use of a probiotic contributes to an increase in fish resistance to diseases and reproduction indicators.

Keywords: fish, discus, tilapia, probiotics, immune status, lactoferrin, hematology

Problemy biologii productivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology. 2022. 1: 80-89

Поступило в редакцию: 10.11.2021 Получено после доработки: 20.12.2021

Сведения об авторах:

Пронина Галина Иозеповна, д.б.н. проф. 8(903)173-62-47. gidrobiont4@yandex.ru.

Саная Ольга Владимировна, м.н.с. 8(916)818-29-40. sanaya2020@list.ru.

Черкалин Алексей Игоревич, студ. 8(929)630-21-42. alexcherckalin@gmail.com.