

А.С. Асылбекова<sup>1\*</sup>, Г.К. Баринава<sup>1</sup>, Г.А. Аубакирова<sup>1</sup>,  
А.Д. Мусина<sup>1</sup>, А.Б. Маханбетова<sup>2</sup>, Ж.Б. Куанчалеев<sup>1</sup>,  
С.Е. Мусин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет  
имени С. Сейфуллина», Казахстан, г. Астана

<sup>2</sup>АО «Республиканский центр по племенному делу в животноводстве «Асыл түлік»,  
Казахстан, г. Косшы

\*e-mail: gamily-05@mail.ru

## ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА СПЕРМЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

В данной статье рассматриваются вопросы низкотемпературного консервирования спермы осетровых рыб. Цель работы – изучение влияния скорости замораживания на показатели качества спермы осетровых рыб и зависимость этих показателей между собой. Материалом для исследований послужили сперма заготовленных самцов стерляди и севрюги на Урало-Атырауском осетровом рыбозаводе. При изучении влияния скорости заморозки на качество спермы осетровых рыб, были определены оптимальные скорости на этапах ступенчатой заморозки. При заморозки спермы стерляди наивысший результат был получен при оптимальной скорости заморозки 17<sup>0</sup>С/мин с подвижностью сперматозоидов 76,8±1,25% и времени жизни спермиев 216,2±1,44сек. Сперма самцов севрюги, замороженная в соломинках имели высокую скорость в начале заморозки в пределах 15–48<sup>0</sup>С/мин, что повлияло на качество спермы севрюги, подвижность спермиев которых колебалась в пределах 12,0–19,5%, время жизни спермиев 228,5–373,75сек. Относительно хорошие результаты были получены от спермы самцов севрюги, замороженных в пробирках Эпиндорфа, которые имели самую высокую скорость заморозки до 20<sup>0</sup>С/мин. Подвижность спермиев при этом колебалась в пределах 27,75–44,75%, время жизни спермиев 393,25–674,5сек. При изучении наблюдается прямая зависимость между подвижностью и времени жизни спермы осетровых рыб, а также из полученных результатов исследований видно, что наиболее оптимальной скоростью замораживания спермы данных видов осетровых рыб является скорость до 20<sup>0</sup>С/мин, емкостью, в которой целесообразно замораживать образцы являются пробирки Эпиндорфа, объемом 0,5 мл, а режим замораживания многоступенчатый с использованием специального бокса.

**Ключевые слова:** криоконсервация, криопротектор, стерлядь, севрюга, сперма.

A.S. Assylbekova<sup>1\*</sup>, G.K. Barinova<sup>1</sup>, G.A. Aubakirova<sup>1</sup>, A.D. Mussina<sup>1,2</sup>,  
A.B. Makhanbetova<sup>3</sup>, Zh.B. Kuanchaleyev<sup>1</sup>, S.E. Mussin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>«S.Seifullin Kazakh AgroTechnical Research University» NCJSC, Kazakhstan, Astana

<sup>2</sup>Al-Farabi Kazakh National university, Kazakhstan, Almaty

<sup>3</sup>Joint-Stock Company “Republican Center for Breeding in Animal Husbandry” Asyl Tulik”,  
Kazakhstan, Kosshy c.

\*e-mail: gamily-05@mail.ru

### The effect of the freezing rate on the quality of sperm of sturgeon fish

This article discusses the issues of low-temperature preservation of sperm of sturgeon fish. The aim of the work is to study the effect of the freezing rate on the sperm quality indicators of sturgeon fish and the dependence of these indicators among themselves. The material for the research was the sperm of harvested males of sterlet and stellate sturgeon at the Ural-Atyrau sturgeon fish hatchery. When studying the effect of the freezing rate on the quality of sperm of sturgeon fish, optimal speeds were determined at the stages of stepwise freezing. When freezing sterlet sperm, the highest result was obtained at an optimal freezing rate of 17<sup>0</sup>C/min with sperm motility of 76.8±1.25% and sperm lifetime of 216.2±1.44sec. The sperm of the male stellate sturgeon frozen in straws had a high rate at the beginning of freezing in the range of 15–48<sup>0</sup>C/min, which affected the quality of the sperm of the stellate sturgeon, whose sperm motility ranged from 12.0–19.5%, the life time of the sperm was 228.5–373.75seconds. Relatively good

results were obtained from the sperm of male stellate sturgeon frozen in Epindorf tubes, which had the highest freezing rate up to 20°C/min. The motility of the sperms ranged from 27.75–44.75%, the lifetime of the sperms 393.25–674.5seconds. When studying, there is a direct relationship between the mobility and the lifetime of sperm of sturgeon fish, and also from the obtained research results it can be seen that the most optimal freezing rate of sperm of these species of sturgeon fish is a speed of up to 20°C / min, the capacity in which it is advisable to freeze samples are Epindorf tubes, 0.5ml in volume, and the multi-stage freezing mode using special boxing.

**Key words:** cryopreservation, cryoprotector, sterlet, stellate sturgeon, sperm.

А.С. Асылбекова<sup>1\*</sup>, Г.К. Баринаова<sup>1</sup>, Г.А. Аубакирова<sup>1</sup>, А.Д. Мусина<sup>1,2</sup>,  
А.Б. Маханбетова<sup>3</sup>, Ж.Б. Куанчалеов<sup>1</sup>, С.Е. Мусин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> «С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті» КеАҚ,  
Қазақстан, Астана қ.

<sup>2</sup> «Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті» КеАҚ, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>3</sup> «Республикалық мал шаруашылығын асылдандыру «Асыл түлік» АҚ, Қазақстан, Қосшы қ.

\*e-mail: gamily-05@mail.ru

### Бекіре тұқымдас балықтардың шәуеттерінің сапа көрсеткіштеріне мұздату жылдамдығының әсері

Бұл мақалада бекіре тұқымдас балықтардың шәуеттерін төмен температурада консервациялау мәселелері қарастырылады. Жұмыстың мақсаты – бекіре тұқымдас балықтардың шәуеттерінің сапа көрсеткіштеріне мұздату жылдамдығының әсерін және осы көрсеткіштердің өзара тәуелділігін зерттеу. Зерттеу материалы Жайық-Атырау бекіре балық өсіру зауытында дайындалған сүйірік пен шоқырдың шәуеттері болып табылды. Бекіре тұқымдас балықтардың шәуеттерінің сапасына мұздату жылдамдығының әсерін зерттеу кезінде сатылы мұздату кезеңдерінде оңтайлы жылдамдықтар анықталды. Сүйірік шәуетін мұздату кезінде ең жоғары нәтиже оңтайлы мұздату жылдамдығы 17°C/мин болғанда, сперматозоидтардың қозғалғыштығы  $76,8 \pm 1,25\%$  және сперматозоидтардың өмір сүру уақыты  $216,2 \pm 1,44$ сек болды. Шоқырдың шәуетін түтікшеде мұздатылған мұздатудың басында 15–48°C/мин аралығында жоғары жылдамдыққа ие болды, бұл шоқырдың шәуетінің сапасына әсер етті, олар сперматозоидтардың қозғалғыштығы 12,0–19,5%, сперматозоидтардың өмір сүру уақыты 228,5–373,75сек аралығында болды. Салыстырмалы түрде жақсы нәтижелер Эпиндорф пробиркаларда мұздатылған шоқырдың шәуетінен алынды, олар 20°C/мин дейін ең жоғары жылдамдыққа ие болды. Сперматозоидтардың қозғалғыштығы 27,75–44,75%, сперматозоидтардың өмір сүру уақыты 393,25–674,5сек аралығында болды. Зерттеу кезінде бекіре тұқымдас балықтардың сперматозоидтарының қозғалғыштығы мен өмір сүру уақыты арасында тікелей байланыс бар екені байқалады, сонымен қатар алынған зерттеу нәтижелерінен бекіре тұқымдас балықтардың осы түрлерінің шәуеттерін мұздатудың ең оңтайлы жылдамдығы 20°C/мин дейінгі жылдамдық, үлгілерді мұздатуға болатын сыйымдылық көлемі 0,5мл Эпиндорф пробиркалары және мұздату режимі көп сатылы арнайы боксты қолдану арқылы екенін байқауға болады.

**Түйін сөздер:** криоконсервация, криопротектор, сүйірік, шоқыр, шәует.

### Введение

В настоящее время нарастающее антропогенное воздействие на водные экосистемы не только оказывают влияние на физиологическое состояние гидробионтов, но и приводят к снижению численности видов. Особенно это заметно по численности осетровых рыб, если ранее русский осётр, севрюга и белуга в Каспийском бассейне имели промысловое значение, то в настоящее время их вылов запрещен. Белуга и севрюга в этих водоёмах стали настолько редкими, что перешли в разряд исчезающих видов, а популяции русского осётра резко сократились [1–7].

Для сохранения и восполнения численности отдельных популяций рыб разработаны биотехнологии искусственного воспроизводства на различных рыбоводных предприятиях. В их основу положены принципы содержания и использования производителей из маточных стад, содержащихся на предприятии, что, в свою очередь, ограничивает число особей, скрещивающихся между собой, и приводит впоследствии к инбридингу [8].

Криоконсервация спермы рыб является эффективным методом сохранения и восстановления генофонда не только редких и исчезающих видов, но и объектов аквакультуры позволяя ре-

шать многие природоохранные, селекционные и другие научные задачи. Создание банков геномных ресурсов, может привести к увеличению потенциальной численности размножающейся популяции и минимизации инбридинга, чтобы гарантировать получение надлежащих генетических комбинаций [9].

Несмотря на ряд достижений в криобиологии спермы рыб, продолжают исследования по оптимизации методов криоконсервирования спермы рыб [10-15]. Они включают обычно сбор спермы, определение качества спермы, разбавление спермы растворами видоспецифичных протекторов, замораживание полученной суспензии по определенной программе, хранение в жидком азоте, размораживание в оптимальных условиях и оценку результата по подвижности оттаявшей спермы [16-18].

Успех криоконсервации, т.е. сохранение замороженными клетками жизнеспособности оплодотворяющей способности, зависит от множества факторов: качества нативной спермы, подбора, оптимальных для данного вида рыб, состава криозащитной среды, соотношения разбавления спермы средой, режимов замораживания и оттаивания, способа активации размороженной спермы и других технических деталей, поэтому потребность в оптимизации и совершенствовании технологий всегда остается актуальной. Гормональная стимуляция также играет важную роль в улучшении качества свежей спермы и спермы после оттаивания [19]. Активация размороженной спермы также влияет на успех процесса криоконсервации и качество размороженной спермы. У большинства видов рыб сперматозоиды, взвешенные в семенной плазме, неподвижны и активируются только при контакте с водой [20-21].

Немаловажным фактором в криоконсервации является подбор режима замораживания и оттаивания образцов спермы, обеспечивающий сохранность клеток. В процессе криоконсервации клетки подвергаются воздействию целого комплекса стрессовых факторов, которые вызывают их структурные и функциональные изменения. Результаты исследований структур клеток свидетельствуют о том, что влияние глубокой заморозки может затронуть любые из их составляющих. Оптимальная скорость заморозки обеспечивает баланс трансмембранного массообмена, в результате которого обезвоживание клеток, с одной стороны, является достаточным, чтобы исключить вероятность внутриклеточного льдообразования, а с другой стороны не

достигает критического уровня, приводящего к неизбежному повреждению клеток [22].

Целью исследований является изучить влияние скорости замораживания на показатели качества спермы осетровых рыб и зависимость этих показателей между собой.

### Материалы и методы исследований

Научные исследования по изучению криоконсервации спермы проведены от заготовленных самцов стерляди (*Acipenser ruthenus*) и севрюги (*Acipenser stellatus*) на Урало-Атырауском осетровом рыболовном заводе в период нерестовой кампании.

Оценка качества свежеполученной спермы от стимулированных самцов осетровых рыб проводилась путем определения подвижности сперматозоидов с помощью микроскопа. Качество спермы определяли по шкале Персова, по результатам которых отбирались пробы с активностью 4 и 5 баллов [23]. Сперму оценивали по внешнему виду по цвету и консистенции. Время жизни устанавливали с помощью секундомера.

Криоконсервация проводилась по следующей схеме: разбавление спермы с криозащитной средой, эквilibрация, замораживание, дефростирование. В процессе криоконсервации были использованы криопротектор, содержащий следующие компоненты: 30mM Tris, 23,4mM сахарозы, 0,25 KCl, 15% метанол. Отобранную после оценки сперму самцов в отдельных пластиковых таргах поместили в холодильник для охлаждения до температуры 10-12°C в течении 15-20 мин. После выравнивания температуры сперму разбавляли охлажденной до той же температуры криозащитной средой в объемном отношении 1:1.

Полученная суспензия сперма – криозащитная среда разливалась в криопробирки Эпиндорфа объемом по 0,5мл и соломинки объемом 0,2мл с помощью пипетки дозатора. Данная работа проводилась на охлажденной поверхности. С момента разлива до момента заморозки время не превышало 15 минут, которая составляла процесс эквilibрации.

Далее замороженный материал выдерживали в парах азота в течение 15 минут в специальном боксе из пенопласта размером 33,5x21см, высотой 26см с наружи и 20см внутри, в котором сверху был установлен плот из пенопласта размером 14,5x14,3см с толщиной 4см. Для контроля температуры в одну из пробирок поместили проводной датчик от низкотемпературного тер-

мометра. Плот с криопробирками выдерживали в течение 15 минут, затем все криопробирки были перенесены в сосуд Дьюара для длительного хранения при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Размораживали криопробирки в дистиллированной воде при температуре  $38^{\circ}\text{C}$  в течение 1 минуты, с помощью водяной бани.

Параметры дефростированной спермы были изучены в лаборатории АО «Республиканский центр по племенному делу в животноводстве «Асыл түлік». Подвижность и время жизни спермы регистрировали на мониторе персонального компьютера с использованием видеоприставки под тринокулярным микроскопом с камерой и программным обеспечением CEROS компьютерной технологии системы CASA (IMV-technologies, Франция). Активировали сперму с помощью воды в соотношении 1:300.

Статистическую обработку проводили по руководству Г.Ф. Лакина [24] и на ПК с применением программы «Excel» [25]. Результаты представлены в виде среднего значения ( $M$ )  $\pm$

стандартного отклонения ( $m$ ). Для определения значимости зарегистрированных различий в значениях подвижности сперматозоидов и времени двигательной активности между исследуемыми объектами использовали t-критерий Стьюдента.

### Результаты исследований и их обсуждения

Исследования были проведены в два этапа. Первым этапом были изучены сперма стерляди, затем сперма севрюги. При экспериментальных работах были отобрано по 4 чипированных самца от каждого вида. После проведения оценки качества свежеполученной спермы, все самцы имели показатели по 5 баллов. От каждого самца получено 16-17 образцов криоматериала.

При изучении криоконсервации спермы осетровых рыб определены показатели качества нативной спермы, после эквilibрации (таблица 1,2) и после дефростации. Также изучено влияние скорости замораживания на показатели качества спермы осетровых рыб.

**Таблица 1** – Качество спермы стерляди до заморозки

№ рыбы	№ чипа	Подвижность нативной спермы, %	Время жизни нативной спермы, с	Подвижность спермиев после эквilibрации, %	Время жизни спермиев после эквilibрации, с
1	6703	95,25 $\pm$ 1,25	297,5 $\pm$ 1,5	86,6 $\pm$ 1,52	256,4 $\pm$ 1,92
2	2644			84,2 $\pm$ 0,75	242,4 $\pm$ 1,68
3	0078			81,6 $\pm$ 1,75	238,6 $\pm$ 1,68
4	2583			88,6 $\pm$ 1,25	258,2 $\pm$ 1,84

По результатам криоконсервации спермы стерляди с использованием криопротектора метанола с концентрацией 15% наивысшей ре-

зультат показал самец с чипом №2583 с подвижностью сперматозоидов 88,6% и времени жизни спермиев 258,2с после эквilibрации ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 2** – Качество спермы севрюги до заморозки

№ рыбы	№ чипа	Подвижность спермиев нативной спермы, %	Время жизни нативной спермы, с	Подвижность спермиев после эквilibрации, %	Время жизни спермиев после эквilibрации, с
1	4386	95,75 $\pm$ 1,25	1200 $\pm$ 4,7	82,75 $\pm$ 0,9	751,5 $\pm$ 1,3
2	4356			84,25 $\pm$ 0,9	760,5 $\pm$ 2,2
3	4371			84,75 $\pm$ 1,5	742,5 $\pm$ 1,7
4	0497			85,50 $\pm$ 0,9	792,5 $\pm$ 2,5

Рыбоводные качества спермы севрюги показали высокие показатели времени жизни сперматозоидов 1200с по сравнению со стерлядью. Из изученных самцов севрюги лучшие результаты были получены от самца №0497 с подвижностью 85,5% и времени жизни 792,5с.

Скорость заморозки осетровых рыб изучали в специальном боксе с помощью низкотемпературного датчика. Плот с криопробирками выдерживали в течение 15 минут в боксе, затем все криопробирки были перенесены в сосуд Дьюара для длительного хранения при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Сперма самцов стерляди разливалась только в пробирки Эпиндрофа. Скорость заморозки спермы самца стерляди №6703 повышалась в течение первых четырех минут до  $15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , далее постепенно понижалась до  $4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Сперма самца №0078 замораживалась первые три минуты со скоростью до  $8^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , следующие 2 ми-

нуты понизилась до  $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , далее повышалась в течение 6 минут до  $14^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , с дальнейшим понижением до  $6^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Сперма самца №2644 замораживалась со скоростью в первую минуту  $11^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , в течение следующих 3-х минут  $6^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , в течение 4-х минут скорость была  $8^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , далее в течение 5 минут  $6^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  и в последнюю минуту снизилась до  $3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  при этом максимальная скорость была в начальном этапе заморозки и составила  $11^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , что привело к повреждению клеток. Скорость заморозки самца №2583 в первую минуту составила  $8^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , с понижением до  $4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  во второй минуте, в течение следующих 3-х минут повысилась до  $17^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , с последующим понижением до  $6^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . При ступенчатой заморозки спермы стерляди оптимальная скорость заморозки была до  $20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  в середине этапа замораживания, кроме самца №2644, с максимальной скоростью  $11^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  в начале заморозки.

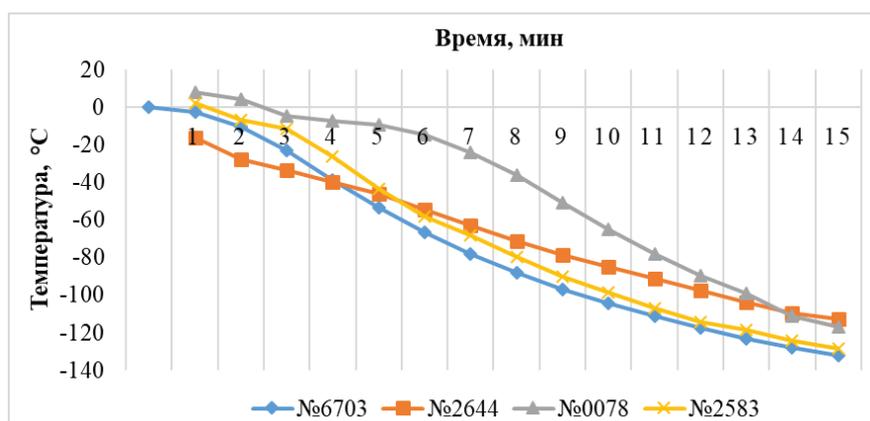
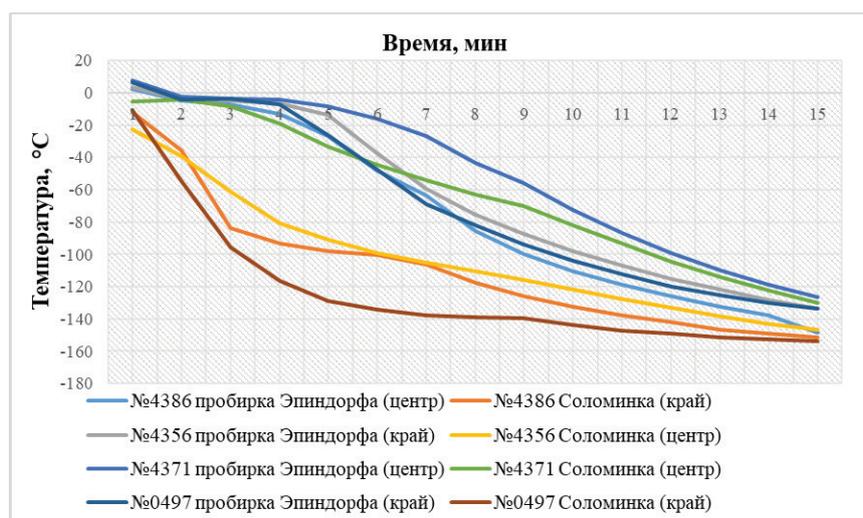


Рисунок 1 – Скорость заморозки спермы стерляди по самцам

Изучение скорости заморозки спермы севрюги проводили в зависимости от криопробирок и от расположения их в специальном боксе в течение 15 минут (рисунок 2). Скорость заморозки криоматериала в соломинках, расположенных на краю бокса, полученных от самца №0497 в первые три минуты составила  $40^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , на четвертой минуте  $20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  с понижением до  $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Похожая скорость заморозки наблюдается у самца №4386, сперма которого была разлита в соломинки и расположенного на краю бокса первые 2 минуты со скоростью  $24^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , на третьей минуте  $48^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  с дальнейшим скачкообразным понижением от  $11^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Сперма самца №4356 замороженных в соломинках, расположенной в цент-

ре бокса первые 4 минуты замораживалась со скоростью до  $20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  с дальнейшим равномерным понижением от  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Сперма самца №4371 в соломинках в центре бокса замораживалась постепенно повышая скорость заморозки до  $14^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  в течение первых пяти минут с понижением в течение дальнейших четырех минут от  $11^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $7^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , далее три минуты скорость держалась  $11^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  с понижением до  $8^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . При заморозки спермы самцов севрюги в соломинках наблюдается высокая скорость в начале заморозки. В соломинках, расположенных по краям бокса скорость заморозки доходила более  $40^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , при расположении в центре бокса от  $15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .



**Рисунок 2** – Скорость заморозки спермы себрюги в зависимости от криопробирок и расположения в боксе

При заморозки спермы себрюги в пробирках Эпиндорфа высокая скорость заморозки наблюдается в середине замораживания с 5 по 10 минуты. Эпиндорфы расположенные по краям бокса имели скорость заморозки от 20<sup>0</sup>C/мин до 25<sup>0</sup>C/мин, в центре бокса от 15<sup>0</sup>C/мин до 20<sup>0</sup>C/мин. Сперма самца №4386 в пробирке Эпиндорфа, расположенного в центре бокса в течение 4 минут имели скорость заморозки более 5<sup>0</sup>C/мин, в течение дальнейших 5 минут до 20<sup>0</sup>C/мин, далее скорость заморозки была 5-10<sup>0</sup>C/мин. Сперма самца №4371 в пробирке Эпиндорфа, расположенного в центре бокса имели скорость заморозки в течение первой минуты 10<sup>0</sup>C/мин, в течение следующих двух минут 1<sup>0</sup>C/мин, далее в течение 6 минут скорость повышалась до 16<sup>0</sup>C/мин с понижением в последних минутах заморозки до 8<sup>0</sup>C/мин. Заморозка спермы самцов №4356 и №0497 проходила аналогично в течение первой минуты скорость заморозки составила 7,5-10<sup>0</sup>C/мин, далее 2 минуты 2-3<sup>0</sup>C/мин, следующие три минуты более 20<sup>0</sup>C/мин, с постепенным понижением в последующих минутах до 5-4<sup>0</sup>C/мин соответственно.

Размораживание спермы осуществляли, извлекая пробирки с замороженной спермой из жидкого азота и помещая их в водяную баню с температурой 38-40<sup>0</sup>C, затем активировали дистиллированной водой. В размороженных образцах определяли количество подвижных сперматозоидов и время жизни (рисунок 3,4).

При изучении показателей качества дефростированной спермы стерляди по четырем самцам также показали хорошие результаты

наименьший из которых показал самец с чипом №0078 с подвижностью сперматозоидов 53,4±0,75% и времени жизни 76,4±1,68сек при оптимальной скорости заморозки 14<sup>0</sup>C/мин на 9-10 минутах заморозки. Наивысший результат показал самец с чипом №2583 по подвижности сперматозоидов 76,8±1,25% и времени жизни спермиев 216,2±1,44сек при оптимальной скорости заморозки 17<sup>0</sup>C/мин на 5 минуте заморозки. Оптимальная скорость заморозки 11-14<sup>0</sup>C/мин показали относительно не высокие результаты подвижности и времени жизни сперматозоидов стерляди (p<0,05). М.Белая и др. в своих исследованиях со спермой стерляди утверждают о меньшем повреждении после заморозки/оттаивания происходит при скорости заморозки 10<sup>0</sup>C/мин [22]. У самцов стерляди при оптимальной скорости заморозки спермы до 20<sup>0</sup>C/мин положительно повлиял на показатели качества спермы.

По результатам качества спермы после замораживания/оттаивания действие метанола в концентрации 15% показал положительные результаты. В исследованиях многих авторов особое внимание уделялось оптимизации качественного и количественного состава протективной среды как важнейший фактор обеспечения защиты сперматозоидов от повреждающего действия низких температур, по результатам которых установили, что наиболее подходящим криопротектором для спермы осетровых рыб (стерляди) является метанол обеспечивая наилучшую устойчивость к оксидативному стрессу [26].

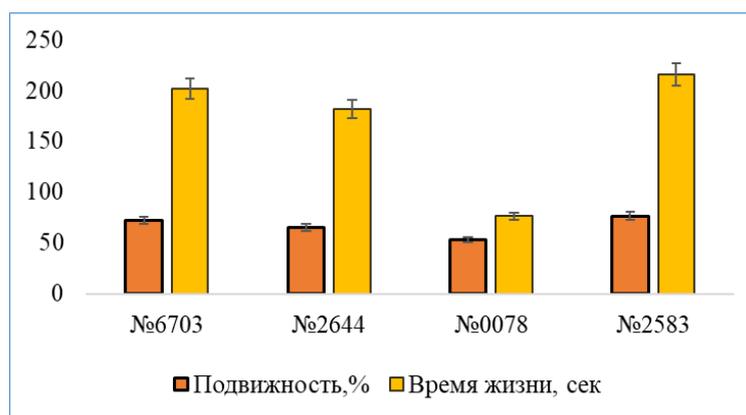


Рисунок 3 – Показатели качества дефростированной спермы стерляди

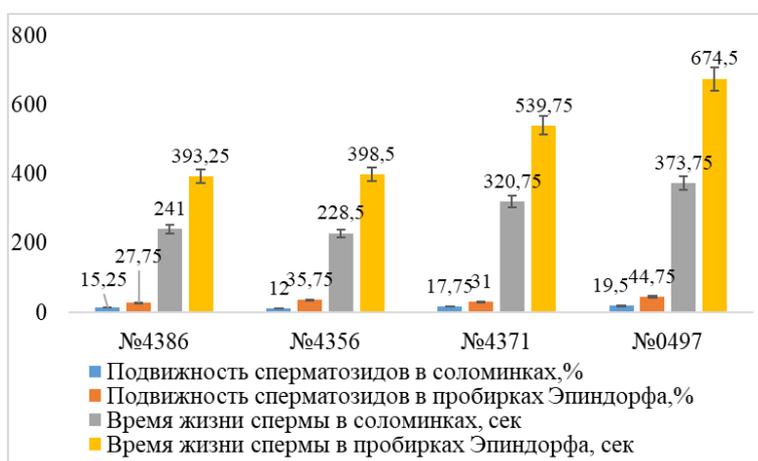


Рисунок 4 – Показатели качества дефростированной спермы севрюги

При изучении показателей качества дефростированной спермы севрюги наблюдаются не высокие результаты этих показателей по сравнению с нативной спермой ( $p < 0,05$ ). Из них высокие результаты были получены от спермы самца №0497, замороженного в пробирках Эпиндорфа при подвижности спермиев  $44,7 \pm 1,25\%$  и времени жизни  $674,5 \pm 3,8$ сек, что обуславливается поэтапной кристаллизацией вне- и внутриклеточной водной среды. В целом сперма, замороженная в пробирках Эпиндорфа имела высокую скорость (до  $20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) в середине процесса замораживания, что минимизирует повреждение внутриклеточных структур при криоконсервации и показала относительно высокие показатели качества спермы, по сравнению со спермой, замороженной в соломин-

ках ( $p < 0,05$ ). При этом подвижность сперматозоидов в пробирках Эпиндорфа колебались от  $27,75\%$  до  $44,75\%$ , а время жизни спермиев от  $393,25$ сек до  $674,5$ сек.

Сперма, замороженная в соломинках имела высокую скорость ( $15-48^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  в зависимости от расположения) в начале процесса замораживания, что повлияло на ускорение процесса кристаллизации вне- и внутриклеточной водной среды. Подвижность сперматозоидов в соломинках при этом колебалась от  $12\%$  до  $19,5\%$ , а время жизни спермиев от  $228,5$ сек до  $373,75$ сек.

В ходе исследований изучены зависимость между подвижностью и времени жизни, замороженной/оттаянной спермы осетровых рыб, где наблюдается прямая зависимость между данными показателями (рисунки 5, 6, 7).

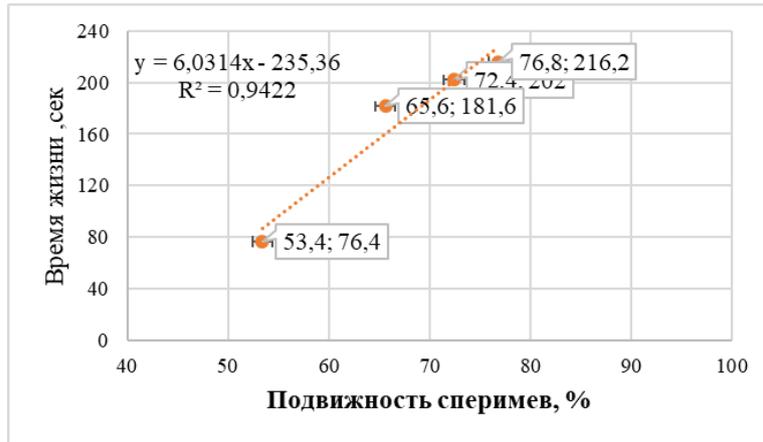


Рисунок 5 – Зависимость между выживаемостью и времени жизни сперматозоидов стеряди (n=4)

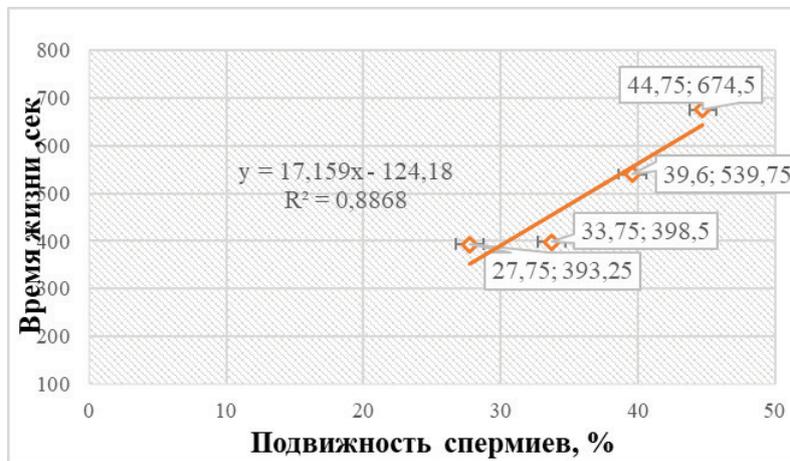


Рисунок 6 – Зависимость между выживаемостью и времени жизни сперматозоидов сеvрюги, замороженных в пробирке Эпидорфа (n=4)

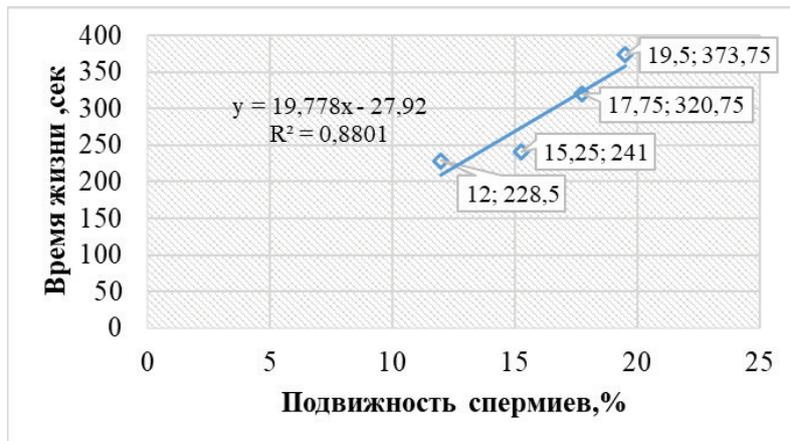


Рисунок 7 – Зависимость между выживаемостью и времени жизни сперматозоидов сеvрюги, замороженных в соломинках (n=4)

## Заключение

По результатам исследований изучены влияние скорости заморозки на качество спермы осетровых рыб. Наблюдаются высокие результаты подвижности и времени жизни спермы стерляди при оптимальной скорости заморозки до 20°C/мин в середине этапа заморозки.

При изучении влияния скорости заморозки на качество спермы севрюги, было установлено, что максимальная скорость заморозки спермы самцов зависела от вида пробирок, в которых замораживалась сперма и расположения их в специальном боксе, а также была разной на этапах ступенчатой заморозки. Сперма, замороженная в соломинках имела высокую скорость в начале заморозки в пределах 15-48°C/мин в зависимости от самцов и места расположения в боксе, что повлияло на качество спермы севрюги, которая имела подвижность спермиев в пределах 12,0-19,5%, время жизни спермиев 228,5-373,75сек. Относительно хорошие результаты были получены от спермы самцов севрюги, замороженных в пробирках Эпиндорфа, которые имели самую высокую скорость в пределах до 20°C/мин, в зависимости от самцов и места расположения в боксе. Подвижность спермиев была в пределах 27,75-44,75%, время жизни спермиев 393,25-674,5сек.

Кроме того, при изучении наблюдается прямая зависимость между подвижностью и времени жизни спермы осетровых рыб, а также из полученных результатов исследований видно, что наиболее оптимальной скоростью замораживания спермы данных видов осетровых рыб

является скорость в пределах до 20°C/мин, емкостью, в которой целесообразно замораживать образцы является пробирки Эпиндорфа, объемом 0,5мл, а режим замораживания многоступенчатый с использованием специального бокса из пенопласта размером 33,5x21см, высотой 26см с наружи и 20см внутри, сверху которого был установлен плот из пенопласта размером 14,5x14,3см с толщиной 4см.

## Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

## Благодарности

Авторы статьи выражают свою благодарность руководству Урало-Атырауского осетрового рыболовного завода за оказание помощи при получении спермы осетровых рыб в период нереста, а также Республиканскому центру по племенному делу в животноводстве «Асыл түлік» при оценки качества дефростированной спермы осетровых рыб.

## Источник финансирования

Работа выполнена в рамках проекта грантового финансирования молодых ученых по научно-техническим проектам на 2021-2023 годы №АР09058175 по теме «Создание криобанка репродуктивных клеток ценных видов рыб Казахстана».

## Литература

1. Ходоревская Р.П., Калмыков В.А., Жилкин А.А. Современное состояние запасов осетровых Каспийского бассейна и меры по их сохранению. Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство. 2012. № 1. С.99-106
2. Васильева Л.М., Смирнова Н.В., Юсупова А.З. К вопросу сохранения и восстановления запасов осетровых рыб в Волго-Каспийском бассейне // Юг России: экология, развитие. 2012. Т. 7, №1. С. 73-76. DOI:10.18470/1992-1098-2012-1-73-76
3. Ананьев, В.И. К вопросу о создании национальной системы генофондных коллекций рыб и других гидробионтов России для аквакультуры и сохранения редких и исчезающих видов: правовые и нормативнометодологические аспекты / В.И. Ананьев, М.С. Манохина // Ветеринарная патология. – 2007. – № 1. – С. 19-24.
4. Матишов Г.Г., Пономарева Е.Н., Белая М.М. Сохранение генетического разнообразия рыб методами низкотемпературного консервирования // Рыбное хозяйство. 2012. № 3. С. 59-62
5. Бапсанова, А.М. Криоконсервация генетического материала для сохранения редких и исчезающих видов животных / А.М. Бапсанова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – № 1. – С. 79.
6. Белая М.М., Красильникова А.А., Пономарева Е.Н. Разработки южного научного центра РАН в области криоконсервации репродуктивных клеток рыб / Известия Самарского научного центра Российской академии наук, т. 20, № 5(2), 2018 – С 280-286.
7. Чипинов, В.Г. Экономическая эффективность использования криоконсервированной спермы при выращивании осетровых видов рыб / В.Г. Чипинов, М.М. Богатырева // Актуальные проблемы обеспечения продовольственной безопас-

ности юга России: инновационные технологии для сохранения биоресурсов, плодородия почв, мелиорации и водообеспечения: материалы Международной научной конференции (27-30 сентября 2011 г., Ростов-на-Дону). – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2011. – С. 133-135.

8. Белая М.М., Красильникова А.А., Пономарева Е.Н. Разработки южного научного центра РАН в области криоконсервации репродуктивных клеток рыб / Известия Самарского научного центра Российской академии наук, т. 20, № 5(2), 2018 – С 280-286.

9. Martinez-Paramo S., Horvath A., Labbe C., Zhang T., Robles V., Herraes P., Suquet M., Adams S., Viveiros A., Tiersch T.R., Cabrera E. Cryobanking of aquatic species. //Aquaculture, 2016. – V. 472. – P.156–177. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042>.

10. Докина О.Б., Цветкова Л.И., Пронина Л.Д., Миленко В.А. Метод криоконсервации спермы осетровых рыб – объектов аквакультуры. Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития: Материалы докладов IV Международной научно-практической конференции, 13-15 марта 2006 г. Астрахань. – М.: Изд-во ВНИРО, 2006, С.76-79

11. Пономарева Е.Н., Богатырева М.М., Антонова Н.А., Осипова В.П. Оптимизация процесса криоконсервации спермы осетровых рыб при использовании различных сред //Известия Самарского научного центра Российской академии наук, т.11, №1(2), 2009. – С.132-134

12. Dzyuba B. et al. Spermatozoa motility, cryoresistance, and fertilizing ability in starlet *Acipenser ruthenus* during sequential stripping // Aquaculture, 2012. – V. 356-357. – P. 272-278.

13. Dzyuba B. et al. Motility and fertilization ability of starlet *Acipenser ruthenus* testicular sperm after cryopreservation // Cryobiology. – 2014. – V. 69. – P. 339-341.

14. Пономарева Е.Н., Красильникова А.А., Тихомиров А.М., Фирсова А.В. Новые биотехнологические методы криоконсервации репродуктивных клеток осетровых видов рыб //Экология животных, т.11, №1, 2016– С.59-68

15. Sadeghi A. et al. Cryopreservation of stellate (*Acipenser stellatus*) sperm: Effect of different concentrations of DMSO and dilution dates on sperm mobility and motility duration after longterm storage // Global Veterinaria. — 2013. – V. 10. – P. 26-30.

16. Asturiano J.F., Cabrera E., Horvath A. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. //Gen. Comp. Endocrinol. – 2017. – V. 245. – P. 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2016.06.019>.

17. Huang B. X.-R. et al. Effect of cryopreservation on the enzyme activity of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) semen //J. Appl. Ichthyol. – 2014. – V. 30. – P. 1585-1589.

18. Horvath A., Chevre P., Urbanyi B. Sperm cryopreservation in sturgeon with a special focus on *A. sturio*: chap. 35 // In: Biology and conservation of the European sturgeon *Acipenser sturio* L. 1758: the reunion of the European and Atlantic sturgeons. Ed. by Williot P., Rochard E., DesseBerset N., Kirschbaum F., Gessner J./Heidelberg, NLD: Springer, 2011. – P. 465-476.

19. Ciereszko A, Judycka S, Nynca J, Słowinska M, Dietrich M. Factors influencing milt quality in fishes and its usefulness to cryopreservation. //Cryopreservation of fish gametes. – 2020. – P. 25-67. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7_3).

20. Billard R., Cosson J., Crim L.W., Suquet M. //Sperm physiology and quality. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), Brood Stock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell Science, London, England, 1995. – P. 25–52.

21. Cosson J., The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. //Aquac. Int. – 2004. – V. 12. – P. 69–85. <https://doi.org/10.1023/B:AQUI.0000017189.44263.bc>.

22. Белая М.М., Краисльникова А.А. Влияние скорости замораживания на рыбоводные качества спермы осетровых рыб //Товарная аквакультура и искусственное воспроизводство гидробионтов, //Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. 2019. №1. С.83-90 DOI: 10.24143/2073-5529-2019-1-83-90

23. Матросова И. В. Биологические основы рыбоводства: эколого-гистофизиологический подход : учебное пособие / И. В. Матросова. — Находка: Дальрыбвтуз, 2020. — 79 с. — URL: <https://e.lanbook.com/book/156844>

24. Лакин Г.Ф. Биометрия – М.: Высш.школа, 1990.-352 с.

25. Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных. –Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, – 2007, –76 с.

26. Magyary I., Urbányi B., Horváth Á., Dinnyes A. Cryopreservation of gametes and embryos of Cyprinid fishes. Cryopreservation in Aquatic Species, 2 ndEd. Ed. Tiersch T.R., Green Ch.C. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA. 2011. P. 525-538.

## References

1. Anan`ev, V.I. K voprosu o sozdanii nacional'noj sistemy` genofondny`x kollekcij ry`b i drugix gidrobiontov Rossii dlya akvakul'tury` i soxraneniya redkix i ischezayushhix vidov: pravovy`e i normativnometodologicheskie aspekty` / V.I. Anan`ev, M.S. Manoxina // Veterinarnaya patologiya. – 2007. – № 1. – S. 19-24.

2. Asturiano J.F., Cabrera E., Horvath A. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. //Gen. Comp. Endocrinol. – 2017. – V. 245. – P. 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2016.06.019>.

3. Bapsanova, A.M. Kriokonservaciya geneticheskogo materiala dlya soxraneniya redkix i ischezayushhix vidov zhivotny`x / A.M. Bapsanova // Mezhdunarodny`j zhurnal prikladny`x i fundamental'ny`x issledovaniy. – 2012. – № 1. – S. 79.

4. Belaya M.M., Kraisl'nikova A.A. Vliyanie skorosti zamorazhivaniya na ry`bovodny`e kachestva spermy` osetrovy`x ry`b // Tovarnaya akvakul'tura i iskusstvennoe vozproizvodstvo gidrobiontov, //Vestnik AGTU. Ser.: Ry`bnoe xozyajstvo. 2019. №1. S.83-90 DOI: 10.24143/2073-5529-2019-1-83-90

5. Belaya M.M., Krasil'nikova A.A., Ponomareva E.N. Razrabotki yuzhnogo nauchnogo centra RAN v oblasti kriokonservacii reproductivny`x kletok ry`b / Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk, t. 20, № 5(2), 2018 – S 280-286.

6. Belaya M.M., Krasil'nikova A.A., Ponomareva E.N. Razrabotki yuzhnogo nauchnogo centra RAN v oblasti kriokonservacii reproduktivny'x kletok ry'b / *Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*, t. 20, № 5(2), 2018 – S 280-286.
7. Billard R., Cosson J., Crim L.W., Suquet M. //Sperm physiology and quality. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Brood Stock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, London, England, 1995. – P. 25–52.
8. Chipinov, V.G. E'konomicheskaya e'ffektivnost' ispol'zovaniya kriokonservirovannoj spermy' pri vy'rashivanii osetrovy'x vidov ry'b / V.G. Chipinov, M.M. Bogaty'reva // *Aktual'ny'e problemy' obespecheniya prodovol'stvennoj bezopasnosti yuga Rossii: innovacionny'e tekhnologii dlya soxraneniya bioresursov, plodorodiya pochv, melioracii i vodoobespecheniya: materialy' Mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii (27-30 sentyabrya 2011 g., Rostov-na-Donu)*. – Rostov-na-Donu: Izd-vo YuNCz RAN, 2011. – S. 133-135.
9. Ciereszko A, Judycka S, Nynca J, Słowinska M, Dietrich M. Factors influencing milt quality in fishes and its usefulness to cryopreservation. // *Cryopreservation of fish gametes*. – 2020. – P. 25-67. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7_3).
10. Cosson J., The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. // *Aquac. Int.* – 2004. – V. 12. – P. 69–85. <https://doi.org/10.1023/B:AQUI.0000017189.44263.bc>.
11. Dokina O.B., Czvetkova L.I., Pronina L.D., Milenko V.A. Metod kriokonservacii spermy' osetrovy'x ry'b – ob'ektov akvakul'tury'. Akvakul'tura osetrovy'x ry'b: dostizheniya i perspektivy' razvitiya: Materialy' dokladov IV Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii, 13-15 marta 2006 g. Astraxan'. – M.: Izd-vo VNIRO, 2006, S.76-79
12. Dzyuba B. et al. Motility and fertilization ability of starlet *Acipenser ruthenus* testicular sperm after cryopreservation // *Cryobiology*. – 2014. – V. 69. – P. 339-341.
13. Dzyuba B. et al. Spermatozoa motility, cryoresistance, and fertilizing ability in starlet *Acipenser ruthenus* during sequential stripping // *Aquaculture*, 2012. – V. 356-357. – P. 272-278.
14. Horvath A., Chevre P., Urbanyi B. Sperm cryopreservation in sturgeon with a special focus on *A. sturio*: chap. 35 // In: *Biology and conservation of the European sturgeon Acipenser sturio L. 1758: the reunion of the European and Atlantic sturgeons*. Ed. by Williot P., Rochard E., Desse-Berset N., Kirschbaum F., Gessner J. /Heidelberg, NLD: Springer, 2011. – P. 465-476.
15. Huang B. X.-R. et al. Effect of cryopreservation on the enzyme activity of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) semen // *J. Appl. Ichthyol.* – 2014. – V. 30. – P. 1585-1589.
16. Korosov A. V., Gorbach V. V. Komp'yuternaya obrabotka biologicheskix dannyx'. –Petrozavodsk: Izd-vo PetrGU, – 2007, –76 s.
17. Lakin G.F. *Biometriya* – M.: Vy'ssh.shkola, 1990.-352 s.
18. Magyary I., Urbányi B., Horváth Á., Dinnyes A. Cryopreservation of gametes and embryos of Cyprinid fishes. *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2 ndEd. Ed. Tiersch T.R., Green Ch.C. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA, 2011. P. 525-538.
19. Martinez-Paramo S., Horvath A., Labbe C., Zhang T., Robles V., Herraes P., Suquet M., Adams S., Viveiros A., Tiersch T.R., Cabrita E. Cryobanking of aquatic species. // *Aquaculture*, 2016. – V. 472. – P.156–177. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042>.
20. Matishov G.G., Ponomareva E.N., Belaya M.M. Soxranenie geneticheskogo raznoobraziya ry'b metodami nizkotemperaturnogo konservirovaniya // *Ry'bnoe xozyajstvo*. 2012. № 3. S. 59-62
21. Matrosova I. V. *Biologicheskie osnovy' ry'bovodstva: e'kologo-gistofiziologicheskij podxod : uchebnoe posobie / I. V. Matrosova. — Naxodka: Dal'ry'bvtuz, 2020. — 79 s. — URL: <https://e.lanbook.com/book/156844>*
22. Ponomareva E.N., Bogaty'reva M.M., Antonova N.A., Osipova V.P. Optimizaciya processa kriokonservacii spermy' osetrovy'x ry'b pri ispol'zovanii razlichny'x sred // *Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*, t.11, №1(2), 2009. – S.132-134
23. Ponomareva E.N., Krasil'nikova A.A., Tixomirov A.M., Firsova A.V. Novy'e biotexnologicheskie metody' kriokonservacii reproduktivny'x kletok osetrovy'x vidov ry'b // *E'kologiya zhivotny'x*, t.11, №1, 2016– S.59-68
24. Sadeghi A. et al. Cryopreservation of stellate (*Acipenser stellatus*) sperm: Effect of different concentrations of DMSO and dilution dates on sperm mobility and motility duration after longterm storage // *Global Veterinaria*. — 2013. – V. 10. – P. 26-30.
25. Vasil'eva L.M., Smirnova N.V., Yusupova A.Z. K voprosu soxraneniya i vosstanovleniya zapasov osetrovy'x ry'b v Volgo-Kaspijskom bassejne // *Yug Rossii: e'kologiya, razvitie*. 2012. T. 7, N1. S. 73-76. DOI:10.18470/1992-1098-2012-1-73-76
26. Xodorevskaya R.P., Kalmy'kov V.A., Zhilkin A.A. Sovremennoe sostoyanie zapasov osetrovy'x Kaspijskogo bassejna i mery' po ix soxraneniyu. *Vestnik AGTU. Seriya: Ry'bnoe xozyajstvo*. 2012. № 1. S.99-106