

**РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ  
КРАТКОСРОЧНОГО ХРАНЕНИЯ СПЕРМЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ**

**Барулин Николай Валерьевич, к.с.-х.н., доцент**

**Шумский Константин Леонардович**

**Белорусская государственная сельскохозяйственная академия**

Barulin Nikolai, PhD, Associate Professor, barulin@list.ru

Shumsky Konstantin

Belarusian State Agricultural Academy

*Разработаны способы увеличения сроков краткосрочного хранения спермопродукции, основанные на уменьшении концентрации сперматозоидов путем разбавления пробы сывороткой спермы (1:10), понижении температуры хранения до 5 °С, принудительной оксигенации и добавлении борной кислоты (500 мг/л) либо винной кислоты (125 мг/л) в качестве консерванта и антиоксиданта, сохраняющие подвижность и оплодотворяющую способность сперматозоидов до 20 суток.*

**Ключевые слова:** *аквакультура, осетровые, воспроизводство, спермопродукция, краткосрочное хранение спермы, подвижность, консервант.*

**Введение.** Воспроизводство дикой рыбы, а также контролируемое воспроизводство в аквакультуре – биологические мероприятия, тесно связанные с репродуктивным успехом и, в частности, с оплодотворением зрелых ооцитов. В настоящее время репродуктивная функция осетровых рыб, особенно в индустриальных условиях, снижается. В этой связи технология искусственного воспроизводства осетровых рыб нуждается в постоянном совершенствовании. Успех оплодотворения высоко зависит от подвижности сперматозоидов, поэтому изучение подвижности спермато-

зоидов способствует совершенствованию методов искусственного оплодотворения. Современные методы компьютерной диагностики качества спермы позволяют проводить точные исследования на высоком методическом уровне [1].

В технологии искусственного воспроизводства осетровых рыб важным моментом является период хранения спермы, поскольку этого требуют различные технологические ситуации (задержка созревания самок, необходимость транспортировки и др.). Известным способом хранения спермы является ее криоконсервация. Однако криоконсервация может значительно снизить качество сперматозоидов. По этой причине перспективным является разработка методов повышения периода краткосрочного хранения спермы осетровых рыб.

Изучение методов оценки, сохранения качества и повышения оплодотворяющей способности спермы является актуальным направлением исследований в области практической аквакультуры.

Цель работы заключалась в разработке методов сохранения качества спермы осетровых рыб при искусственном оплодотворении.

**Материал и методика исследований.** Экспериментальные исследования выполнялись на базе кафедры ихтиологии и рыбоводства и рыбоводных хозяйств, работающих по технологии замкнутого водоснабжения: фермерское хозяйство «Василек» (Минская область), рыбоводный индустриальный комплекс УО «БГСХА» (с 2017 г. – рыбоводный индустриальный комплекс ОАО «Форелевое хозяйство «Лохва» (Могилевская область)), ООО «Фирма «Ремона» (г. Могилев), а также в прудовых хозяйствах ОАО «Рыбхоз Волма» (Минская область) и ОАО «Опытный рыбхоз «Селец» (Брестская область). Лабораторные исследования выполнялись в лабораториях кафедры ихтиологии и рыбоводства Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. Исследования проводились в период 2014–2019 гг. В качестве объекта исследований была выбрана сперма самцов 5 видов и гибридов осетровых рыб, таких как сибирский осетр ленской популяции (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869), русский осетр (*A. gueldenstaedtii*, Brandt, 1833), стерлядь (*A. ruthenus*, Linnaeus, 1758), гибрид бестер (*Huso huso* × *A. ruthenus*), гибрид РО×ЛО (*A. gueldenstaedtii* × *A. baerii*).

Отбор спермопродукции осуществлялся с помощью пластикового шприца Жане с катетером. Объем получаемой пробы составлял в среднем 100 см<sup>3</sup>. Получаемая сперма имела наивысший балл по 5-балльной шкале Персова.

Выделение сыворотки из пробы для разбавления спермы до необходимой концентрации проводили методом центрифугирования (2 мин при 800 об/мин затем 10 минут при 3500 об/мин).

Для исследования подвижности сперматозоидов использовалась система CASA состоящая из тринокулярного электронного микроскопа (ММС-KZ-900) с камерой для микроскопии (ММС-31С12-М) и персонального компьютера с автоматизированным программным обеспечением ММС Сперм с последующим анализом данных в программе ImageJ.

В ходе данного исследования в качестве консервантов и антиоксидантов с целью увеличения срока хранения спермопродукции использовались различные химические вещества.

Для проведения исследований по применению антиоксидантов были сформированы контрольная группа, в которой сперма разбавлялась в сыворотке без добавления консерванта и опытные группы, в которых сперма разбавлялась в сыворотке с добавлением консервантов в различных концентрациях.

При исследовании влияния борной кислоты на качественные и количественные показатели спермы были сформированы следующие опытные группы, в которых сперма разбавлялась в сыворотке с добавлением кислоты в концентрациях – 125, 250, 500, 1000 мг/л, цинка (в форме сульфат цинка) в концентрациях – 125, 250, 500, 1000 мг/л, винной кислоты в концентрациях – 125, 250, 500, 1000 мг/л, спирта (технический этанол) в концентрациях – 1, 2, 3, 4, 5 %, сахара в концентрациях – 125, 250, 500 мг/л, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 Н) в концентрациях – 10, 50, 100 мг/л. лимонной кислоты в концентрациях – 125, 250, 500 мг/л. Затем сперма помещалась в пробирки типа Eppendorf для хранения в холодильнике.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Как показали наши исследования, в процессе хранения происходит увеличение антиоксидантной активности спермоплазмы, что косвенно свидетельствует об увеличении образования активных форм кислорода, кроме того, активные формы

кислорода могут образовываться в ответ на принудительную оксигенацию в этой связи одним из путей решения этой проблемы рекомендуется использоваться антиоксиданты.

На основании вышеизложенного нами были выбраны вещества, которые, по нашему мнению, могли оказать эффект на увеличение периода краткосрочного хранения спермы: цинк (в форме сульфата цинка), этиловый спирт, сахароза,  $H_2SO_4$  (0,1 Н), лимонная, винная и борная кислоты.

В результате проведенных исследований нами было установлено, что цинк оказывает отрицательное действие на качественные и количественные показатели сперматозоидов сибирского осетра ленской популяции в течение краткосрочного хранения. Такие же негативные результаты были получены при использовании спирта. Хотя, следует обратить внимание на то, что на 3-й день хранения спирт в концентрации 3 % и 4 % продемонстрировал лучшие значения относительно контрольных значений. Использование сахарозы,  $H_2SO_4$  (0,1 Н), лимонной кислоты также произвело отрицательный эффект.

Однако следует отметить, что хорошие результаты при краткосрочном хранении спермы были продемонстрированы при использовании винной кислоты. При использовании винной кислоты сперматозоиды, разведенные в концентрации 1:10, при хранении в холодильнике в контейнерах заполненными на 10 % оставались активными в среднем до 10-го дня.

Через сутки после сцеживания (на 2-й день хранения) в контрольной группе, в сыворотку которой не добавляли винную кислоту, общая средняя криволинейная скорость сперматозоидов (VCL) составила  $59,90 \pm 0,52$  мкм/с. В опытных группах значения VCL составили:  $27,89 \pm 1,46$  мкм/с при концентрации винной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л,  $5,03 \pm 2,66$  мкм/с – 250 мг/л. В опытных группах с концентрациями 500 и 1000 мг/л подвижных сперматозоидов не обнаружено.

На 10-й день хранения в контрольной группе подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В опытной группе с концентрацией винной кислоты 125 мг/л значения VCL составили  $22,71 \pm 4,77$  мкм/с.

Лучшие результаты при краткосрочном хранении спермы были продемонстрированы при использовании борной кислоты. При использовании борной кислоты сперматозоиды, разведенные в концентрации 1:10, при хранении в холодильнике в контейнерах заполненными на 10 % оставались активными в среднем до 13-го дня.

Через сутки после сцеживания (на 2-й день хранения) в контрольной группе, в сыворотку которой не добавляли борную кислоту, общая средняя криволинейная скорость сперматозоидов (VCL) составила  $59,90 \pm 0,52$  мкм/с. В опытных группах значения VCL составили:  $61,76 \pm 0,78$  мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л,  $58,39 \pm 0,67$  мкм/с – 250 мг/л,  $57,11 \pm 0,62$  мкм/с ( $p \leq 0,001$ ) – 500 мг/л,  $50,12 \pm 0,90$  мкм/с ( $p \leq 0,001$ ) – 1000 мг/л.

На 13-й день хранения в контрольной и опытных группах с концентрацией борной кислоты 125 и 250 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах значения VCL составили:  $27,29 \pm 3,59$  мкм/с ( $P \leq 0,05$ ) – 500 мг/л,  $23,69 \pm 4,35$  мкм/с ( $P \leq 0,05$ ) – 1000 мг/л.

Через сутки после сцеживания (на 2-й день хранения) в контрольной группе, в сыворотку которой не добавляли борную кислоту, средняя криволинейная скорость сперматозоидов категории А (VCL (A)) составила  $60,13 \pm 0,47$  мкм/с. В опытных группах значения VCL (A) составили:  $62,63 \pm 0,65$  мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л,  $59,42 \pm 0,49$  мкм/с – 250 мг/л,  $57,55 \pm 0,54$  мкм/с ( $P \leq 0,001$ ) – 500 мг/л,  $51,81 \pm 0,65$  мкм/с ( $P \leq 0,001$ ) – 1000 мг/л.

На 13-й день хранения в контрольной и опытных группах с концентрацией борной кислоты 125 и 250 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах значения VCL (A) составили:  $39,08 \pm 5,49$  мкм/с ( $P \leq 0,05$ ) – 500 мг/л,  $30,88 \pm 10,58$  мкм/с ( $P \leq 0,05$ ) – 1000 мг/л.

Под влиянием оптимальной дозировки борной кислоты (500 мг/л) происходило увеличение антиоксидантной активности сыворотки спермы осетровых рыб в условиях краткосрочного хранения. Что позволяло спермоплазме более эффективно бороться с ростом активных форм кислорода.

Кроме данного эффекта, увеличение периода краткосрочного хранения спермы под влиянием борной кислоты можно объяснить ее относительно негативным действием на гетеротрофных протистов. В присутствии оптимальной дозировки борной кислоты активный рост гетеротрофных протистов происходил значительно позже.

Под влиянием борной кислоты, в процессе хранения наблюдались более низкие значения индекса тератозооспермии и индекса дефективности сперматозоидов. Что свидетельствовало о том, что борная кислота не оказывала негативного эффекта на морфологические аномалии сперматозоидов.

На основании проведенных исследований были рекомендованы следующие оптимальные технологические параметры для краткосрочного хранения спермы осетровых рыб: разбавление сперматозоидов в собственной спермоплазме в концентрации (1:10), спермоплазму необходимо получать методом центрифугирования части спермы; после получения спермоплазмы и перед добавлением в нее сперматозоидов рекомендуется осуществлять добавление консервантов (борная кислота (500 мг/л) или винная кислота (125 мг/л); для увеличения периода хранения рекомендуется применять принудительную оксигенацию спермы в кислородном пакете в соотношении  $\geq 1:10$ ; хранение в охлажденном состоянии (5 °C).

**Заключение.** В результате проведенных исследований установлено, что вещества, обладающие консервирующими эффектами, способны оказывать влияние на период краткосрочного хранения спермы осетровых рыб без использования криоконсервации, замедляя ухудшение морфологических, биохимических и динамических показателей: снижая рост гетеротрофных протистов на 5 суток ( $P < 0,05$ ), индекс тератозооспермии – на 0,15 п. ( $P < 0,05$ ), индекс дефективности сперматозоидов – на 0,6 п. ( $P < 0,05$ ), сохраняя все параметры подвижность сперматозоидов на достаточном для оплодотворения уровне. Среди исследуемых консервантов отрицательный и нейтральный эффект на период краткосрочного хранения спермы оказали цинк, сахар, лимонная кислота и серная кислота (0,1 Н). Лучшие результаты показали борная кислота и винная кислота. Максимальные результаты показали борная (500 мг/л) и винная кислоты (125 мг/л), увеличивая общий срок краткосрочного хранения без использования криоконсервации до 13 и 10 суток, соответственно. Разработаны оптимальные технологические параметры краткосрочного хранения спермы осетровых рыб, включающие разбавление (1:10), добавление консервантов (борная кислота (500 мг/л) или винная кислота (125 мг/л), оксигенацию и охлаждение (до 5 °C), сохраняющие подвижность и оплодотворяющую способность сперматозоидов до 20 суток ( $P < 0,05$ ), обеспечивая оплодотворение икры 62 %, выживаемость свободных эмбрионов 67 %, выживаемость личинок перед переходом на активное питание 82 %, выживаемость личинок после перехода на активное питание 72 %.

#### Список использованных источников

1. Барулин, Н. В. Рекомендации по воспроизводству осетровых рыб в рыбоводных промышленных комплексах с применением инновационных методов / Н. В. Барулин, В. Ю. Плавский, К. Л. Шумский, Л. О. Атрощенко, Е. Г. Новикова, С. В. Роговцов, М. С. Лиман – Горки : БГСХА, 2016. – 204 с.