

ПРИМЕНЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 (РОНКОЛЕЙКИНА®) ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МОЛОДИ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ

Нечаева Т.А.

Введение. Современная аквакультура предполагает значительный уровень интенсификации производства. В свою очередь, высокие плотности посадки рыбы, поддержание достаточно высоких температур воды при интенсивном кормлении и максимально возможной плотности посадки рыбы, неизбежное органическое загрязнение способствуют возникновению различных заболеваний. Молодь, выращиваемая в рыбоводных хозяйствах, особенно чувствительна как к инфекционным болезням, так и к болезням, связанным с условиями внешней среды.

При этом активное использование антибиотиков для подавления вспышек бактериозов, вызываемых условно-патогенной микрофлорой, не всегда оправдано, так как способствует появлению штаммов микроорганизмов, устойчивых к их воздействию.

Следовательно, возникает необходимость поиска новых методов борьбы с заболеваниями и путей улучшения физиологического состояния рыб в условиях индустриального рыбоводства. Одним из таких методов является иммунокоррекция, для реализации которой необходимы препараты, имеющие иммунокорректирующую способность. Таким препаратом является Ронколейкин® - рекомбинантный интерлейкин-2 (далее – ИЛ-2).

Ронколейкин® представляет собой полный структурный и функциональный аналог эндогенного ИЛ-2, обладающий тем же спектром функциональной активности. Он способен восполнять дефицит ИЛ-2 и воспроизводить его эффекты как одного из ключевых компонентов цитокиновой сети. Основная функция ИЛ-2 состоит в обеспечении клеточной составляющей адаптивного иммунитета.

Материалы и методы. Целью нашей работы являлось изучение эффективности применения Ронколейкина® на ранних стадиях выращивания радужной форели, то есть, для повышения выживаемости икры, личинок и улучшения физиологического состояния молоди форели. Исследования проводили на базе форелевых хозяйств Ленинградской области в 2009 году.

Организация экспериментальных работ

1. Икра радужной форели

Для проведения опыта была взята икра радужной форели. Инкубируемая икра была помещена в рамки инкубационных аппаратов лоткового типа. Объем пробы составлял от 200 до 400 г на каждую рамку. Количество икры в пробе в среднем от 2400 до 5000 шт. Инкубация икры происходила при температуре воды 5.0 – 7.0°C и длилась с 21.01.2009 по 16.03.2009 (1 тур), с 28.01.2009 по 23.03.2009 (2 тур), с 05.02.2009 по 06.04.2009 (3 тур), с 12.02.2009 по 26.04.2009 (4 тур).

1 тур. Для проведения опыта были взяты четыре рамки с икрой радужной форели. Рамка № 1 (контроль), рамки № 2, 3, 4 (опыт). Была проведена обработка икры (ванны) Ронколейкином® дважды. Дозировка препарата при обработке рамок № 2 и 3 составила 250 МЕ на 100 л, а при обработке рамки № 4 – 500 МЕ на 100 л. Экспозиция обработки составила 15 мин. Обработка икры проведена 10.02.2009 на 21-й день инкубации (до стадии «глазка») и 27.02.2009 на 38-й день инкубации (на стадии «глазка»).

2 тур. Для проведения опыта были взяты три рамки с икрой радужной форели. Рамка № 1 и 2 (опыт), рамка 3 (контроль). На стадии икры обработка Ронколейкином® не проведена.

3 тур. Для проведения опыта были взяты три рамки с икрой радужной форели. Рамка № 1 (опыт), рамки № 2 и 3 (контроль). Обработка Ронколейкином® проведена на стадии «глазка», однократно, в дозировке 250 МЕ на 100 л, с экспозицией 15 мин (26.03.2009).

4 тур. Для проведения опыта были взяты две рамки с икрой радужной форели. Рамка № 1 (опыт), рамка № 2 (контроль). Обработка Ронколейкином® проведена двукратно, до

стадии «глазка» (26.03.2009) и на стадии «глазка» (06.04.2009) в дозировке 500 МЕ на 100 л, с экспозицией 15 мин.

2. Личинки радужной форели

Для проведения опытов использованы личинки 2 – 4 туров.

2 тур. Обработка Ронколейкином® (ванны) проведена на 3-й день после вылупления (26.03.2009), в дозировке 250 МЕ на 100 л, с экспозицией 10 мин.

Вторая обработка проведена 06.04.2009, на стадии пигментации тела перед подъемом на плав (14.04.2009), в дозировке 250 МЕ на 100 л, с экспозицией 10 мин.

3 тур. Обработка Ронколейкином® (ванны) проведена на 5-й день после вылупления (06.04.2009), в дозировке 250 МЕ на 100 л, с экспозицией 10 мин.

Вторая обработка проведена при подъеме на плав (21.04.2009) в дозировке 250 МЕ на 100 л, с экспозицией 15 мин.

4 тур. Обработка Ронколейкином® (ванны) проведена на стадии пигментации тела (21.04.2009), в дозировке 500 МЕ на 100 л, с экспозицией 10 мин. Вторая обработка проведена в период перехода на активное питание, (06.05.2009) в дозировке 500 МЕ на 100 л, с экспозицией 15 мин.

3. Молодь радужной форели

Вели наблюдения за эпизоотическим и физиологическим состоянием молоди 2 – 4 туров. Сравнивали темп роста и навески в опытных и контрольных группах в мае – июне 2009 г.

Методы исследований.

Состояние икры и личинок определяли по их визуальному осмотру, по степени поражения грибковой инфекцией, по проценту уродств.

Ихтиопатологическое обследование молоди проводили по общепринятым методикам (Быховская-Павловская, 1985). При клиническом осмотре молоди оценивали состояние кожных покровов, жабр, характер слизиотделения. При патологоанатомическом осмотре оценивали состояние внутренних органов – печени, почек, селезенки, ЖКТ.

Результаты экспериментальных работ.

1. Икра

1 тур. 22.01.2009 на вторые сутки после оплодотворения проведен отбор неоплодотворенной икры. Икра, как в опыте, так и в контроле не имела грибковых поражений.

Таблица 1

№ рамки	Количество неоплодотворенной икры, шт.	Количество неоплодотворенной икры, %
1 (контроль)	48	1.9
2 (250 МЕ/100 л)	53	2.1
3 (250 МЕ/100 л)	62	2.4
4 (500 МЕ/100 л)	59	2.3

После прохождения икрой наиболее чувствительных стадий развития 09.02.2009 (20-й день инкубации) был проведен отбор неоплодотворенной икры и определен процент оплодотворения (данные приведены в таблице 2). Поражения грибковой инфекцией в этот период не наблюдалось.

Таблица 2

№ рамки	Количество неоплодотворенной икры		Процент оплодотворения, %
	шт.	%	
1 (контроль)	51	2.0	84
2 (250 МЕ/100 л)	51	2.4	90
3 (250 МЕ/100 л)	56	2.2	96
4 (500 МЕ/100 л)	63	2.5	92

После этого была проведена первая обработка икры Ронколейкином® (10.02.2009).

24.02.2009 икра достигла стадии «глазка», 25.02.2009 на 36-й день инкубации был проведен отбор икры, пораженной сапролегнией. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

№ рамки	Количество икры, пораженной сапролегнией	
	шт.	%
1 (контроль)	4	0.16
2 (250 МЕ/100 л)	7	0.28
3 (250 МЕ/100 л)	8	0.32
4 (500 МЕ/100 л)	7	0.28

На данном этапе достоверной разницы между опытом и контролем не выявлено. Длина гифов сапролегнии в опыте и в контроле одинакова – не превышает 1 мм.

27.02.2009 на 38-й день инкубации проведена вторая обработка Ронколейкином®.

03.03.2009 на 43-й день инкубации проведен отбор неоплодотворенной и пораженной сапролегнией икры. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4

№ рамки	Количество неоплодотворенной икры		Количество пораженной сапролегнией икры	
	шт.	%	шт.	%
1 (контроль)	60	2.4	8	0.32
2 (250 МЕ/100 л)	52	2.0	7	0.28
3 (250 МЕ/100 л)	50	2.0	5	0.20
4 (500 МЕ/100 л)	50	2.0	6	0.20

В контроле длина гифов сапролегнии достигала 7 – 8 мм, среди пораженных икринок две были на стадии «глазка». В опыте поражены были только неоплодотворенные икринки, а длина гифов не превышала 1 мм.

08.03.2009 (47-й день инкубации). Отмечено первое появление сапролегнии в контроле – 3 пораженные икринки. Отбор пораженной икры не производили.

12.03.2009 (51-й день инкубации). Дальнейшее наблюдение за развитием сапролегнии на икре. В контроле обнаружено 5 пораженных икринок, на рамках № 1 и 2 (250 МЕ/100 л) – по 3 икринки, на рамке № 4 (500 МЕ/100 л) – 2 икринки. Отбор пораженной икры не производили.

14.03.2009 (53-й день инкубации) – идет вылупление личинок.

16.03.2009 (53-й день инкубации). Вылупление закончено. Произведен отбор неоплодотворенной икры и пораженных сапролегнией икры и личинок. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5

№ рамки	Количество неоплодотворенной икры		Количество пораженных сапролегнией икры и личинок	
	шт.	%	шт.	%
1 (контроль)	35	1.4	24	0.96
2 (250 МЕ/100 л)	24	0.9	11	0.44
3 (250 МЕ/100 л)	24	0.7	8	0.32
4 (500 МЕ/100 л)	21	0.8	7	0.28

В контроле длина гифов сапролегнии достигала 1 – 15 мм, среди пораженных икринок 7 шт. - на стадии «глазка». В опыте на рамках № 1 и 2 (250 МЕ/100 л) и на рамке № 4 (500

МЕ/100 л) обнаружено по 3 икринки на стадии «глазка». Длина гифов сапролегнии на рамках № 1 и 2 достигала 0.5 – 8 мм, на рамке № 4 - от 0.5 до 5 мм.

С 19 по 24.03.2009 наблюдали за состоянием вылупившихся личинок, проводили отбор погибших личинок. Общие данные по количеству пораженной сапролегнией икры, икры на стадии «глазка» и личинки приведены в таблице 6.

Таблица 6

№ рамки	Общее количество пораженной сапролегнией икры		Количество пораженных сапролегнией икры на стадии «глазка» и личинок	
	шт.	%	шт.	%
1 (контроль)	46	1.8	12	0.48
2 (250 МЕ/100 л)	28	1.1	9	0.36
3 (250 МЕ/100 л)	28	1.1	8	0.32
4 (500 МЕ/100 л)	25	1.0	6	0.24

Поражение грибковой инфекцией икры и личинок в 1.3 – 2.0 раза выше, чем в опыте.

2 тур. На стадии икры обработка Ронколейкином® не проведена. Процент оплодотворения в опыте и контроле в пределах норматива 80 – 85%.

3 тур. Как контрольные, так и опытная партии икры в этом туре отличались чрезвычайно низким процентом оплодотворения – 60 % в контроле, 50 % в опыте, что свидетельствует о неблагоприятном физиологическом состоянии производителей и возможно – о низком качестве потомства. В процессе инкубации поражение сапролегнией в опыте и в контроле не превышало 10 %. Однако при вылуплении в обеих контрольных группах была зафиксирована гибель 10 % личинок непосредственно при вылуплении, что, в данном случае, может быть связано с их низким физиологическим статусом.

4 тур. Процент оплодотворения в опыте и в контроле составил около 75 %. В процессе инкубации в опыте поражение икры сапролегнией не превышало 5 %, в то время как в контроле составило около 25 %. Процесс вылупления прошел нормально в опыте и в контроле.

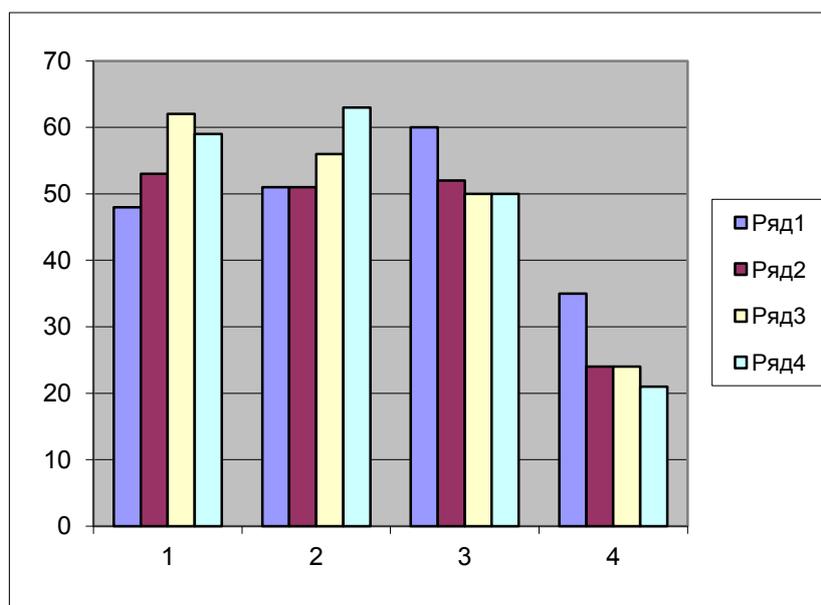


Рис.1. Количество неоплодотворенной икры

Примечание: синий цвет – контроль; коричневый, жёлтый, голубой – опыт.

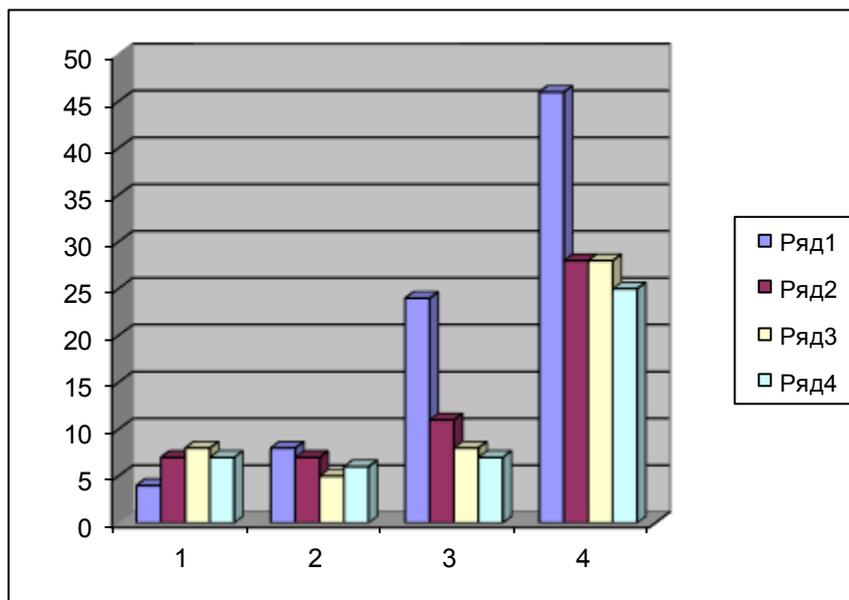


Рис.2. Общее количество пораженной сапролегнией икры

Примечание: синий цвет – контроль; коричневый, жёлтый, голубой – опыт

2. Личинки радужной форели

2 тур. 1 и 2 рамки – опыт, 3 рамка – контроль.

Данный тур изначально отличался наилучшим состоянием икры и молоди. В контроле и опыте за весь период выдерживания, перехода на активное питание не отмечено отклонений от рыбоводных нормативов.

3 тур. 1 рамка – опыт, 2 и 3 рамки – контроль

В подопытной группе в течение периода выдерживания, перехода на активное питание не отмечено отклонений от нормы. В контрольных группах вскоре после вылупления у 10 % (рамка 3) и 20 % (рамка 2) личинок отмечена водянка желточного мешка.

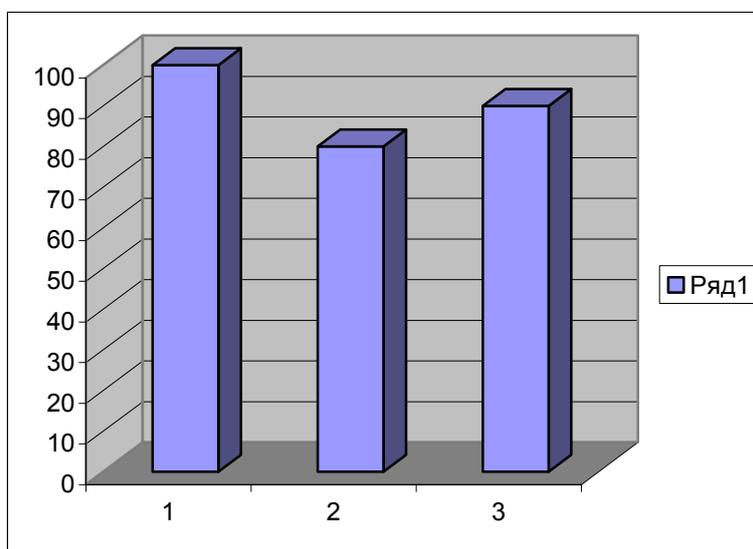


Рис.3. Выживаемость личинки

Примечание: 1 – опыт; 2 и 3 – контроль

Предполагается, что это заболевание возникает при совокупном влиянии неблагоприятных наследственных факторов и внешней среды. У самок, находящихся в неблагополучном состоянии или впервые нерестящихся икра низкого качества. Для личинок, полученных из такой икры характерна низкая выживаемость и частые случаи водянки желточного мешка. Появлению этого заболевания также способствуют механические

повреждения, резкие колебания температуры воды, нарушения кислородного режима. В данном случае проявление заболевания связано, по-видимому, с качеством производителей.

4 тур. 1 рамка – опыт, 2 – контроль.

В опытной группе в течение периода выдерживания, перехода на активное питание не отмечено отклонений от нормы. В контрольной группе после вылупления у 15 % личинок отмечена водянка желточного мешка.

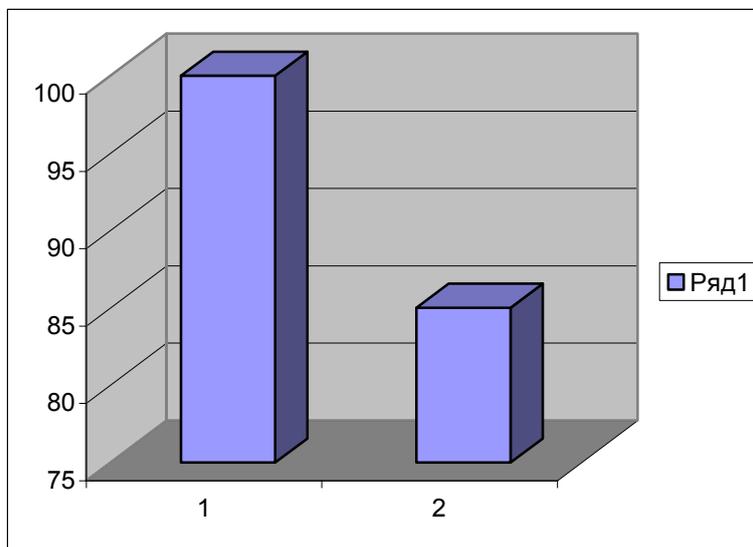


Рис.4. Выживаемость личинки

Примечание: 1 – опыт; 2 - контроль

3. Молодь радужной форели

В ходе наблюдений за состоянием молоди форели в период ее выращивания отмечен более высокий темп роста опытной молоди. Данные приведены на начало июня 2009 года.

2 тур. Навески (средняя масса тела) в опытных группах составляли 0.380 мг (группа 1) и 0.370 г (группа 2). В контрольной группе (3) навеска была значительно ниже - 0.310 г (3). Таким образом, по выживаемости значительной разницы на данный период различия зафиксированы не были. В среднем у молоди она составила 80 %. Однако у 10 % из обследованных рыб контрольной группы отмечена анемия внутренних органов.

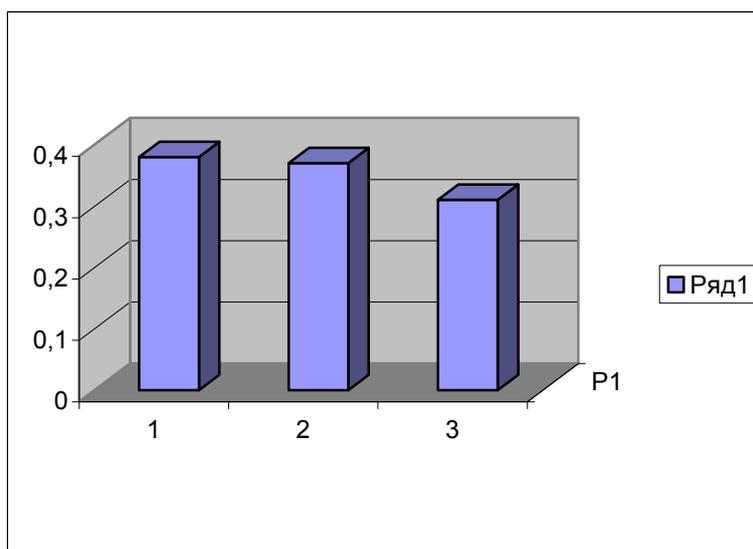


Рис.5. Средняя масса тела в опыте и контроле

Примечание: 1 и 2 – опыт; 3 - контроль

3 тур. У молоди опытной группы к июню 2009 года навеска составила 0.440 г (группа 1), в то время как у молоди контрольных групп навеска была 0.380 (группа 2) и 0.340 г (группа 3). Прирост опытной молоди по сравнению с контрольной составил 0.060 – 0.1 г. Выживаемость опытной молоди на стадии выдерживания личинок была выше на 10 %, однако из-за большего процента неоплодотворенной икры в этой группе, выживаемость на данном этапе выращивания была одинаковой – 50 %.

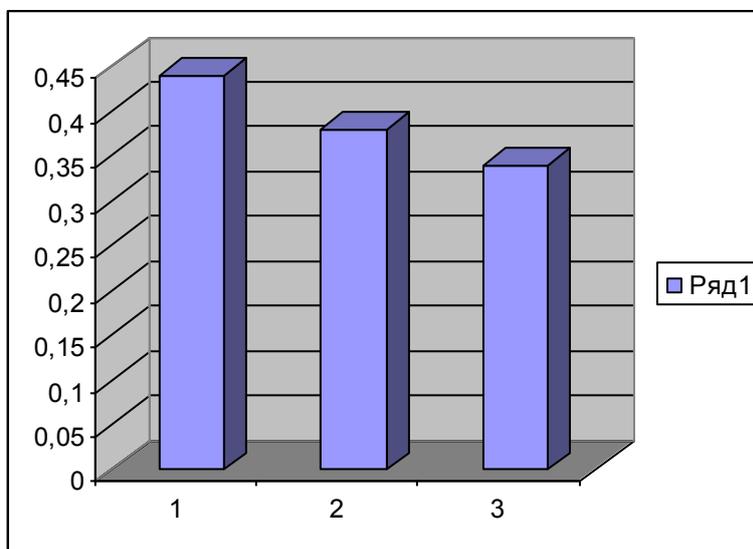


Рис.6. Средняя масса тела в опыте и контроле

Примечание: 1 – опыт; 2 и 3 - контроль

4 тур. Навеска молоди в опытной группе 1 и в контрольной группе 2 в июне 2009 года были одинаковыми – 0.300 г. Однако весьма существенно различалась выживаемость. В контрольной группе она составила 60 %, а опытной – 85 %.

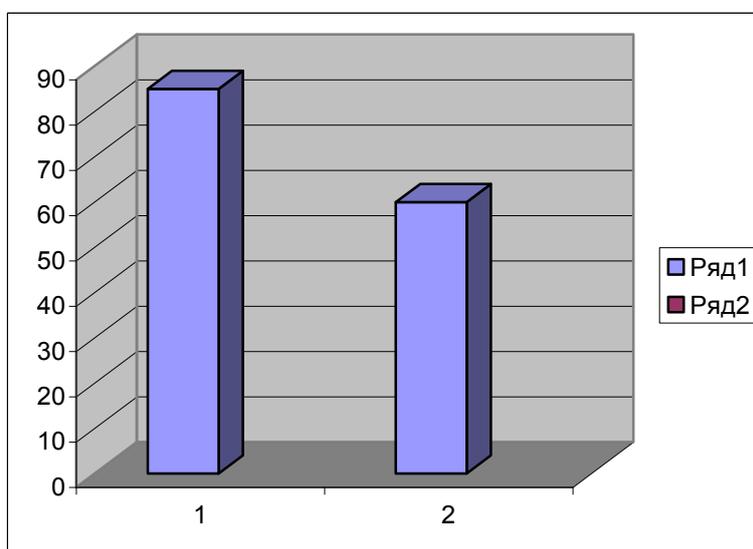


Рис.7. Выживаемость молоди форели в опытной и контрольной группах

Примечание: 1 – опыт; 2 – контроль; выживаемость молоди считали от общего количества оплодотворенной икры.

Обсуждение результатов исследования

1. Икра. Обработка икры форели Ронколейкином[®] позволяет повысить ее выживаемость и снизить зараженность сапролегнией. На первых этапах выращивания какой-либо разницы между контрольной и опытными группами 1 тура не обнаруживалось. Однако к концу инкубации и в первые дни периода выдерживания личинок, когда заражение сапролегнией протекает интенсивно, различия стали уже существенными. Поражение икры и личинок в опыте в 1.3 – 2.0 раза ниже, чем в контроле. Еще более значительная разница в поражении грибковой инфекцией опытной и контрольной группы была выявлена в 4 туре (поражение икры в опыте 5 %, в контроле - 25 %). Здесь различия были зафиксированы в середине периода инкубации. Необходимо отметить, что столь низкое качество икры в контрольной группе может быть связано с худшим физиологическим состоянием производителей.

2. Личинки радужной форели. Результаты опытов (3 и 4 тур) позволяют говорить о повышении выживаемости личинок форели после обработок Ронколейкином[®] при инкубации и в последствии - на стадии выдерживания и при переходе на активное питание. При общем неблагоприятном состоянии икры (низкий процент оплодотворения) обработка Ронколейкином[®] при инкубации снижает смертность личинок при вылуплении.

Наблюдаем также значительное снижение процента уродств (водянка желточного мешка), связанных как с качеством икры, так и с условиями ее инкубации. Выживаемость в подопытных группах по сравнению с контрольными повысилась на 10 – 15 %.

3. Молодь радужной форели. У опытной молоди 2 и 3 туров наблюдаем увеличение массы тела от 60 до 100 мг по сравнению с контролем. Необходимо отметить лучшее физиологическое и эпизоотическое состояние подопытной молоди. Это свидетельствует о позитивном воздействии Ронколейкина[®] на формирование иммунной системы молоди. За рыбами этих групп необходимо продолжить наблюдение.

Выводы

Исследование действия Ронколейкина[®] на организм радужной форели на ранних стадиях развития (от икры до молоди) показали следующее:

1. Положительное воздействие препарата усиливается на ранних стадиях его введения.
2. Обработка икры форели Ронколейкином[®] в дозировке 250 – 500 МЕ/100 л воды способствует повышению иммунитета икры и личинок при поражении грибковой инфекцией.
3. Обработка икры форели Ронколейкином[®] в дозировке 250 – 500 МЕ/100 л воды способствует повышению выживаемости личинок при вылуплении и значительно снижает процент уродств (водянка желточного мешка).
4. Обработка личинок форели Ронколейкином[®] в дозировке 250 – 500 МЕ/100 л после вылупления, на стадии пигментации тела, при подъеме на плав и переходе на активное питание способствует активному формированию иммунной системы молоди, и, как следствие, улучшению ее физиологического и эпизоотического состояния.
5. Обработка Ронколейкином[®] способствует увеличению навески – масса опытных рыб, на 60 - 100 мг.

Это позволяет рекомендовать Ронколейкин[®] к применению в рыбоводстве для профилактики заболеваний молоди, а также для улучшения физиологического и эпизоотического состояния ослабленной молоди.