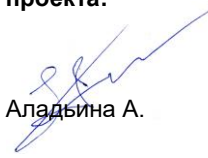


	КОМПАНИЯ: NORTH CASPIAN OPERATING COMPANY N.V.		Контракт: UI176768 Заказ № 4512583596 от 22.05.2023 г. Заказ № 4512585696 от 26.10.2023 г. Заказ № 4512585697 от 26.10.2023 г. Заказ № 4512585699 от 26.10.2023 г.		
	ПРОЕКТ: ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ УСЛУГ МОНИТОРИНГА ЖИВОТНОГО МИРА И БИОРАЗНООБРАЗИЯ В АТЫРАУСКОЙ И МАНГИСТАУСКОЙ ОБЛАСТЯХ				
 	ИСПОЛНИТЕЛИ: КАЗАХСТАНСКОЕ АГЕНТСТВО ПРИКЛАДНОЙ ЭКОЛОГИИ (КАПЭ) ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЭКОЛОГИИ И ЭВОЛЮЦИИ им. А.Н. СЕВЕРЦОВА (ИПЭЭ РАН)				
ИССЛЕДОВАНИЯ КАСПИЙСКОГО ТЮЛЕНЯ В АКВАТОРИИ СЕВЕРНОГО КАСПИЯ. ОСЕНЬ 2023 Г. Раздел 2: Изучение современного состояния популяции каспийского тюленя, как вида-индикатора состояния экосистемы Каспийского моря ОТЧЕТ РЕДАКЦИЯ 01 АННОТАЦИЯ Работы выполнены в рамках Контракта UI176768. Отчет содержит данные по исследованию популяции каспийского тюленя в водах Северного Каспия. Все исследования каспийского тюленя проведены с применением только не инвазивных и малоинвазивных методов, не наносящих или наносящих временный дискомфорт каждому животному и популяции в целом в период их изучения. Исследования биологического материала проведены специалистами Казахстана (НПЦ МиВ) и России (ИПЭЭ РАН).					
Казахстанское Агентство Прикладной Экологии 050000 Казахстан г. Алматы пр. Жибек Жолы, 157 Тел.: +7 727 234 16 89, +7 727 234 22 61 E-mail: office@kape.kz , http://www.kape.kz		Цель выпуска: Для рассмотрения и выдачи замечаний Заказчиком	ДАТА: 25.12.23	СТАДИЯ: Предвари- тельная	Менеджер проекта:  Аладыина А.
		Цель выпуска: Для использования	ДАТА: 28.12.23	СТАДИЯ: Заклучи- тельная	

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	10
1.1. Цель и задачи исследований.....	12
1.2. Распространение документа и целевая аудитория	12
1.3. Определения, сокращения и аббревиатуры.....	12
1.3.1. Общие определения.....	12
1.3.2. Особые термины, определения, сокращения и аббревиатуры.....	12
1.4. Справочные документы и ссылки.....	17
2. РОЛИ И ОБЯЗАННОСТИ	18
3. ПРОГРАММА ПОЛЕВЫХ РАБОТ	20
3.1. План исследований	20
3.2. Сроки и район исследований	20
3.3. Методика полевых работ.....	22
3.3.1. Учет каспийского тюленя	22
3.3.2. Отлов каспийского тюленя.....	23
3.3.3. Морфометрические исследования	24
3.3.4. Отбор волос и вибрисс для токсикологических исследований	26
3.3.5. Отбор крови для токсикологических исследований	26
3.3.6. Отбор волос и вибрисс для гормональных исследований	27
3.3.7. Отбор образцов ткани для генетических исследований	28
3.3.7.1. Отбор образцов крови.....	28
3.3.7.2. Отбор образцов ткани.....	29
3.3.8. Отбор крови и получения плазмы для серологических исследований, и мазка крови	29
3.3.9. Отбор смывов для вирусологических исследований	30
3.3.10. Отбор смывов для молекулярно-вирусологических исследований.....	32
3.3.11. Отбор смывов для молекулярно-бактериальных исследований	33
3.3.12. Отбор ректальных смывов или свежих образцов фекалий для молекулярно-паразитологических исследований.....	35
3.3.13. Отбор смывов для микробиологических исследований	36
3.3.14. Отбор тканей для вирусологических исследований.....	36
3.3.15. Отбор биологического материала для морфологических исследований	37
3.3.16. Мечение животных	38
3.4. Аналитические методы.....	42
3.4.1. Токсикологические исследования на содержание тяжелых металлов	42
3.4.2. Гормональные исследования.....	42
3.4.3. Серологические исследования	43
3.4.4. Протокол обработки проб для морфометрических исследований	43
3.4.5. Микробиологические исследования. Выделение вирусного генома	44
3.4.6. Исследования иммунитета	45
3.4.7. Вирусологические исследования (НПЦ МиВ. РК).....	46
3.4.7.1. Протокол выделения вирусного генома из биологических образцов и синтез комплементарной цепи ДНК.....	46
3.4.7.2. Протокол проведения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).....	46
3.4.7.3. Протокол проведения электрофоретического анализа продуктов ПЦР.....	47
3.4.8. Секвенирование и анализ метагеномных данных.....	47
4. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛЕВЫХ РАБОТ В 2023 Г.	48
4.1. Метеорологические наблюдения.....	48
4.2. Учет численности тюленей	49
4.3. Обследование каспийского тюленя в 2023 г.	51
4.3.1. Возрастно-половой состав.....	52
4.3.2. Повреждения кожно-волосного покрова и другие визуальные отклонения.....	52
4.3.3. Размер и масса	53
4.3.4. Ультразвуковая диагностика (УЗИ, УЗ-диагностика)	53
4.4. Перемещения каспийского тюленя по данным спутниковых радиомаяков	54
4.5. Результаты анализа биологического материала	62
4.5.1. Вирусологический и бактериальный анализ (НПЦ МиВ РК).....	62
4.5.1.1. Вирусологический скрининг на наличие возбудителей вирусных болезней каспийского тюленя	63

4.5.1.2.	Исследование вирусного метагенома каспийского тюленя	66
4.5.1.3.	Характеристика микробиома каспийских тюленей респираторного, желудочно-кишечного и урогенитальных трактов путем секвенирования гена 16S рибосомальной РНК микрофлоры	71
4.5.1.4.	Серологическое исследование циркуляции вирусов гриппа А и вируса чумы плотоядных (CDV) популяции каспийских тюленей в 2019-2023 г.	74
4.5.1.5.	Молекулярное исследование паразитофауны каспийского тюленя	74
4.5.2.	Микробиологические исследования	75
4.5.2.1.	Назальный микробиом	75
4.5.2.2.	Ректальный микробиом.....	78
4.5.2.3.	Урогенитальный микробиом.....	80
4.5.2.4.	Функциональные возможности микробиома каспийского тюленя	82
4.5.3.	Токсикологические исследования	85
4.5.3.1.	Содержание ртути в шерсти	85
4.5.3.2.	Содержание ртути в вибриссах.....	87
4.5.3.3.	Содержание ртути в крови	90
4.5.4.	Гормональные исследования.....	91
4.5.4.1.	Гормоны в крови	91
4.5.4.2.	Гормоны в волосах	93
4.5.4.3.	Гормоны в вибриссах.....	95
4.5.5.	Серологические исследования	99
4.5.6.	Исследования иммунитета	100
5.	СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ С ДАННЫМИ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	102
5.1.	Учет численности	102
5.2.	Прослеживание тюленей	103
5.3.	Вирусологические исследования	114
5.4.	Микробиологические исследования.....	115
5.5.	Токсикологические исследования.....	117
5.6.	Гормональные исследования	121
5.6.1.	Межгодовые различия гормонов в разных половозрастных группах	121
5.6.2.	Анализ шерсти разных участков тела	126
5.6.3.	Кортизол	126
5.6.4.	Тестостерон.....	127
5.6.5.	Прогестерон	127
5.6.6.	Оценка процентаяловости самок	128
5.7.	Серологические исследования	128
5.8.	Исследования иммунитета.....	131
6.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	133
7.	РЕКОМЕНДАЦИИ.....	136
8.	ЛИТЕРАТУРА	138
ПРИЛОЖЕНИЕ А	ОБЪЕМ РАБОТ	150
ПРИЛОЖЕНИЕ В	ПЕРЕЧЕНЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБ.....	153
ПРИЛОЖЕНИЕ С	ТАБЛИЧНЫЕ ДАННЫЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	155
ПРИЛОЖЕНИЕ D	ДАННЫЕ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА.....	162
ПРИЛОЖЕНИЕ E	ФОТОМАТЕРИАЛЫ	166

СПИСОК ТАБЛИЦ

Таблица 3.3-1	Технические характеристики DJI Mavic 2 Pro (БПЛА)	23
Таблица 3.3-2	Техническая характеристика радиомаяка «Пульсар»	39
Таблица 3.3-3	Погрешность классов точности	39
Таблица 3.4-1	Контроль качества	42
Таблица 3.4-2	Последовательности специфических праймеров к генам вирусов.....	46
Таблица 3.4-3	Параметры термоциклирования ПЦР с различными праймерами	47
Таблица 4.2-1	Координаты обследованных шалыг в ноябре 2023 г.	50
Таблица 4.2-2	Количество учтенных тюленей, НИС «Наутилус-один», ноябрь 2023 г.	50
Таблица 4.2-3	Плотность распределения тюленей в казахстанской части Северного Каспия, 2023 г.....	51
Таблица 4.3-1	Количество отловленных живых тюленей в разных возрастных группах ..	52
Таблица 4.3-2	Размеры тюленей в возрастных группах, 2023 г.	53

Таблица 4.4-1	Информация об установленных передатчиках по состоянию на 16.12.2023 г.....	54
Таблица 4.4-2	Информация об установленных передатчиках по состоянию на 10.03.2024 г.....	55
Таблица 4.4-3	Количество дней в месяц, в которые метки передавали сигналы	55
Таблица 4.5-1	Образцы биоматериала отобранного у живых тюленей, ноябрь 2023 г. ...	62
Таблица 4.5-2	Результаты ПЦР скрининга материалов каспийских тюленей на наличие фрагментов генома вирусов	63
Таблица 4.5-3	Количество контигов для семейств, родов и видов вирусов каспийских тюленей с максимальным покрытием, процентом идентичности выравнивания и максимальной длиной контига	67
Таблица 4.5-4	Показатели альфаразнообразия микробиомов слизистых оболочек каспийской нерпы (Mean $\pm$ SD).....	75
Таблица 4.5-5	Частотное распределение концентраций ртути в шерсти исследованных особей каспийского тюленя	85
Таблица 4.5-6	Частотное распределение концентраций ртути в вибриссах исследованных особей каспийского тюленя	87
Таблица 4.5-7	Частотное распределение концентраций ртути в крови исследованных особей каспийского тюленя	90
Таблица 4.5-8	Концентрация гормонов в плазме крови каспийского тюленя.....	91
Таблица 4.5-9	Концентрация гормонов в волосах каспийского тюленя	94
Таблица 4.5-10	Концентрация гормонов в сегментах вибрисс каспийского тюленя.....	95
Таблица 4.5-11	Серопозитивность каспийского тюленя к различным патогенам	100
Таблица 4.5-12	Сводные данные по серопозитивности к различным патогенам к различным патогенам.....	100
Таблица 5.1-1	Результаты учета численности каспийского тюленя в акватории	102
Таблица 5.5-1	Частотное распределение концентраций ртути в шерсти каспийского тюленя	117
Таблица 5.5-2	Частотное распределение концентраций ртути в вибриссах каспийского тюленя	117
Таблица 5.5-3	Частотное распределение концентраций ртути в крови каспийской нерпы	118
Таблица 5.5-4	Результаты попарного сравнения концентраций ртути в биоматериалах каспийского тюленя разного пола (U критерий Манна-Уитни) и коэффициенты корреляции Спирмена между концентрацией ртути в биоматериалах с длиной, массой и возрастом тюленей в разные годы исследований.....	119
Таблица 5.5-5	Коэффициенты корреляции Спирмена (RS) между концентрацией ртути в биоматериалах каспийского тюленя в разные годы исследования.....	119
Таблица 5.5-6	Уровни содержания ртути в шерсти различных видов ластиногих.....	120
Таблица 5.6-1	Количество каспийских тюленей разных половозрастных категорий и статуса наличия беременности в выборках 2019-2023 гг.	121
Таблица 5.7-1	Сводные данные по проценту серопозитивности каспийских тюленей к различным патогенам в течение всех лет исследований.....	128

СПИСОК РИСУНКОВ

Рисунок 3.2.1	Научно-исследовательское судно «Наутилус-один»	20
Рисунок 3.2.2	Маршруты движения судов и научной группы в ноябре 2023 г.	21
Рисунок 3.3.1	Отлов тюленей.....	23
Рисунок 3.3.2	Средства для отлова и транспортировки тюленей	24
Рисунок 3.3.3	Измерение тюленя.....	24
Рисунок 3.3.4	Исследования когтей передней лапы	25
Рисунок 3.3.5	Техника забора крови.....	27
Рисунок 3.3.6	Радиометка серии «Пульсар»	38
Рисунок 3.3.7	Карта-схема пространственной фильтрации данных на примере метки №252216 с помощью SDA-фильтра.....	40
Рисунок 4.1.1	График среднесуточной температуры воздуха, ноябрь 2023 г.	48
Рисунок 4.1.2	График среднесуточного атмосферного давления	48
Рисунок 4.1.3	Роза ветров в период проведения исследований	49

Рисунок 4.2.1	Схема точек встреч каспийского тюленя по маршруту движения судна	50
Рисунок 4.3.1	Нарушения кожно-волосного покрова и другие отклонения у отловленных тюленей	52
Рисунок 4.3.2	Определение беременности с помощью УЗ-диагностики	54
Рисунок 4.4.1	Треки всех тюленей, помеченных в ноябре 2023 г. (до 10.03.2024 г.).....	56
Рисунок 4.4.2	Треки перемещений (А) и ключевые места обитания тюленей (В) в ноябре 2023 г.	57
Рисунок 4.4.3	Треки перемещений (А) и ключевые места обитания тюленей (В) в декабре 2023 г.	57
Рисунок 4.4.4	Треки перемещений (А) и ключевые места обитания тюленей (В) в январе 2024 г.	58
Рисунок 4.4.5	Треки перемещений (А) и ключевые места обитания тюленей (В) в феврале 2024 г.	59
Рисунок 4.4.6	Треки перемещений (А) и ключевые места обитания тюленей (В) в марте 2024 г.	59
Рисунок 4.4.7	Активность помеченных животных в период с ноября по март.....	60
Рисунок 4.4.8	Скорость перемещений помеченных животных в период с ноября по март (км/ч)	60
Рисунок 4.4.9	Дистанция до берега	61
Рисунок 4.4.10	Глубины акваторий в местах регистрации помеченных животных	61
Рисунок 4.5.1	Воспаление конъюнктивы и острый гнойно-катаральный ринит у каспийских тюленей (ноябрь 2023 г.).....	62
Рисунок 4.5.2	Электрофореграмма результатов исследования продуктов ПЦР из биопроб от каспийских тюленей в 2% агарозном геле после амплификации с праймерами к <i>rol</i> гену аденовирусов.....	64
Рисунок 4.5.3	Электрофореграмма результатов исследования продуктов ПЦР из биопроб от каспийских тюленей в 2% агарозном геле после амплификации с праймерами к <i>Us2</i> гену герпесвирусов	64
Рисунок 4.5.4	Филогенетическое древо консенсусных последовательностей фрагмента гена ДНК-зависимой ДНК полимеразы аденовирусов каспийских тюленей, состоящей из 240 нуклеотидных последовательностей	65
Рисунок 4.5.5	Филогенетическое древо консенсусных последовательностей фрагмента ДНК-полимеразы (DPOL) герпесвируса, состоящей из 175 нуклеотидов последовательности.....	66
Рисунок 4.5.6	Характеристика виroma ротовых, носовых, урогенитальных и ректальных смывов взрослых особей самок каспийских тюленей	68
Рисунок 4.5.7	Характеристика виroma внутренних органов павших каспийских тюленей.....	68
Рисунок 4.5.8	Соотношение контигов, связанных с вирусами разных семейств	69
Рисунок 4.5.9	Основные бактериальные таксоны в образцах носовых, ротовых, ректальных и урогенитальных мазков взрослых самок каспийского тюленя	72
Рисунок 4.5.10	Основные бактериальные таксоны в образцах тканей внутренних органов павших каспийских тюленей	73
Рисунок 4.5.11	Профиль микробиома самок и самцов каспийского тюленя.....	73
Рисунок 4.5.12	Структура микробиома назальной слизи каспийского тюленя на уровне филумов.....	76
Рисунок 4.5.13	Индивидуальная структура микробиома назальной слизи каспийского тюленя на уровне филумов	76
Рисунок 4.5.14	Структура микробиома назальной слизи каспийской нерпы на уровне семейств	77
Рисунок 4.5.15	Преобладающие рода микроорганизмов назальной слизи каспийского тюленя	78
Рисунок 4.5.16	Структура микробиома ректальной слизи каспийской нерпы на уровне филумов.....	78
Рисунок 4.5.17	Индивидуальная структура микробиома ректальной слизи каспийского тюленя на уровне филумов	79
Рисунок 4.5.18	Индивидуальная структура микробиома ректальной слизи каспийского тюленя на уровне семейств.....	79
Рисунок 4.5.19	Структура микробиома урогенитальной слизи каспийского тюленя на уровне филумов.....	80

Рисунок 4.5.20	Индивидуальная структура микробиома урогенитальной слизи каспийского тюленя на уровне филумов	81
Рисунок 4.5.21	Индивидуальная структура микробиома урогенитальной слизи каспийского тюленя на уровне семейств	81
Рисунок 4.5.22	Преобладающие рода микроорганизмов ректальной (синий) и урогенитальной (оранжевый) слизи каспийского тюленя	82
Рисунок 4.5.23	Представленность ферментов катаболизма жирных кислот, углеводов и аминокислот на ректальной, назальной и вагинальной слизи каспийской нерпы по данным PICRUST-анализа	83
Рисунок 4.5.24	Демонстрация сходства функциональных возможностей ректального микробиома (красные маркера), вагинального микробиома (синие маркера) и назального микробиома (зеленые маркера) методом главных компонент	83
Рисунок 4.5.25	Сравнение функциональных возможностей микробиомов ректальной, назальной и вагинальной слизи каспийской нерпы по данным KEGG-анализа	85
Рисунок 4.5.26	Содержание ртути в шерсти самцов и самок исследованных особей каспийского тюленя	86
Рисунок 4.5.27	Связь концентраций ртути в шерсти с длиной тела каспийского тюленя ..	86
Рисунок 4.5.28	Связь концентраций ртути в шерсти с массой тела каспийского тюленя ..	87
Рисунок 4.5.29	Связь концентраций ртути в шерсти с возрастом каспийского тюленя	87
Рисунок 4.5.30	Сравнительное содержание ртути в вибриссах у самцов и самок каспийского тюленя	88
Рисунок 4.5.31	Сравнительное содержание ртути в шерсти и вибриссах каспийского тюленя	88
Рисунок 4.5.32	Связь концентраций ртути в вибриссах и шерсти каспийского тюленя	89
Рисунок 4.5.33	Содержание ртути в вибриссах исследованных особей каспийского тюленя в зависимости от возраста (А), длины (В) и массы (С) тела	89
Рисунок 4.5.34	Связь концентраций ртути в крови и в вибриссах каспийского тюленя	90
Рисунок 4.5.35	Содержание ртути в крови каспийского тюленя в зависимости от содержания ртути в шерсти (А), возраста (В), длины тела (С) и массы тела (D) животного	91
Рисунок 4.5.36	Концентрация тестостерона в крови у взрослых и молодых самок каспийского тюленя	93
Рисунок 4.5.37	Концентрация прогестерона в крови у каспийских тюленей с разным статусом наличия беременности	93
Рисунок 4.5.38	Концентрация гормонов в волосах каспийского тюленя, собранных из области холки и поясницы	94
Рисунок 4.5.39	Концентрация кортизола в волосах взрослых и молодых самок каспийского тюленя	95
Рисунок 4.5.40	Концентрация кортизола в сегментах вибрисс каспийского тюленя	97
Рисунок 4.5.41	Концентрация тестостерона в сегментах вибрисс каспийского тюленя	97
Рисунок 4.5.42	Концентрация прогестерона в сегментах вибрисс каспийского тюленя	98
Рисунок 4.5.43	Концентрация кортизола в сегментах вибрисс каспийского тюленя разного пола, возраста и статуса наличия беременности	98
Рисунок 4.5.44	Концентрация тестостерона в сегментах вибрисс каспийского тюленя разного пола, возраста и статуса наличия беременности	99
Рисунок 4.5.45	Концентрация прогестерона в сегментах вибрисс каспийского тюленя разного пола, возраста и статуса наличия беременности	99
Рисунок 4.5.46	Уровень лизоцима у каспийского тюленя различных возрастных групп ..	101
Рисунок 5.2.1	Треки помеченных тюленей	104
Рисунок 5.2.2	Ключевые участки обитания помеченных тюленей	106
Рисунок 5.2.3	Ледовые карты Северного Каспия	108
Рисунок 5.2.4	Активность перемещений тюленей	109
Рисунок 5.2.5	Индексы скорости (для 2019 и 2020 гг.) и абсолютное значение скорости (для 2022 и 2023 гг.), км/ч	110
Рисунок 5.2.6	График изменения широты сигналов (1 точка в день), полученных от самок	111
Рисунок 5.2.7	Расстояние до береговой линии	111
Рисунок 5.2.8	Глубины районов обитания по месяцам для самок и самцов	112

Рисунок 5.2.9	Расстояние до кромки льда для самок	113
Рисунок 5.4.1	Анализ бета-разнообразия ректального (красный маркер), вагинального (зеленый маркер) и назального (синий маркер) микробиомов каспийского тюленя	116
Рисунок 5.4.2	Диаграмма Вена распределения ОТЕ между слизистыми	116
Рисунок 5.5.1	Содержание ртути в шерсти каспийского тюленя в разные годы исследований	118
Рисунок 5.5.2	Содержание ртути в вибриссах каспийского тюленя в разные годы исследований	118
Рисунок 5.5.3	Содержание ртути в крови каспийского тюленя в разные годы исследований	119
Рисунок 5.6.1	Концентрация кортизола в крови молодых самцов из выборок 2020 и 2023 гг.	122
Рисунок 5.6.2	Концентрация прогестерона в крови молодых самцов из выборок 2020 и 2023 гг.	122
Рисунок 5.6.3	Концентрация кортизола в волосах молодых самок из выборок 2020, 2020 и 2023 гг.	123
Рисунок 5.6.4	Концентрация прогестерона в крови молодых самок из выборок 2020, 2022 и 2023 гг.	123
Рисунок 5.6.5	Концентрация прогестерона в волосах молодых самок	124
Рисунок 5.6.6	Концентрация прогестерона в крови яловых самок из выборок 2020, 2022 и 2023 гг.	124
Рисунок 5.6.7	Концентрация прогестерона в волосах яловых самок из выборок 2020, 2022 и 2023 гг.	125
Рисунок 5.6.8	Концентрация кортизола в волосах беременных самок из выборок 2020, 2022 и 2023 гг.	125
Рисунок 5.6.9	Концентрация прогестерона в волосах беременных самок из выборок 2020, 2022 и 2023 гг.	126
Рисунок 5.7.1	Количество животных, серопозитивных к различному числу патогенов ..	129
Рисунок 5.7.2	Доля серопозитивных животных	130

Настоящий документ подготовлен для компании «North Caspian Operating Company N.V.»:

Подрядчик	Субподрядчик
ТОО «Казахстанское Агентство Прикладной Экологии» (КАПЭ) 050010 Казахстан, г.Алматы, ул.Жибек Жолы 157 Тел.: +7 727 234 16 89, +7 727 234 22 61 E-mail: office@kape.kz http://www.kape.kz	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт проблем экологии и эволюции им.А.Н.Северцова» Российской академии наук (ИПЭЭ РАН) 119071, Россия, г.Москва, Ленинский проспект, д.33. Тел.: +7 (495) 954-75-53, 952-20-88 Факс.: +7 (495) 954-55-34 E-mail: admin@sevin.ru
Контактное лицо	Контактное лицо
Аладина А. П. Тел.: +7 727 272 64 86 Факс.: +7 727 239 10 49 E-mail: a.aladina@kape.kz	Найденко С.В. Тел.: +7 (495) 954-75-53 Факс.: +7 (495) 954-55-34 E-mail: admin@sevin.ru; director@sevin.ru
Субподрядчик	Субподрядчик
	ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии» (НПЦ МиВ) 050010, Казахстан, г.Алматы, ул. Богенбай батыра, 105. Тел.: +7 (727) 291-84-97 Факс.: +7 (727) 291-84-96 E-mail: kydyrmanov@yandex.kz
Контактное лицо	Контактное лицо
	Кыдырманов А.И. Тел.: +7 (727) 291-84-97 Факс.: +7 (727) 291-84-96 E-mail: kydyrmanov@yandex.kz

В подготовке отчета приняли участие следующие специалисты:

Федор Климов	Исполнительный директор, «КАПЭ»
Анна Аладина	Менеджер проекта, «КАПЭ»
Алексей Муляев	Главный специалист, «КАПЭ»
Вячеслав Бойко	Главный специалист, «КАПЭ»
Олег Бедненко	Главный специалист, «КАПЭ»
Анатолий Левин	Главный специалист, «КАПЭ»
Канат Алишев	Главный специалист, «КАПЭ»
Олег Кочнев	Главный специалист, «КАПЭ»
Светлана Сургутская	Главный специалист, «КАПЭ»
Бибигуль Абдусаматова	Ведущий специалист, «КАПЭ»
Эрнар Рахимов	Главный специалист, «КАПЭ»
Айсауле Жанатова	Ведущий специалист, «КАПЭ»
Айдын Кыдырманов	Заведующий лабораторией, д.вет.н., «НПЦ МиВ»
Кобей Карамендин	Ведущий научный сотрудник, к.вет.н., «НПЦ МиВ»
Ермухаммет Касымбеков	Старший научный сотрудник, «НПЦ МиВ»
Темірлан Сабыржан	Младший научный сотрудник, «НПЦ МиВ»
Сардор Нуралибеков	Младший научный сотрудник, «НПЦ МиВ»
Сергей Найденко	Директор, д.б.н., профессор РАН, «ИПЭЭ РАН»
Вячеслав Рожнов	Заведующий лабораторией, академик РАН, д.б.н., «ИПЭЭ РАН»
Сергей Найденко	Главный научный сотрудник, директор, д.б.н., «ИПЭЭ РАН»
Мария Соловьева	Старший научный сотрудник, к.б.н., «ИПЭЭ РАН»
Дмитрий Глазов	Ведущий инженер, «ИПЭЭ РАН»
Полина Шибанова	Младший научный сотрудник, «ИПЭЭ РАН»
Полина Ильина	Младший научный сотрудник, «ИПЭЭ РАН»

Максим Вечерский	Старший научный сотрудник, к.б.н., «ИПЭЭ РАН»
Полина Ключникова	Ведущий инженер, «ИПЭЭ РАН»
Алексей Суров	Главный научный сотрудник, зам.дир., д.б.н. «ИПЭЭ РАН»
Никита Платонов	Старший научный сотрудник, к.т.н., «ИПЭЭ РАН»
Давид Хайруллин	Ведущий инженер, «ИПЭЭ РАН»
Глеб Пилипенко	Лаборант экспедиции, «ИПЭЭ РАН»
Виктор Комов	Главный научный сотрудник, «ИПЭЭ (ИБВВ) РАН»
Юрий Удоденко	Старший научный сотрудник, «ИПЭЭ (ИБВВ) РАН»
Вячеслав Мищенко	Главный специалист, «КАПЭ»
Ирина Орлова	Главный специалист, «КАПЭ»
Александр Чернов	Начальник отдела ГИС «КАПЭ»
Инна Сапожникова	Главный специалист, отдела ГИС «КАПЭ»
Елена Фомина	Главный специалист, отдела ГИС «КАПЭ»
Владимир Даниленко	Перевод отчета на английский язык, «КАПЭ»
Галия Джумабаева	Перевод отчета на английский язык, «КАПЭ»
Светлана Соломенцева	Оформление, выпуск отчета, «КАПЭ»

1. ВВЕДЕНИЕ

Мониторинг состояния популяций морских млекопитающих – одна из важных направлений в экологических исследованиях, как неотъемлемый компонент стратегии сохранения дикой природы и контроля потенциальной угрозы здоровью людей и животных. Морские млекопитающие многих акваторий используются как виды-индикаторы для средне- и долгосрочных наблюдений за изменениями, происходящими во внешней среде [Aguilar, Borrell, 1994].

Каспийская нерпа или каспийский тюлень (*Pusa caspica*, Gmelin, 1788) – единственный вид морских млекопитающих, обитающий в Каспии. Эндемик, он играет уникальную роль в экосистеме Каспия, являясь замыкающим звеном в трофической цепи каспийской водной экосистемы, обитает во всей акватории моря и может считаться видом-индикатором ее состояния.

С 2008 г. каспийский тюлень имеет охранный статус Endangered (находящийся под угрозой исчезновения) в Красном списке Международного союза охраны природы. В 2017 г. более 100 стран отнесли каспийского тюленя к видам, которым угрожает исчезновение. По решению ООН, принятому в рамках Конвенции по сохранению мигрирующих видов диких животных (Боннская конвенция) на 12-й сессии Конференции Сторон, каспийский тюлень включен в Приложения I и II к Конвенции [Annexes I et II de la Convention, 2018]. Это подразумевает необходимость запрета на промысел тюленя и обязывает страны-участники Конвенции прилагать максимальные усилия для сохранения и восстановления популяции, защиты мест обитания, устранения препятствий на путях миграции, уменьшения воздействия неблагоприятных факторов [Конвенция, 2003].

Ареал обитания каспийского тюленя расположен на территории пяти прикаспийских государств: России, Казахстана, Азербайджана, Туркменистана и Ирана. В 1993 г. вид занесен в Красную книгу Азербайджана, в 2011 г. – в Красную книгу Туркменистана. В Иране принят охранный статус Endangered – находящийся под угрозой исчезновения, определенный Международным союзом охраны природы. В 2020 г. каспийский тюлень был внесен в Красные книги Российской Федерации и Республики Казахстан.

По данным международной группы исследователей из Казахстана, России и европейских стран, проводивших визуальные авиа учеты в казахстанской акватории моря, численность вида на Каспии за 105 лет (с 1900 по 2005 гг.) уменьшилась с 1,2 млн. особей до 168 тыс. – на 86% [Harkonen et al., 2012]. По данным визуальной и мультиспектральной авиа съемки 2012 и 2022 гг., выполненной российскими, казахстанскими и британскими специалистами, на акватории Северного Каспия расчетное количество тюленей составило 270 – 311 тыс. особей [Кузнецов и др., 2013; КАПЭ, ВНИРО, 2022].

Основными критическими угрозами для каспийского тюленя являются: прилов при незаконном рыболовстве, а также рост нелегальной добычи тюленей (умышленного лова с использованием осетровых орудий лова и нелегального боя), который стимулируется повышенным рыночным спросом на тюленьи шкуры и жир как на рынках Прикаспия, так и в других регионах.

Серьезными угрозами также считаются фактор беспокойства и деградация среды обитания. К умеренным угрозам относятся болезни каспийского тюленя, в том числе массовые эпизоотии, паразитарные инвазии, биоаккумуляция токсикантов, вызывающие иммунодепрессию, патоморфологическое нарушение внутренних органов, в том числе и репродуктивных. Потенциальными угрозами, требующими внимания, но в настоящее время не оцененными с точки зрения воздействия на популяцию, следует считать: влияние загрязнений на пищевую цепь; перевылов объектов питания (рыбы); распространение инвазивных видов; деградацию/утрату местообитаний тех видов рыб, которые составляют основу питания тюленей; изменение климата, вызывающее сокращение ледовых полей (мест размножения тюленей) и чрезмерный нагрев поверхностных вод Каспийского моря летом.

Российские и казахстанские территориальные воды Каспия, особенно северная часть (Северный Каспий), являются наиболее важной зоной для каспийского тюленя. С осени до середины весны основная часть популяции, совершающая миграции по всему морю, концентрируется на Северном Каспии для одного из значимых этапов жизненного цикла – размножения. Вместе с тем, казахстанские и российские территориальные воды являются зоной растущего антропогенного воздействия на морскую экосистему, что оказывает влияние на благополучие популяции каспийского тюленя.

В настоящее время далеко не все известно о биологии и экологии каспийского тюленя. Нет стабильной информации об общей численности животных, слабо изучены миграционные пути и особенности использования акватории, в том числе – изменения перемещений в зависимости от воздействия факторов среды. Не исследована циркуляция различных заболеваний в популяции и не оценен уровень иммунитета животных. Отсутствует информация об их гормональном статусе и представление о генетической структуре вида. Отсутствует достоверный не инвазивный способ определения возраста тюленей. Все эти сведения необходимы для разработки адекватных и эффективных мер охраны данного вида.

В целях обеспечения охраны окружающей среды, сохранения биологического разнообразия в части каспийского тюленя и ключевых мест его обитания в Каспийском море, в пределах юрисдикции Российской Федерации и Республики Казахстан утверждена «Программа исследований каспийского тюленя в акватории Северного Каспия на 2019-2023 годы». Данная Программа исследований разработана с учетом условий и требований Конвенции о правовом статусе Каспийского моря, подписанной 12 августа 2018 года.

В основу Программы заложены изложенные в Конвенции принципы охраны природной среды Каспийского моря - сохранения, восстановления и рационального использования его биологических ресурсов и содействия проведению научных исследований в области экологии, сохранения и использования биологических ресурсов Каспийского моря.

В настоящее время далеко не всё известно о биологии и экологии каспийского тюленя. Отсутствует информация о точной численности животных, слабо известны их миграционные пути и особенности использования акватории, в том числе – изменения перемещений в зависимости от воздействия факторов среды. Не исследована циркуляция различных заболеваний в популяции и не оценен уровень иммунитета животных. Отсутствует информация об их гормональном статусе и представление о генетической структуре вида. Возбудители вирусных заболеваний морских млекопитающих выявляются только после массовых вспышек инфекций, достигших эпизоотических масштабов. Следовательно, существует потребность в упрощающих диагностических методах для своевременного выявления новых вирусов с зоонозным потенциалом, способных вызывать вспышки болезней, в целях разработки эффективной стратегии борьбы с опустошающими эпизоотиями уязвимых видов животных. Заболевания бактериальной природы могут быть как самостоятельными, так и вторичными или оппортунистическими инфекциями. В связи с этим, важным представляется изучение как нормальной, условно патогенной, так и патогенной микрофлоры у каспийского тюленя, что позволит оценить их роль в общей патологии при массовых вспышках инфекционных заболеваний.

Весной 2000 г. была установлена морбилливирусная этиология массовой гибели каспийского тюленя [Kennedy et al., 2000, Kuiken et al., 2000]. Изучена эволюция морбиллируса у каспийского тюленя в 2000 г., путем восстановления полноразмерных последовательностей генома из архивных материалов с использованием метода секвенирования следующего поколения [Jo et al., 2019]. В последние годы, благодаря исследованиям с использованием современных методов молекулярной диагностики, был идентифицирован герпесвирус каспийского тюленя. Тюлений герпесвирус PhHV-1 был обнаружен в образцах, собранных в 2016 г. [Кыдырманов и др., 2019].

С применением метода массового параллельного секвенирования сотрудниками лаборатории экологии вирусов «НПЦ микробиологии и вирусологии» предварительно изучен состав вирусных метапопуляций каспийского тюленя, выявлены контингенты вирусов, принадлежащих к семействам: *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Pneumoviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, и *Papillomaviridae*. В ходе недавних исследований 2023 г., были идентифицированы три новых вируса каспийского тюленя, которые предварительно отнесены к *parvovirus-like* (*seal parvovirus type*), *annellvirus-like* (*Seal anellovirus type*) и *circovirus-like* (*Fur seal circovirus type*) вирусам.

В январе 2023 г. специалистами из Республики Казахстан на Дагестанском побережье Каспийского моря были подвергнуты ПЦР скринингу пробы тканей собранных от павших тюленей. В результате ОТ-ПЦР с праймерами к Р-гену морбилливирусов (чума плотоядных), ожидаемые продукты в 429 п.о. выявлены в тканях легких у 34 тюленей. Для контроля специфичности использовали живую модифицированную вакцину к вирусу чумы плотоядных (Pfizer, США). Для определения инфицированности тюленей ортомиксовирусами провели ОТ-ПЦР с праймерами к М-гену вируса гриппа А (H5N1). В результате электрофореза в 2% агарозном геле ожидаемые продукты ПЦР в 279 п.о. выявлены в пробах легких девяти тюленей. Таким образом, в исследованных пробах каспийских тюленей с дагестанского побережья моря, зимой 2023 года, одномоментно обнаружены возбудители гриппозной и морбилливирусной инфекций у погибших тюленей.

Осенью 2023 г. проведены исследовательские работы в соответствии с Контрактом U1176768, Наряд-заказов № 4512583596 и № 4512585696. Выполненный Объем работ является частью вышеназванной Программы (**Приложение А**).

1.1. Цель и задачи исследований

Цель исследований: Оценка численности, распределения и благополучия популяции каспийского тюленя на акватории Северного Каспия в 2023 году.

Задачи исследования:

- отлов тюленей, выполнение морфометрических исследований, отбор биологического материала для токсикологических, физиологических (серологических и гормональных), вирусологических и микроскопических исследований согласно Программы «Исследования каспийского тюленя в акватории северного Каспия в 2019-2023 гг.», утвержденной Компанией от 3 июля 2019 г.;
- изучение путей перемещения каспийского тюленя с применением спутниковой телеметрии путем установки не менее 10 спутниковых радиомаяков на отловленных животных в акватории Северного Каспия в весенний период;
- проведение учета численности тюленей на маршрутах движения судов, залежках, в местах проведения полевых работ в осенний период;
- разработка предложений по сохранению популяции.

1.2. Распространение документа и целевая аудитория

Если не предусмотрено иных разрешений от компании NCOC N.V., данный документ предназначен для внутреннего пользования в компании NCOC N.V.

1.3. Определения, сокращения и аббревиатуры

1.3.1. Общие определения

Компания – означает North Caspian Operating Company N.V. (NCOC N.V.).

«Подрядчик» означает сторону, предоставляющую Компании услуги в течение срока действия Контракта на основе Наряд-заказов, включающие руководство проектом и подготовительные работы, полевые исследовательские работы, аналитические исследования и отчетность.

«Поставщик» (Изготовитель/Поставщик) означает сторону, которая производит или поставляет оборудование и услуги для выполнения обязательств, указанных Подрядчиком.

Слово **«должен»** означает, что какое-либо положение подлежит обязательному исполнению.

Слово **«следует»** означает, что какое-либо положение не является обязательным, но рекомендуется к исполнению в качестве рациональной практики ведения работ.

1.3.2. Особые термины, определения, сокращения и аббревиатуры

Список сокращений:

Термин / Сокращение / Аббревиатура	Толкование / определение
AIS	Автоматическая идентификационная система слежения за передвижением судов (Automatic Identification System)
BLAST	Средство поиска основного локального выравнивания (Basic Local Alignment Search Tool)
E	Восточная долгота
GPS	Глобальная система позиционирования (Global Positioning System)
HPAI-вирусы	Высоко патогенный вирус гриппа А (Highly pathogenic avian influenza)
LC50	50-процентная летальная концентрация
LPAI-вирусы	Низко патогенный вирус гриппа А (Highly pathogenic avian influenza)
N	Северная широта
N (NA)	Нейраминидаза

Термин / Сокращение / Аббревиатура	Толкование / определение
NMDA	N-метил-D-аспартат (NMDA) глутаматные рецепторы
RhHV-1	Герпесвирус типа 1
TSPMe	Трис-(4-хлорфенил)-метан
TSPMON	Трис-(4-хлорфенил)-метанол
TEQ	Токсический эквивалент
ZcAV	Аннеловирус калифорнийских морских львов
НП	Нефтепродукты
ТХДД	Тетрахлордibenзо-п-диоксин
АрУ	Ароматические углеводороды
БАФ	Фактор биоаккумуляции
БПК	Биохимическое потребление кислорода
БПЛА	Беспилотный летательный аппарат
ВГ	Вирус гриппа
ВГА	Вирус гриппа А
ВГП	Вирус гриппа птиц
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВЧП	Вирус чумы плотоядных
ГБЦД	Гексабромциклододекан
ГХ/МС	Сочетание газовой хроматографии и масс-спектрометрии
ГХБ	Гексахлорбензол
ГХЦГ	Гексахлорциклогексан
ДДД	Дихлордифенилдихлорэтилен
ДДТ	1,1,1-трихлор-2,2-бис(4-хлорфенил) этан)
ДЗЗ	Дистанционное зондирование Земли
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДУ	Допустимый уровень
ИБВВ РАН	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук.
ИЛ ХАЦ КАПЭ	Испытательная лаборатория Химико-Аналитического центра ТОО «Казахстанское агентство прикладной экологии»
ИПЭЭ РАН	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук
ИФА	Иммуноферментный анализ
кДНК	Комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
КСКМ	Казахстанский сектор Каспийского моря
КК РФ	Красная книга Российской Федерации
ММ	Морские млекопитающие
МП	Морские птицы
МСОП	Международный Союз Охраны Природы (IUCN)
Н (НА)	Гемагглютинин
НИС	Научно-исследовательское судно
ОЗТОСиБ	Охрана здоровья, труда, окружающей среды и безопасности
ОРВИ	Острые респираторные вирусные инфекции
ОТ-ПЦР	Обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция
ПАУ	Полициклические ароматические углеводороды
ПБДЭ	Полибромированные дифениловые эфиры
ПДК	Предельно допустимая концентрация
п.о.	Парное основание
ПХБ	Полихлорированные бифенилы
пхдд/пхдф	Полихлорированные дibenзо-п-диоксины и Полихлорированные дibenзофураны
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
РГА	Реакция гемагглютинации
РК	Республика Казахстан
РНК	Рибонуклеиновая кислота
рРНК	Рибосомальная рибонуклеиновая кислота
РТГА	Реакция торможения гемагглютинации

Термин / Сокращение / Аббревиатура	Толкование / определение
РФ	Российская Федерация
РЭМ	Растровая электронная микроскопия
СИЗ	Средства индивидуальной защиты
СКМК	Северо-каспийский морской канал
СОЗ	Стойкие органические загрязнители
СПАВ	Синтетические поверхностно-активные вещества
ТМ	Тяжелые металлы
ТОО «КАПЭ» (КАПЭ)	Товарищество с ограниченной ответственностью «Казахстанское агентство прикладной экологии»
ТОО «НПЦ МиВ»	Товарищество с ограниченной ответственностью «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»
УВ	Углеводороды
ФГБНУ «ВНИРО»	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии».
ФГБНУ «ФИЦ ФТМ»	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»
ФГБОУ ВО «АГТУ»	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный технический университет»
ФГБУ «НПО «Тайфун»	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-производственное объединение «Тайфун»
ФЭК	Форменные элементы крови
ХОС	Хлорорганические соединения
ХПК	Химическое потребление кислорода
A	(англ. Alive) – живой каспийский тюлень
AF	(англ. Aborted Foetus) – абортированный плод
AIS	(англ. Automatic Identification System) – автоматизированная информационная система слежения за передвижением судов
BSE	Режим обратно отраженных, или обратно рассеянных электронов
Ca	Кальций
CV	(англ. Coefficient of variation) – коэффициент вариации
CV	Коэффициент вариации
D	(англ. Died) – мертвый каспийский тюлень
ECM	Экстрацеллюлярный матрикс
Fe	Железо
GPS	(англ. Global Positioning System) – глобальная система позиционирования.
Hg	Ртуть
Mg	Магний
NCOC N.V.	North Caspian Operating Company N.V.
Na	Натрий
P	Фосфор
SD	(Англ. – standard deviation) – стандартное отклонение
SSE	Режим вторично отраженных электронов
Wn	Размах значений в выборке с количеством компонентов (n)
WoS	(Англ. – Web of Science) – политематическая реферативно- библиографическая и библиометрическая база данных по мировым научным публикациям
O	Кислород
C	Углерод

Список определений:

Термин / Сокращение / Аббревиатура	Толкование / определение
A/Fowl Plague/Dutch/27 (H7N7)	первый выделенный и изученный штамм вируса гриппа А субтипа H7N7 (в 1927 г.). Данный штамм входил в используемую в США диагностическую сывороточную панель

Термин / Сокращение / Аббревиатура	Толкование / определение
AGID (Agar Gel Immunodiffusion)	Иммунодиффузия в агаровом геле. В русской литературе – реакция преципитации в агаровом геле. Для иммунодиффузионных испытаний в агаровом геле (AGID, gel ID или double diffusion) круглые лунки вырезают в слое агара на пластиковой пластине с помощью пуансона. Одна лунка, обычно центральная, заполнена растворимым антигеном, а другие лунки заполнены исследуемой сывороткой. Положительный контрольный образец антитела включен в каждый анализ. Реагентам дают возможность диффундировать в агар, и когда антитела и антиген встречаются в оптимальных пропорциях (точка эквивалентности), образуются иммунные комплексы. Это приводит к появлению видимой линии осадка между лункой антигена и лунками, содержащими положительную сыворотку
BLAST – Basic Local Alignment Search Tool	Семейство компьютерных программ, служащих для поиска гомологов белков или генов, для которых известна первичная структура (последовательность) или ее фрагмент. При помощи BLAST можно произвести сравнение имеющейся последовательности с последовательностями из базы данных и найти схожие или удаленные белки/гены
Акантоцефалы (скребни, колючеголовые)	относятся к типу <i>Acanthocephales</i> , классу <i>Acanthocephala</i>
Белек	новорожденный не перелинявший детеныш тюленя [Гептнер и др., 1976]
Блот-анализ, Вестерн-блоттинг (вестерн-блот, белковый иммуноблот, Western blot)	аналитический метод, используемый для определения в образце специфичных белков. На первом этапе используют электрофорез белков в полиакриламидном геле для разделения денатурированных белков по длине или по трехмерной структуре. Далее белки переносят на нитроцеллюлозную или PVDF-мембрану, затем детектируют с использованием антител, специфичных к заданному белку. Существует множество коммерческих компаний, специализирующихся на производстве антител к десяткам тысяч различных белков
Годовик	каспийский тюлень в возрасте от 1 года до 2 лет
Вакцинный штамм	штамм микроорганизма, применяемый в различных типах вакцинации (в качестве вакцины)
Гельминты	представляют собой экологическую группу, указывающую на образ жизни и вред, который они наносят различным живым организмам. Понятие «гельминты» ограничивается паразитическими организмами типов Platheminthes (плоские черви), Nematelminthes (круглые черви) и Acanthocephales (скребни)
Грам-положительные (грамположительные) бактерии	бактерии, которые не имеют внешней дополнительной мембраны из липополисахаридов, и окрашиваются фиолетовым при использовании окраски микроорганизмов по методу окрашивания по Граму
Гратукулы	сетка широт и долгот на картосхемах
Дефинитивный (окончательный) хозяин	организм, в котором происходит половое размножение паразита
Динамика изменений	количественное значение оценивается через линейный тренд (коэффициент наклона регрессионной прямой). Качественное значение (положительная динамика, отрицательная динамика) – через знак (плюс, минус) коэффициента наклона регрессионной прямой
Значимость изменений	количественное значение оценивается через статистическую значимость линейного тренда. Качественное – значимость изменений положительная при превышении уровня статистической значимости 0.95 (если не оговорен другой уровень значимости). На рисунках отображается со знаком динамики изменений (положительной, отрицательной) для улучшения восприятия
Изолят	в микробиологии под изолятом понимают культуры вирусов или других микробов, изолированные из какого-либо конкретного источника
Интенсивность инвазии (ИИ)	число паразитов, обнаруженных у обследованного животного, выраженное в экземплярах
ИФА	иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) – лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. ИФА уникальна специфичностью иммунохимической реакции (то есть антитела связываются исключительно с определенными антигенами, и ни с какими другими)

Термин / Сокращение / Аббревиатура	Толкование / определение
Кератинизированные дериваты кожи	шерсть, вибрисс
Межгодовая изменчивость	для выбранного месяца или сезона разброс значений (среднеквадратическое отклонение от среднемноголетнего значения)
Нематоды	круглые гельминты, относящиеся к типу Nematelminthes, классу Nematoda
Пагетодные (пагофильные) виды тюленей	виды, использующие для рождения, выкармливания, линьки, спаривания и отдыха лед [Гептнер и др., 1976]
Пес	практическая единица солёности – единица измерения солёности
Продукти	округлые отверстия в ледовом покрове, проделываемые и используемые тюленями для дыхания [Гептнер и др., 1976]
Псевдамфистомоз	паразитарное заболевание из группы трематодозов, возбудителем которого является трематода <i>Pseudamphistomum truncatum</i> (семейство Opisthorchidae), [Акбаев, Есаулова, 2004]
РТГА	Реакция торможения гемагглютинации. Метод идентификации вируса или выявления противовирусных антител в сыворотке крови, основанный на феномене отсутствия агглютинации эритроцитов препаратом, содержащим вирус, в присутствии иммунной к нему сыворотки крови. РТГА основана на блокаде, подавлении антигенов вирусов антителами иммунной сыворотки, в результате чего вирусы теряют свойство агглютинировать эритроциты. РТГА применяют для диагностики многих вирусных болезней, возбудители которых могут агглютинировать эритроциты различных животных
Сеголетка	каспийский тюлень в возрасте до 1 года
Сиварь	окончательно перелинявший детеныш каспийского тюленя [Гептнер и др., 1976].
Среднее арифметическое	число, равное сумме всех чисел множества, деленной на их количество. Используется для вычисления оценки математического ожидания. Применяется для оценки среднемноголетнего значения, получаемой для выбранного сезона или месяца года по имеющемуся многолетнему набору данных
Среднеквадратическое отклонение (стандартное отклонение), σ	показатель рассеивания значений случайной величины относительно ее математического ожидания. Квадратный корень из суммы квадратов отклонений от среднего, деленный на число измерений. Стандартное отклонение обычно упоминается для указания разброса после указания среднего значения; для сокращения записи может указываться нотация
Среднемноголетнее значение	для выбранного месяца или сезона среднее (арифметическое) значение для рассматриваемого периода
Стандартная ошибка тренда	оценка ошибки коэффициента наклона прямой линейной регрессии
Статистическая значимость тренда	безразмерная величина, характеризующая надежность полученной оценки коэффициента наклона регрессионной прямой.
Трематоды	относятся к плоским гельминтам типа Platheminthes, класса Trematoda (сосальщики)
Тренд, линейный тренд	изменение анализируемого параметра за рассматриваемый период. Используется оценка коэффициента наклона прямой линейной регрессии. Используется для оценки динамики изменений
Цестоды	ленточные гельминты, относящиеся к типу Platheminthes, классу Cestoda
Шалыга	типичный морской мелкий остров в Каспийском море, образованный естественным образом на мелководных банках из наносов песка и мелкой ракушки под воздействием восточных ветров (местное название).
Штамм	низшая инфраподвидовая систематическая категория, обозначающая идентифицированную чистую культуру микроорганизмов одного вида, у которой изучены морфологические и физиологические особенности
Экстенсивность инвазии (ЭИ)	отношение числа зараженных животных к общему числу обследованных животных, выраженное в процентах
Эссенциальные химические элементы	элементы без которых организм не может расти, развиваться и совершать жизненный цикл
Яловость	понятие, означающее недополучение приплода в маточной группе стада за истекший год по причине абортированности или бесплодия. Выражается в процентах (при получении в маточной группе стада 80 детенышей от 100 самок яловость составляет 20%), [Ветеринарный энциклопедический словарь, 1981]

1.4. Справочные документы и ссылки

Исх.	Номер документа / ссылка	Название / Описание
(1)	№ 400-VI г. от 02.01.2021 г. Глава 16, Статья 245, 256; Глава 19, Статья 269, 274.	«Экологический кодекс Республики Казахстан»
(2)	№ 1469 от 31 декабря 2004 г.	Постановление Правительства РК .Об утверждении Правил выдачи разрешений на пользование животным миром
(3)	№ 652 от 10 ноября 2004 г.	Приказ Министра сельского хозяйства РК . Об утверждении Правил использования животных, кроме редких и находящихся под угрозой исчезновения, в научных, культурно-просветительских, воспитательных и эстетических целях, в том числе для создания зоологических коллекций.
(4)	Marine Mammal Necropsy: An introductory guide for stranding responders and field biologists. Woods Hole Oceanog. Inst. Tech.Rept. WHOI-2007-06.	Marine Mammal Necropsy: An introductory guide for stranding responders and field biologist
(5)	Office International des Epizooties (OIE), Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. – Paris, 2000	Manual of standards for diagnostic tests and vaccines.
(6)	TITLE IV, Marine Mammal Health and Stranding Response. – 1972	The Marine Mammal Protection Act of 1972 As Amended
(7)	WHO/CDS/CSR/NCS/ Manual for on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance/ - Geneva, 2002. – P. 15-18.	Manual for on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance
(8)	CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, Boca Raton, Florida: CRC Press, 2018, 3rd ed.	CRC Handbook of Marine Mammal Medicine

2. РОЛИ И ОБЯЗАННОСТИ

Специалисты, принявшие участие в полевых работах и написании отчета.

КАЗАХСТАН:

Персонал	Должность / Роль	Институт/Компания где работает	Расположение
Научный персонал			
Климов Ф.В.	Исполнительный директор	КАПЭ	г. Алматы
Аладына А.П.	Менеджер, главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Стогова Л.Л.	Начальник отдела ЭММ	КАПЭ	г. Алматы
Давлетбаева А.	Зам. директора	КАПЭ	г. Актау
Искакбаев А.А.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Муляев А.Н.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Бедненко О.Г.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Бойко В.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Левин А.С.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Алишев К.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Кочнев О.Ю.	Главный специалист	КАПЭ	г. Атырау
Сургутская С.	Главный специалист	КАПЭ	г. Атырау
Медведев Д.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Переверьев Ю.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Капанов Б.	Главный специалист	КАПЭ	г. Атырау
Ибраев С.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Абдусаматова Б.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Рахимов Э.А.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Жанатова А.Ж.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Калдаев С.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Мищенко В.П.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Орлова И.В.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Сапожникова И.А.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Фомина Е.	Главный специалист	КАПЭ	г. Алматы
Чернов А.М.	Начальник отдела ГИС	КАПЭ	г. Алматы
Кыдырманов А.И.	Специалист вирусолог	НПЦ МиВ	г. Алматы
Карамендин К.О.	Специалист паразитолог	НПЦ МиВ	г. Алматы
Касымбеков Е.Т.	Научный сотрудник	НПЦ МиВ	г. Алматы
Сабыржан Т.	Младший научный сотрудник	НПЦ МиВ	г. Алматы
Нуралибеков С.	Младший научный сотрудник	НПЦ МиВ	г. Алматы
Соломенцева С.М.	Начальник отдела ТП	КАПЭ	г. Алматы
Даниленко В.В.	Переводчик	КАПЭ	г. Алматы
Отарбаева А.	Переводчик	КАПЭ	г. Алматы
Байсартова А.	Переводчик	КАПЭ	г. Алматы
Судно «Наутилус-один»			
Барсуков С.И.	Капитан	КАПЭ	Казахстан, Баутино
Куликов А.Е.	Старший помощник капитана	КАПЭ	Казахстан, Актау
Конищев С.К.	Старший механик	КАПЭ	Россия, Астрахань
Ауганов А.С.	Второй механик	КАПЭ	Казахстан, Форт-Шевченко
Изтурган А.	Боцман	КАПЭ	Казахстан, Баутино
Коваль К.Ю.	Матрос	КАПЭ	Казахстан, Баутино
Нуржанов К. С.	Повар	КАПЭ	Казахстан, Актау

РОССИЯ:

Персонал	Должность / Роль	Институт/Компания где работает	Расположение
Научный персонал			
Найденко С.В.	Директор, д.б.н.	ИПЭЭ РАН	г. Москва
Рожнов В.В.	Заведующий лабораторией, академик РАН, д.б.н.	ИПЭЭ РАН	г. Москва
Соловьева М.А.	Руководитель проекта, старший научный сотрудник, к.б.н.	ИПЭЭ РАН	г. Москва
Суров А.В.	Главный научный сотрудник, заместитель директора по науке, д.б.н.	ИПЭЭ РАН	г. Москва
Глазов Д. М.	Ведущий инженер	ИПЭЭ РАН	г. Москва

Персонал	Должность / Роль	Институт/Компания где работает	Расположение
Вечерский М.В.	Старший научный сотрудник, к.б.н.	ИПЭЭ РАН	г. Москва
Платонов Н.Г.	Старший научный сотрудник	ИПЭЭ РАН	г. Москва
Хайруллин Д.Р.	Ведущий инженер	ИПЭЭ РАН	г. Москва
Ключникова П.С.	Ведущий инженер	ИПЭЭ РАН	г. Москва
Шибанова П.Ю.	Младший научный сотрудник	ИПЭЭ РАН	г. Москва
Ильина П.О.	Младший научный сотрудник	ИПЭЭ РАН	г. Москва
Пилипенко Г.Ю.	Лаборант	ИПЭЭ РАН	г. Москва
Удоденко Ю.Г.	Главный научный сотрудник	ИПЭЭ (ИБВВ) РАН	г. Москва
Комов В.Т.	Главный научный сотрудник, д.б.н	ИПЭЭ (ИБВВ) РАН	г. Москва

3. ПРОГРАММА ПОЛЕВЫХ РАБОТ

3.1. План исследований

Основной целью осенних исследований 2023 г. являлось изучение современного состояния популяции каспийского тюленя, как эндемика фауны Каспийского моря и вида-индикатора состояния экосистемы Каспия.

С целью изучения современного состояния популяции каспийского тюленя осенью 2023 г. проведен отлов тюленей на морской шалыге КСКМ.

Для подсчета численности каспийского тюленя на островах и шалыгах, поиска подходов к участкам с отдыхающими животными для высадки ученых, в районах скопления животных, использовался квадрокоптер DJI Mavic 2 Pro. Данный осмотр позволял оценить количество тюленей и определить место подхода лодки для отлова тюленей.

На участке, от порта Баутино до северо-восточной части Тюленьих островов (о.Кулалы) и от участка Седловины до СКМК, проведены наблюдения по учету численности каспийского тюленя с ходового мостика НИС «Наутилус-один». Учет проводился при благоприятных погодных условиях в светлое время суток (вахты по 4 часа). Наблюдения и подсчет проведен визуально одним-тремя наблюдателями с помощью бинокля Nikon 10x50 по ходу движения судна.

Изучение демографической структуры популяции каспийского тюленя (соотношение в ней самцов и самок разного возраста) проведено параллельно с отбором проб их генетического материала и других проб на месте залежки тюленей. У отловленных особей казахстанскими и российскими специалистами проведен отбор биологического материала по сертифицированным методикам, рекомендованным международным эпизоотическим бюро и Комиссией по морским млекопитающим.

3.2. Сроки и район исследований

В казахстанской части Северного Каспия полевые исследования проведены с 6 по 17 ноября 2023 г. в рамках совместной экспедиции КАПЭ (4 специалиста), ИПЭЭ РАН (4 специалиста) и НПЦ МиВ (4 специалиста) на НИС «Наутилус-один». Учет тюленей проведен во время движения судна от порта Баутино в район о.Кулалы и район Северо Каспийской морской канал.



Рисунок 3.2.1 Научно-исследовательское судно «Наутилус-один»

Перед началом экспедиции поступило сообщение о крупном выбросе погибших тюленей на берег Тюп-Караганской косы, а также на побережье п. Баутино. 5 ноября проведено обследование погибших тюленей в количестве 40 особей.

Маршруты движения судов представлены на рисунке 3.2.2.



3.3. Методика полевых работ

3.3.1. Учет каспийского тюленя

Полевые работы по учетам включают в себя береговые наблюдения и наблюдения с судна.

Береговые наблюдения. Наблюдения проводятся с одного или нескольких наблюдательных пунктов, расположенных в пешей доступности от обнаруженной залежки, но на таком расстоянии, чтобы не беспокоить залегающих животных (из естественного или искусственного укрытия, если необходимо). Возможно использование готовых строений как наблюдательных постов. Наблюдательные пункты могут быть смещены в соответствии с полученной во время полевых работ информацией и особенностями местного рельефа.

Наблюдатели применяют два основных метода:

- сканирование горизонта для получения оценок относительной плотности популяции и размеров групп тюленей на побережье. Для работы используют бинокли с 10-12-кратным увеличением. Сканирование проводится в режиме – 1 раз на протяжении определенных промежутков времени в течение светового дня и при благоприятных погодных условиях. Промежутки времени для сканирования выбираются, исходя из поведения животных и динамики их перемещения;
- непрерывное наблюдение за акваторией с целью корректировки результатов сканирования, а также наблюдения за отдельными особями или группами тюленей с целью описания поведения на поверхности.

Судовые визуальные наблюдения в акватории проводятся с пеленгаторной площадки или другого возвышенного места на судне, в том числе, с ходового мостика, при неблагоприятной погоде, а также с маломерного судна.

Необходимо учитывать, что при наилучших условиях наблюдения видимость (дистанция до линии горизонта) будет составлять примерно 10 км, если наблюдатель просматривает акваторию с помощью бинокля, находясь от поверхности моря на высоте около 7 м. Учет численности тюленей проводился в радиусе до 500 м от судна, и 300 м с рабочей лодки.

Наблюдения ведутся на протяжении всего светлого времени суток двумя наблюдателями, входящими в команду из 4 человек. В темное время суток наблюдения могут проводиться во время стоянки судна или при его близком прохождении к берегу.

Максимальные углы обзора с пеленгаторной площадки достаточно широки – 120^0 влево и 120^0 вправо от курса судна, с ходового мостика обзор ограничен иллюминаторами, в том числе на дальность и четкость значительно влияют «шум» стекла иллюминатора. С рабочей лодки угол обзора составляет 90 градусов.

Наблюдения с ходового мостика ведутся исключительно при плохих погодных условиях, влияющих, в первую очередь, на качество наблюдений и способных вывести из строя используемую аппаратуру (низкие температуры, сильный дождь, качка судна и т.д.). С рабочей лодки при плохих погодных условиях (при волнении более 50 см и скорости ветра более 8-10 м/с) учет тюленей не проводится.

Учет во время рейса на НИС «Наутилус-один» с 3 по 8 ноября 2022 г. проходил при движении судна от п.Баутино в сторону тюленьих островов в казахстанской акватории Каспийского моря.

Подсчет численности тюленей на шалыгах в казахстанском секторе Каспийского моря проводили с помощью квадрокоптера DJI Mavic 2 Pro. Характеристики квадрокоптера представлены в таблице 3.3-1.

Управление БПЛА осуществлял один оператор, он же проводил фото- и видео- регистрацию животных в течение авиаоблета. Во время облета с помощью штатной видеокамеры велась непрерывная видеосъемка. Взлет осуществлялся с моторной лодки. Высота полета варьировала от 80 до 100 метров от воды и зависела от маршрута и цели полета коптера.

Во время наблюдений вся текущая информация записывалась на диктофон или в блокнот, координаты определялись посредством GPS-приемника и дублировались судовой системой AIS. Все наблюдения заносились в специально разработанные электронные формы.

Таблица 3.3-1 Технические характеристики DJI Mavic 2 Pro (БПЛА)

Наименование оборудования	Характеристики оборудования	Фото
Квадрокоптер DJI Mavic 2 Pro	Максимальная скорость взлета – 6 м/с (режим Sport)/5 м/с (режим Position); Максимальная скорость снижения – 3 м/с (режим Sport)/3 м/с (режим Position); Максимальная горизонтальная скорость полета – 72 км/ч (режим Sport)/50 км/ч (режим Position)/58 км/ч (режим Atti); Максимальный угол наклона – 42° (режим Sport); 25°/(режим Position); Максимальная угловая скорость – 250°/с (режим Sport)/150°/с (режим Atti); Максимальная высота полета над уровнем моря – 6000 м; Максимальная высота полета над точкой взлета – 500 м; Время полета – около 30 минут; Допустимая температура эксплуатации – от 0°C до 40°C; Поддерживаемые системы спутниковой навигации – GPS/GLONASS	

Для получения объективных данных о погоде регулярно (один раз в 6 часов) и при изменениях фиксируются погодные условия в форму «Регистрация метеоданных во время наблюдений». Заносится следующая информация: дата; ФИО наблюдателя; время; ветер, направление (градусы); скорость ветра (м/с); облачность (баллы); температуру воздуха (градусы С); осадки; влажность (%); атмосферное давление (гПа); волнение (период в сек.); волнение (количество, полуметры); характеристика льда (сплоченность); видимость (км); бофорт (ветровое волнение); курс судна (градусы); скорость судна (км/ч); комментарии.

3.3.2. Отлов каспийского тюленя

Отлов тюленей выполнялся участниками экспедиции на песчаных шалыгах, в светлое время суток (рисунок 3.3.1). Для поимки животных использовались сачки (рисунок 3.3.2 а), которые состояли из стального обруча диаметром около 100 см (толщина проволоки – 8 мм), деревянной рукоятки длиной 2 м и прикрепленной к обручу сети (дели) длиной 3 м, изготовленной из капроновой нити толщиной 1,5 мм, с ячейей 70-80 мм.

Тюлени после отлова помещались в брезентовые сумки на молнии (рисунок 3.3.2 б), имеющие вентиляционные отверстия. Медицинских препаратов для иммобилизации животных не применяли.



Рисунок 3.3.1 Отлов тюленей



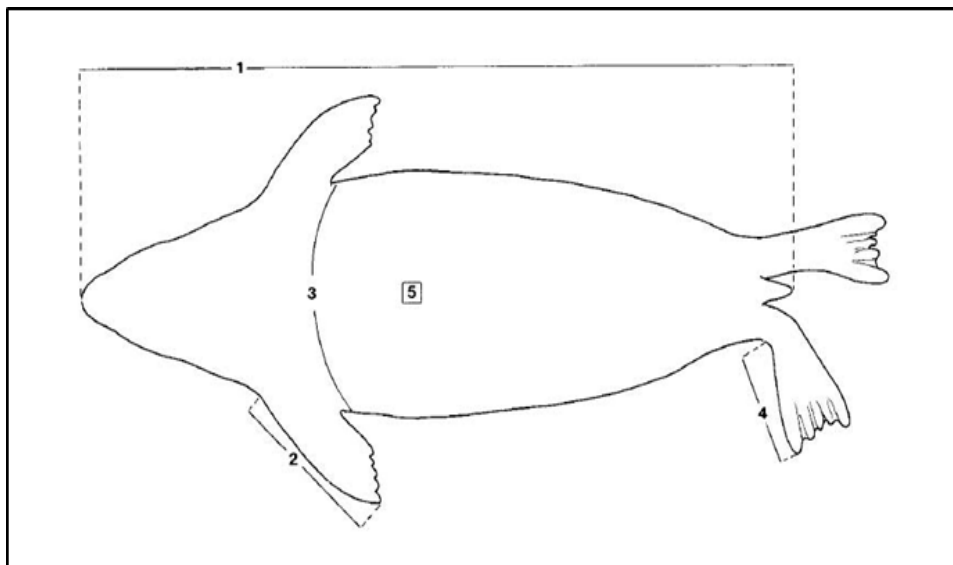
а) Сачок для отлова

б) Сумка для транспортировки

Рисунок 3.3.2 Средства для отлова и транспортировки тюленей

3.3.3. Морфометрические исследования

Зоологическая длина тела (curvilinear body length) - измерялась от нижних точек ноздрей до конца хвоста (линия проходит по голове и спине), (рисунок 3.3.3).



1 – проекционная длина; 2 – длина передней ласты; 3 – обхват грудной клетки;
4 – длина задней ласты [Geraci, Lounsbury, 1998]

Рисунок 3.3.3 Измерение тюленя

Проекционная зоологическая длина тела (standard body length) - расстояние от нижних точек ноздрей до конца хвоста животного в горизонтальной проекции. Перпендикулярно телу животного, лежащего на брюхе, по поверхности, на которой оно лежит, проводятся две параллельные линии: одна – от ноздрей, вторая – от конца хвоста и измеряют расстояние между ними.

Общая проекционная длина (total projection body length) - расстояние от ноздрей до конца левой задней ласты в горизонтальной проекции. Перпендикулярно телу животного, лежащего на брюхе, по поверхности, на которой оно лежит, проводят две параллельные линии: одну – от ноздрей, вторую – от конца левой задней ласты (до конца первого пальца) и измеряют расстояние между ними.

Длину хвоста измеряли от его основания до конца по центральной оси симметрии.

Длину левой передней лапы измеряли от основания выступающей из туловищного мешка части предплечья по внешнему краю до кончика когтя первого пальца.

Длину левой задней лапы - от основания выступающей из туловищного мешка части голени по внешнему краю до кончика первого пальца.

Обхват грудной клетки - измеряли под передними лапами животного. Длина волоса измерялась на загривке, от его основания до кончика.

Животное взвешивалось. Дополнительно оценивалось состояние волосяного покрова каспийского тюленя: окрас шерсти, наличие не перелинявших участков (для исследований в период линьки). Отмечалось наличие повреждений кожного покрова и любые другие возможные отклонения. Животное фотографировалось. В записях указывался номер животного, дата, время и место исследований (GPS-координаты), вид животного, пол и результаты морфометрических измерений. При необходимости делали снимки: общего вида сверху, с левого и правого бока (тюлень лежит на брюхе); общего вида сверху (тюлень лежит на спине) для мертвого животного; головы; передней левой и задней левой лапы; хвоста; повреждений кожно-волосяного покрова и прочих отклонений от нормального состояния.

Промеры головы тюленя выполняли с помощью штангенциркуля. В зависимости от целей исследования, перечень измерений может включать: общую, или кондильобазальную длину черепа (от нижней точки ноздри до места соединения черепа с шейным отделом позвоночника); длину мозговой части черепа (от латерального угла глаза до места соединения черепа с шейным отделом позвоночника); ширину роострума у верхней точки ноздри; ширину мозговой части черепа у медиального угла глаза; ширину мозговой части черепа у щелевидного отверстия наружного слухового прохода; длину наружного щелевидного отверстия левой ноздри; расстояние от латерального до медиального угла глаза; расстояние от медиального угла глаза до слухового отверстия; длину щелевидного отверстия наружного слухового прохода.

При исследовании когтей на передней лапе обращали внимание на наличие эмбрионального конуса (рисунок 3.3.4). Подсчет полных сегментов проводился на том когте, где эмбриональный конус не сточен или имеется его часть и сегменты видны наиболее отчетливо. Сегменты подсчитывали и на когтях задних лап, если они видны отчетливо.



1 – эмбриональный конус; 2 – полные сегменты

Рисунок 3.3.4 Исследования когтей передней лапы

На левой передней и задней лапе с помощью штангенциркуля измеряли длину и ширина когтя на первом пальце. Длина – от кончика до основания (до кожной складки); ширина – у основания когтя (у кожной складки).

3.3.4. Отбор волос и вибрисс для токсикологических исследований

Образцы шерсти и вибрисс отбирали для определения содержания в них ртути (Hg) и оценки степени ртутного загрязнения вод Каспийского моря.

Перечень необходимого оборудования для отбора биопробы: пакет с замком zip-lock 7 x 10 см (80 мкм), или пакет с замком zip-lock 6 x 8 см (40 мкм); хирургические ножницы, скальпель; пинцет общего назначения; марлевые салфетки для обработки инструмента; емкость для пакетированных образцов; водостойчивые этикетки; водостойчивый маркер; антисептики и дезинфицирующие средства - этиловый спирт (70-80 % об), раствор перекиси водорода (3%). Необходимы также средства индивидуальной защиты (СИЗ): одноразовые медицинские маски, одноразовые медицинские латексные перчатки.

Метод отбора биопроб. Шерсть животного (с загривка, массой около 1 г) состригали ножницами или скальпелем, помещали в пакет. Вибриссы выстригали ножницами: у живого животного над глазами 1 шт., у павшего 2-3 шт. на верхней губе. Отбор биоматериала от живого тюленя выполняли при его физической иммобилизации.

Маркировка индивидуальной упаковки. Пакеты маркировали. На этикетке указывали: номер животного; вид животного (*Pusa caspica*); вид биоматериала - шерсть (Hg), вибриссы (Hg), дата в формате ДД.ММ.ГГ.

Информация, отражаемая в полевом журнале. В полевом журнале указывался номер животного, дата, время, место отбора пробы (GPS-координаты); информация о животном, которая необходима для дальнейших исследований: вид животного, пол, возраст (белек, сиварь, сеголетка, неполовозрелая особь, взрослая особь), морфометрические данные, окраска шерсти; содержимое пробы; количество проб, маркировка на индивидуальной этикетке, краткое описание индивидуальной упаковки, комментарии.

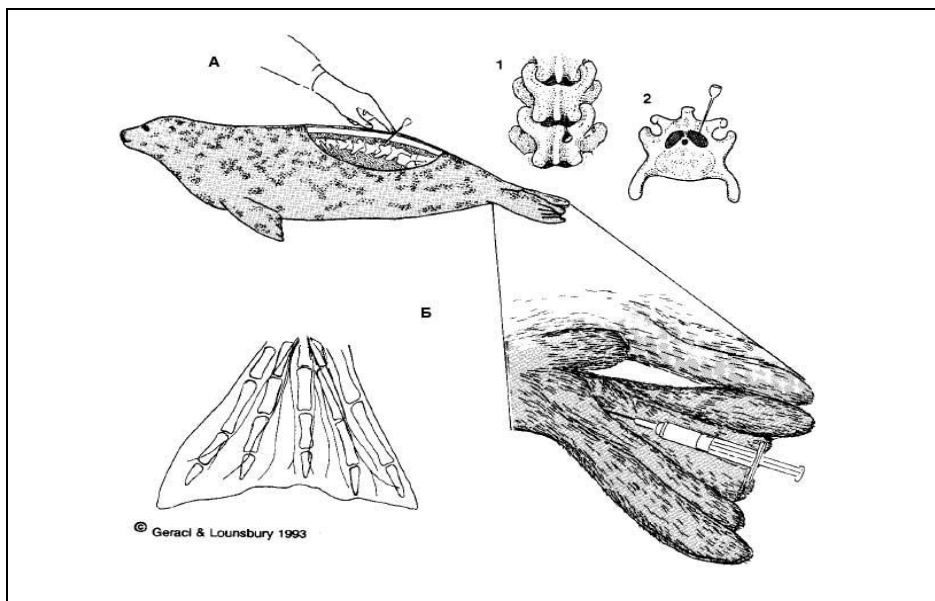
Хранение и транспортировка. Образцы хранили и транспортировали в замороженном состоянии (строго меньше 0°C). Для непродолжительной транспортировки использовали термосумку или термоконтейнер с замороженными аккумуляторами холода.

3.3.5. Отбор крови для токсикологических исследований

Отбор крови выполняли от живого каспийского тюленя для анализа в лабораторных условиях стойких органических загрязнителей (СОЗ) и токсических металлов.

Перечень необходимого оборудования для отбора биопробы. Для забора крови из ласты необходимы стерильные иглы-бабочки 21G x 3/4" (0,8 мм x 2,0 см) с луэр-адаптером и держателем, стерильные иглы 20G x 1 1/2" (0,9 мм x 4 см) с луэр-адаптером, держатели вакуумных пробирок, шприцы (10 мл); медицинский жгут для взятия венозной крови. Для забора крови из эпидурального венозного синуса спинномозгового канала необходимо иметь: спинальные иглы размерами 18Gx75 мм и 18Gx90 мм с луэр-адаптером (выбираются в зависимости от упитанности животного); держатели вакуумных пробирок. Кроме того потребуются: стерильные вакуумные пробирки с антикоагулянтом КЗ ЭДТА для гематологии (объемом 6 мл); антисептики и дезинфицирующие средства: этиловый спирт (70-80 % об.); раствор хлоргексидина биглюконата (20%); раствор перекиси водорода (3%); марлевые салфетки; водостойчивый маркер; водостойкие этикетки; небольшие пакеты (10 x 15 см) из плотного полиэтилена (80 мкм) с замком zip-lock (для хранения всех пробирок); СИЗ (одноразовые медицинские маски, одноразовые медицинские латексные перчатки).

Метод отбора биопробы. Отбор биоматериала выполняли при физической иммобилизации животного. Пробы крови отбирались из межфаланговых вен задней ласты каспийского тюленя (рисунок 3.3.5).



А – забор крови из эпидурального венозного синуса спинномозгового канала; Б – забор крови из задней лапы тюленя [Geraci, Lounsbury, 1998].

Рисунок 3.3.5 Техника забора крови

Место введения иглы предварительно дезинфицировали этанолом. При взятии крови из эпидурального венозного синуса спинномозгового канала игла вводилась между остистыми отростками (1) поясничных позвонков в эпидуральную вену (2), которая лежит над спинным мозгом. Для забора крови из задней лапы игла вводилась в вену, лежащую между вторым и третьим пальцем (чуть выше межпальцевой перепонки). С учетом того, что для анализа СОЗ необходимо 10 мл плазмы крови, а для анализа металлов 15 мл цельной крови, отбирается 45 мл крови.

Маркировка индивидуальной упаковки. Пробирки с кровью маркировались с помощью водостойкого маркера. Ввиду ограниченного места для маркировки применялся короткий код: номер животного; вид животного – РС (*Pusa caspica*); вид биоматериала - КСОЗМ (кровь для СОЗ и металлов); дата забора крови в формате ДД.ММ.ГГ.

Информация в полевом журнале. В полевом журнале указывался номер животного, дата, время, место отбора пробы (GPS-координаты); информация о животном, которая необходима для дальнейших исследований: вид животного, пол, возраст морфометрические данные, содержимое пробы; количество проб, маркировка на индивидуальной этикетке, краткое описание индивидуальной упаковки, комментарии.

Хранение и транспортировка. Образцы крови хранили и транспортировали в полевых условиях при температуре -15 – -30°C. Для непродолжительной транспортировки использовали термосумку или термоконтейнер с замороженными аккумуляторами холода.

3.3.6. Отбор волос и вибрисс для гормональных исследований

Образцы волос и вибрисс отбирались от каспийского тюленя для определения содержащихся в них гормонов стресса и половых гормонов (кортизола, тестостерона и прогестерона). На основании полученных данных оценивается репродуктивное состояние животного и уровень стресса у отдельных особей.

Перечень необходимого оборудования для отбора биопробы: хирургические ножницы, скальпель; медицинский анатомический пинцет общего назначения; небольшие пакеты (7 x 10 см) из плотного полиэтилена (80 мкм) с замком zip-lock (для индивидуальных проб волос); полиэтиленовый пакет вместимостью 1 л для заморозки до – 30°C с замком zip-lock и бегунком (для хранения всех образцов волос); этикетки; водостойчивый маркер; антисептики и дезинфицирующие средства: этиловый спирт (70-80 % об.); раствор хлоргексидина биглюконата (20 %); раствор перекиси водорода (3 %); емкость для ополаскивания пинцета в перекиси водорода объемом 50-100 мл; марлевые салфетки; СИЗ (одноразовые медицинские маски, одноразовые медицинские латексные перчатки).

Метод отбора биопробы. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Волосы, вибриссы фиксировались пинцетом и состригались ножницами у основания стержня. Волосы отбирались с крупы животного. У живого тюленя состригается 1 вибрисса над глазами, у павшего - 2-3 вибриссы на верхней губе. Для исследований необходим образец каждого вида материала массой 0,1-0,5 г, который помещался в индивидуальный пакет с замком zip-lock. После отбора пробы ножницы и пинцет тщательно ополаскивались в растворе перекиси водорода.

Маркировка индивидуальной упаковки. Пакеты с образцами волос и вибрисс маркировались с помощью бумажной этикетки и спиртоустойчивого маркера. На этикетке указывался: номер животного; вид животного – *Pusa caspica*; вид и назначение биоматериала – волосы (гормоны) или вибриссы (гормоны); дата отбора пробы в формате ДД.ММ.ГГ.

Информация в полевом журнале. В полевом журнале указывался номер животного, дата, время, место отбора пробы (GPS-координаты); информация о животном, которая необходима для дальнейших исследований: вид животного, пол, возраст (белек, сиварь, сеголетка, неполовозрелая особь, взрослая особь), морфометрические данные, окраска шерсти; содержимое пробы; количество проб, маркировка на индивидуальной этикетке, краткое описание индивидуальной упаковки, комментарии.

Хранение и транспортировка. Пробы волос и вибрисс хранились и транспортировались в полевых условиях при температуре -15 – -30°C. Для непродолжительной транспортировки использовалась термосумка или термоконтейнер с замороженными аккумуляторами холода.

3.3.7. Отбор образцов ткани для генетических исследований

Образцы ткани отбирались для последующего выделения из них тотальной ДНК особи с целью анализа тех или иных генетических маркеров, используемых при оценке популяционной структуры, трендов в ее изменении, благополучия популяции и т.д.

Основным видом ткани, собираемой для этих целей, является цельная кровь. Отбор венозной крови – один из наименее травмирующих для живого животного способов, позволяющий получить достаточное для анализа множественных ДНК-маркеров количество живых клеток. Сохранение крови цельной позволяет минимизировать концентрацию свободного гемоглобина и ионов железа (ингибирующих протекание полимеразной цепной реакции) до начала проведения анализа.

В случае невозможности сбора достаточного количества цельной крови для генетического анализа сохраняли форменные элементы крови, остающиеся после отбора плазмы из образцов, собранных для серологических исследований, а также у животного производится сбор волос с волосяными луковицами.

3.3.7.1. Отбор образцов крови

Перечень необходимого оборудования и материалов: стерильные вакуумные пробирки для гематологических исследований объемом 2–10 мл с антикоагулянтom К2 ЭДТА или К3 ЭДТА; стерильные иглы-бабочки 21G x 3/4" (0,8 мм x 2,0 см) с луэр-адаптером и держателем, стерильные иглы 20G x 1 1/2" (0,9 мм x 4 см) с луэр-адаптером, держатели вакуумных пробирок; штатив для вакуумных пробирок; антисептики и дезинфицирующие средства: этиловый спирт (70-80 % об.); раствор хлоргексидина биглюконата (20%); раствор перекиси водорода (3%); марлевые салфетки; этикетки; спиртоустойчивый маркер; СИЗ (одноразовые медицинские маски, одноразовые медицинские латексные перчатки).

Метод отбора биопробы. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. В качестве образца собиралась венозная кровь путем пункции вены на заднем лапке тюленя. Место пункции вены предварительно дезинфицировали этанолом. Работа проводилась в одноразовых медицинских перчатках.

Количество собираемого материала. Объем крови, собранной от одного животного должен быть не менее 1 мл, желательно 2–4 мл.

Маркировка индивидуальной упаковки. Пробирка с кровью маркировалась – указывался номер животного; вид животного – РС (*Pusa caspica*); вид биоматериала - КГ (кровь для генетических исследований); дата забора крови в формате ДД.ММ.ГГ.

Хранение и транспортировка. В случае, если между моментом сбора крови и доставки пробирки в лабораторию проходило не более 5 дней, допустимо хранение пробирок с собранной кровью как при $-15 - -30^{\circ}\text{C}$, так и при $+2 - +4^{\circ}\text{C}$. Для транспортировки использовали термосумку или термоконтейнер с аккумуляторами холода, температура которых соответствует температуре хранения пробирок.

3.3.7.2. Отбор образцов ткани

Образцы тканей (мышцы или кожа) отбирали от мертвого каспийского тюленя для генетических исследований.

Перечень инструментов и расходных материалов для отбора биопробы: секционный нож; скальпель; хирургические ножницы; медицинский анатомический пинцет общего назначения; алюминиевая фольга; небольшие пакеты (10 x 15 см) из плотного полиэтилена (80 мкм) с замком zip-lock (для индивидуальных проб тканей и органов) или небольшие пластиковые контейнеры с герметичной крышкой; полиэтиленовый пакет вместимостью 1 л для заморозки до -30°C с замком zip-lock и бегунком (для хранения всех образцов); водостойкие этикетки; водостойчивый маркер; антисептики и дезинфицирующие средства: этиловый спирт (70-80% об.); раствор хлоргексидина биглюконата (20%); раствор перекиси водорода (3%); марлевые салфетки; СИЗ (одноразовые медицинские маски, одноразовые медицинские латексные перчатки).

Метод отбора биопроб. Выполняли вскрытие животного [Pugliares et al., 2007]. Отбор тканей выполнялся при отсутствии видимых признаков разложения. Образцы помещали в пробирку, заполненную этиловым спиртом. Проба была полностью покрыта этиловым спиртом.

Маркировка индивидуальной упаковки. Пробирки с образцом биоматериала маркировались с помощью водостойкой этикетки и водостойкого маркера. На этикетке указывался: номер животного; вид животного – *Pusa caspica*; дата отбора пробы в формате ДД.ММ.ГГ.

Информация в полевом журнале. В полевом журнале указывался номер животного, дата, время, место отбора пробы (GPS-координаты); информация о животном, которая необходима для дальнейших исследований: вид животного, пол, возраст морфометрические данные, содержимое пробы; количество проб, маркировка на индивидуальной этикетке, краткое описание индивидуальной упаковки, комментарии.

Хранение и транспортировка. Пробы биоматериала хранились и транспортировались в полевых условиях при температуре минус 15 – минус 30 $^{\circ}\text{C}$. Для непродолжительной транспортировки использовалась термосумка или термоконтейнер с замороженными аккумуляторами холода.

3.3.8. Отбор крови и получения плазмы для серологических исследований, и мазка крови

Отбор крови с последующим получением из нее плазмы выполнялся для оценки в лабораторных условиях параметров врожденного иммунитета каспийского тюленя и идентификации антител к различным патогенам: вирусу простого герпеса, парвовирусу, вирусу чумы плотоядных и псевдобешенства, к трихинелле, токсоплазме, хламидии, бруцелле, токсоплазме, микоплазме, кандиде и др.

Перечень необходимого оборудования для отбора биопроб: для забора крови из ласты потребуются: стерильные иглы-бабочки 21G x 3/4" (0,8 мм x 2,0 см) с луэр-адаптером и держателем, стерильные иглы 20G x 1 1/2" (0,9 мм x 4 см) с луэр-адаптером, держатели вакуумных пробирок, шприцы (10 мл). Для забора крови из эпидурального венозного синуса спинномозгового канала необходимы спинальные иглы размерами 18Gx75 мм и 18Gx90 мм с луэр-адаптером (выбираются в зависимости от упитанности животного), держатели вакуумных пробирок; стерильные вакуумные пробирки с антикоагулянтom КЗ ЭДТА для гематологии (объемом 6 мл); Кроме того нужны: штатив для крио- и микропробирок, штатив для вакуумных пробирок; центрифуга медицинская лабораторная; автоматическая пипетка и стерильные одноразовые наконечники для отбора плазмы крови; стерильные криоустойчивые герметичные полипропиленовые пробирки с закручивающейся крышкой (объемом 2 мл) для хранения плазмы/сыворотки крови; стерильные пипетки-груши для дозирования крови и форменных элементов крови в пробирки типа «Эппендорф»; стерильные пробирки типа «Эппендорф» (1,5-2,0 мл); антисептики и дезинфицирующие средства: этиловый спирт (70-80 % об.); раствор

хлоргексидина биглюконата (20%); раствор перекиси водорода (3%); марлевые салфетки; водостойкие этикетки; водостойчивый маркер; СИЗ (одноразовые медицинские маски, одноразовые медицинские латексные перчатки).

Метод отбора биопробы. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Пробы крови отбирались из эпидурального венозного синуса спинномозгового канала или задней лапы каспийского тюленя. Место пункции вены предварительно дезинфицировалось этанолом. Образцы крови центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. Полученная сыворотка переносилась в стерильную криоустойчивую герметичную полипропиленовую пробирку с закручивающейся крышкой. Оставшиеся после центрифугирования форменные элементы крови могут использоваться для ряда исследований (токсикологических, генетических и др.).

Для мазка крови чистым носиком отбирается 1 мкл крови и переносится на стерильное предметное стекло. Второе стерильное предметное стекло устанавливается под углом 45° относительно первого. Быстрым движением капля крови размазывается по длине предметного стекла. Получившийся мазок фиксируется метанолом. Хранение – при комнатной температуре в контейнере для мазков.

Маркировка индивидуальной упаковки. Пробирка с кровью маркировалась с помощью водостойчивого маркера. Ввиду ограниченного места для маркировки применялся короткий код: номер животного; вид животного – РС (*Pusa caspica*); вид биоматериала - КС (кровь для серологических исследований); дата забора крови в формате ДД.ММ.ГГ.

Пробирки с плазмой крови маркировались с помощью водостойчивого маркера. Ввиду ограниченного места для маркировки применялся короткий код: номер животного 00; вид животного – РС (*Pusa caspica*); вид биоматериала - ПС (плазма для серологических исследований); дата забора крови в формате ДД.ММ.ГГ.

Пробирки с форменными элементами крови после центрифугирования маркировались с помощью водостойких этикеток и водостойчивого маркера. Ввиду ограниченного места для маркировки применялся короткий код: номер животного 00; вид животного – РС (*Pusa caspica*); вид биоматериала - ФЭК (форменные элементы крови); дата забора крови в формате ДД.ММ.ГГ.

Форменные элементы крови используются для токсикологических, генетических и других исследований.

Информация в полевом журнале. В полевом журнале указывался номер животного, дата, время, место отбора пробы (GPS-координаты); информация о животном, которая необходима для дальнейших исследований: вид животного, пол и др.; содержимое пробы; количество проб, маркировка на индивидуальной этикетке, краткое описание индивидуальной упаковки, комментарии.

Хранение и транспортировка. Образцы плазмы и форменных элементов крови хранились и транспортировались в полевых условиях при температуре -15 – -30°C. Для непродолжительной транспортировки использовалась термосумка или термоконтейнер с замороженными аккумуляторами холода.

3.3.9. Отбор смывов для вирусологических исследований

Конъюнктивальные (глазные) смывы, или мазки, от живых тюленей собирались с целью идентификации возбудителей мультисистемных вирусных инфекций животных (аденовирусов, герпесвирусов, калицивирусов, коронавируса, лиссавирусов, ортомиксовирусов, парамиксовирусов) и ряда других патогенов.

Назальные (носовые) смывы, или мазки, от живых тюленей собирались с целью идентификации возбудителей респираторных и мультисистемных вирусных инфекций животных передающихся воздушно-капельным путем; ортомиксовирусов (гриппозные инфекции); коронавируса (коронавирус тюленей, коронавирус собак); морбилливирусов (в том числе чумы собак и чумы тюленей); герпесвирусов (альфа- и гамма-герпесвирусы тюленей серотипов 1-7); лиссавирусов (в том числе бешенства) и ряда других патогенов в организме животного.

Ротовые смывы от живых тюленей собирались с целью идентификации возбудителей респираторных, желудочно-кишечных и мультисистемных вирусных инфекций животных (аденовирусов, герпесвирусов, калицивирусов, коронавирусов, лиссавирусов, ортомиксовирусов, парамиксовирусов) и ряда других патогенов.

Урогенитальные смывы от живых тюленей собирались с целью идентификации возбудителей мультисистемных вирусных инфекций животных (аденовирусов, гепадновирусов, герпесвирусов, калицивирусов, папилломавирусов) и ряда других патогенов.

Ректальные смывы от живых тюленей собирались с целью идентификации возбудителей желудочно-кишечных и мультисистемных вирусных инфекций животных (аденовирусов, гепадновирусов, калицивирусов, папилломавирусов, парвовирусов) и ряда других патогенов.

Перечень необходимых материалов и оборудования для отбора биопробы: стерильные криоустойчивые герметичные полипропиленовые пробирки с закручивающейся крышкой (объемом 1,8-2 мл); вирус-транспортировочная среда, например: транспортная среда 199, содержащая комплекс антибиотиков (пенициллин 2000 ед./мл, стрептомицин 2 мг/мл, гентамицин 50 мкг/мл, нистатин 50 ед./мл) и бычий сывороточный альбумин в конечной концентрации 0,5% (в каждую пробирку добавляется по 0,8 мл смеси; нейлоновые (дакрон) или вязкие аппликаторы с пластиковым стержнем; ножницы; штатив для криопробирок; автономный переносной полевой принтер для печати этикеток, например, типа BRADY марки BMP21, картридж с устойчивой в жидком азоте самоклеящейся нейлоновой лентой (шириной 12,7 мм) и разноцветный перманентный маркер; антисептики и дезинфицирующие средства: этиловый спирт (70-80 % об.); раствор хлоргексидина биглюконата (20%); раствор перекиси водорода (3%); бутыл-спрей для дезинфицирующих средств; бумажные салфетки; средства индивидуальной защиты: одноразовые медицинские маски, одноразовые медицинские латексные перчатки; сосуд Дьюара с жидким азотом или переносной морозильник (- 80°C).

Метод отбора биопроб

Глазной смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Для сбора слезной жидкости и эпителиальных клеток необходимо аккуратно провести ватным кончиком аппликатора по конъюнктиве у нижнего края глазной щели, уделяя внимание латеральному углу глаза. Далее поместить аппликатор в криопробирку с транспортной средой и отрезать стержень. От одного животного необходимо отобрать 2 мазка. Каждый аппликатор поместить в отдельную пробирку.

Назальный смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Необходимо аккуратно ввести кончик аппликатора в ноздрю животного и сделать несколько вращательных движений, чтобы кроме истечения из носа, на него попали клетки эпителия слизистой оболочки (аппликатор вводится в каждую ноздрю; глубина введения до 4 см). Далее поместить аппликатор в криопробирку с вирус-транспортирующей средой и отрезать стержень. От одного животного необходимо отобрать 2 смыва. Каждый аппликатор поместить в отдельную пробирку.

Ротовой смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Необходимо аккуратно провести впитывающим кончиком аппликатора по внутренним сторонам щек и ротоглотки, уделяя внимание секрету тонзиллы. Далее поместить аппликатор в криопробирку с вирус-транспортирующей средой и отрезать стержень. От одного животного необходимо отобрать 2 смыва. Каждый аппликатор поместить в отдельную пробирку.

Урогенитальный смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Необходимо аккуратно провести впитывающим кончиком аппликатора по внутренним сторонам половых путей самки или препуция самца, уделяя внимание секрету. Далее поместить аппликатор в криопробирку с вирус-транспортирующей средой и отрезать стержень. От одного животного необходимо отобрать 2 смыва. Каждый аппликатор поместить в отдельную пробирку.

Ректальный смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Для сбора ректальных смывов и образцов фекалий необходимо аккуратно ввести аппликатор в анальное отверстие (глубина введения до 5-6 см) и провести по внутренним сторонам кишечника. Далее поместить аппликатор в криопробирку с вирус-транспортирующей средой и отрезать стержень. От одного животного необходимо отобрать 2 смыва. Каждый аппликатор поместить в отдельную пробирку [Manual of standards, 2019].

Маркировка индивидуальной упаковки. Пробирки с пробами маркировались с помощью самоклеящейся нейлоновой ленты, наклеиваемой внахлест. Для маркировки применялся код животного состоящий из латинского двухбуквенного обозначения места сбора материала, года сбора на указанной точке, двухзначного порядкового номера животного. Например: KU-22/01 (KU – Кулалы, 2022 г., 01 – номер животного). Указывается вид биоматериала - Ocular swab (глазной смыв), nasal swab (носовой смыв), buccal swab (ротовой смыв), genital swab (смыв урогенитальных путей), rectal swab (ректальный смыв); вид животного – *Pusa caspica*, дата сбора материала.

Информация в полевом журнале. В полевом журнале указывался номер животного, дата, время, место отбора пробы (GPS-координаты); информация о животном, которая необходима для дальнейших исследований: вид животного, пол, возраст (белек, сиварь, сеголетка, неполовозрелая особь, взрослая особь), морфометрические данные, окраска шерсти; содержимое пробы; количество проб, маркировка на индивидуальной этикетке, краткое описание индивидуальной упаковки, комментарии.

Хранение и транспортировка. Образцы во время полевых работ хранились в жидком азоте (-196°C) и транспортировались в специальном сосуде Дьюара, рекомендованном IATA для авиаперевозок. Допускается хранение смывов при температуре от 2 до 8°C – в течение 1-2 суток; при температуре -18°C – в течение 2-3 недель. При температуре -80°C или в жидком азоте образцы могут храниться длительно. Возможно только однократное замораживание и оттаивание биоматериала.

3.3.10. Отбор смывов для молекулярно-вирусологических исследований

Конъюнктивальные (глазные) смывы от живых тюленей собирались для массового параллельного секвенирования виroma в NGS (Next Generation Sequencing) и детекции нуклеиновых кислот возбудителей мультисистемных вирусных инфекций животных (аденовирусов, герпесвирусов, калицивирусов, коронавирусов, лиссавирусов, ортомиксовирусов, парамиксовирусов) и ряда других патогенов.

Насальные (носовые) смывы от живых тюленей собирались для массового параллельного секвенирования виroma в NGS и детекции нуклеиновых кислот возбудителей респираторных и мультисистемных вирусных инфекций животных передающихся воздушно-капельным путем в полимеразной цепной реакции (ПЦР); ортомиксовирусов (гриппозные инфекции); коронавирусов (коронавирус тюленей, коронавирус собак); морбилливирусов (в том числе чумы собак и чумы тюленей); герпесвирусов (альфа- и гамма-герпесвирусы тюленей серотипов 1-7); лиссавирусов (в том числе бешенства) и ряда других патогенов в организме животного.

Ротовые смывы от живых тюленей собирались для массового параллельного секвенирования виroma и детекции нуклеиновых кислот возбудителей респираторных, желудочно-кишечных и мультисистемных вирусных инфекций животных (аденовирусов, герпесвирусов, калицивирусов, коронавирусов, лиссавирусов, ортомиксовирусов, парамиксовирусов) и ряда других патогенов.

Урогенитальные смывы от живых тюленей собирались для массового параллельного секвенирования виroma и детекции нуклеиновых кислот возбудителей мультисистемных вирусных инфекций животных (аденовирусов, гепадновирусов, герпесвирусов, калицивирусов, папиломавирусов) и ряда других патогенов.

Ректальные смывы от живых тюленей собирались для массового параллельного секвенирования виroma и детекции нуклеиновых кислот возбудителей желудочно-кишечных и мультисистемных вирусных инфекций животных (аденовирусов, гепадновирусов, калицивирусов, папиломавирусов, парвовирусов) и ряда других патогенов.

Перечень необходимого для отбора биопробы: стерильные полипропиленовые пробирки с закручивающейся крышкой (объемом 1.8-2 мл); реагент DNA/RNA Shield для стабилизации нуклеиновых кислот в любом биологическом образце, сохраняет генетическую целостность и профили экспрессии образцов при температуре окружающей среды и полностью инактивирует инфекционные агенты (вирусы, бактерии, грибы и паразиты), необходимо добавить по 0,8 мл реагента в каждую пробирку; стерильные нейлоновые (дакроновые) или вязкие аппликаторы с пластиковым стержнем; ножницы; штатив для микропробирок; автономный переносной полевой принтер для печати этикеток, например, типа BRADY марки BMP21; картридж с самоклеящейся нейлоновой лентой (шириной 12,7 мм) и разноцветный перманентный маркер для маркировки. Антисептики и дезинфицирующие средства: этиловый

спирт (70-80 % об.); раствор хлоргексидина биглюконата (20%); раствор перекиси водорода (3%); бутыл-спрей для дезинфицирующих средств; бумажные салфетки; средства индивидуальной защиты: одноразовые медицинские маски, одноразовые медицинские латексные перчатки.

Метод отбора биопробы

Глазной смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Для сбора слезной жидкости и эпителиальных клеток необходимо аккуратно провести ватным кончиком аппликатора по конъюнктиве у нижнего края глазной щели, уделяя внимание латеральному углу глаза. Далее поместить аппликатор в пробирку с реагентом DNA/RNA Shield и отрезать стержень.

Носовой смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Необходимо аккуратно ввести кончик аппликатора в ноздрю животного и сделать несколько вращательных движений, чтобы кроме истечения из носа, на него попали клетки эпителия слизистой оболочки (аппликатор вводится в каждую ноздрю; глубина введения до 4 см). Далее поместить аппликатор в пробирку с реагентом DNA/RNA Shield и отрезать стержень.

Ротовой смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Необходимо аккуратно провести впитывающим кончиком аппликатора по внутренним сторонам щек и ротоглотки, уделяя внимание секрету тонзиллы. Далее поместить аппликатор в пробирку с реагентом DNA/RNA Shield и отрезать стержень.

Урогенитальный смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Необходимо аккуратно провести впитывающим кончиком аппликатора по внутренним сторонам половых путей самки или препуция самца, уделяя внимание секрету. Далее поместить аппликатор в пробирку с реагентом DNA/RNA Shield и отрезать стержень.

Ректальный смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Для сбора ректальных смывов и образцов фекалий необходимо аккуратно ввести аппликатор в анальное отверстие животного (глубина ввода до 5-6 см) и провести по внутренним сторонам кишечника. Далее поместить аппликатор в пробирку с реагентом DNA/RNA Shield и отрезать стержень.

Маркировка индивидуальной упаковки. Пробирки с пробами маркировались с помощью самоклеящейся нейлоновой ленты, наклеиваемой внахлест. Для маркировки применялся код животного состоящий из латинского двухбуквенного обозначения места сбора материала, года сбора на указанной точке, двухзначного порядкового номера животного. Например: KU-22/01 (KU – Кулалы, 2022 г., 01 – номер животного). Указывался вид биоматериала - Ocular NA (глазные НК), nasal NA (носовые НК), buccal NA (ротовые НК), genital NA (НК урогенитальных путей), rectal NA (ректальные НК); вид животного – *Pusa caspica*, дата сбора материала.

Информация в полевом журнале. В полевом журнале указывался номер животного, дата, время, место отбора пробы (GPS-координаты); информация о животном, которая необходима для дальнейших исследований: вид животного, пол, возраст (белек, сиварь, сеголетка, неполовозрелая особь, взрослая особь), морфометрические данные, окраска шерсти; содержимое пробы; количество проб, маркировка на индивидуальной этикетке, краткое описание индивидуальной упаковки, комментарии.

Хранение и транспортировка. Для конъюнктивальных, назальных, ротовых, урогенитальных и ректальных смывов, или мазков, допускается хранение в реагенте DNA/RNA Shield при температуре от 35-40°C до 7 суток; при температуре 4-25°C до 30 суток. При температуре -20°C и ниже образцы могут храниться длительно.

3.3.11. Отбор смывов для молекулярно-бактериальных исследований

Конъюнктивальные (глазные) смывы от живых тюленей собирались для массового параллельного секвенирования гена 16S мРНК микробиома слизистой ткани глаз животных и бактериальных возбудителей инфекционных заболеваний роговицы в NGS (Next Generation Sequencing): псевдомонад, моракселез, клебселиоз, лептоспироз.

Назальные (носовые) смывы от живых тюленей собирались для массового параллельного секвенирования гена 16S мРНК микробиома носовой полости и бактериальных возбудителей респираторных заболеваний животных в NGS: аэромонад, бордетелиоз, стафилококков, стрептококков, микоплазмоз, лептоспироз.

Ротовые смывы от живых тюленей собирались для массового параллельного секвенирования гена 16S мРНК микробиома ротовой полости и возбудителей мультисистемных бактериальных инфекций животных в NGS (диплококкозов, бордетелиозов, стафилококкозов, стрептококкозов, лептоспирозов, листериозов, микоплазмозов, пастереллезы) и ряда других патогенов.

Урогенитальные смывы от живых тюленей собирались для массового параллельного секвенирования гена 16S мРНК микробиома половых путей и бактериальных возбудителей мультисистемных инфекций животных в NGS (аэромоназов, бруцеллеза, лептоспирозов, эдвардсиеллез, пастереллез и ряда других патогенов).

Ректальные смывы от живых тюленей собирались для массового параллельного секвенирования гена 16S мРНК микробиома желудочно-кишечного тракта и бактериальных возбудителей кишечных инфекций животных в NGS (сальмонеллез, клостридиозы, кампилобактериозы и ряд других патогенов).

Перечень необходимого для отбора биопробы: стерильные полипропиленовые пробирки с закручивающейся крышкой (объемом 1,8-2 мл); реагент DNA/RNA Shield - для стабилизации нуклеиновых кислот в любом биологическом образце, сохраняет генетическую целостность и профили экспрессии образцов при температуре окружающей среды и полностью инактивирует инфекционные агенты (вирусы, бактерии, грибы и паразиты), необходимо добавить по 0,8 мл реагента в каждую пробирку; стерильные нейлоновые (дакроновые) или вискозные аппликаторы с пластиковым стержнем; ножницы; штатив для микропробирок; автономный переносной полевой принтер для печати этикеток, например, типа BRADY марки BMP21; картридж с самоклеящейся нейлоновой лентой (шириной 12,7 мм) и разноцветный перманентный маркер для маркировки; антисептики и дезинфицирующие средства: этиловый спирт (70-80 % об.); раствор хлоргексидина биглюконата (20%); раствор перекиси водорода (3%); бутыл-спрей для дезинфицирующих средств; бумажные салфетки; средства индивидуальной защиты: одноразовые медицинские маски, одноразовые медицинские латексные перчатки.

Метод отбора биопробы

Глазной смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Для сбора слезной жидкости и эпителиальных клеток необходимо аккуратно провести ватным кончиком аппликатора по конъюнктиве у нижнего края глазной щели, уделяя внимание латеральному углу глаза. Далее поместить аппликатор в пробирку с реагентом DNA/RNA Shield и отрезать стержень.

Носовой смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Необходимо аккуратно ввести кончик аппликатора в ноздрю животного и сделать несколько вращательных движений, чтобы кроме истечения из носа, на него попали клетки эпителия слизистой оболочки (аппликатор вводится в каждую ноздрю; глубина введения до 4 см). Далее поместить аппликатор в пробирку с реагентом DNA/RNA Shield и отрезать стержень.

Ротовой смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Необходимо аккуратно провести впитывающим кончиком аппликатора по внутренним сторонам щек и ротоглотки, уделяя внимание секрету тонзиллы. Далее поместить аппликатор в пробирку с реагентом DNA/RNA Shield и отрезать стержень.

Урогенитальный смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Необходимо аккуратно провести впитывающим кончиком аппликатора по внутренним сторонам половых путей самок или препуция самцов, уделяя внимание секрету. Далее поместить аппликатор в пробирку с реагентом DNA/RNA Shield и отрезать стержень.

Ректальный смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Для сбора ректальных смывов и образцов фекалий необходимо аккуратно ввести аппликатор в анальное отверстие животного (глубина введения до 5-6 см) и провести по внутренним сторонам кишечника. Далее поместить аппликатор в пробирку с реагентом DNA/RNA Shield и отрезать стержень.

Маркировка индивидуальной упаковки. Пробирки с пробами маркировались с помощью самоклеящейся нейлоновой ленты, наклеиваемой внахлест. Для маркировки применялся код животного состоящий из латинского двухбуквенного обозначения места сбора материала, года сбора на указанной точке, двухзначного порядкового номера животного. Например: KU-22/01 (KU – Кулалы, 2022 г., 01 – номер животного). Указывается вид биоматериала - Ocular NA (глазные НК), nasal NA (носовые НК), buccal NA (ротовые НК), genital NA (НК урогенитальных путей), rectal NA (ректальные НК); вид животного – *Pusa caspica*, дата сбора материала.

Информация в полевом журнале. В полевом журнале указывался номер животного, дата, время, место отбора пробы (GPS-координаты); информация о животном, которая необходима для дальнейших исследований: вид животного, пол, возраст (белек, сиварь, сеголетка, неполовозрелая особь, взрослая особь), морфометрические данные, окраска шерсти; содержимое пробы; количество проб, маркировка на индивидуальной этикетке, краткое описание индивидуальной упаковки, комментарии.

Хранение и транспортировка. Для конъюнктивных, назальных, ротовых, урогенитальных и ректальных смывов, или мазков, допускается хранение в реагенте DNA/RNA Shield при температуре от 35-40°C до 7 суток; при температуре 4-25°C до 30 суток. При температуре -20°C и ниже образцы могут храниться длительно.

3.3.12. Отбор ректальных смывов или свежих образцов фекалий для молекулярно-паразитологических исследований

Ректальные смывы от живых тюленей собирались для массового параллельного секвенирования генов 16S mtDNA, 12S mtDNA, 28S rDNA гельминтофауны животных в NGS (Next Generation Sequencing).

Перечень необходимых материалов для отбора биопробы: стерильные полипропиленовые пробирки с закручивающейся крышкой (объемом 1.8-2 мл); реагент DNA/RNA Shield - для стабилизации нуклеиновых кислот в любом биологическом образце, сохраняет генетическую целостность и профили экспрессии образцов при температуре окружающей среды и полностью инактивирует инфекционные агенты (вирусы, бактерии, грибы и паразиты), необходимо добавить по 0,8 мл реагента в каждую пробирку; стерильные нейлоновые (дакроновые) или вискозные аппликаторы с пластиковым стержнем; ножницы; штатив для микропробирок; автономный переносной полевой принтер для печати этикеток, например типа BRADY марки BMP21; картридж с самоклеящейся нейлоновой лентой (шириной 12,7 мм) и разноцветный перманентный маркер для маркировки; антисептики и дезинфицирующие средства: этиловый спирт (70-80 % об.); раствор хлоргексидина биглюконата (20%); раствор перекиси водорода (3%); бутыл-спрей для дезинфицирующих средств; бумажные салфетки; средства индивидуальной защиты: одноразовые медицинские маски, одноразовые медицинские латексные перчатки.

Метод отбора биопробы

Ректальный смыв. Отбор биоматериала выполнялся при физической иммобилизации животного. Для сбора ректальных смывов и образцов фекалий необходимо аккуратно ввести аппликатор в анальное отверстие животного (глубина ввода до 5-6 см) и провести по внутренним сторонам кишечника. Далее поместить аппликатор в пробирку с реагентом DNA/RNA Shield и отрезать стержень.

Образцы фекалий. Для сбора образцов фекалий необходимо ввести аппликатор в толщу фекалий и провернуть несколько раз. Далее поместить аппликатор в пробирку с реагентом DNA/RNA Shield и отрезать стержень.

Маркировка индивидуальной упаковки. Пробирки с пробами маркировались с помощью самоклеящейся нейлоновой ленты, наклеиваемой внахлест. Для маркировки применялся код животного состоящий из латинского двухбуквенного обозначения места сбора материала, года сбора на указанной точке, двухзначного порядкового номера животного. Например: KU-23/01 (KU – Кулалы, 2023 год, 01 – номер животного). Указывается вид биоматериала - rectal NA (ректальные НК), вид животного – *Pusa caspica*, дата сбора материала.

Информация в полевом журнале. В полевом журнале указывался номер животного, дата, время, место отбора пробы (GPS-координаты); информация о животном, которая необходима для дальнейших исследований: вид животного, пол, возраст (белек, сиварь, сеголетка, неполовозрелая особь, взрослая особь), морфометрические данные, окраска шерсти; содержимое пробы; количество проб, маркировка на индивидуальной этикетке, краткое описание индивидуальной упаковки, комментарии.

Хранение и транспортировка. Допускается хранение ректальных смывов и образцов фекалий в реагенте DNA/RNA Shield при температуре от 35-40°C до 7 суток; при температуре 4-25°C до 30 суток. При температуре -20°C и ниже образцы могут храниться длительно.

3.3.13. Отбор смывов для микробиологических исследований

Насальные, анальные и вагинальные мазки собираются с целью идентификации в них патогенных микроорганизмов, представляющих угрозу для благополучного существования вида, либо потенциально опасных для него.

Перечень оборудования, инструментов и расходных материалов для отбора биопробы: полимерные пробирки с наполнителем (зондом с вязкозным наконечником); средства защиты: одноразовые медицинские маски из нетканого материала и одноразовые медицинские латексные перчатки; антисептики и дезинфицирующие средства: этиловый спирт (96% об.); раствор хлоргексидина биглюконата (20%); раствор перекиси водорода (3%); лаковый маркер для маркировки образцов.

Метод отбора биопробы: назальные, анальные и вагинальные мазки отбирали введением всего наконечника зонда внутрь носовых ходов, ануса и вагины животного соответственно. Зонд проворачивали двумя-четырьмя круговыми движениями с тем чтобы, кроме секрета, на него попали клетки эпителия слизистой оболочки. Каждый зонд помещали в отдельную стерильную пробирку. От одного животного отбирали 9 мазков: 3 носовых, три анальных и три вагинальных. Пробирки с мазками маркировали, используя лаковый маркер. Информация о взятии проб вносилась в полевой протокол.

Маркировка индивидуальной упаковки. Пробирки с пробами маркируются с помощью самоклеящейся нейлоновой ленты, наклеиваемой внахлест. Для маркировки применяется код животного, состоящий из латинского двухбуквенного обозначения места сбора материала, года сбора на указанной точке, двухзначного порядкового номера животного. Например: PR.2019-09 (PR – Прорва, 2019 г., 09 – номер животного). Указывается вид биоматериала – Н (назальные), А (анальные), В (вагинальные); вид животного – PC (*Pusa caspica*), дата сбора материала.

Информация в полевом журнале. В полевом журнале указывается номер животного, дата, время, место отбора пробы (GPS-координаты); информация о животном, которая необходима для дальнейших исследований: вид животного, пол, возраст (белек, сиварь, сеголетка, неполовозрелая особь, взрослая особь), морфометрические данные, окраска шерсти; содержимое пробы; количество проб, маркировка на индивидуальной этикетке, краткое описание индивидуальной упаковки, комментарии.

Хранение и транспортировка. Отобранные мазки хранятся и транспортируются в полевых условиях при температуре минус 15 – минус 30 °С. Для непродолжительной транспортировки используется термосумка или термоконтейнер с замороженными аккумуляторами холода.

3.3.14. Отбор тканей для вирусологических исследований

Ткани головного мозга, легких, сердца, печени, почек и лимфатических узлов от павших тюленей собирались для идентификации, изоляции и молекулярной диагностики вирусных инфекций животных; ортомиксовирусов (гриппозные инфекции); коронавирусов (коронавирус тюленей, коронавирус собак); морбилливирусов (в том числе чумы собак и чумы тюленей); герпесвирусов (альфа- и гамма-герпесвирусы тюленей серотипов 1-7); лиссавирусов (в том числе бешенства) и ряда других патогенов организме животного.

Перечень необходимого для отбора биопробы: стерильные полипропиленовые пробирки с закручивающейся крышкой (объемом 1.8-2 мл); вирус-транспортировочная среда, например, транспортная среда 199, содержащая комплекс антибиотиков (пенициллин 2000 ед/мл, стрептомицин 2 мг/мл, гентамицин 50 мкг/мл, нистатин 50 ед/мл) и бычий сывороточный альбумин в конечной концентрации 0,5% (необходимо добавить по 0,8 мл смеси в каждую пробирку); реагент DNA/RNA Shield для стабилизации нуклеиновых кислот в любом биологическом образце, сохраняет генетическую целостность и профили экспрессии образцов при температуре окружающей среды и полностью инактивирует инфекционные агенты (вирусы, бактерии, грибы и паразиты), необходимо добавить по 0,8 мл реагента в каждую пробирку; стерильные нейлоновые (дакроновые) или вязкозные аппликаторы с пластиковым стержнем; кипятильник дезинфекционный; нож ветеринарный ампутационный малый; нож резекционный брюшистый; нож хрящевой реберный; ножницы анатомические кишечные прямые; ножницы реберные; ножницы тупоконечные прямые; перчатки анатомические; пила листовая с пластмассовой ручкой; пинцет анатомический общего назначения; скальпель, например, ветеринарный брюшистый средний и черенок скальпеля для съемных лезвий с размерами 21-25; штатив для микропробирок; автономный переносной полевой принтер, например, типа

BRADY марки BMP21; картридж с самоклеящейся нейлоновой лентой (шириной 12,7 мм) и разноцветный перманентный маркер для маркировки; антисептики и дезинфицирующие средства: этиловый спирт (70-80 % об.); раствор хлоргексидина биглюконата (20%); раствор перекиси водорода (3%); бутыл-спрей для дезинфицирующих средств; бумажные салфетки; средства индивидуальной защиты: одноразовые медицинские маски, одноразовые медицинские латексные перчатки.

Метод отбора биопробы. Выполнялось вскрытие животного [Pugliares et al., 2007].

Мозг должен быть исследован путем удаления верхней части черепа с помощью пилы. Срез мозга объемом по 1 см³ следует брать в асептических условиях и поместить в криопробирку с вирус транспортирующей средой и пробирки с реагентом DNA/RNA Shield.

Вскрыть грудную клетку, удалив нижнюю часть стенки с помощью ножниц для кости. В асептических условиях отбирают срез ткани легких, селезенки и бронхиального лимфатического узла объемом 1 см³ и помещают в криопробирку с вирус- транспортирующей средой и пробирки с реагентом DNA/RNA Shield.

Маркировка индивидуальной упаковки. Пробирки с пробами маркировались с помощью самоклеящейся нейлоновой ленты, наклеиваемой внахлест. Для маркировки применялся код животного состоящий из латинского двухбуквенного обозначения места сбора материала, года сбора на указанной точке, двухзначного порядкового номера животного. Например, KU-22/01 (KU – Кулалы, 2022 год, 01 – номер животного). Указывается вид биоматериала – brain (головной мозг), lung, (легкие) spleen (селезенка) bronchi lymph node (бронхиальные лимфоузлы), вид животного – *Pusa caspica*, дата сбора материала.

Информация в полевом журнале. В полевом журнале указывался номер животного, дата, время, место отбора пробы (GPS-координаты); информация о животном, которая необходима для дальнейших исследований: вид животного, пол, возраст (белек, сиварь, сеголетка, неполовозрелая особь, взрослая особь), морфометрические данные, окраска шерсти; содержимое пробы; количество проб, маркировка на индивидуальной этикетке, краткое описание индивидуальной упаковки, комментарии.

Хранение и транспортировка

Образцы тканей головного мозга, легких, сердца, печени, почек и лимфатических узлов от павших тюленей хранились во время полевых работ в жидком азоте (-196 °C) и транспортировались в специальном сосуде Дьюара, рекомендованном IATA для авиаперевозок. Допускается хранение образцов, помещенных в вирус-транспортную среду, при температуре от 2 до 8° C – в течение 1-2 суток; при температуре -18° C – в течение 2-3 недель; при температуре -80° C или в жидком азоте – длительно. Возможно только однократное замораживание и оттаивание биоматериала.

Допускается хранение образцов, помещенных в реагент DNA/RNA Shield, при температуре от 35-40° C до 7 суток; при температуре 4-25° C до 30 суток. При температуре -20° C и ниже образцы могут храниться длительно.

3.3.15. Отбор биологического материала для морфологических исследований

Образцы тканей, дериватов кожи, органов тюленя отбирали для исследований методами световой и сканирующей электронной микроскопии.

Перечень необходимого оборудования для отбора и фиксации биопроб: секционный нож; одноразовый скальпель; медицинские ножницы; медицинский анатомический пинцет общего назначения; пластиковые пробирки и небольшие пластиковые контейнеры с герметичной крышкой; этикетки; водостойчивый маркер; парафильм-лента лабораторная; пластиковые пакеты с застежкой «зип-лок»; термосумка или транспортировочный контейнер; антисептики и дезинфицирующие средства (этиловый спирт (96%); раствор хлоргексидина биглюконата (20%); раствор перекиси водорода (3%)), марлевые салфетки; средства индивидуальной защиты (халат медицинский, одноразовая медицинская повязка, одноразовые перчатки); 10%-ный забуференный (нейтральный) раствор формалина; контейнер для транспортировки биоматериала в первичной упаковке; полевой дневник.

Метод отбора биопроб. У павшего животного отбирали образцы кожи, когтей, вибрисс, волос, желудка, толстого кишечника, печени, почек. У живого животного отбирали образцы волос и вибрисс. Для фиксации биоматериала использовали 10%-ный нейтральный раствор формалина. Соотношение биопробы и раствора 1:10.

Отбор волос. Волосы (небольшой пучок – 15-20 шт.) срезали ножницами или скальпелем с холки животного и с помощью пинцета помещали в пластиковую пробирку с герметичной крышкой, заранее заполненную 96% этанолом.

Отбор вибрисс. У живого животного ножницами срезали одну вибриссу над глазами, у павшего животного – 2-3 шт. на верхней губе. Образцы помещали в герметичную пластиковую пробирку или герметичный контейнер, заранее заполненный 96% этанолом.

Отбор кожи. Кожу (вместе с волосяным покровом) скальпелем отделяли от подкожной жировой клетчатки. Затем полученный фрагмент нарезают ножницами на кусочки размером около 0,5х0,5 см. Для исследования достаточно три образца, приготовленных таким образом. Полученные образцы помещали в герметичную пластиковую пробирку или герметичный контейнер с формалином.

Выполняли вскрытие животного [Pugliares et al., 2007].

Отбор когтей. Пять когтей с передней лапы отрезают по суставу дистальной фаланги и помещают в пластиковый пакет с застежкой zip-лок.

Все пробирки и контейнеры с биоматериалом маркировали, горлышко каждой пробирки дополнительно обматывали лабораторной парафильм-лентой, помещали во вторичную упаковку с застежкой «zip-лок» и термосумку или транспортировочный контейнер.

Маркировка индивидуальной упаковки. На этикетке указывали: номер животного; вид животного (*Pusa caspica* Gmelin, 1788); вид и назначение биоматериала (например, кожа /морфология/ или волосы /микроанализ/); дата отбора образца в формате ДД.ММ.ГГ.

Информация в полевом журнале. В полевом журнале указывался номер животного, дата, время, место отбора пробы (GPS-координаты); информация о животном, которая необходима для дальнейших исследований: вид животного, пол, возраст, вес (белек, сиварь, сеголетка, неполовозрелая особь, взрослая особь), морфометрические данные, окраска шерсти; содержимое образцов; количество образцов, маркировка на индивидуальной этикетке, краткое описание индивидуальной упаковки, комментарии.

Хранение и транспортировка. Пробы хранили и транспортировали в замороженном виде. Для непродолжительной транспортировки использовалась термосумка или термоконтейнер с аккумуляторами холода.

3.3.16. Мечение животных

Описание меток:

Для мечения использовались спутниковые радиометки серии «Пульсар» производства ЗАО «Эс-Пасс», Россия (рисунок 3.3.6). Радиомаяк функционирует в составе международной спутниковой системы определения местоположения и сбора данных Argos, позволяющей определять местоположение животного на базе эффекта Доплера (таблица 3.3-2).



Рисунок 3.3.6 Радиометка серии «Пульсар»

Таблица 3.3-2 Техническая характеристика радиомаяка «Пульсар»

Радиосигнал:	
Несущая частота	401,650±МГц
Мощность излучаемого сигнала	700 мВт
Вид модуляции сигнала	фазовая манипуляция с индексом 1,1 радиан и битовой скоростью 400 Гц
Период излучения	1 мин
Определение координат:	
Способ определения местоположения	на базе эффекта Доплера системы Argos
Эксплуатация:	
Температура окружающей среды	от -40 до +60°C
Температура хранения	от -10 до +10°C
Продолжительность работы	не менее 12 месяцев
Конструкция:	
Источник питания	литиевые батареи
Выключатель	съемный магнитный
Корпус	монолитный, герметичный
Антенна	штыревая, гибкая
Масса	не более 350 г

Описание работы меток:

Все передатчики работают на частотах спутниковой системы Argos (ARGOS, Advanced Research and Global Observation Satellite) – совместной французско-американской программы по космическому мониторингу природной среды. Радиосигналы, подаваемые меткой, фиксируются пролетающим над данной территорией спутником. Для приема спутником сигнала от передатчика необходимо, чтобы сам передатчик и антенна полностью находились над водой. Для получения относительно точной информации о местоположении животного, необходимо, чтобы спутник получил минимум 4 сообщения от передатчика: 3 – для определения местонахождения по эффекту Доплеровского смещения частоты, и четвертая – для оценки смещения передатчика относительно собственной позиции. После приема данных космический аппарат передает их в центр обработки данных.

Полученные данные имеют различный класс точности: данные низкой точности имеют буквенные обозначения – A, B, Z и 0, более высокой численные – от 1 до 3. Класс точности отражает радиус овала, в котором может находиться данная точка, а также выражает вероятность ошибки (таблица 3.3-3; см. сайт <http://www.argos-system.org/>).

Таблица 3.3-3 Погрешность классов точности

Класс	Погрешность (м)
3	<250
2	250m < < 500
1	500m < < 1500
0	>1500
A	Нет оценки
B	Нет оценки
Z	Неверное местоположение

Установка меток на тюлене:

Метка «Пульсар» прикреплялась на спину животного между лопаток [Fedak et al., 1983; Mazzaro and Dunn, 2009]. Шерсть в месте мечения предварительно очищалась от песка и грязи и обезжиривалась с помощью медицинского спирта и ацетона. Для достижения максимального сцепления обезжиривалась также и поверхность передатчика [Stewart et al., 1989]. После этих приготовлений на шерсть и на метку наносился слой быстросохнущей (пятиминутной) эпоксидной смолы. Поверхности прижимались друг к другу и выдерживались в течение 15 минут.

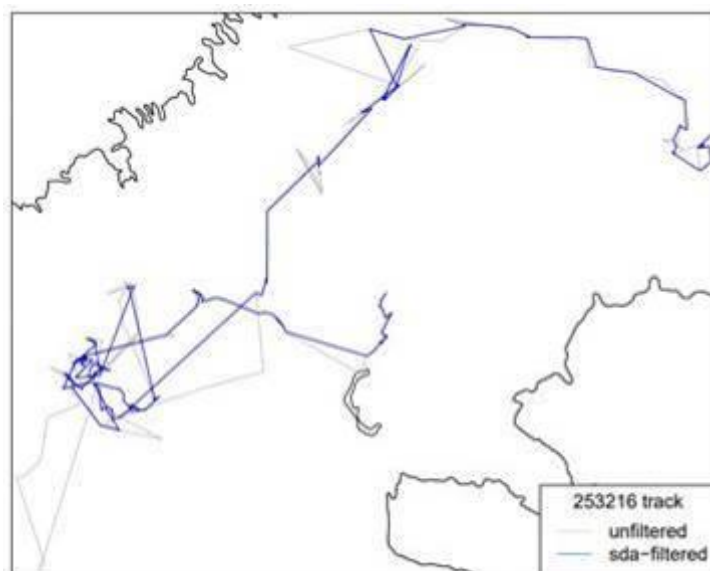
Медицинские препараты для седирования животных не применялись. За состоянием животного постоянно следили специалисты, не позволяя тюленю перегреться, пораниться или задохнуться.

Обработка спутниковых данных:

Информация о местоположении зверей считывалась с информационного пула компании ARGOS CLS через интернет. Поступившие данные были декодированы с использованием программного обеспечения производителя (WC-DAP 3.0, Wildlife Computers) и прошли предварительную фильтрацию по методу Кальмана (Kalman Filtering algorithm) на сайте системы Argos (www.argos-system.cls.fr). Полученные данные являются «сырыми» и перед анализом должны пройти три этапа фильтрации – предварительную фильтрацию, фильтрацию самого трека и фильтрацию по географическому принципу.

Предварительная фильтрация, позволяющая удалить повторные и ошибочные сообщения, проводилась в Ms Excel и применялась для всех данных.

Фильтрация трека производилась для каждого передатчика в отдельности SDA-фильтром (speed-distance-angle) пакета argosfilter для R [Freitas et al., 2008; R Development Core Team, 2011]. Фильтр учитывает максимальную скорость перемещения, угол между тремя последовательными локациями и расстояние между ними. При фильтрации использовали следующие параметры: максимальная скорость перемещения тюленей – 1,5 м/с [Watanabe et al., 2004]; максимальный угол между двумя отрезками пути длиной больше 2,5 км – 15°, длиной 5 км – 25°. После прохождения данного фильтра были удалены все локации, полученные ошибочно (рисунок 3.3.7).



Обозначения: *unfiltered* – трек до применения фильтра; *sda-filtered* – трек после применения sda-фильтра

Рисунок 3.3.7 Карта-схема пространственной фильтрации данных на примере метки №252216 с помощью SDA-фильтра

Пространственная фильтрация по географическому принципу проводилась в пакете программ ArcMap 10.4.1. В ходе этого этапа из треков удалялись все локации, оказавшиеся на удалении от береговой линии вглубь суши более чем на 1 км.

Прошедшие через все фильтры данные использовались для дальнейшей работы.

Определение ключевых акваторий:

Для определения вероятности использования акватории животным использовали метод фиксированного контура, или метод ядерных полигонов (kernel method), [Worton, 1989]. Это непараметрический метод, часто используемый для оценки вероятности появления животного в каждой точке пространства. Расчеты производятся с использованием 2-мерной функции плотности вероятности (2-dimensional probability density function, PDF), также известной как ядерная функция или функция кернел. Данная функция вычисляет плотность точечных объектов вокруг каждой локации. В результате определяется набор полигонов, в каждом из которых различается вероятность встречи животного, то есть оценивается регулярность использования животным пространства. При этом плотность распределения точек находится в обратной зависимости от вероятности нахождения [Citta et al., 2012].

На картах отображается в виде полигонов (ядерные зоны, core area) с оценкой в процентах. Так, полигон с 90% вероятностью - район, в пределах которого прослеживаемое животное находилось практически всегда, а с 10% вероятностью - редко, но плотность точек в нем максимальная, и значит, он наиболее важен для животного. Традиционно при описании используются полигоны 50% и 95%. Расчеты были проведены с помощью пакетов Home range и Animal movements для программы ArcView GIS 3.2 [Powell, 2000]. В анализ входили все локации, полученные за исследованный промежуток времени.

Расчет активности и скорости перемещения

Из полученного набора точек для каждого дня, для которого имелись данные, выбирали одну точку, ближайшую к 12:00:00 по показателю времени с наилучшим показателем качества (поле Location quality). Отобранные точки соединяли и для полученных отрезков рассчитывали их длину, которая являлась пройденным тюленем расстоянием за данный отрезок времени. Таким расстоянием, пройденным за определенный отрезок времени (за сутки, за месяц или за все время прослеживания), характеризовали активность тюленей. Скорость перемещения тюленей (км/ч) рассчитывали путем деления длины отрезка на количество часов между двумя точками. Активность и скорость перемещения были определены только для периода ноябрь-декабрь-январь, так как в феврале данных для этого анализа было недостаточно (метки передавали точки не каждый день).

Статистическую обработку данных проводили стандартным инструментом Descriptive statistics в программе STATISTICA 12.

Анализ данных батиметрии

Для анализа батиметрии были использованы карты глубин GebcoMaps для Каспийского моря (<http://www.gebco.net>). Точность использованных карт - 1 м, пространственное разрешение – 00°00'30".

В пакете программ ArcMap 10.4.1 был проведен анализ идентичности (Identity analysis) с помощью инструмента «Идентичность». Данный инструмент вычисляет геометрическое пересечение между входными объектами и объектами идентичности. К входным объектам или их частям, которые совпадают с объектами идентичности, присоединяются атрибуты соответствующих объектов идентичности.

Для каждой локации была определена глубина акватории, в которой она находилась. Дальнейший анализ проводился и визуализировался в пакетах программ Statistica 8 и Microsoft office.

Анализ ледовой обстановки

Для анализа ледовой обстановки в районах перемещений животных были использованы карты Государственного научного центра «Арктический и антарктический научно-исследовательский институт», находящиеся в открытом доступе (<http://www.aari.ru>). Карты формируются 1 раз в одну-две недели (в зависимости от сезона года). Содержат информацию о наличии льда, типе льда, сплоченности льда и другие характеристики.

Для дальнейших анализов использовались такие параметры льда, как его тип, и сплоченность:

1. Тип льда [Снежинский, 1954]:

- Нилас – начальный вид развития льда. Тонкая, эластичная корка льда, легко прогибающаяся на волне и зыби и при сжатии образующая зубчатые наслоения. Имеет матовую поверхность и толщину до 10 см;
- Молодой лед – включает в себя понятия «серый лед» и «серо-белый лед», встречающиеся в некоторых, более подробных классификациях. Для наших целей было достаточно общего понятия. Это переходная форма льда, толщиной от 10 до 30 см;
- Однолетний лед – большая группа льдов, включающая в себя покрытие толщиной от 30 до 200 см, просуществовавшее не более одной зимы.

Все перечисленные виды льда существуют только один год. Многолетнего льда, покрывающего воду более одного года подряд, в исследуемых акваториях не образуется. Для областей, не покрытых льдом вообще, использовалось понятие «чисто» или «открытая вода».

2. Сплоченность льда – условная величина, характеризующая степень покрытия поверхности воды дрейфующим льдом. Ее количественное значение оценивается через отношение общей площади льда к общей площади видимой морской поверхности. Сплоченность измеряется по десятибалльной шкале, причем 10 баллов соответствуют сплошному льду, а 0 баллов – чистой воде. В некоторых источниках баллы переводятся в проценты – от 0 до 100 [Сплоченность льда, 1987].

Для сопоставления данных о перемещениях животных с данными о ледовой обстановке в пакете программ ArcMap 10.4.1. был проведен анализ идентичности (Identity analysis). Инструмент «Идентичность» каждому входному объекту (локации) присоединяет атрибуты соответствующих объектов идентичности (ледовые карты) с которыми он совпадает. Для каждой ледовой карты выбирались только те локации, которые совпадали по временному промежутку. В атрибуты каждой локации записывались данные о типе льда, его сплоченности и (при наличии) – подвижности. В случае, если локаций попадала на открытую воду в атрибутах отмечалось отсутствие льда («чисто»). Анализ и сравнение ледовой обстановки между сезонами года и в различных акваториях было проведено в программе Microsoft excel.

3.4. Аналитические методы

3.4.1. Токсикологические исследования на содержание тяжелых металлов

До аналитических работ образцы шерсти каспийского тюленя хранились в морозильной камере при температуре -10°C .

Определение содержания ртути в волосах и вибриссах проводилось на атомно-абсорбционном спектрометре с зеемановской коррекцией РА 915М с пиролитической приставкой ПИРО (Свидетельство Госреестра РИ РФ 59385-14, заводской №2972 свидетельство о поверке 243/195-2020). Для определения ртути предварительно взвешенный образец шерсти тюленя (20-50 мг) помещался в пиролитическую камеру ПИРО для термического разложения с одновременной адсорбцией ртути. Детектирование атомов ртути происходит методом беспламенной атомной абсорбции с помощью анализатора ртути РА-915М. Результаты анализа отображаются с помощью специального программного обеспечения РАПИД.

Аналогичным способом проводилось определение ртути в вибриссах.

При определении ртути в крови 100 мкл образца сорбировалось на прокаленном активированном угле и после этого помещалось в пиролитическую камеру. Оставшийся образец крови подвергался лиофилизации. После высушивания содержание ртути определялось в 10-20 мг сухой крови.

Определение концентрации ртути в одном образце шерсти и крови проводилось в трехкратной повторности. Число повторностей при анализе вибрисс зависело от объема поступившей пробы (1-6 повторности).

Для контроля точности измерений использовались стандартные образцы DORM-2 (fish protein, NRC-CNRC, Канада) и внутренний стандарт ИБВВ РАН (мышцы судака), (таблица 3.4-1). Для этого перед анализом определялось содержание ртути в стандартных образцах. Погрешность составила 3-5%, что соответствует допустимой ошибке метода измерения.

Таблица 3.4-1 Контроль качества

Определяемые параметры	Дата анализа	Стандартный образец	Концентрация по сертификату, ppm	Результаты измерений, ppm
Ртуть	1.12.2023	DORM-2	4.47±0.32	4.40±0.10
Ртуть	1.12.2023	Мышцы судака	2.22±0.20	2.25±0.05

3.4.2. Гормональные исследования

Оценка гормонального статуса животных проводилась с использованием наборов ИФА компании Иммунотех (Москва, Россия) для измерений уровня кортизола, тестостерона, прогестерона и свободного трийодтиронина. Оценка проводилась в парных измерениях с расчетом коэффициента вариации для двух измеряемых образцов. При коэффициенте вариации более 5% измерения проводились заново. При выявлении высоких (вне пределов стандартной кривой) концентраций гормонов они разводились PBS и перемерялись.

Концентрации прогестерона и тестостерона использовались как параметр оценки активности половой системы животных, концентрация кортизола позволяла оценить уровень стрессированности животных в данный момент времени, концентрация трийодтиронина (Т3) характеризовала интенсивность обмена в организме, в определенной степени отражая обеспеченность животных кормом (чем выше Т3, тем больше были обеспечены животные кормом). Следует отметить, что уровень кортизола также может увеличиваться при недостатке корма.

Экстракция гормонов из волос проводилась по ранее описанному методу [Mastromonaco et al., 2014]. Волосы без волосяных луковиц промывались в течение двух минут в 100% метаноле (удаляя потенциальные остатки гормонов, которые могли попасть на них со слюной или кровью), а затем высушивали при температуре +50°C. Высушенные волосы измельчались ножницами и взвешивались в 15 мл пробирке. Вес волос (обычно 0,03-0,12 г), которые использовались для экстракции, фиксировались с точностью до 0,0001 г (0,1 мг), а затем добавлялся 100% метанол из расчета 10 мл метанола на 0,1 г волос (то есть на 0,0545 г волос добавлялось 5,45 мл метанола). Пробирки герметично закупоривались и пробы ставились на 24-часовую экстракцию в прибор Bio RS-24 Mini-Rotator (Biosan, Южная Корея). После проведения экстракции многократной пипеткой отбиралось 2 мл раствора и помещалось в пробирку Эппендорфа для выпаривания при температуре +55°C. После полного испарения метанола в пробирку добавляли 0,4 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) для растворения гормонов. Все измерения проводились согласно инструкциям производителя, при необходимости (высоких концентрация гормонов) пробы были разведены PBS в соотношении 1:5. Аналогично проводилась экстракция для вибрисов, предварительно разделяя их на двухсантиметровые участки, отражающие определенные периоды в жизни животных.

Измерения проводились с использованием коммерческих наборов компании XEMA (Москва) для определения в слюне уровня кортизола (REF K210S), тестостерона (REF K209S) и прогестерона (REF K207S). Стандарты были изготовлены на основе стандартов производителя путем их серийного разведения. Концентрации стандартов составили для кортизола 0, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40 нг/мл (чувствительность набора - 0,035 нг/мл), тестостерона - 0, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 нг/мл (чувствительность - 0,005 нг/мл), прогестерона - 0, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 нг/мл (чувствительность - 0,016 нг/мл). Все измерения проводились согласно протоколам производителя. Полученная концентрация в растворе X использовалась для расчета концентрации гормона в волосах (Y), согласно формуле $Y = X \cdot D^{101/5}$, где D – коэффициент разведения (при отсутствии разведения D=1).

3.4.3. Серологические исследования

Оценка серопозитивности животных к различным патогенам проводилась с помощью наборов ИФА. Оценка проводилась с использованием коммерческих наборов компаний IDVet (Нидерланды) (наличие антител к трихинелле) и Хема (Россия), (наличие антител к мобиливирусам (ВЧП), микоплазме, хламидии, токсоплазме, вирусу простого герпеса, *Candida sp.*, *Brucella sp.*, *Trichinella sp.*). При работе с наборами компании Хема в качестве конъюгата использовался протеин А, конъюгированный с пероксидазой хрена. Протеин А обладает высоким сродством к иммуноглобулинам, что позволяло выявить антитела у каспийской нерпы, связавшиеся с иммобилизованным антигеном на поверхности пластины. Определение серопозитивности к каждому из восьми протестированных патогенов проводилось для 20 проб сывороток каспийской нерпы, собранных в 2023 г.

Семьдесят две сыворотки, собранные от каспийских тюленей в период с 2019 по 2023 гг., тестировались на наличие противогриппозных антител с использованием ИФА набора IDEXX Influenza A Ab Test Cat.# 99-53101, согласно Bodewes et al. Антитела (IgG) к морбилливирусам плотоядных в сыворотках животных анализировались с помощью набора CDV (Distemper Virus) IgG antibodies ELISA Cat.# DE2478, согласно инструкции изготовителя, а также методом вируснейтрализации.

3.4.4. Протокол обработки проб для морфометрических исследований

Протокол пробоподготовки для световой микроскопии

Материал отмывали от посторонних загрязнений в растворе детергента. Клыки и когти были сфотографированы при помощи универсального цифрового микроскопа Keyence VHX-1000 (Keyence Corporation, Япония) при увеличениях x20 - x30 с использованием функции

автоматического сшивания снимков (2d image stitching). Измерения параметров когтей и клыков выполнены в штатном программном обеспечении, установленном на управляющем компьютере микроскопа.

Далее целые клыки и когти были распилены на низкоскоростном отрезном станке TechCut 4 (Allied High Tech, США) с использованием штатного отрезного диска с алмазным абразивом на смоляной основе (марка диска: RB, D). При этом клыки были распилены в поперечном направлении на границе между коронкой и корнем, а когти – в продольном направлении от основания к концу. Готовые спилы были вручную отполированы последовательно на трёх алмазных притирочных дисках (diamond lapping film) фирмы Allied с зернистостью 9, 3 и 1 микрон соответственно. Поверхность распиленных клыков и когтей была сфотографирована на микроскопе при помощи универсального цифрового микроскопа Keyence VHX-1000 (Keyence Corporation, Япония) при увеличениях $\times 20$ – $\times 30$ и $\times 200$ с использованием функции автоматического сшивания снимков (2d image stitching). Для увеличения контраста отдельных слоёв на спилах их поверхность покрывали водой или водно-глицериновым раствором.

Протокол пробоподготовки для растровой электронной микроскопии

Распиленные клыки и когти прикрепляли при помощи электропроводного углеродного скотча на стандартные столики для РЭМ отшлифованной поверхностью вверх и помещали в установку Q150R ES Plus (Quorum Technologies, U.K.) для откачки содержащихся в них газов и воды на три часа.

Полученные препараты клыков и когтей напыляли золотом на установке S150A Sputter Coater (Edwards, U.K.) и исследовали на растровом электронном микроскопе MIRA 3 LMH (TESCAN ORSAY HOLDING, Чехия), оснащённом системой энергодисперсионного микроанализа AZtecOne X-act. На РЭМ фотографировали клыки и когти.

Для клыков и когтей получали фотографии некоторых участков, представляющих интерес для анализа, на больших увеличениях.

Протокол проведения световой микроскопии и морфометрии

Отобранный материал фотографировали на световых микроскопах: когти и клыки – на микроскопе Keyence VHX-1000 (Keyence Corporation, Япония). Измеряли длину и ширину объектов. После съёмки общих видов когти и клыки распиливали в продольном направлении (два образца клыков были распилены ещё в поперечном направлении) на установке TechCut 4 (AlliedHighTech, США), поверхность каждого распила полировали и фотографировали на микроскопе Keyence VHX-1000 (Keyence Corporation, Япония). Выполняли необходимые морфометрические измерения.

Протокол проведения электронной микроскопии и морфометрии

Поверхность распилов когтей и клыков очищали от посторонних частиц в растворе детергента, высушивали на воздухе. Очищенные когти и клыки целиком при помощи лака приклеивали к столикам для электронной микроскопии отшлифованной поверхностью вверх, напыляли золотом на установке Q150R ES Plus (QuorumTechnologiesLtd, Великобритания) и фотографировали на растровом электронном микроскопе MIRA 3 LMH (TESCAN ORSAY HOLDING, Чехия).

3.4.5. Микробиологические исследования. Выделение вирусного генома

Перед выделением ДНК образцы размораживались. Для метагеномных работ использовался один из трех отобранных swabов. Для выделения ДНК был использован набор реактивов NucleoSpin Soil, MACHEREY-NAGEL (Германия) согласно инструкции производителя.

Количество и качество выделенной ДНК определялось с помощью флуориметра Qubit, Thermo Fisher Scientific (США). Подготовка библиотек ампликонов проводилась путем ПЦР с праймерами на V3–V4 региона эубактериальной 16S-рДНК: F (341) 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' / R (805) 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'.

Библиотеки ампликонов были секвенированы на платформе Illumina MiSeq 2 × 300 п.н. с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Сырые прочтения (риды) были обработаны в среде Qiime с алгоритмом cutadapt для удаления адаптеров, праймеров и беспраймерных ридов. Получившиеся последовательности были триммированы до достижения уровня качества $Q25 \geq 100\%$ и

спарены с помощью алгоритма DADA2. Химеры удалялись с помощью алгоритма Qiime-Vsearch. Оставшиеся сиквенсы были кластеризованы в операционные таксономические единицы (OTE) по критерию сходства 97% (open reference алгоритм) и затем аннотированы по базе данных Silva132 по критерию сходства 97%. Адекватность аннотации OTE вручную проверялась по базе данных Genbank PubMed (Blast алгоритм), устаревшая таксономия исправлялась. Неаннотированные «de novo» OTE также вручную аннотировались по базе данных Genbank PubMed (Blast алгоритм). OTE с идентичной аннотацией демультиплицировались.

Функциональные возможности микробиомов оценивались с помощью пакета PICRUSt по базе данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [Langille et al., 2013]. Значения представлены в нормированном виде.

Для получения полноразмерных 16SpPHK генов ключевых микроорганизмов было проведено shotgun-секвенирование суммарной ДНК на платформе Illumina HiSeq с глубиной чтения не менее 5ГБ. Обработка полученных чтений проводилась по следующим этапам: 1. Предобработка (скрипты Trimmomatic и CutAdapt), 2. Проверка качества: (комплекс FastQC), 3. Объединение ридов, удаление коротких ридов (комплексы PEAR, Qiime), 4. Сборки контигов и оценка их качества (MetaSpades), 5. Аннотирование по базам данных (алгоритмы Blast, MEGAN).

Базовая статистика (среднее и стандартное отклонение), непараметрическая ANOVA и расчет индексов альфа-разнообразия были рассчитаны в среде Qiime.

3.4.6. Исследования иммунитета

Оценка иммунного состояния животных проводилась с использованием четырех основных методов: реакции гемоагглютинации для оценки концентрации имеющихся неспецифических антител (natural antibodies), оценки концентрации лизоцима и общей концентрации иммуноглобулинов G, способности сывороток к убийству бактерий (bacteria killing assay). Большинство исследований в лабораториях сосредоточено на оценке параметров иммунного ответа животных на определенные стимулы, например, на введение нереплицирующихся антигенов (эритроцитов барана, гемоцианина и т.д.) [Naidenko et al., 2019].

Проводилось серийное разведение проб сывороток физраствором в 96-луночных планшетах с U-образным дном (50 мкл сыворотки + 50 мкл физраствора, титр 1:1, 1:2; 1:4... 1:1024). В каждую из лунок добавлялось 50 мкл раствора эритроцитов барана с концентрацией 100×10^6 шт/мл, а затем инкубировали в течение 90 минут при $T=37^\circ\text{C}$. За итоговый титр принималась последняя лунка, в которой не образовывался осадок из эритроцитов барана. Результаты анализа логарифмировались ($\log_2$).

Определение концентрации лизоцима в сыворотке крови животных проводилось, на основании метода Хейнриха с соавторами [Heinrich et al., 2017]. Диапазон стандартов составлял от 0 до 500 мкг/мл. Изготавливался 1% агар на стерильном PBS с модифицированным до 6.3 pH, остужался до $50-60^\circ\text{C}$, затем добавлялась лизоцим чувствительная бактерия *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma Aldrich; M3770) с концентрацией 40 мг/100 мл, и разливался в 96-луночный планшет по 250 мкл/лунку. После застывания агара в течение часа, в каждую из ячеек добавлялось по 20 мкл стандартов лизоцима или исследуемых сывороток крови. Инкубация составляла 18 часов при комнатной температуре, после чего считывалась оптическая плотность с использованием планшетного спектрофотометра на длине волны 350 нм.

Определение общей концентрации иммуноглобулинов G проводилось согласно общепринятой методике [Heinrich et al., 2017]. Для каждого планшета рассчитывалась линейная стандартная кривая с использованием стандартных концентраций. Затем рассчитывались концентрации IgG на основе стандартной кривой.

Определение активности сывороток в тесте убийства бактерий проводилось по выше описанной методике (Heinrich et al., 2016). Оценка результатов теста проводилась согласно Heinrich et al., 2016, принимая за результат титр (и впоследствии разведение) при котором сыворотка уничтожала 50% бактерий. Если этого не наблюдалось даже в первой ячейке (при титре 2 и числе разведений 1), то в данном случае результат тестирования принимался равным 0.

3.4.7. Вирусологические исследования (НПЦ МиВ. РК)

3.4.7.1. *Протокол выделения вирусного генома из биологических образцов и синтез комплементарной цепи ДНК*

Пробы органов и тканей растирали в криопробирках с транспортировочной средой с помощью нержавеющей стальных шариков в автоматическом высокоскоростном гомогенизаторе закрытого типа TissueLyser II (QIAGEN).

Полученные гомогенаты дополнительно обрабатывали с помощью QIAshredder (биополимер-измельчитель в формате микроцентрифужных колонок) для улучшения выхода нуклеиновых кислот, путем нанесения по 700 мкл образцов на колонки системы. Пробы центрифугировали в течение 2 мин при 14000 оборотов/мин. Полученные лизаты тканей использовались для процедур по изоляции нуклеиновых кислот вирусов.

Экстракцию РНК из гомогенатов органов осуществляли с помощью реагента TRIZOL LS (Invitrogen), в соответствии с рекомендациями производителя из 50-100 мг ткани или 250 мкл суспензии органов [Ausubel et.al., 1990; Chomczynski, Sacchi, 1987]. К 250 мкл лизата добавляли 750 мкл реагента TRIZOL LS и инкубировали 5 мин при комнатной температуре для диссоциации нуклеопротеидного комплекса. Затем наносили по 200 мкл хлороформа и суспензии центрифугировали для разделения на водную и органическую фазы. Общую РНК экстрагировали из водной фазы путем осаждения изопропиловым спиртом.

Выделение РНК из смывов проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden), в соответствии с рекомендациями производителя из 140 мкл смыва [QIAamp Viral RNA Vini Handbook, 2005].

3.4.7.2. *Протокол проведения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)*

ОТ-ПЦР проводили одновременно в одношаговой реакции с использованием OneTaq RT-PCR Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, США) [Payungporn et.al., 2004]. Для приготовления реакционной смеси использовали набор праймеров специфичных к высококонсервативным участкам генов искомых вирусов (таблица 3.4-2) в окончательном объеме 25 мкл.

Реакцию ставили в термоциклере Eppendorf Gradient при следующих условиях: обратная транскрипция при 48°C 45 мин, начальная 2 мин денатурация при 95°C и амплификация в 40 циклов, включающая денатурацию, отжиг праймеров и удлинение цепи (таблица 3.4-2, 3.4-3) с последующей окончательной элонгацией при 72°C, 10 мин.

Таблица 3.4-2 Последовательности специфических праймеров к генам вирусов

Ген-мишень	Последовательность праймера	Длина ожидаемого продукта ПЦР (п.о.)
М ген вируса грипп А	CU-MF: 5'-TGATCTTCTTGAATTTGCAG-3' CU-MR: 5'-TGTTGACAAAATGACCATCG-3'	279
NS ген вируса грипп В	NS1: 5'- ATG GCC ATC GGA TCC TCA AC-3' NS2: 5'- TGT CAG CTA TTA TGG AGC TG-3'	240
PВ1 ген вируса гриппа D	5'-TGGATGGAGAGTGCTGCTTC-3', IDV R обратный: 5'-GCCAATGCTTCCTCCCTGTA-3', IDV Probe FAM-CATGTTAAACATTCCCATCAGCATTCCT_BHQ1	110
P ген морбилливируса	UP-P1:-5' ATGTTTATGATCACAGCGGT-3' UP-P2: -5' ATTGGGTGACCACTTGTC-3'	429
L-ген семейства парамиксовирусов	PAR F1:-5'GAAGGITATTGTCAIAARNTNTGGAC-3' PAR F2:-5'GTTGCTCAATGGTTTCARGGNGAYAA-3'	600
polу ген семейства коронавирусов	Cor-FW:- 5'ACWCARHTVAAYYTNAARTAYG-3' Cor-RW:- 5' TCRCAYTTDGGRTARTCCC-3'	251
polу ген аденовирусов	polFouter [5'-TNMGNGGNGGNGMNTGYTAYCC-3'; polRouter [5'-GTDGCRAANSHNCCRTABARNGMRTT-3', - для второго раунда polFinner (5'-GTNTWYGAYATHTGYGGHATGTAYGC-3' polRinner (5'-CCANCCBCDRTTTRTGNARNGTRA-3').	318-325
gp64ген герпесвирусов	F 5'-CCGCAACCTGGTGCCCATGG-3 R 5'-CGTTTGGGTTGCGCAGCGGG -3	139
gD ген α-герпесвирусов	seal herpes gD1 (F) 5 - GAAGTTCGGTATGTWAC - 3, seal herpes1 gD2 (R) 5 - AATCCCAATTCATCRTC - 3.	290
ретровирусов	Pan-retrovirus F 5'-TGGAAAGTGTRCCMCARGG-3', Pan-retrovirus R 5'GGMGGCCAGSAKGTATCCAYGT-3'	1300

Таблица 3.4-3 Параметры термоциклирования ПЦР с различными праймерами

Пара праймеров	Денатурация цепи		Отжиг праймера		Удлинение цепи	
	Температура	Время	Температура	Время	Температура	Время
CU-MF/MR	94°C	30 сек	55°C	30 сек	72°C	30 сек
NS1/NS2	95°C	1 мин	45°C	1 мин	72°C	3 мин
P1/P2	95°C	1 мин	53°C	1 мин	72°C	1 мин
PMX1/PMX2	95°C	15 сек	41°C	30 сек	72°C	30 сек
PAR F1/ PAR F2	94°C	15 сек	50°C	30 сек	72°C	30 сек
Cor-FW/ Cor-RW	94°C	30 сек	48°C	30 сек	72°C	1 мин

3.4.7.3. Протокол проведения электрофоретического анализа продуктов ПЦР

Горизонтальный гель-электрофорез проводили в 2% растворе агарозы (Sigma, США), окрашенном бромистым этидием, в трис-ацетатном буфере при напряжении 88V (8 вольт/см) на аппарате Bioster (Великобритания). Визуализацию и документирование результатов гель-электрофореза осуществляли с помощью системы GelMax® 125 Imager (Upland, CA, США).

3.4.8. Секвенирование и анализ метагеномных данных

Для массивного параллельного секвенирования библиотеки конструировали с помощью набора NEBNext Ultra DNA Library Preparation Kit (New England Biolabs, США) в соответствии с протоколом производителя, подбор размера библиотек осуществляли с использованием шариков Ampure XP (Beckman Coulter, США), библиотеки проверяли на Прибор Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Германия). Секвенирование проводили с использованием набора MiSeq Reagent v.3 на секвенаторе MiSeq (Illumina, США).

Обработка данных выполнялась на машине Linux, расположенной локально, с использованием аналитической комбинации DIAMOND + MEGAN. Первоначально необработанные метагеномные данные, полученные из каждого пула, подвергались предварительной обработке с использованием программного обеспечения Fastp (версия 0.20.0) со следующими параметрами: «-n 0 -l 30 -5 -r -W 5 -cut_mean_quality 20». Этот этап предварительной обработки был направлен на исключение некачественных хвостов и адаптеров секвенирования. На этом этапе определялось общее количество чистых чтений, полученных из четырех пулов. Чтобы обеспечить контроль загрязнения, считывания секвенирования были приведены в соответствие с геномом *Pusa caspica* с использованием инструментов BWA-mem v. 0.7 и впоследствии удалены из набора данных.

Впоследствии чтения с контролем качества были собраны заново с использованием MEGANIT v1.2.9 с «-k-min 21 -k-max 141 -k-step 20» [Green, K.Y. et al., 2000]. Для таксономической аннотации собранных контигов было проведено сравнение с базой данных номеров NCBI (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA/nr.gz) (по состоянию на 10 мая 2023 г.) с использованием DIAMOND Blastx v. 0.9.24. Использованное пороговое значение E было <10⁻⁵ [Smith A.W. et al., 1973]. Впоследствии контиги были таксономически классифицированы, а результаты визуализированы с использованием настроек по умолчанию в MEGAN (MEtaGenome Analyser, версия 6.24.23, Тюбинген, Германия) [Gulland F.M. et al., 1997; Smith A.W. et al., 1973]. Результаты MEGAN, которые были получены в виде обобщенных чтений, были использованы для представления всестороннего обзора таксономической классификации считываний секвенирования. Критерии исключения применялись к контигам, происходящим от клеточных организмов, включая бактерии, археи и эукариоты.

Чтобы исключить ложноположительные попадания вируса, дальнейший анализ вирусоподобных считываний был выполнен с использованием DIAMOND Blastx v. 0.9.24 (значение E < 10⁻¹⁰) и сравнен с базой данных эталонных последовательностей вирусов NCBI (RefSeq) (https://ftp.ncbi.nih.gov/refseq/release/viral/) для выявления последовательностей с более высоким сходством с вирусными последовательностями по сравнению с невирусными последовательностями. Полученные результаты были дополнительно проанализированы с использованием программного обеспечения MEGAN (v. 6.24.23) с параметром наименьшего общего предка (LCA). Во время анализа применялись минимальный пороговый балл 100 и порог e-значения 1 × 10⁻¹⁰.

Продукты ПЦР секвенировали по Сэнгеру и сравнивали с исходной матрицей. Филогенетический анализ проводили методом соседнего соединения с 1000 бутстрепными повторами с использованием модели p-distance в программе MEGA X [Kumar S. et al., 2018].

4. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛЕВЫХ РАБОТ В 2023 Г.

4.1. Метеорологические наблюдения

Метеорологические параметры приведены в **Приложении С**, таблица С.1. Измерения производились многопараметровой метеостанцией Skywatch GEOS.

Температура воздуха. Во время проведения исследовательских работ погода была устойчивая. Утренняя температура воздуха изменялась в пределах от +2 до +7⁰С, дневная температура изменялась в пределах от +7 до +16⁰С, вечерняя от +8 до +13⁰С. Среднедневная температура колебалась в пределах от +5.8 до +10,5⁰С. График среднедневной температуры воздуха представлен на рисунке 4.1.1.

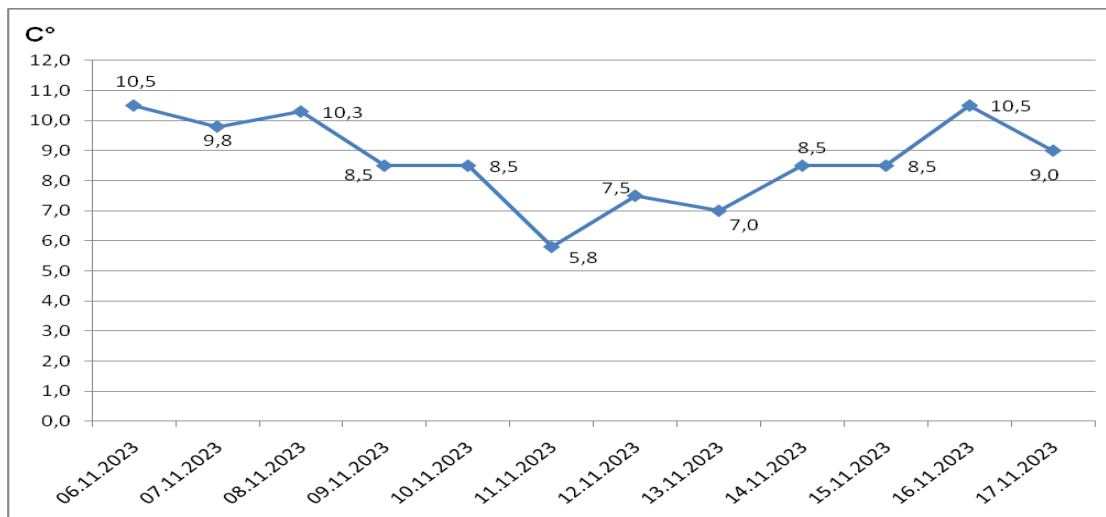


Рисунок 4.1.1 График среднедневной температуры воздуха, ноябрь 2023 г.

Атмосферное давление. В период исследований 2023 г. атмосферное давление находилось в пределах 762 – 776 мм/рт. Оно зависит от сезона проведения работ, температуры воздуха и влияния воздушных масс. График среднедневного атмосферного давления представлен на рисунке 4.1.2.

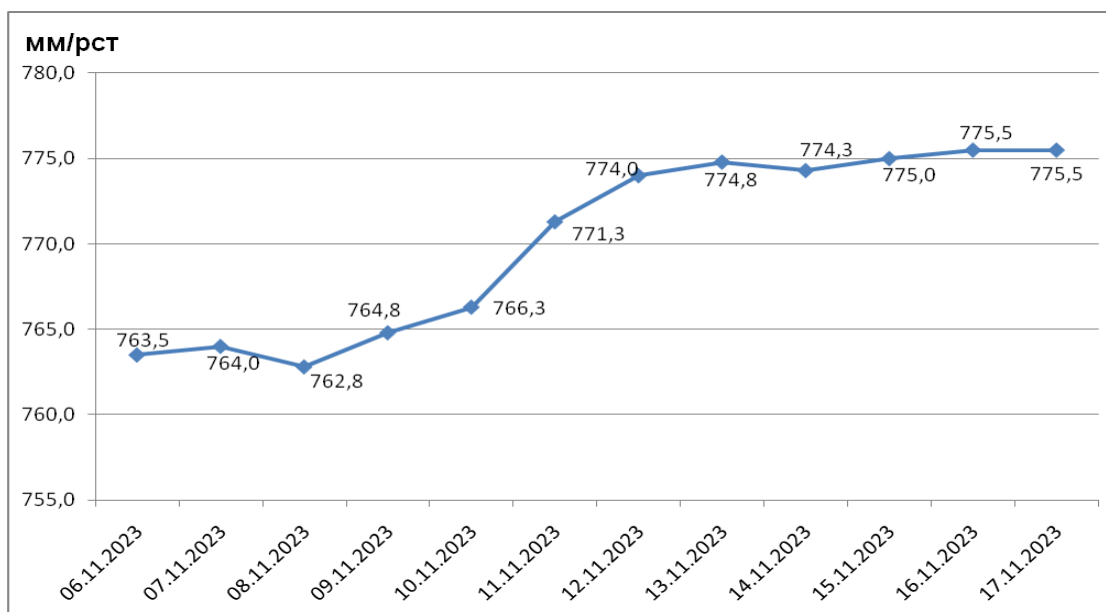


Рисунок 4.1.2 График среднедневного атмосферного давления

Направление и скорость ветра. Осенью 2023 г., во время проведения работ, наблюдалась неустойчивая погода, в основном ветра юго-восточного и западного направлений со скоростью от 1 до 14 м/с, с порывами до 18 м/с, рисунок 4.1.3.

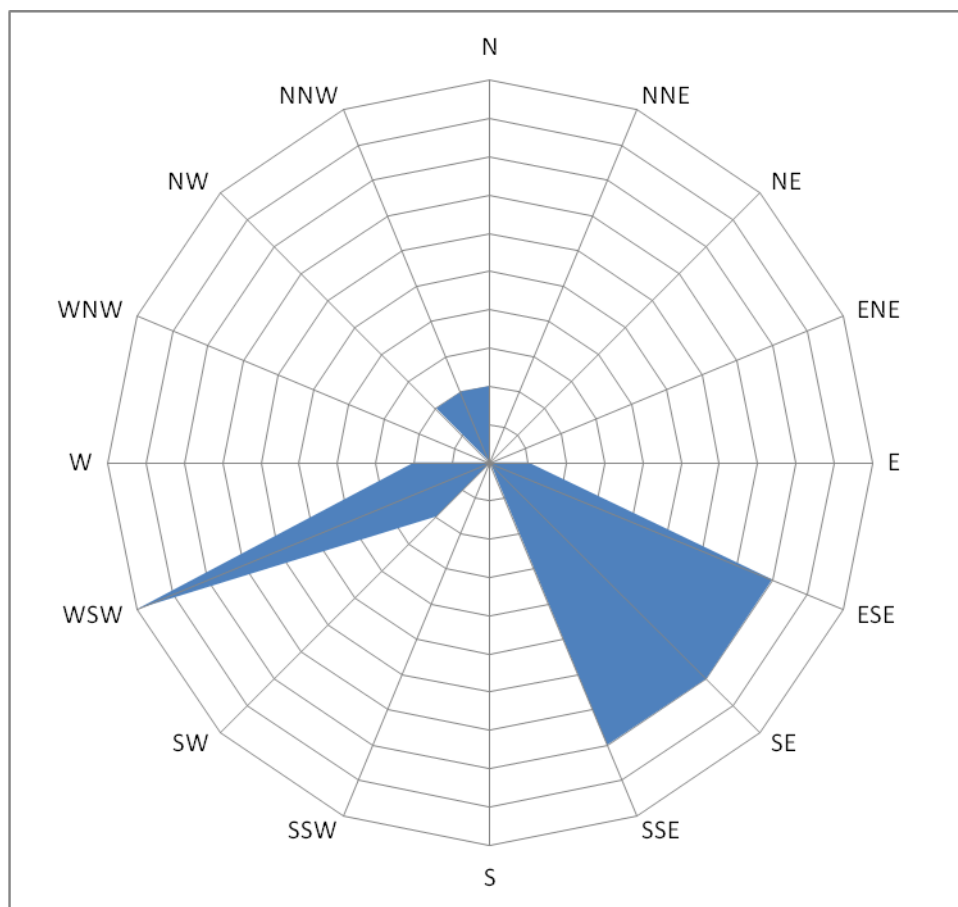


Рисунок 4.1.3 Роза ветров в период проведения исследований

4.2. Учет численности тюленей

За время рейса на НИС «Наутилус-один» (07.11.2023- 16.11.2023 гг.) в казахстанской акватории Каспийского моря, было зарегистрировано 200 встреч каспийского тюленя (217 особей) (рисунок 4.2.1).

При подготовке к отлову тюленей были осмотрены 6 шалыг, из них 4 (КТ1 - КТ4) были притоплены в следствии нагона и поднятия уровня воды в море (таблица 4.2-1). На шалыге КТ5 и КТ6 зафиксированы залежки каспийского тюленя, за 2 дня отлова было учтено 9836 особей каспийского тюленя. При движении к шалыге КТ2 зафиксировано четыре погибших тюленя.

В таблице 4.2-3 приведен расчет плотности встреченных тюленей в казахстанской части Северного Каспия.

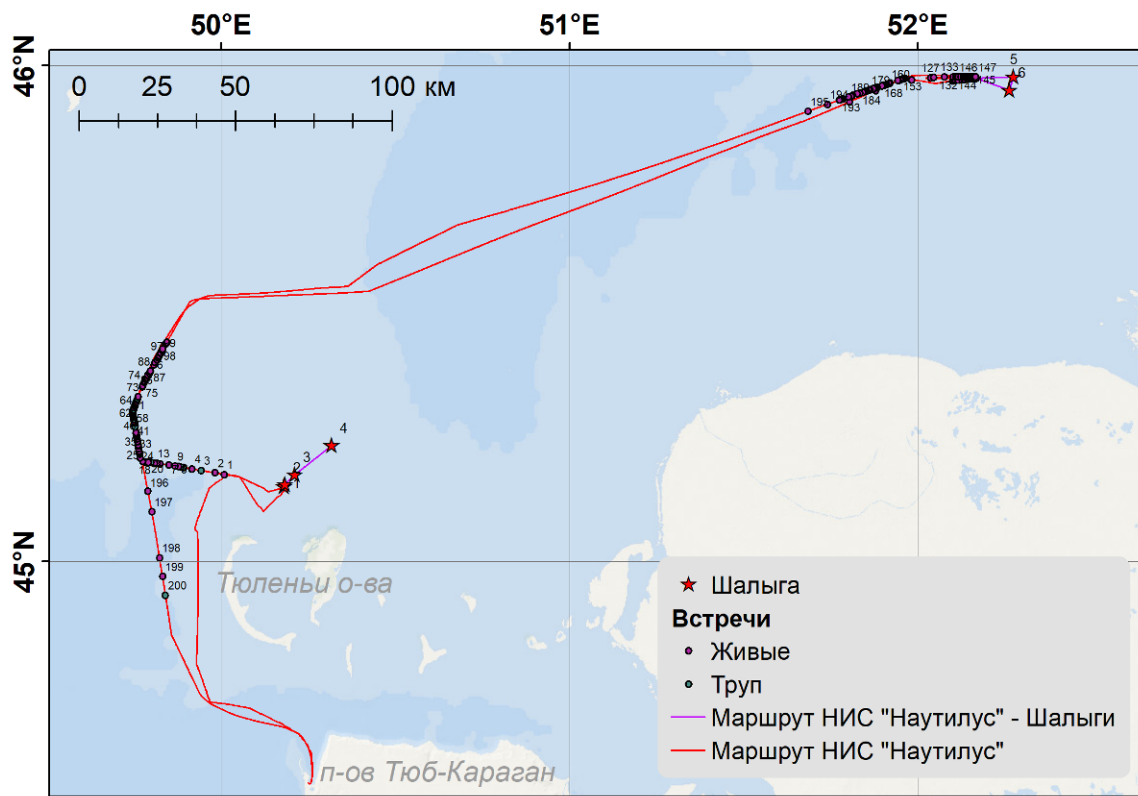


Рисунок 4.2.1 Схема точек встреч каспийского тюленя по маршруту движения судна

Таблица 4.2-1 Координаты обследованных шалыг в ноябре 2023 г.

№	Шалыги	Северная широта	Восточная долгота
1	Притопленная вытянутая шалыга (ТО)	45.15253°N	50.18067°E
2	Притопленная вытянутая Е образная шалыга (ТО)	45.156176° N	50.183407° E
3	Трапецевидная шалыга (ТО)	45.17670°N	50.21097°E
4	Притопленная вытянутая шалыга (ТО)	45.23598°N	50.31708°E
5	С образная небольшая шалыга (СКМК)	45° 58' 39.32"N	52° 16' 28.94"E
6	Длинная шалыга, на некоторых участках притопленная (СКМК)	45°57'3,35"	52°15'50,40"

Таблица 4.2-2 Количество учтенных тюленей, НИС «Наutilus-один», ноябрь 2023 г.

Дата	Наблюдатель	Время	Количество, шт	Расстояние от судна, м	Комментарий
11.11.2023	ФК АМ	12:00-13:00	18	20-400	Проведен учет численности тюленей на пути движения лодки, всего 14 живых и 4 мертвых. Длина маршрута 34 км. Ширина учета по 400 м с каждого борта. На 4 шалыгах (КТ1-КТ4), а так же островах Подгорный, Морской и Кулалы залежек тюленей не выявлено.
11.11.2023	ГП НП ПШ ПИ	14:00- 18:00	147	20-400	Наблюдения с НИС Наutilus один. Северо-восточный Каспий, расстояние 217 км. Наблюдения с левого и правого борта. Сильное волнение, волна 60-110 см
13.11.2023	ФК АМ	15:00-17:00	46	20-400	Проведен учет численности тюленей на пути движения лодки, всего 46 особь, из них с левого борта 37 шт, правого - 9 шт. Длина маршрута 24,6 км. Ширина учета по 400 м с каждого борта.
	АМ	17:32	278		Проведен осмотр шалыги КТ5 с использованием квадрокоптера. Высота полета 150 м. На шалыге КТ5 - 278 тюленей.

Дата	Наблюдатель	Время	Количество, шт	Расстояние от судна, м	Комментарий
	АМ	17:54	9558		Проведен осмотр шалыги КТ6 с использованием квадрокоптера. Высота полета 100м. На шалыге КТ6 - 9558 тюленей. На шалыге отловлено 13 тюленей, установлено 13 радиомаяков.
14.11.2023	ФК АМ	11:00-12:00	60	20-400	Проведен учет численности тюленей на пути движения лодки, всего 60 особей, из них с левого борта 32 шт, правого - 28 шт. Длина маршрута 8,0 км. Ширина учета по 400 м с каждого борта. На шалыге КТ6 отловлено 7 особей каспийского тюленя.
16.11.2023	ГП НП ПШ ПИ	9:00- 12:00	70	20-400	Наблюдения с НИС Наутилус один. Северо-восточный Каспий, расстояние 118 км. Наблюдения с левого и правого борта. Сильное волнение, волна 80-100 см
Всего:			10177		из них 4 мертвых

Примечание: ГП – Глеб Пилипенко, НП – Никита Платонов, ПШ – Полина Шибанова, ПИ – Полина Ильина, ФК – Федор Климов, МА – Муляев Алексей.

Таблица 4.2-3 Плотность распределения тюленей в казахстанской части Северного Каспия, 2023 г.

Дата	Место	Длина маршрута, км*	Ширина учетной полосы, км	Площадь учетной полосы, км ²	Количество учтенных тюленей, особей	Плотность, особь/км ²
11.11.2023	«Наутилус-один»	217	1	217	147	0,68
16.11.2023	«Наутилус-один»	118	1	118	70	0,59
13.11.2022	Учет на шалыге КТ5	0,300	0,1	0,03	278	9267
13.11.2022	Учет на шалыге КТ6	1	0,05	1	9558	9558
11.11.2023	Моторная лодка	34	0,8	27,2	14	0,66
13.11.2023	Моторная лодка	24,6	0,8	19,7	46	4,5
14.11.2022	Моторная лодка	8,0	0,8	6,4	60	9,4
Среднее значение с лодки						4,85 (с лодок)

Примечание: * суммарная длина отрезков маршрута, на которых проводились наблюдения

Исследования показали, что численность тюленей на участке с глубинами 5-12 м составляет 0,59-0,68 экз/км², над глубинами 0,5-4,0 м, выше, 0,66-9,4 экз/км², самая высокая отмечается в местах отдыха, на морских шалыгах 9267-9558 экз/км².

4.3. Обследование каспийского тюленя в 2023 г.

Оценка численности тюленей на шалыгах в казахстанском секторе Каспийского моря проводили с помощью квадрокоптера DJI Mavic 2 Pro. При подготовке к отлову тюленей были осмотрены 6 шалыг, из них 4 (КТ1- КТ4) были притоплены вследствие нагона и поднятия уровня воды. Залежка тюленей отмечена только на шалыге КТ5 и КТ6. При отлове живых тюленей на шалыге КТ6 численность тюленей на залежке составила 9267 экз., из которых за 2 дня отловлено 20 особей для отбора проб.

Изучение демографической структуры популяции каспийского тюленя (соотношение в ней самцов и самок разного возраста) проведено параллельно с отбором проб их генетического материала и других проб на местах залежки тюленей.

5-6 ноября 2023 г. от Управления рыбной инспекции по Мангистауской области поступило сообщение о выбросе 40 погибших тюленей на берег, на участке между поселками Баутино и Форт Шевченко. Сотрудники лаборатории экологии вирусов НПЦ МиВ (РК) совместно с учеными ТОО КАПЭ в присутствии представителей природоохранных структур Мангистауской области участвовали в исследовании причин гибели животных. С этой целью был произведен осмотр обнаруженных мертвыми животных, для вирусологических и бактериологических анализов.

Степень разложение погибших животных была высокой, погибшие особи были не пригодны для отбора проб, так как процессы аутолиза маскируют картину патологических изменений.

4.3.1. Возрастно-половой состав

Информация о живых тюленях представлена в **Приложении С**, таблица С.3. Большинство тюленей являлись самками (90%), самцами были только 2 особи (10%).

Поскольку для каспийской нерпы не разработаны прижизненные методы идентификации возраста, выборку живых животных разделили на несколько возрастных групп по количеству полных сегментов на когтях (таблица 4.3-1).

Таблица 4.3-1 Количество отловленных живых тюленей в разных возрастных группах

Возрастная группа	Количество особей	% соотношение
младше 3 лет	5	25
старше 3 лет (3+)	2	10
старше 4 лет (4+)	3	15
старше 5 лет (5+)	5	25
старше 6 лет (6+)	3	15
старше 7 лет (7+)	1	5
старше 8 лет (8+)	1	5

4.3.2. Повреждения кожно-волосного покрова и другие визуальные отклонения

Визуальные отклонения от нормального физиологического состояния выявлены у 11 живых тюленей (**Приложение С**, таблица С.3), что составило 55 % от общего числа исследованных живых особей. Большинство случаев можно отнести к следующим типам отклонений: болезни глаз, отсутствие когтей, повреждения кожно-волосного покрова (рисунок 4.3.1).



Отсутствие когтей (PC-23-18)



Рана у когтя на правой передней лапе (PC-23-18)



Раздражение анального отверстия (PC23-04)



Наличие лысых участков (PC23-09)

Рисунок 4.3.1 Нарушения кожно-волосного покрова и другие отклонения у отловленных тюленей

Раны на теле были обнаружены у нерп РС23-04, РС23-06, РС23-10 и РС23-11. Болезни глаз обнаружены у двух нерп: у животного РС23-08 наблюдались зеленовато-желтые выделения из глаз, у животного РС23-17 – раздражение слизистой.

Отсутствие одного или нескольких когтей наблюдалось у трёх нерп: РС23-08, РС23-09, РС23-18. Ещё у двух наблюдалось частичное повреждение когтей: у нерпы РС23-11 был сломан коготь, у РС23-12 – поврежден. У некоторых животных наблюдалось кровотечение, что говорит об относительно недавнем получении травмы.

Единичные особи имели отклонения, не относящиеся к ранее выделенным типам. У нерпы РС23-04 наблюдалось раздражение у анального отверстия, у РС23-09 отмечались лысые участки на шкуре.

4.3.3. Размер и масса

В анализируемую выборку 2023 г. были включены живые особи. Поскольку по ряду морфометрических признаков, в частности зоологической длине, обхвату грудной клетки, характеризующихся сезонной изменчивостью, павшие тюлени, погибшие в разное время года, вносили бы погрешность в интерпретацию результатов исследований [Пастухов, 1993; Ian et al, 2010].

Результаты измерений, сгруппированные по возрастным группам и представлены в таблице 4.3-2.

Таблица 4.3-2 Размеры тюленей в возрастных группах, 2023 г.

Параметр	Возраст, лет							
	1+	2+	3+	4+	5+	6+	7+	8+
Зоологическая длина, см	$\frac{94}{1}$	$\frac{88,6 \pm 6,2}{4}$	$\frac{92,3 \pm 9,2}{2}$	$\frac{121,0 \pm 5,6}{3}$	$\frac{121,0 \pm 5,5}{5}$	$\frac{122,0 \pm 12,1}{3}$	$\frac{117}{1}$	$\frac{120}{1}$
Длина хвоста, см	$\frac{9}{1}$	$\frac{8,6 \pm 1,6}{4}$	$\frac{7,3 \pm 0,6}{2}$	$\frac{9,3 \pm 0,6}{3}$	$\frac{8,4 \pm 1,1}{5}$	$\frac{8,3 \pm 2,3}{3}$	$\frac{10}{1}$	$\frac{7}{1}$
Обхват грудной клетки, см	$\frac{87}{1}$	$\frac{80,7 \pm 2,9}{4}$	$\frac{94,0 \pm 6,2}{2}$	$\frac{121,3 \pm 7,8}{3}$	$\frac{121,4 \pm 8,0}{5}$	$\frac{123,7 \pm 5,1}{3}$	$\frac{117}{1}$	$\frac{125}{1}$
Масса, кг	$\frac{25,5}{1}$	$\frac{21,7 \pm 1,9}{4}$	$\frac{29,7 \pm 4,0}{2}$	$\frac{74,2 \pm 3,9}{3}$	$\frac{73,3 \pm 7,2}{5}$	$\frac{73,9 \pm 6,2}{3}$	$\frac{56,7}{1}$	$\frac{74,7}{1}$

Примечание: - в числителе – среднее значение ($\bar{x}$) $\pm$ стандартное отклонение (σ),
- в знаменателе - количество особей (n) в возрастной группе.

4.3.4. Ультразвуковая диагностика (УЗИ, УЗ-диагностика)

В ходе полевых работ было проведено УЗИ всех взрослых самок (РС23-01 – РС23-13) и одной молодой самки (РС23-14). Для выявления наличия эмбриона, сканировалась брюшная полость животных.

По результатам УЗИ были выявлены несколько групп самок (рисунок 4.3.2; **Приложение С**): «беременные» - самки, у которых силуэт эмбриона отчетливо виден; «вероятно, нет беременности» - взрослые самки, у которых наличие эмбриона ставится под сомнение (силуэт четко не выявлен), «с большой вероятностью нет беременности» - особи, у которых эмбрион не регистрировался, молодые животные (УЗ-диагностика проводилась только для одной особи РС23-14).



Беременные взрослые самки (PC23-01)



Взрослые самки, у которых, вероятно, нет беременности» (PC23-02)



Молодые самки - с большой вероятностью нет беременности (PC23-14)

Рисунок 4.3.2 Определение беременности с помощью УЗ-диагностики

4.4. Перемещения каспийского тюленя по данным спутниковых радиомаяков

Данные по установке радиомаяков представлены в **Приложении С**, таблица С.4.

Из 13 меток, установленных в ноябре на 16 декабря 2023 г. гарантировано продолжали работать 13 меток (таблица 4.4-1). По состоянию на начало марта 2024 г. продолжала работу только одна метка - №253218 (таблица 4.4-2).

Таблица 4.4-1 Информация об установленных передатчиках по состоянию на 16.12.2023 г.

№ метки	Дата последнего сигнала	Кол-во полученных локаций после фильтрации	Длина трека (км)
253210	16/12/23	22	276
253211	15/12/23	58	764
253212	14/12/23	53	795
253213	08/12/23	14	1032
253214	07/12/23	23	548
253215	14/12/23	21	916

№ метки	Дата последнего сигнала	Кол-во полученных локаций после фильтрации	Длина трека (км)
253216	15/12/23	27	871
253217	14/12/23	62	1068
253218	11/12/23	43	1152
253219	10/12/23	80	1244
253220	15/12/23	92	1658
253221	14/12/23	55	976
253222	15/12/23	30	1304

Таблица 4.4-2 Информация об установленных передатчиках по состоянию на 10.03.2024 г.

№ метки	Дата первого корректного сигнала	Дата последнего сигнала	Кол-во дней работы	Кол-во полученных локаций после фильтрации	Длина трека (км)
253210	16.11.2023	11.01.2024	56	130	1519
253211	16.11.2023	08.12.2023	22	87	938
253212	16.11.2023	06.02.2024	82	385	3467
253213	16.11.2023	02.02.2024	78	107	3151
253214	16.11.2023	11.01.2024	56	207	2953
253215	18.11.2023	21.01.2024	64	82	1868
253216	16.11.2023	27.01.2024	72	206	1702
253217	15.11.2023	28.01.2024	74	167	2780
253218	19.11.2023	10.03.2024	112	355	2735
253219	18.11.2023	26.11.2023	8	57	351
253220	17.11.2023	14.01.2024	58	151	3045
253221	16.11.2023	14.02.2024	90	187	2573
253222	16.11.2023	29.01.2024	74	163	3253

Большинство меток прекратило работу в январе-феврале. Продолжительность работы меток для разных особей отличалась и составляла от 22 дней (метка №253212) до 112 дней (метка №253218). Все установленные метки проработали минимум 3 месяца, кроме метки №253211, которая работала до начала декабря 2023 г. Метка №253219 в период с декабря по февраль подавала сигналы только из одной точки в дельте реки Урал, поэтому данные этого передатчика за упомянутый период были исключены из анализа.

Частота передаваемых локаций у всех меток была регулярной. От каждой метки было получено в среднем 176 ± 98 локаций. Наибольшее количество локаций было получено от метки №253212 и составило 385 локаций. Наименьшее количество локаций (за исключением метки №253219) было получено от метки №253215 и составило 82 локаций.

Несмотря на регулярность получения локаций, в большинстве случаев количество дней в месяце, в которые были получены локаций, не превышало 15 (таблица 4.4-3).

На рисунке 4.4.1 представлены треки всех помеченных животных в период до 10 марта 2024 г.

Таблица 4.4-3 Количество дней в месяц, в которые метки передавали сигналы

№ метки	Ноябрь	Декабрь	Январь	Февраль	Март
253210	10	8	4	0	0
253211	10	4	0	0	0
253212	10	16	15	5	0
253213	6	10	10	1	0
253214	9	16	8	0	0
253215	4	12	4	0	0
253216	9	14	11	0	0
253217	7	16	12	0	0
253218	5	14	10	15	6
253219	7	26	24	7	0
253220	10	9	1	0	0
253221	6	9	6	7	0
253222	8	12	1	0	0



Рисунок 4.4.1 Треки всех тюленей, помеченных в ноябре 2023 г. (до 10.03.2024 г.)

Описание перемещений

Ноябрь

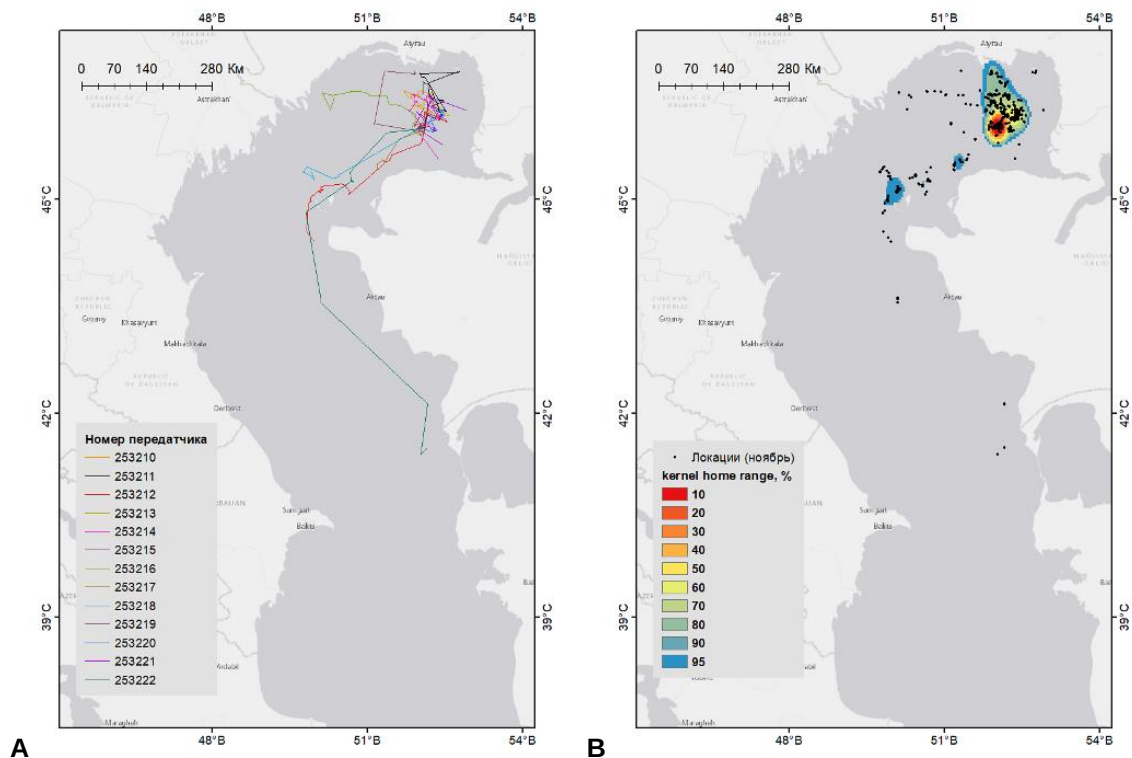
В ноябре 2023 г. тюлени перемещались в основном в северном Каспии. Животные концентрировались в районе мечения (рисунок 4.4.2). Кроме того, тюлени регистрировались в районе о. Кулалы и островов Тюленьего архипелага. Животное с меткой №253222 также регистрировалось в южной части среднего Каспия, в районе залива Кара-Богаз-Гол.

Декабрь

В декабре тюлени перемещались как в северном, так и в среднем Каспии. Животные все еще регистрировались в районе мечения, однако ключевое местообитание формировали в районе о. Кулалы и островов Тюленьего архипелага (рисунок 4.4.3). Животные с метками №253214, №253213, №253222, №253220, №253212, №253217 активно использовали акваторию среднего Каспия и заходили в восточную и западную часть южного Каспия. Кроме того, животные регистрировались вблизи западного и восточного берегов Каспийского моря, в том числе в районе Казахского залива.

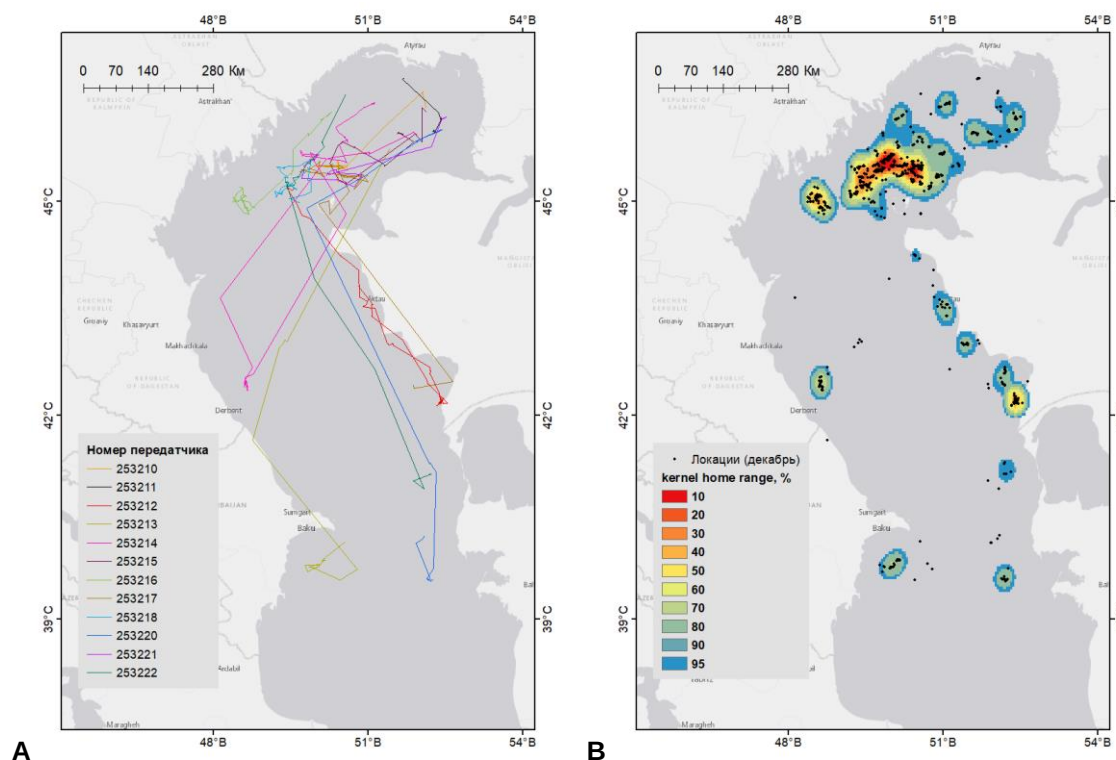
Январь

В январе, так же, как и в декабре, тюлени перемещались в северном и в среднем Каспии. Ключевые местообитания находились в районе о. Кулалы и островов Тюленьего архипелага, а также в районе к северу от Казахского залива (рисунки 4.4.4). Животные с метками №253221, №253213, №253217 также регистрировались в южной части среднего Каспия, перемещаясь вдоль западного и восточного берега.



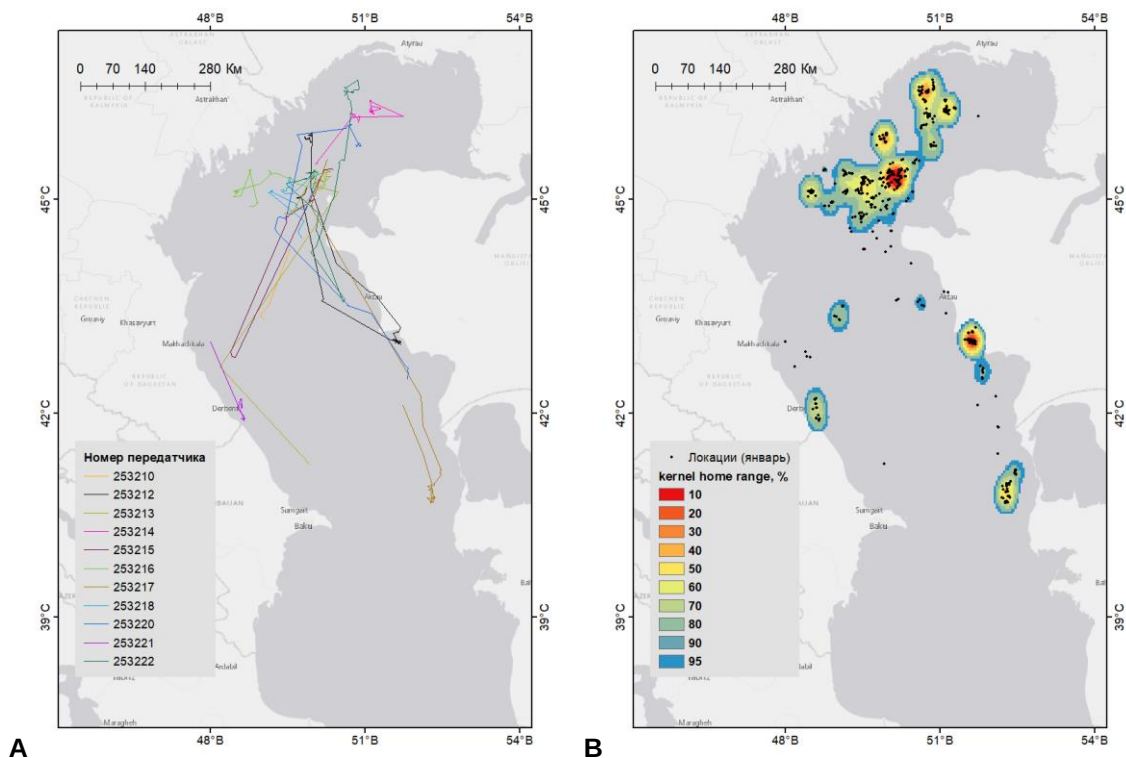
Количество работающих меток $n=13$.

Рисунок 4.4.2 Треки перемещений (А) и ключевые места обитания тюленей (В) в ноябре 2023 г.



Количество работающих меток $n=13$.

Рисунок 4.4.3 Треки перемещений (А) и ключевые места обитания тюленей (В) в декабре 2023 г.



Количество работающих меток $n=12$.

Рисунок 4.4.4 Треки перемещений (А) и ключевые места обитания тюленей (В) в январе 2024 г.

Февраль

В феврале 2024 г. сигналы приходили только от четырех меток - №253212, №253213, №253218, №253221. При этом от метки №253213 сигналы были получены только 2 февраля, а от метки №253212 – 1, 2, 4, 5 и 6 февраля. Тюлени находились в северном Каспии и формировали ключевые местообитания севернее о. Кулалы и островов Тюленьего архипелага (рисунок 4.4.5). Кроме того, тюлень с меткой №253218 регистрировался в акватории вблизи Форта-Шевченко (п-ов Тюб-Караган (Тупкараган)).

Март

В марте количество работающих меток сократилось, сигналы приходили только от метки №253218. Животное, передатчик которого еще работал, находилось в районе о. Кулалы и островов Тюленьего архипелага (рисунок 4.4.6).

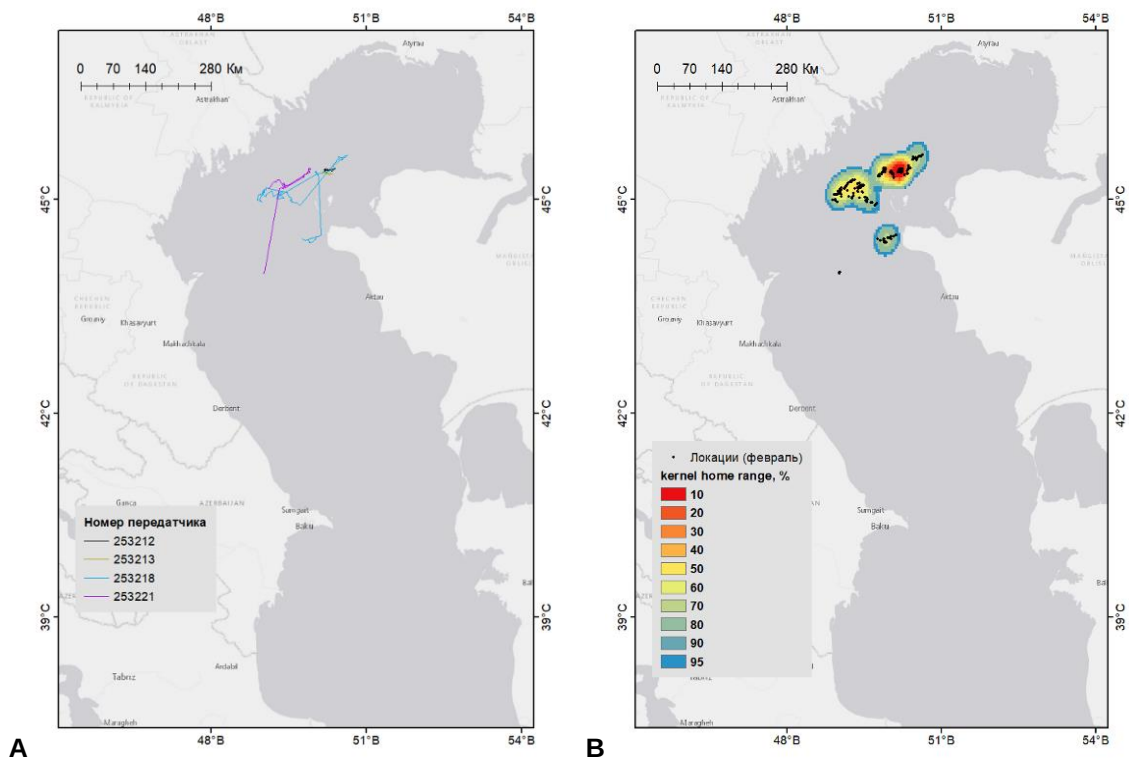


Рисунок 4.4.5 Треки перемещений (А) и ключевые места обитания тюленей (В) в феврале 2024 г.

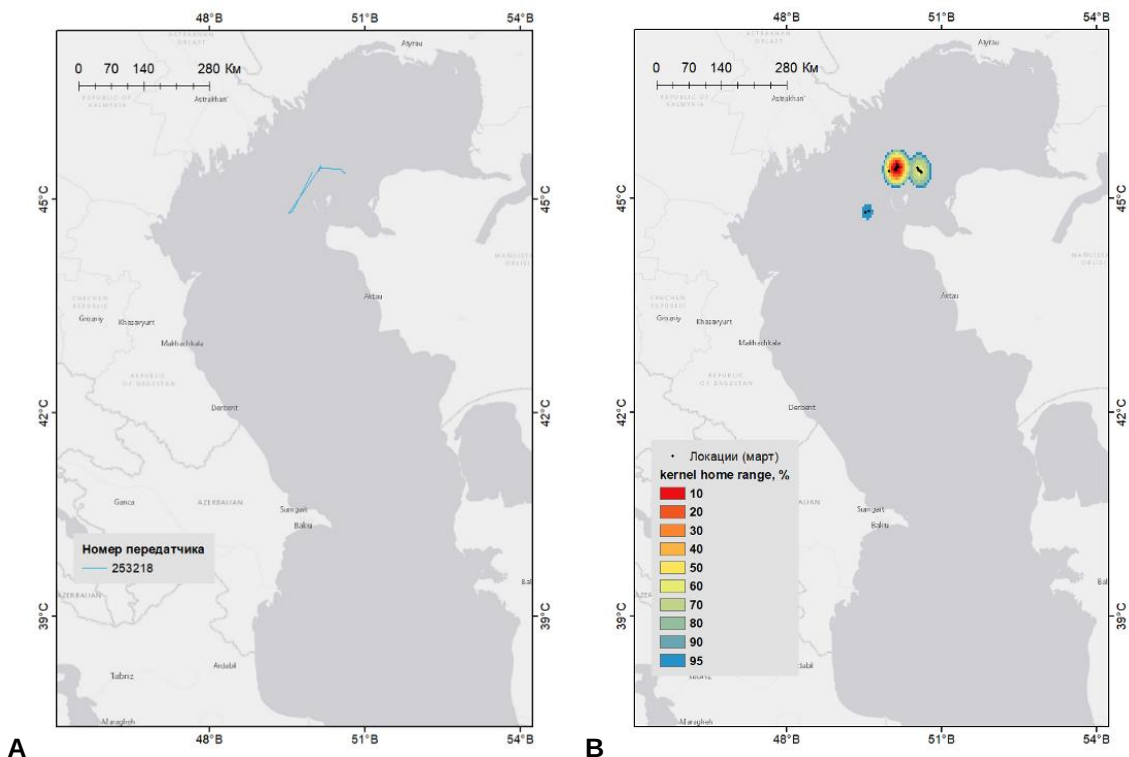


Рисунок 4.4.6 Треки перемещений (А) и ключевые места обитания тюленей (В) в марте 2024 г.

Активность помеченных животных

Активность помеченных животных с ноября по март отражена на рисунке 4.4.7. Отмечается уменьшение активности перемещений животных в период с декабря по февраль. Так как в марте сигналы поступали только от одной метки, показатели пройденного расстояния отражают индивидуальные особенности помеченного животного, передатчик которого продолжал работу в этот месяц.

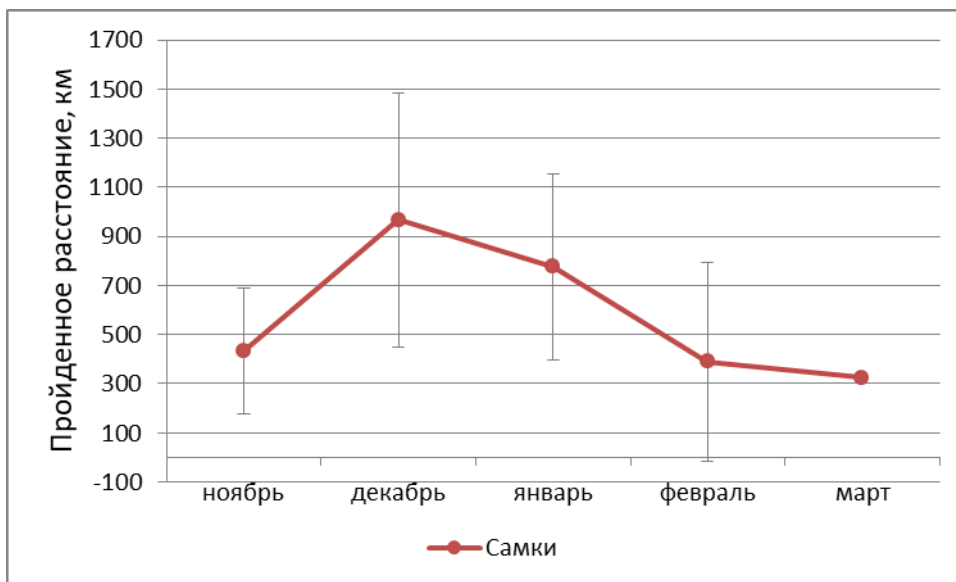


Рисунок 4.4.7 Активность помеченных животных в период с ноября по март

На рисунке 4.4.8 представлены значения параметра скорости перемещений животных по месяцам. В ноябре, скорость была чуть ниже, чем в декабре. С декабря по март заметно постепенное снижение значений скорости животных. Стоит отметить, что данный параметр не отражает истинную скорость движения животных, а показывает лишь отношение дистанции между двумя локациями по данным прослеживания к количеству часов между двумя локациями.

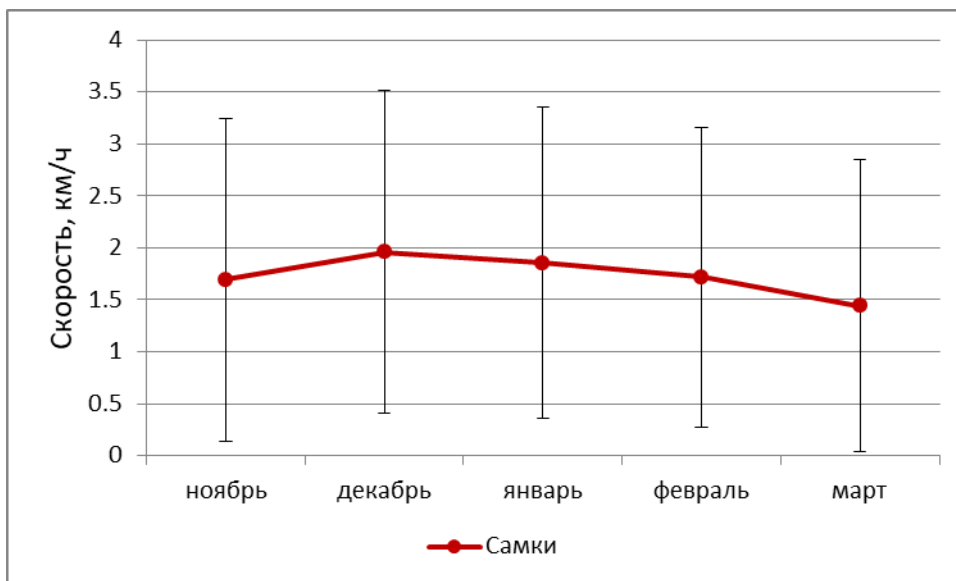


Рисунок 4.4.8 Скорость перемещений помеченных животных в период с ноября по март (км/ч)

За кратчайшую дистанцию до берега принимается дистанция до материковой береговой линии Каспийского моря без учета шалыг. Изменения параметра дистанции до берега по месяцам отражены на рисунке 4.4.9. Отмечается уменьшение медианных значений дистанции до берега в декабре и феврале. Однако стоит отметить сильное перекрытие разброса данных, в связи с чем нельзя говорить о достоверных различиях данного параметра по месяцам.

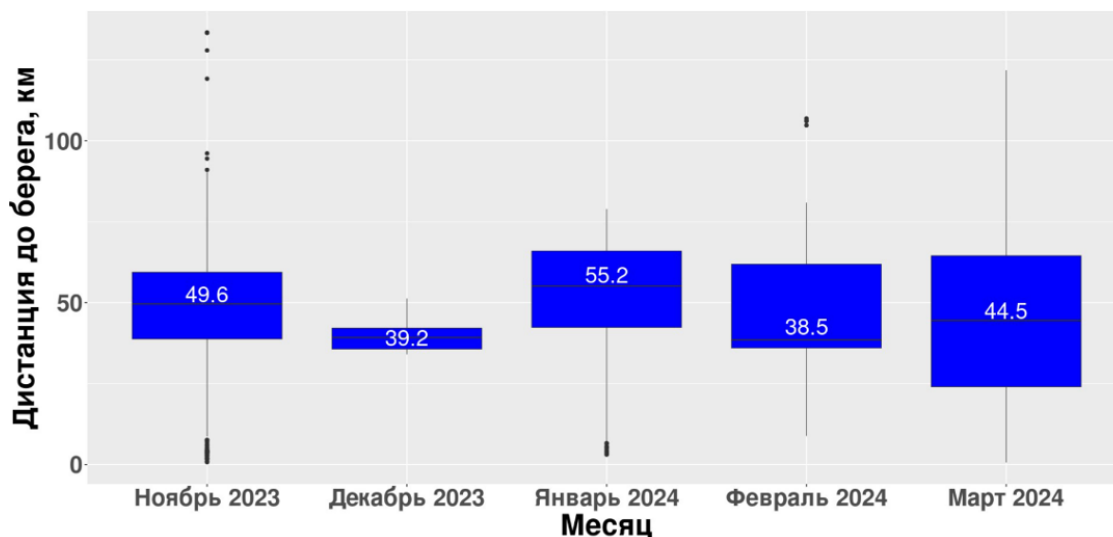


Рисунок 4.4.9 Дистанция до берега

Установленные на животных передатчики не имели датчика глубины погружения, в связи с чем не представляется возможным проанализировать глубину занывивания животных. Однако возможно оценить приуроченность тюленей к акваториям с определенными глубинами по значениям глубин в локациях. Значения данного параметра отображены на рисунке 4.4.10. В течение всего периода наблюдений большинство локаций было получено из северного и среднего Каспия, медианные значения глубин для каждого месяца составляют от 4 до 6 метров. При этом отмечается, что наибольшее количество локаций, приуроченных к глубоководным районам Каспия, получено в ноябре, что заметно большему разбросу данных для этого месяца.

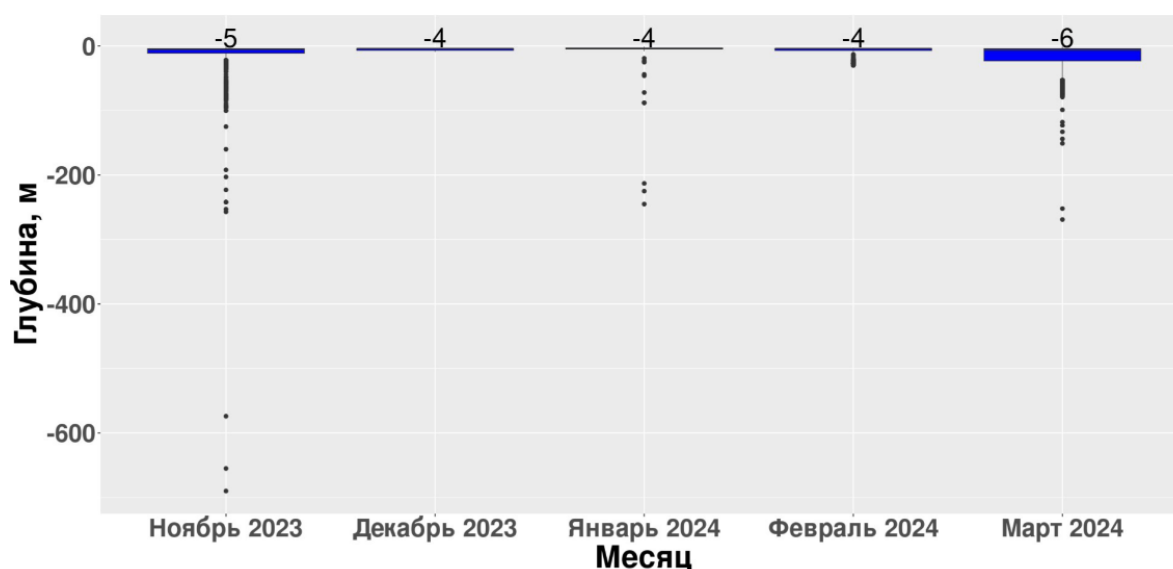


Рисунок 4.4.10 Глубины акваторий в местах регистрации помеченных животных

4.5. Результаты анализа биологического материала

Во время полевых работ у живых и павших тюленей отобраны образцы биоматериала (таблица 4.5-1; Приложение В, Таблицы В.1-В.3).

Таблица 4.5-1 Образцы биоматериала отобранного у живых тюленей, ноябрь 2023 г.

Тип пробы	Количество проб
«НПЦ МиВ» (РК)	
Конъюнктивальные мазки для вирусологических исследований	20
Насальный, ротовой смывы для вирусологических и микробиологических исследований	40
Урогенитальные смывы для микробиологических исследований	20
Ректальные смывы для вирусологических исследований	20
Сыворотка для серологических исследований	20
ИПЭЭ РАН (РФ)	
Насальные мазки, или смывы для вирусологических и микробиологических исследований	54
Вагинальные смывы для микробиологических исследований	48
Ректальные смывы для вирусологических исследований	54
Образцы волос для гормональных, токсикологических исследований	60
Вибриссы для гормональных, токсикологических исследований	40
Плазма крови для серологических исследований	60
Кровь для токсикологических исследований и исследований на тяжелые металлы	40
ФЭК для токсикологических и генетических исследований	40
Мазки крови для серологических исследований	40

Специалистами «МиВ» (РК): для вирусологических, микробиомных, вирусных, молекулярно-паразитологических и серологических исследований было отобрано 120 биологических проб и сыворотки крови от 20 особей без ущерба для жизни и здоровья тюленей. Дополнительно собраны 24 образцов секционного материала от погибших тюленей.

Специалистами «ИПЭЭ РАН» (РФ): для вирусологических, серологических, гормональных, генетических, токсикологических, морфологических и микробиологических исследований было отобрано 436 биологических проб от живых тюленей, без ущерба для их жизни и здоровья.

4.5.1. Вирусологический и бактериальный анализ (НПЦ МиВ РК)

Характеристика биологических материалов, собранных специалистами «НПЦ МиВ» (РК) для вирусологических, микробиомных, вирусных, молекулярно-паразитологических и серологических исследований представлены в таблице 4.5-1. Было собрано 120 биологических образцов в виде конъюнктивальных, носовых, ротовых, урогенитальных, ректальных смывов и сыворотки крови от 20 особей каспийских тюленей, без ущерба для жизни и здоровья животных. При внешнем осмотре у некоторых молодых животных отмечались симптомы респираторной инфекции, в виде воспаления конъюнктивы и катарального истечения из носа (рисунок 4.5.1.).



Рисунок 4.5.1 Воспаление конъюнктивы и острый гнойно-катаральный ринит у каспийских тюленей (ноябрь 2023 г.)

4.5.1.1. Вирусологический скрининг на наличие возбудителей вирусных болезней каспийского тюленя

Методом ПЦР проведен вирусологический скрининг 100 образцов в виде конъюнктивальных, носовых, ротовых, урогенитальных, ректальных смывов от 20 тюленей, на наличие возбудителей основных вирусных инфекций морских млекопитающих и наземных плотоядных.

В результате вирусологического анализа в пробах каспийских тюленей не выявлены нуклеиновые кислоты возбудителей гриппозных (вирусы гриппа А и В), коронавирусных, парамиксовирусных (в т.ч. морбилливируса плотоядных), гепивирусных (гепатит Е), поксвирусных, лиссаивирусных, ретровирусных инфекций животных. Указанные семейства вирусов являются возбудителями самых массовых инфекционных заболеваний теплокровных животных. Во всех сериях исследования, продукты ПЦР соответствующие ожидаемым размерам амплифицировались только в препаратах вирусов взятые в качестве положительного контроля.

Во всех сериях исследования, продукты ПЦР соответствующие ожидаемым размерам фрагментов генов аденовирусов и герпесвирусов выявлены в пробах носовых смывов собранные в 2023 г. казахстанской части моря (таблица 4.5-2) от животных с признаками респираторной инфекции. Количество ПЦР-положительных животных, на наличие адено- и герпесвирусов приведены на рисунках 4.5.2 - 4.5.3.

Аденовирусы выявлены в пробах трех взрослых и семи молодых животных. В результате BLAST поиска, нуклеотидные последовательности из 240 пар оснований, полученных в результате секвенирование ПЦР-положительного на аденовирус образцов, совпадали таковыми аденовируса каспийского тюленя выявленный в 2016 г. (идентичность 98%). Дальнейшая филогенетическая характеристика аденовирусов каспийских тюленей, позволила установить их родство с аденовирусом норок (рисунок 4.5.4). Необходима дальнейшая полногеномная характеристика аденовирусов каспийских тюленей, для определение его филогенетические взаимосвязи с другими аденовирусами.

Филогенетически наиболее близкими были аденовирусы норки (Lutrine типа 1), тюленей (Phocine 2), изоляты мастаденовирусов летучих мышей и морских львов (Otarine 2), хотя взаимосвязи были неявными. В совокупности это указывает на присутствие нового аденовируса у каспийских тюленей, который, по-видимому, отличается от известных в настоящее время представителей семейства *Adenoviridae*.

Таблица 4.5-2 Результаты ПЦР скрининга материалов каспийских тюленей на наличие фрагментов генома вирусов

№ п/п	Тип ПЦР-анализа								
	RT-PCR Грипп А (PB-1 gene)	RT-PCR CDV (P gene)	RT-qPCR CDV	RT-PCR Pan- Paramyxo	Pan-CoV	Pan- Herpes	Pan- Adeno	RT-PCR Грипп А (M-gene)	RT-PCR Грипп В (NS-gene)
1	–	–	–	–	–	+	–	–	–
2	–	+	?	–	–	–	–	–	–
3	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	–	+	?	–	–	–	–	–	–
5	–	+	?	–	–	–	+	–	–
6	–	–	–	–	–	+	+	–	–
7	–	–	–	–	–	+	+	–	–
8	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10	–	–	–	–	–	+	–	–	–
11	–	–	–	–	–	–	–	–	–
12	–	–	–	–	–	+	–	–	–
13	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	–	–	–	–	–	?	+	–	–
15	–	+	?	–	–	+	+	–	–
16	–	–	–	–	–	+	–	–	–
17	–	–	–	–	–	+	–	–	–
18	–	–	–	–	–	+	–	–	–
19	–	–	–	–	–	+	+	–	–
20	–	–	–	–	–	+	+	–	–
21	–	–	–	–	–	+	+	–	–

№ п/п	Тип ПЦР-анализа								
	RT-PCR Грипп А (PB-1 gene)	RT-PCR CDV (P gene)	RT-qPCR CDV	RT-PCR Pan- Paramyxo	Pan-CoV	Pan- Herpes	Pan- Adeno	RT-PCR Грипп А (M-gene)	RT-PCR Грипп В (NS-gene)
22	–	–	–	–	–	+	+	–	–
23	–	–	–	–	–	+	–	–	–
24	–	–	–	–	–	+	–	–	–
Положительный контроль	Штамм (7994)	вакцина Nobivac & Biocan DHPPI+LR	вакцина Nobivac & Biocan DHPPI+LR	вакцина Nobivac & Biocan DHPPI+LR	Бета- Cov/Vero CC)	Штамм PHHV-1	вакцина Nobivac & Biocan DHPPI+LR	Штамм (7994)	Штамм B/Yamagata

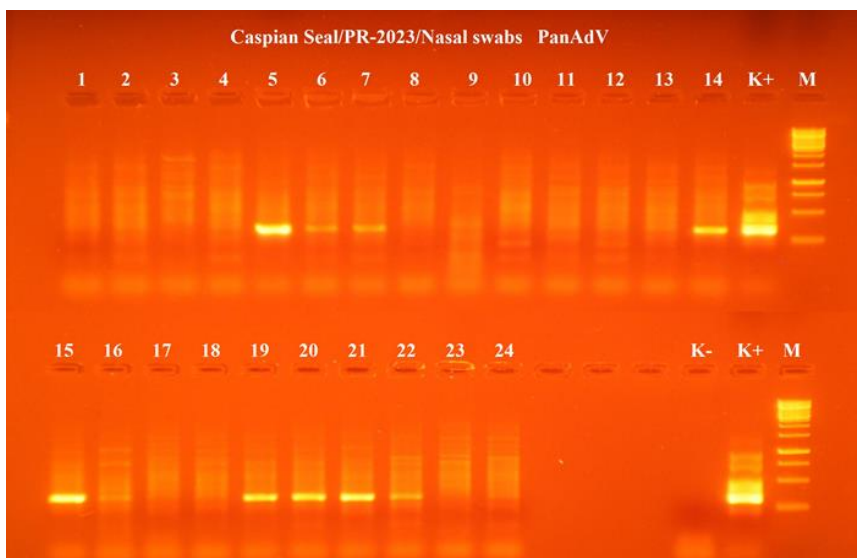


Рисунок 4.5.2 Электрофореграмма результатов исследования продуктов ПЦР из биопроб от каспийских тюленей в 2% агарозном геле после амплификации с праймерами к *pol* гену аденовирусов

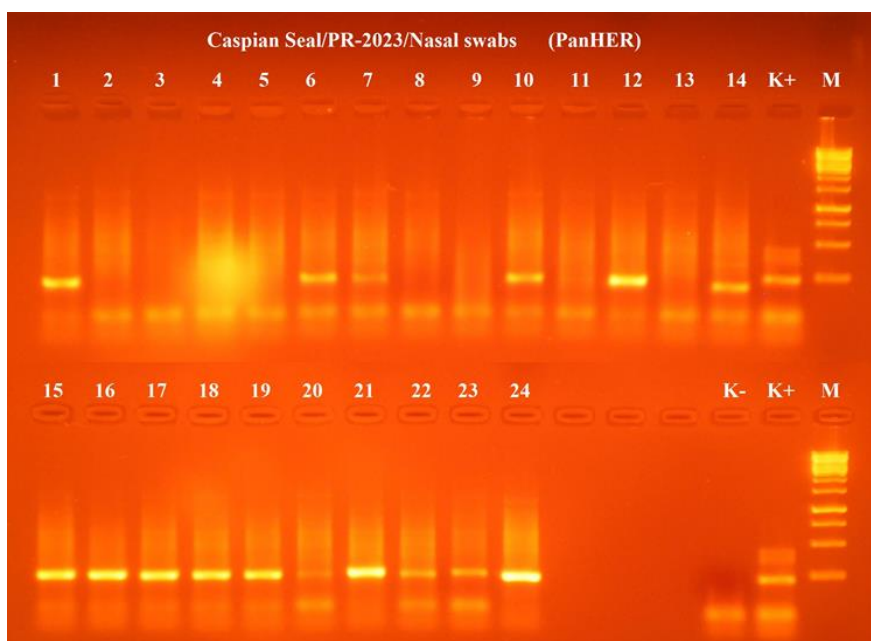


Рисунок 4.5.3 Электрофореграмма результатов исследования продуктов ПЦР из биопроб от каспийских тюленей в 2% агарозном геле после амплификации с праймерами к *Us2* гену герпесвирусов

положительных на герпесвирус проб тюленей имели 89% идентичности с фрагментом гена ДНК-полимеразы изолята герпесвируса хохлача (*Cystophora cristata*) FMV04-1493871. Герпесвирус хохлача (Hooded seal herpesvirus Taxonomy ID: 1419110) относится к неклассифицированным гаммагерпесвирусам. Эти находки дополняют наше представление о спектре герпесвирусов каспийских тюленей, так как в предыдущих исследованиях нами также получены вирусологические и серологические доказательства циркуляции альфа-герпесвирусов в популяции этих животных [Kudyrmanov A, Karamendin K., etc., 2023; Kudyrmanov A.I., Karamendin K.O., Kasymbekov E.T., 2023].

В результате филогенетического анализа фрагмента нуклеотидной последовательности гена Us2 герпесвируса каспийского тюленя установлено, что исследуемый вирус относится к гаммагерпесвирусу тюленей (Phocine herpesvirus serotype 2, PhHV-1), но секвенирование полного генома необходимо для полной характеристики вируса и выявления его связи с другими герпесвирусами ластоногих (рисунок 4.5.5). Анализ фрагмента генома герпесвируса каспийского тюленя показывает его родство с герпесвирусами тюленей серотипа 2, таковые как гаммагерпесвирусы гренландских тюленей, кольчатых нерп. Клиническое проявление инфекций с гаммагерпесвирусами у перечисленных видов ластоногих не описаны.

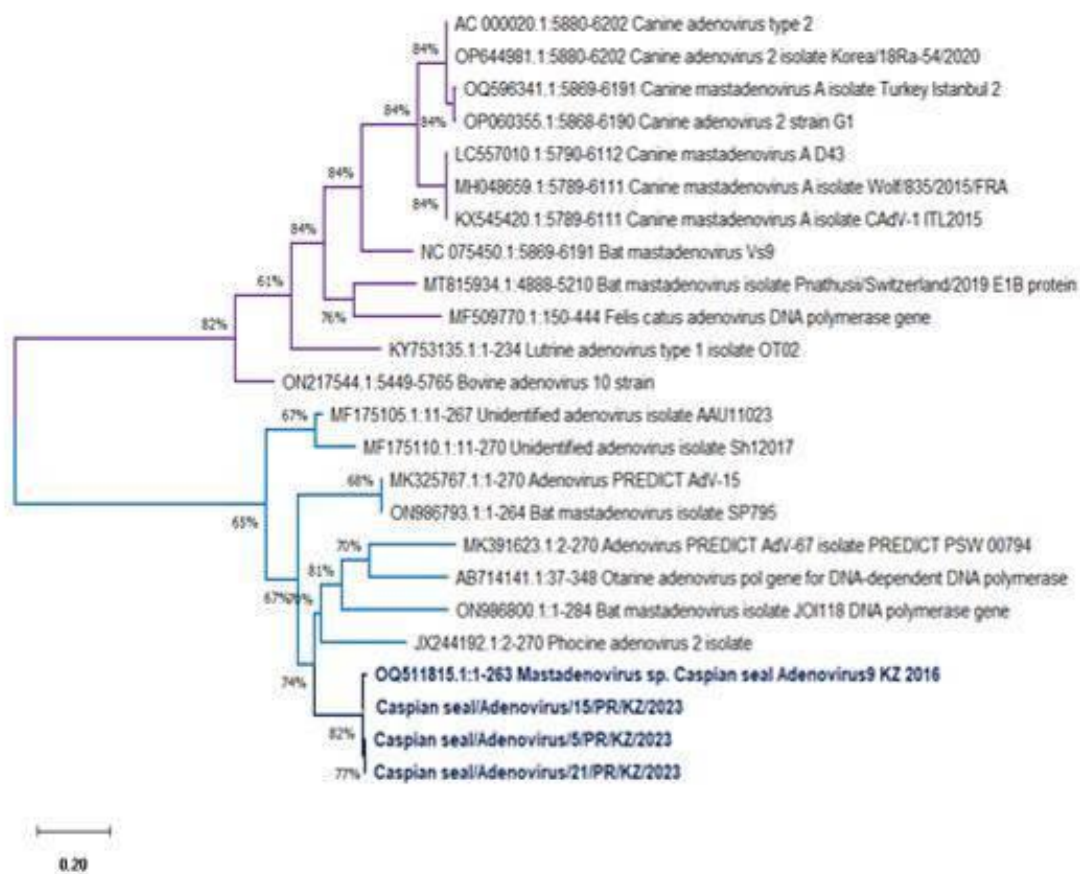


Рисунок 4.5.4 Филогенетическое древо консенсусных последовательностей фрагмента гена ДНК-зависимой ДНК полимеразы аденовирусов каспийских тюленей, состоящей из 240 нуклеотидных последовательностей

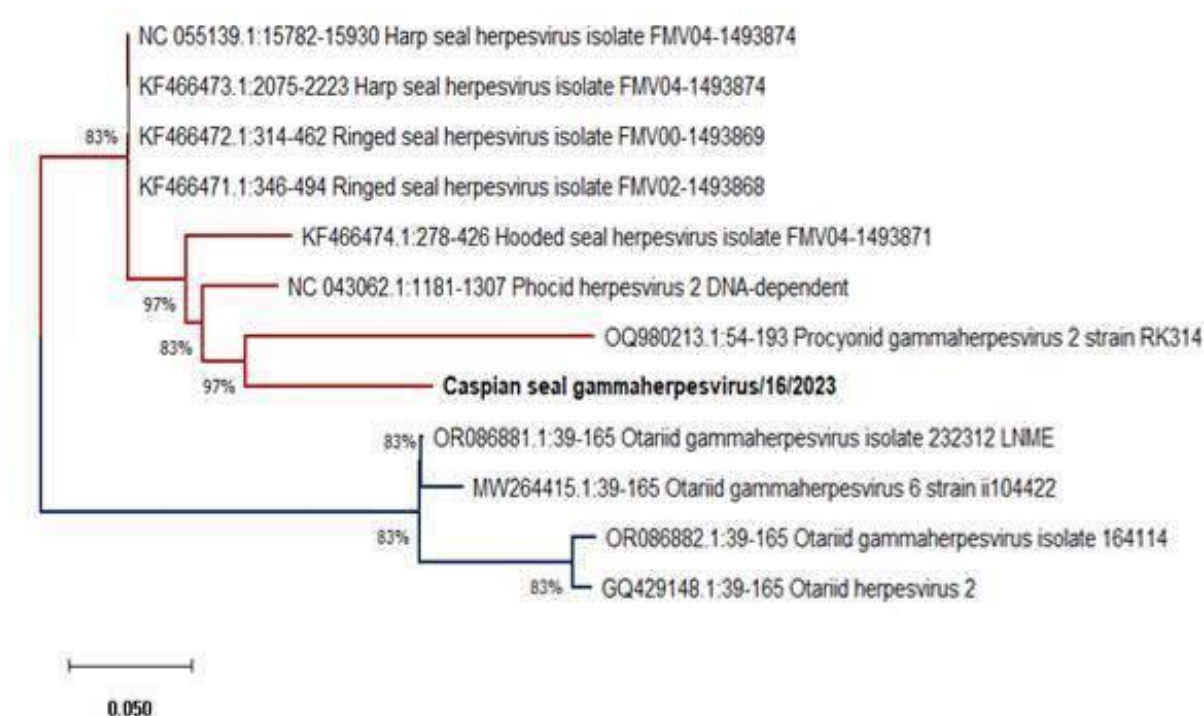


Рисунок 4.5.5 Филогенетическое древо консенсусных последовательностей фрагмента ДНК-полимеразы (DPOL) герпесвируса, состоящей из 175 нуклеотидов последовательности

Анализ частичной последовательности гена Us2 позволяет предположить, что вариант герпесвируса каспийского тюленя очень похож на альфагерпесвирусу тюленей (*Phocine herpesvirus serotype 1*, PhHV-1), но секвенирование полного генома необходимо для полной характеристики вируса и его связи с другими герпесвирусами тюленей.

На основании исследованных выборок, полученные данные свидетельствуют о наличии смешанной респираторной инфекций среди исследованной группы животных, вызванные с аденовирусами и герпесвирусами тюленей серотипа 1. Доминирующая роль вирусов в инфекционной патологии требует дополнительных исследований.

4.5.1.2. Исследование вирусного метагенома каспийского тюленя

Всего для анализа были взяты пробы от 20 тюленей, которые были объединены в пулы с учетом пола и возраста. Были получены восемь типа пулов: носовые, ротовые, урогенитальные и ректальные смывы из молодых и взрослых самцов, молодых и взрослых самок, пулы органов павших животных и абортированных плодов. Дополнительно в лабораторию были доставлены образцы легких павших тюленей из Дагестана (Россия). Эти образцы использовались для приготовления библиотеки, которые секвенировали на Illumina HiSeq4000 компании Macrogen, Inc. (Республика Корея).

В общей сложности было получено приблизительно 1 250 000 необработанных секвенированных ридов на образец. BLAST поиск полученных контигов с использованием порогового значения $10E-5$ выявил наличие вирусов, принадлежащих к семействам Anelloviridae, Caliciviridae, Circoviridae, Coronaviridae, Herpesviridae, Orthomyxoviridae, Papillomaviridae, Parvoviridae, Picornaviridae (таблица 4.5-3). Вирусные контиги показали широкий спектр идентичности к последовательностям (71-100%) фрагмента генома известных вирусов. Предполагается, что некоторые из этих последовательностей могут быть получены из новых видов вирусов.

Таблица 4.5-3 **Количество контигов для семейств, родов и видов вирусов каспийских тюленей с максимальным покрытием, процентом идентичности выравнивания и максимальной длиной контига**

Пол, возраст животного / тип образца	Семейство вируса	Род вируса	Разновидность	Макс. покрытие	Макс. идент., %	Макс. длина контига, п.н.	Кол-во контигов
Взрослые самки /носовой смыв	Anelloviridae	Lambdatorquevirus	Torque teno pinniped virus 3	26,012	78,98	2278	6
		Nutorquevirus	Torque teno seal virus 4	66,054	71,48	1366	3
	Papillomaviridae	Gammapapillomavirus	Gammapapillomavirus 1	5	100	321	1
	Caliciviridae	Vesivirus	San Miguel sea lion virus 8	20,028	78,11	861	1
Взрослые самки /ротовой смыв	Papillomaviridae	Betapapillomavirus	Betapapillomavirus 1	47,216	78,79	359	2
		unknown	Leptonychotes weddellii papillomavirus 6	3663	80,95	1342	13
	Herpesviridae	Percavirus	Phocid gammaherpesvirus 3	52	94,73	1667	13
	Anelloviridae	Nutorquevirus	Torque teno seal virus 4	1659,93	82,99	326	1
	Circoviridae	unknown	Circovirus-like genome DCCV-4	7,044	98,73	300	2
Взрослые самки /ректальный смыв	Parvoviridae	Aquambidensovirus	Asteroid aquambidensovirus 1	5	83,28	798	1
	Papillomaviridae	Gammapapillomavirus	Gammapapillomavirus 1	2,006	99,62	484	5
	Anelloviridae	unknown	Seal anellovirus TFFN/USA/2006	1935,90	87,90	2300	1
	Circoviridae	unknown	Circovirus-like genome DCCV-4	4,027	99,15	292	1
Взрослые самки/Урогенитальный смыв	Anelloviridae	Nutorquevirus	Torque teno seal virus 4	47,06	82,71	927	7
		unknown	Seal anellovirus TFFN/USA/2006	252,542	84,93	1051	3
		Lambdatorquevirus	Torque teno pinniped virus 3	59,073	79,12	954	1
	Parvoviridae	Chaphamaparvovirus	Rodent chaphamaparvovirus 1	136,947	78,53	3027	24
	Circoviridae	unknown	Circovirus-like genome DCCV-4	52,185	100	422	5
	Papillomaviridae	Gammapapillomavirus	Gammapapillomavirus 1	12,064	100	327	1
	Coronaviridae	Betacoronavirus	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	14,08	100	316	1
Мозг	Orthomyxoviridae	Alphainfluenzavirus	Influenza A virus	4,017	93,89	371	1
	Coronaviridae	Betacoronavirus	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	55,188	99,53	434	1
	Papillomaviridae	Betapapillomavirus	Betapapillomavirus 1	36,073	99,69	637	1
Gammapapillomavirus		Gammapapillomavirus 1	15,028	100	672	2	
Взрослые обоих полов / легкие	Orthomyxoviridae	Alphainfluenzavirus	Influenza A virus	12,047	89,39	394	1
	Papillomaviridae	Gammapapillomavirus	Gammapapillomavirus 1	93,085	100	1236	5
Взрослые обоих полов / печень, селезенка, почки	Parvoviridae	Erythroparvovirus	Pinniped erythroparvovirus 1	2,085	92,11	539	3
	Herpesviridae	Rhadinovirus	Bovine gammaherpesvirus 4	2	84,27	349	1
	Circoviridae	unknown	Circovirus-like genome DCCV-4	3,011	99,27	416	1
Взрослые обоих полов / лимфоузлы	Picornaviridae	Hepatovirus	Hepatovirus B	4	92,86	367	1
Аборт.плод / легкие	Circoviridae	unknown	Circovirus-like genome DCCV-4	616,05	100	342	1
Аборт.плод / печень, селезенка, почки	Parvoviridae	unknown	Psittaciform parvoviridae sp.	1	99.70	593	3

Уровень идентичности на основе эталонного штамма в базе данных вирусов RefSeq (база данных эталонных последовательностей NCBI). Анализ выполнен с использованием BLAST X (E -значение < 1 × 10⁻¹⁰).

В носовых смывах взрослых животных преобладали вирусы семейства *Anelloviridae* (разновидности вирусов ластоногих *Torque teno pinniped virus* 3-4) *Papillomaviridae* (γ -папилломавирус-1), *Caliciviridae* (вирус Сан-Мигелских морских львов) (рисунок 4.5.6). Ротовые смывы каспийских тюленей отличались наличием β -папилломавирусов 1, папилломавирусами тюленей Уэддела 6, γ -герпесвирусами тюленей 3, *Circovirus-like genome* DCCV-4. Виром ректальных смывов взрослых самок обнаружены контиги вирусов семейств *Parvoviridae* (*Asteroid aquambidensovirus* 1), *Anelloviridae* (анелловирус тюленей TFFN/USA/2006). Виром уrogenитальных смывов самок характеризовались наличием β -коронавируса.

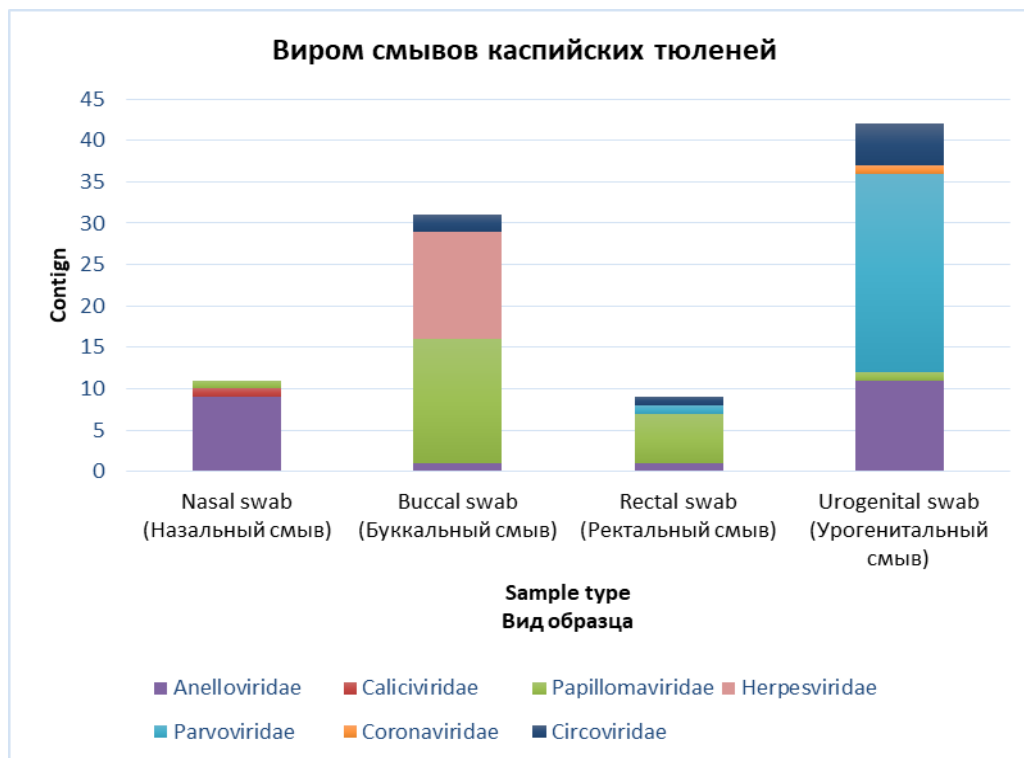


Рисунок 4.5.6 Характеристика виroma ротовых, носовых, уrogenитальных и ректальных смывов взрослых особей самок каспийских тюленей

В тканях мозга павших животных выявлены контиги вирусов семейств *Orthomyxoviridae*, *Papillomaviridae*, *Coronaviridae* (рисунок 4.5.7).

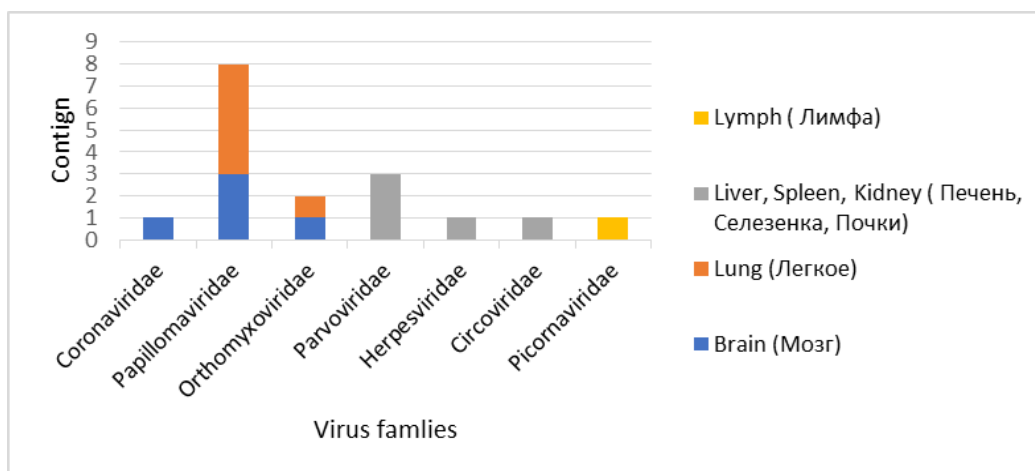


Рисунок 4.5.7 Характеристика виroma внутренних органов павших каспийских тюленей

В легких животных обнаружены контиги вируса гриппа А (сем. Orthomyxoviridae), а также γ-папилломавирусы. В пуле внутренних органов павших тюленей идентифицированы вирус-специфические последовательности характерные к семействам вирусов Parvoviridae, Herpesviridae, Circoviridae. Вирусная флора внутренних органов (печень, селезенка, почки) характеризовались наличием герпес-, парво-, цирковирусов. В лимфоузлах павшего тюленя обнаружен контиги Hepatovirus В (сем. Picornaviridae), известный как фопивирус (phopivirus) тюленей.

Что касается пространственного распространения вирусов, то Каспийское море в целом следует рассматривать как единое место для сбора материала, поскольку каспийский тюлень не связан с какой-либо частью моря, а перемещается по морю, не образуя отдельных популяций. Что касается распространения вирусов в зависимости от вида образца, то, исходя из полученных результатов (рисунок 4.5.8), можно проследить конкретные закономерности.

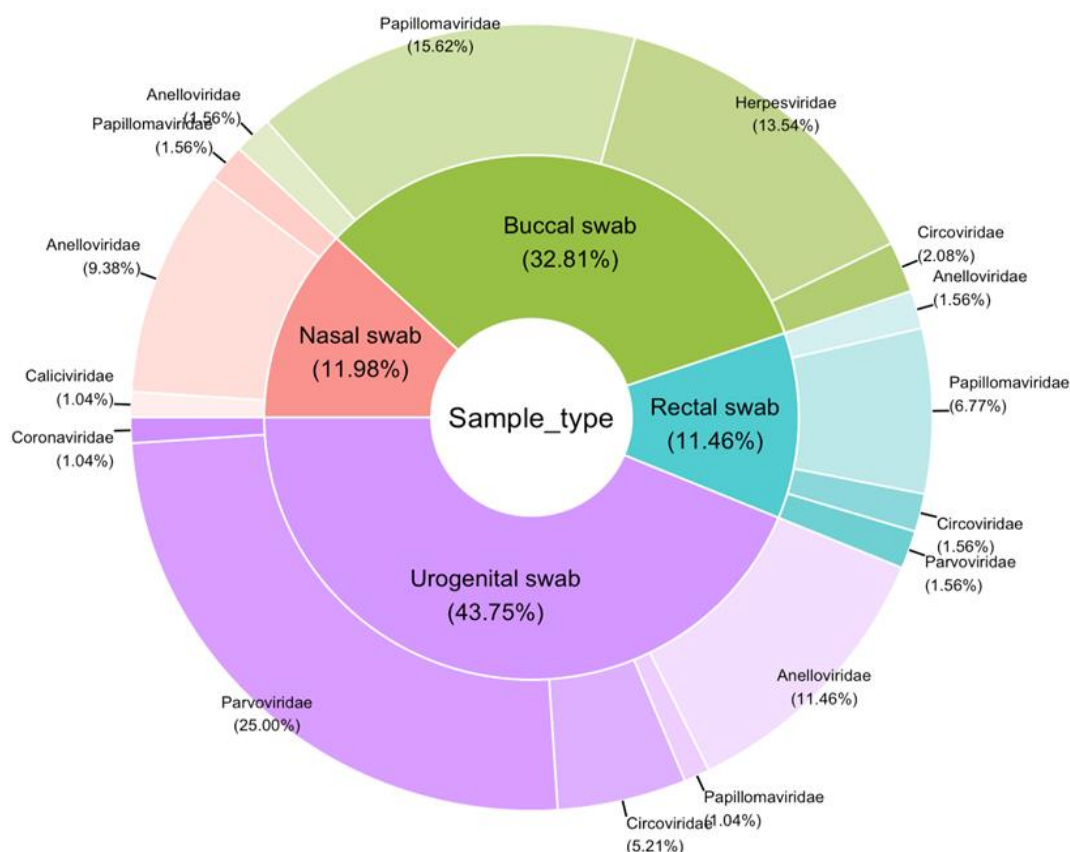


Рисунок 4.5.8 Соотношение контигов, связанных с вирусами разных семейств

Исследование не выявило никакой разницы в распространенности вирусов среди молодых или взрослых животных обоих полов. Далее приводится описание каждого найденного семейства вирусов.

Семейство *Circoviridae* было самым распространённым семейством вирусов в этом исследовании. Представители семейства *Circoviridae* - это небольшие, не конвертированные, кольцевые одноцепочечные вирусы ДНК, идентифицированные у различных млекопитающих, птиц и других организмов по всему миру. Филогенетический анализ показал наиболее значительное сходство между цирковирусом каспийского тюленя и циркоподобным вирусом 2, связанным с дыхалом горбатых китов, обнаруженным в Австралии в 2017 году. Схожие вирусные последовательности, подобные *Circoviridae*, широко распространены в морской среде и могут быть связаны со многими водными организмами.

Вторым по численности семейством является *Parvoviridae*, которое включает безоболочечные линейные вирусы с одноцепочечной ДНК. В данном исследовании у каспийских тюленей были обнаружены последовательности, на 58,8% сходные с парвовирусом собак, но мы не можем

считать их близкородственными этому патогенному виду вируса. Вместо этого они связаны с парвовирусами, связанными с водными экосистемами. Филогенетический анализ частичной последовательности неструктурного белка NS2 показал кластеризацию парвовируса каспийского тюленя с денсовирусами, далекими от патогенного парвовируса собак. Денсовирус каспийского тюленя сгруппирован с денсовирусами устриц, моллюсков и морских звезд, которые также относятся к морской аквакультуре.

Herpesviridae — большое семейство оболочечных вирусов с двухцепочечной ДНК. Герпесвирусы часто регистрируются у морских млекопитающих. Последовательности, обнаруженные у каспийских тюленей Us2-подобным белком, на 97% аналогичны последовательности альфа-герпесвируса тюленей 1, описанного у атлантических морских тюленей в 1985 г. Ротовых смывах обнаружены геномные последовательности двух типов герпесвирусов, такие как γ -герпесвирус KPC 6 и γ -герпесвирусу Phocid 3 (герпесвирус гренландского тюленя).

Папилломавирусы представляют собой небольшие безоболочечные кольцевые вирусы с двухцепочечной ДНК, которые инфицируют кожу или слизистые оболочки различных видов животных. Среди морских млекопитающих папилломавирусы были выявлены у морских свиней (*Phocoena phocoena*) в 1999 г. Последовательности каспийского тюленя на 72,58 % сходны с белком E2, ранее идентифицированным как папилломавирус тюленей Уэдделла 6. В пробах обеих групп животных присутствовали γ -папилломавирусы. В пробах взрослых животных дополнительно обнаружены β -папилломавирусы.

Пикорнавирусы представляют собой небольшие безоболочечные вирусы с положительной смысловой одно цепочечной РНК семейства *Picornaviridae*, обнаруженные в исследованных образцах каспийских тюленей. Последовательности пикорнавирусов каспийского тюленя на 70 % аналогичны пикорнавирусу енотовидной собаки, выделенному в Китае в 2017-2021 гг.

Caliciviridae представляет собой семейство безоболочечных одноцепочечных вирусов с положительной смысловой РНК. Морские калицивирусы относятся к роду *Vesivirus* семейства *Caliciviridae*. Было высказано предположение, что морские млекопитающие служат их естественным резервуаром. *Vesivirus*-подобные последовательности, обнаруженные в этом исследовании, были на 71% сходны с вирусом морского льва Сан-Мигель, выделенным в США. Филогенетический анализ также подтвердил его родство с вирусом морского льва Сан-Мигель и везивирусами собак.

Анелловирусы представляют собой безоболочечные кольцевые вирусы с одноцепочечной ДНК, принадлежащие к семейству *Anelloviridae*. Они очень разнообразны и до сих пор не были связаны с каким-либо заболеванием. Последовательность анелловируса каспийского тюленя была на 78% аналогична последовательности анелловируса тюленя 4. Филогенетический анализ частичной нуклеотидной последовательности ORF1 анелловируса каспийского тюленя показал его родство с кластером, состоящим из анелловирусов тюленей 4 и 5.

Ортомиксовирусы представляют собой оболочечные вирусы с сегментированной РНК. Контиги вируса гриппа А были обнаружены в образцах 2009 г. По генам гемагглютинаина и неструктурного белка вирус был на 94-95% близки к вирусам гриппа, выделенных от диких птиц в 2006–2019 гг. Вирус гриппа от каспийского тюленя принадлежал подтипу H3, ранее описанного у ластоногих.

В заключение отмечается наличие двух больших групп, состоящих из разных семейств вирусов: первая группа состоит из семейств *Circoviridae* и *Parvoviridae*, связанных с водной экосистемой. Первичными хозяевами этих вирусов являются различные организмы морской среды Каспийского моря. Например, беспозвоночные в случае цирковирусов или насекомые и ракообразные в случае денсовирусов семейства *Parvoviridae*. Следует отметить, что эта группа составляет 72% всего виroma каспийского тюленя. Возможно, они имеют диетическое происхождение. Ко второй группе относятся вирусы млекопитающих: *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Caliciviridae*, *Anelloviridae*, *Orthomyxoviridae*. Вирусы этой группы потенциально могут вызывать различные патологии у млекопитающих или протекать бессимптомно. До сих пор неясно, к какой группе принадлежат *Picornaviridae*-подобные последовательности, поскольку идентифицированные контиги генетически далеки от вирусов млекопитающих и водных организмов. Сходство вирусов каспийского тюленя обеих групп с вирусами, зарегистрированными у других животных в мире, варьировало от 58 до 100%. Ареал обитания

каспийского тюленя ограничен замкнутым водоемом Каспийского моря, не имеющим прямого выхода в Мировой океан, и ожидалось обнаружение генетически отдаленных вирусов.

Регулярны случаи гибели каспийских тюленей с ежегодным выбросом на берег до нескольких сотен туш. К сожалению, в таких случаях не всегда удается выявить основную причину смерти, что обуславливает необходимость регулярных исследований вирусов тюленей.

Проведенные исследования имеют некоторые ограничения. Во-первых, были идентифицированы короткие вирусные последовательности, и их филогенетическое положение требует дальнейшего подтверждения. Во-вторых, ПЦР/ОТ-ПЦР-подтверждение проводилось не во всех случаях из-за отсутствия надежных праймеров. В-третьих, подсчет вирусных контигов для анализа распространенности является обычной практикой, но это косвенный показатель.

4.5.1.3. Характеристика микробиома каспийских тюленей респираторного, желудочно-кишечного и урогенитальных трактов путем секвенирования гена 16S рибосомальной РНК микрофлоры

Бактериальный анализ проведен путем секвенирования фрагмента 16S рибосомальной РНК микрофлоры по протоколу Illumina для выявления возбудителей всех бактериальных инфекций респираторного и желудочно-кишечного трактов каспийского тюленя с применением геноспецифических праймеров к 16S V3 и V4 регионам и наборов NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 1), E7335S (24 reactions). Для этого, ротовые, урогенитальные и ректальные смывы каспийских тюленей, объединили в пулы по половозрастным признакам. Для биоинформационного анализа результатов секвенирования, полученные данные были загружены в программу Geneious 16S Biodiversity Tool.

В совокупности в микробиоме каспийских тюленей были обнаружены таксоны, представляющие 14 типа бактерий, в наборе данных преобладали пять типов: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Fusobacteria* (рисунок 4.5.9).

Из них актинобактерии продуцируют широкий спектр вторичных метаболитов, таких как ферменты, антибиотики, антиоксиданты и цитотоксические соединения. Наличие актинобактерии является характерной особенностью микробиома каспийских тюленей, этот тип встречается у всех видов ластоногих.

Таксоны, принадлежащие к филуму *Bacteroidetes* преобладали в микробиоме каспийских тюленей. Изобилие рода *Bacteroides* был связан с плотоядной диетой тюленей, характеризующиеся высоким уровнем белков, аминокислот и животных жиров. Кодировав большое количество активных углеводных ферментов животного происхождения, *Bacteroides* обладают высокой способностью гидролизовать пищевые гликаны, тип полисахаридов, полученных из белков. Таким образом, высокая численность рода *Bacteroides*, обнаруженная в ходе настоящего исследования у тюленей, согласуется с их плотоядными привычками. Ферменты, содержащиеся в этих типах бактерий, могут помочь тюленю получать энергию от съеденной добычи.

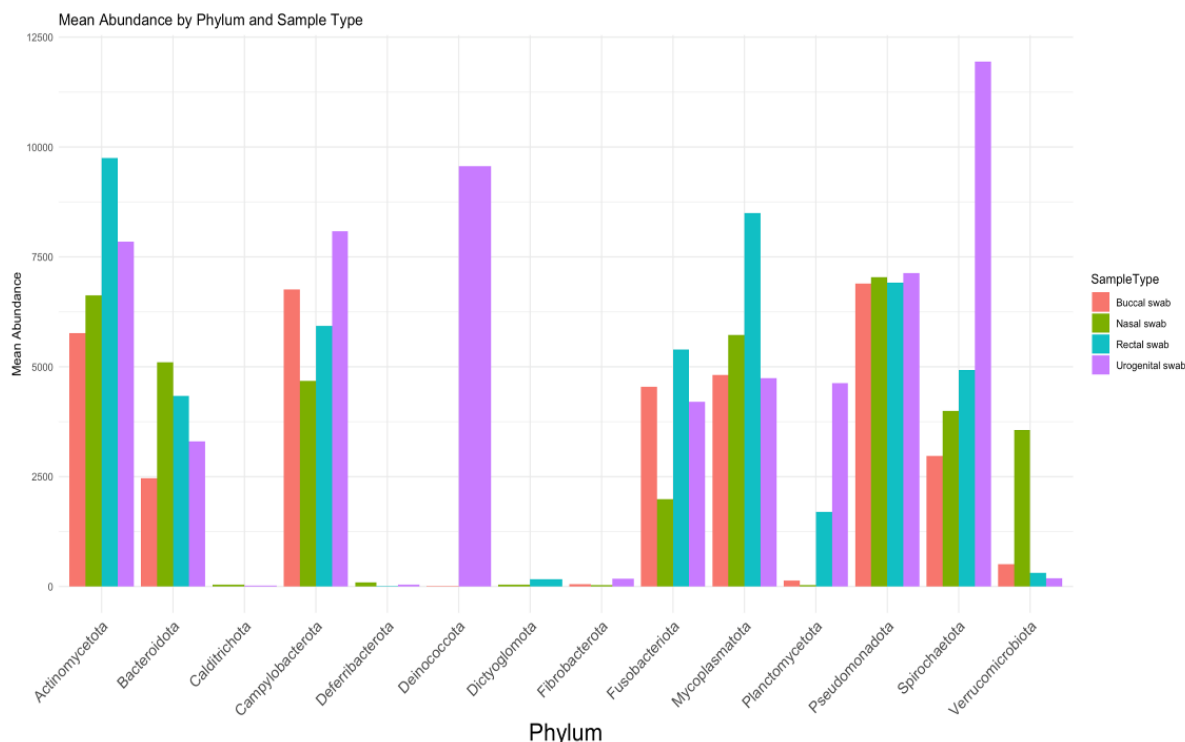


Рисунок 4.5.9 Основные бактериальные таксоны в образцах носовых, ротовых, ректальных и уrogenитальных мазков взрослых самок каспийского тюленя

Бактероиды, которые метаболизируют полисахариды и олигосахариды, обеспечивают питание и витамины хозяина и других обитателей кишечника. Некоторые виды *Bacteroides* могут играть двойную полезную и патогенную роль в зависимости от их расположения в организме хозяина, часто оказывая благотворное влияние на кишечник, но являясь условно-патогенными микроорганизмами в других частях тела.

Фирмикуты играют важную роль в иммунных функциях хозяина и обычно обнаруживаются в пищеварительном тракте многих видов млекопитающих, в то время как многочисленные популяции отсутствуют в среде, не связанной с хозяином.

Более высокая доля *Firmicutes*, чем *Bacteroidetes*, связана как с большей эффективностью извлечение энергии из пищи, так и с накоплением жира. Высокое соотношение *Firmicutes* и *Bacteroidetes* в прямой кишке тюленей связано с тем, что эти животные в значительной степени зависят на отложение жира для накопления энергии и терморегуляции. Следует предположить, что у каспийских тюленей кишечные микробы способствуют эффективному накоплению жира, необходимому для выживания, за счет увеличения доступности энергии толстой кишки, как это наблюдается у людей.

Фузобактерии, известные своей протеолитической активностью в кишечнике человека, оказались преобладающим родом в кишечной микробиоте тюленей (25%). Морские млекопитающие имеют более высокую численность *Fusobacteria*, чем наземные млекопитающие. Члены этого типа, такие как *Fusobacterium*, населяют ротовую полость и кишечник животных. Подобно другим морским хищникам, фузобактерии были одним из самых распространенных типов в микробиоме каспийских тюленей.

Протеобактерии присутствуют на различных участках тела, таких как кожа, ротовая полость, язык и вагинальный тракт, кроме кишечника.

В ходе анализа установлен идентичный состав микробиома в органах павших животных (рисунок 4.5.10).

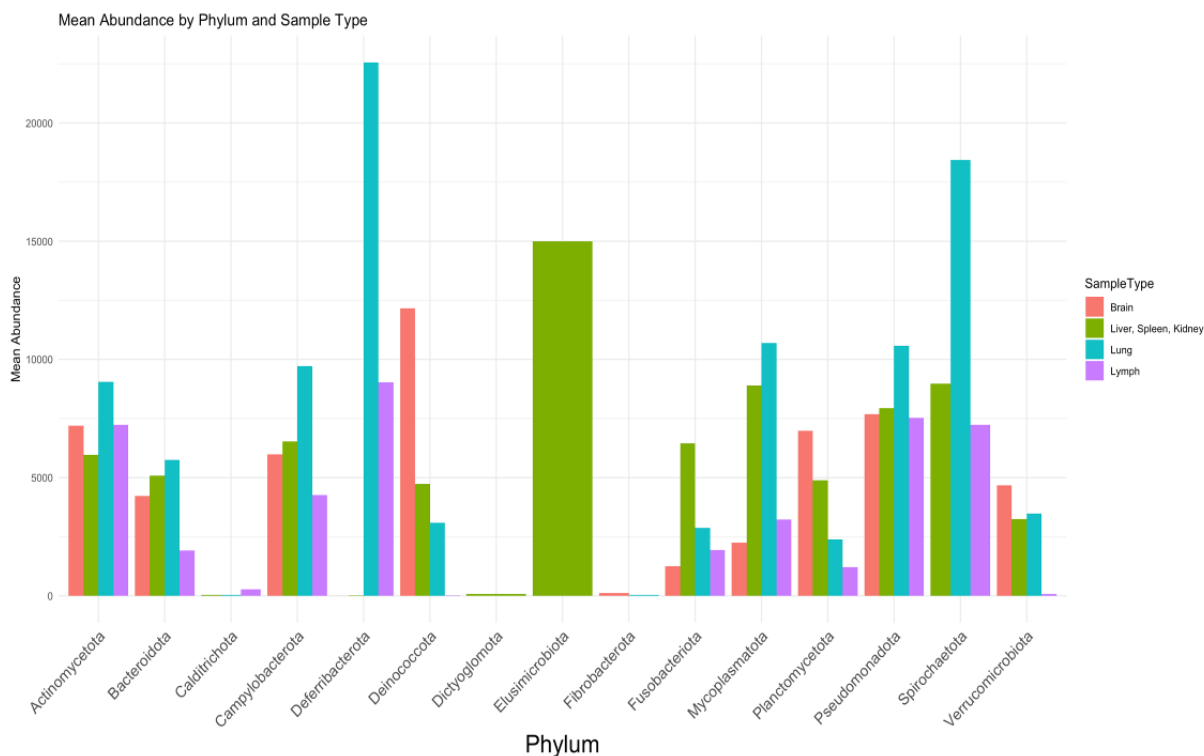


Рисунок 4.5.10 Основные бактериальные таксоны в образцах тканей внутренних органов павших каспийских тюленей

В ходе анализа установлено, что состав микробиома у самцов и самок каспийского тюленя различается, преобладающим типом бактерий являются фирмикуты (рисунок 4.5.11).

Микробиом ротовой, носовой и урогенитальной области у самцов тюленей был представлен преимущественно протеобактериями, за исключением ректальных образцов. В отношении ректального микробиома каспийских тюленей, как было упомянуто ранее в отношении других видов ластоногих, пять основных типов преобладали: *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Микробиом конъюнктивальных смывов обоих полов каспийских тюленей отличался низкой разнообразностью.

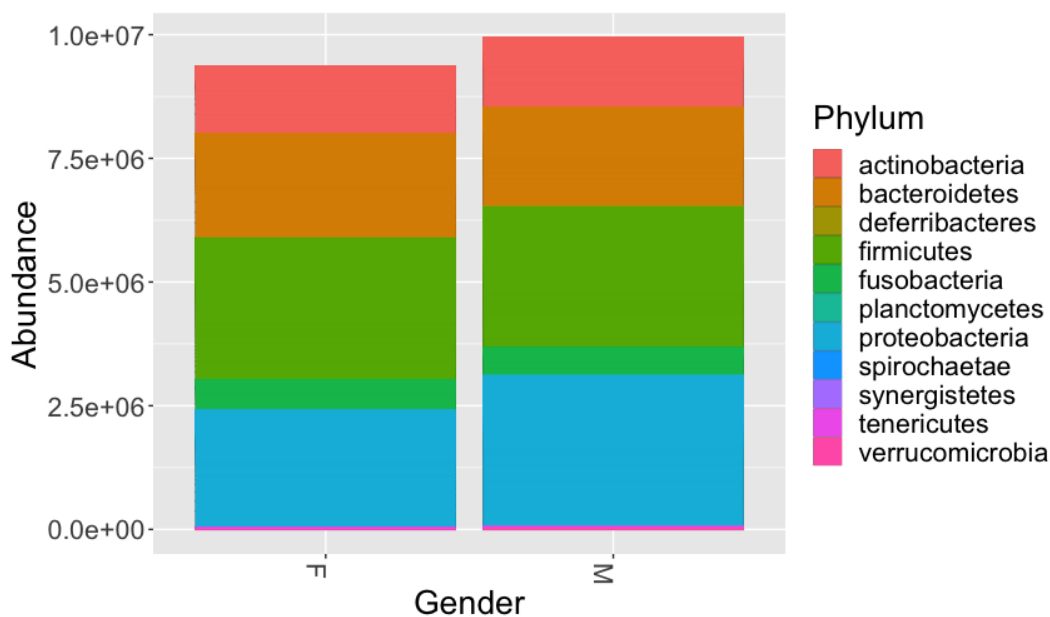


Рисунок 4.5.11 Профиль микробиома самок и самцов каспийского тюленя

В ходе сравнительного анализа микрофлоры каспийских тюленей были выявлены схожие профили микробиома смывов респираторного, алиментарного и урогенитального трактов животных, собранных в период с 2020 по 2023 год. Отмечалась изменчивость процентного соотношения семейств бактерий в зависимости от вида образца от каспийского тюленя. Полученные данные подчеркивают необходимость регулярного мониторинга микробиома у каспийских тюленей для выявления внесения клинически значимых бактериальных патогенов в их популяцию. В общем, результаты данного исследования создают прочную основу для будущих научных работ и способствуют пониманию взаимодействия между хозяином и микробами в популяции каспийского тюленя.

4.5.1.4. *Серологическое исследование циркуляции вирусов гриппа А и вируса чумы плотоядных (CDV) популяции каспийских тюленей в 2019-2023 г.*

Тридцать восемь сывороток, собранные от каспийских тюленей в период с 2020 по 2023 год, были протестированы с использованием набора для ИФА IDEXX Influenza A Ab Test Cat.# 99-53101, согласно Bodewes et al.

Специфичные IgG-антитела к белку гриппа A/NP были обнаружены в 25 из 47 протестированных образцов сыворотки (53,2%). Антитела против вируса гриппа А обнаружены в четырёх образцах (30,8%) из 13 сывороток тюленей, собранных в 2020 г., тогда как положительными на присутствие противогриппозных IgG оказались 21 (84%) из 25 проб крови собранных в ноябре 2022 г. (представлены в Приложение D, таблица D.1).

Высокий процент наличие антител против вируса гриппа А в пробах сывороток каспийских тюленей, собранных в 2022 г. по сравнению с материалами 2020 г. демонстрирует сильной подверженности каспийских тюленей к воздействию гриппозной инфекции и активной циркуляции возбудителя болезни в их популяции. Полученные серологические данные дополняют результаты ПЦР-скрининга на наличие вируса гриппа А в пробах тюленей, павших в казахстанской и российской частях моря в конце 2022 г. и январе 2023 г., и косвенно свидетельствует о причастности возбудителя к вспышке эпизоотии гриппозной инфекции среди тюленей с высокой летальностью.

При иммуноферментном анализе, антитела к вирусу чумы плотоядных (CDV) не обнаружены в сыворотках тюленей, собранных в 2020 г., тогда как в образцах 2022 г. они выявлены до 28%. Одна сыворотка полученный в 2019 г. и две пробы 2023 г. также были положительными на наличие антител к вирусу чумы плотоядных (Приложение D, таблица D.2).

Паралельно к ИФА исследованию, сыворотки тюленей собранные в 2020-2022 гг. дополнительно протестированы в реакции вируснейтрализации на наличие антител к CDV. В ходе которого также установлено присутствие вируснейтрализующих антител к CDV до 60% (15 из 25 исследованных) в сыворотках 2022 г. Значительная разница в результатах серопозитивности образцов в двух разных тестах объясняется с тем, что в ИФА анализ выявляет антитела только одному вирусному антигену (белку), тогда как в реакции вируснейтрализации вирус взаимодействует с антителами выработанные к разным белкам патогена повышая специфичность реакции.

Полученные данные свидетельствуют о недавней вспышке указанных инфекций в популяции этих животных.

4.5.1.5. *Молекулярное исследование паразитофауны каспийского тюленя*

Для выявления паразитологической ситуации среди тюленей ставили цель изучить качественный и количественный состав фауны паразитов тюленей как их окончательных хозяев, охарактеризовать их размещение в их организме, их динамику в пространстве и времени, а также конкретные особенности пола и возраста, оказывающие положительное или отрицательное влияние на их численность и развитие.

Был выбран метод секвенирования нового поколения яиц паразитических червей для описания «гельминтобиома» тюленей. С этой целью были выбраны специфические праймеры к разным областям генома паразитических червей класса Trematoda, Cestoda и Nematoda, содержащие NGS-адаптеры и баркоды. Выделение ДНК проводили с помощью специального набора для фекалий: PureLink Microbiome Kit (Invitrogen) из ректального смыва 20 особей каспийского тюленя.

Каспийские тюлени являются дефинитивными хозяевами *Anisakis chupakovi* показатели зараженности которыми имеют важное значение в поддержании эпизоотического очага в Каспийском море.

По результатам исследований 20 проб фекалий тюленей методами Дарлинга и Щербова яиц гельминтов, в том числе гельминта *Anisakis chupakovi* не выявлено. Отсутствие яиц гельминтов в фекалиях тюленей указывает на малую выборку исследуемого материала или отсутствие инвазированных тюленей в период исследований.

4.5.2. Микробиологические исследования

При проведении микробиологических исследований использовались назальные, ректальные и урогенитальные образцы микробиоты. Первичные данные по структуре микробиома слизистых каспийского тюленя были получены в 2019 г., анализ которых показал, что очень ограниченная выборка с разнородной половозрастной структурой недостаточна для полноценной характеристики. Выборка для проведения анализа в 2022 г. была расширена до 20 особей, все из которых являлись взрослыми самками. В 2023 г. из собранного материала отобраны дополнительно 10 проб.

При исследовании назального микробиома было получено 202385 высококачественных прочтений (ридов), для ректального микробиома – 184187 ридов, для урогенитального микробиома – 201831 ридов. Они были кластеризованы и аннотированы в 262 операционные таксономические единицы (ОТЕ).

Для характеристики устойчивости сообщества были рассчитаны следующие параметры альфаразнообразия: индекс Шеннона, индекс Симпсона, индекс Чао.

- Индекс Шеннона характеризует биологическое разнообразие и для сообществ слизистых оболочек обычно колеблется в диапазоне 1,8-4,8;
- Индекс Симпсона характеризует выравненность сообщества: насколько равномерно особи (риды) распределены по видам. У максимально выравненных сообществ индекс Симпсона стремится к единице;
- Индекс Чао отражает количество уникальных операционно-таксономических единиц в микробиоме, включая самые незначительные.

Здоровые устойчивые сообщества обычно имеют высокие индексы Шеннона и Симпсона. Низкий индекс Шеннона говорит об уязвимости сообщества. Низкий индекс Симпсона говорит о текущем дисбиозе и возможных физиологических проблемах.

Референсные данные нормальных физиологических значений параметров альфаразнообразия представлены в Таблице 4.5-4.

Таблица 4.5-4 Показатели альфаразнообразия микробиомов слизистых оболочек каспийской нерпы (Mean $\pm$ SD)

Индексы	Слизистая		
	Назальная	Ректальная	Урогенитальная
Chao1	31,3 $\pm$ 16,4	42,0 $\pm$ 13,8	54,3 $\pm$ 22,5
Shannon	2,19 $\pm$ 0,53	3,48 $\pm$ 0,59	3,74 $\pm$ 0,61
Simpson	0,65 $\pm$ 0,13	0,85 $\pm$ 0,06	0,86 $\pm$ 0,06

4.5.2.1. Назальный микробиом

Микробиом слизистой носа каспийской нерпы характеризуется следующими параметрами альфа-разнообразия:

- Индекс Шеннона составляет 2,19, что свидетельствует о невысоком разнообразии сообщества, но ожидаемом для носовой слизистой;
- Индекс Чао составляет 31,3, что отражает количество уникальных операционно-таксономических единиц в микробиоме;
- Индекс Симпсона составляет 0,66, что указывает на достаточно выравненное распределение частот микроорганизмов в сообществе, без ярко выраженных доминантов.

Однако у особей №1 и №17 было отмечено резко сниженное разнообразие при низкой выравненности.

В таксономическом плане на уровне филумов в назальном микробиоме каспийской нерпы преобладают Bacteroidetes, Actinobacteria и Proteobacteria. Не менее 1% составляют Firmicutes и Epsilonbacteraeota (рисунок 4.5.12).

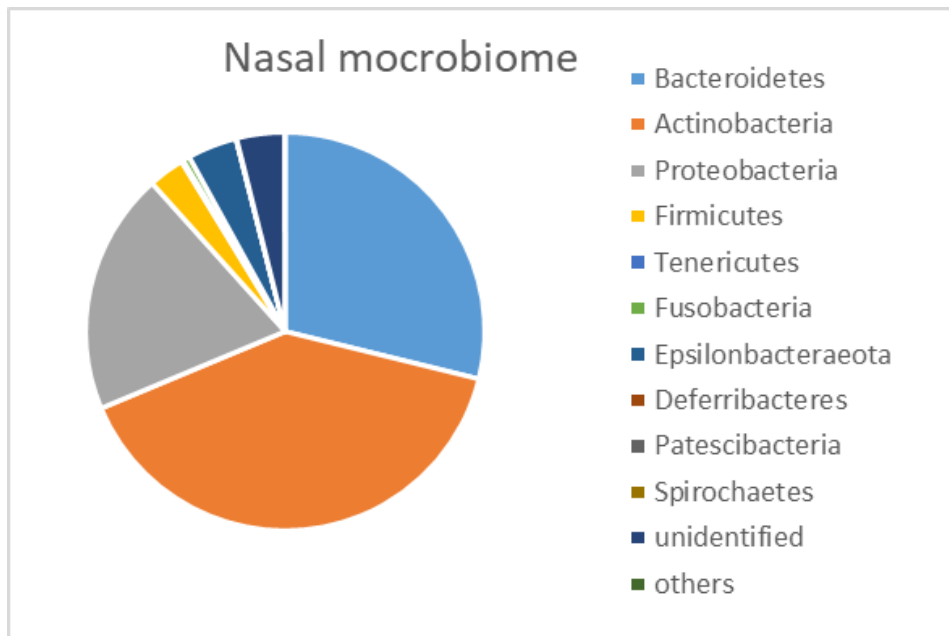


Рисунок 4.5.12 Структура микробиома назальной слизи каспийского тюленя на уровне филумов

Индивидуальная изменчивость на высоком таксономическом уровне проявлялась слабо. Две особи (№1 и №17) были практически лишены Proteobacteria (рисунок 4.5.13). При этом особь №4 содержала нехарактерного доминанта – Epsilonbacteraeota. Обращает на себя внимание появление Fusobacteria у особи №7.

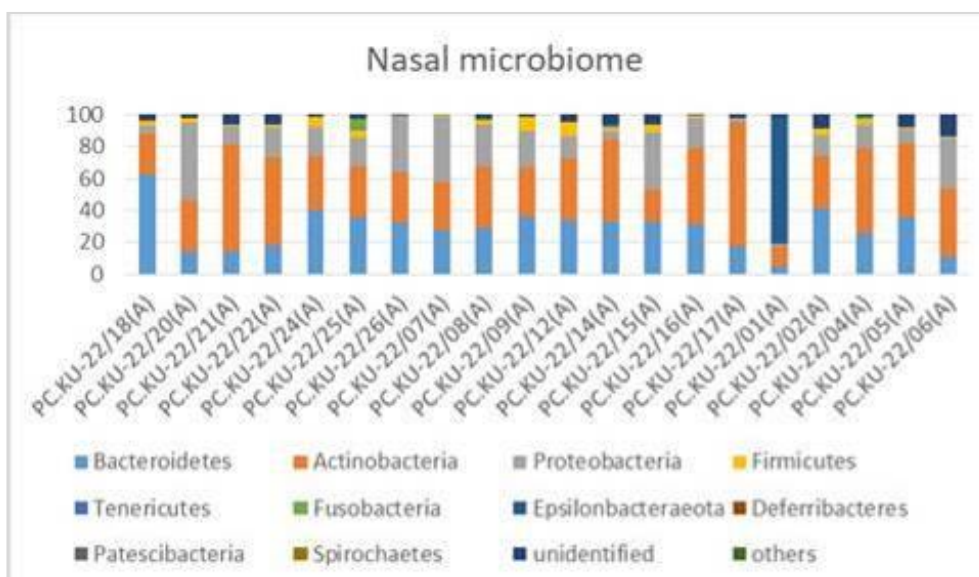


Рисунок 4.5.13 Индивидуальная структура микробиома назальной слизи каспийского тюленя на уровне филумов

Преобладающие семейства назального микробиома приведены на рисунке (рисунок 3.5.14). На этом уровне индивидуальные различия наблюдались более ярко. К консервативным семействам можно отнести только *Flavobacteriaceae* и *Corynebacteriaceae*. Также у всех особей кроме №18 присутствовали представители *Moraxellaceae*. Доли остальных 15 семейств колебались в очень широком диапазоне.

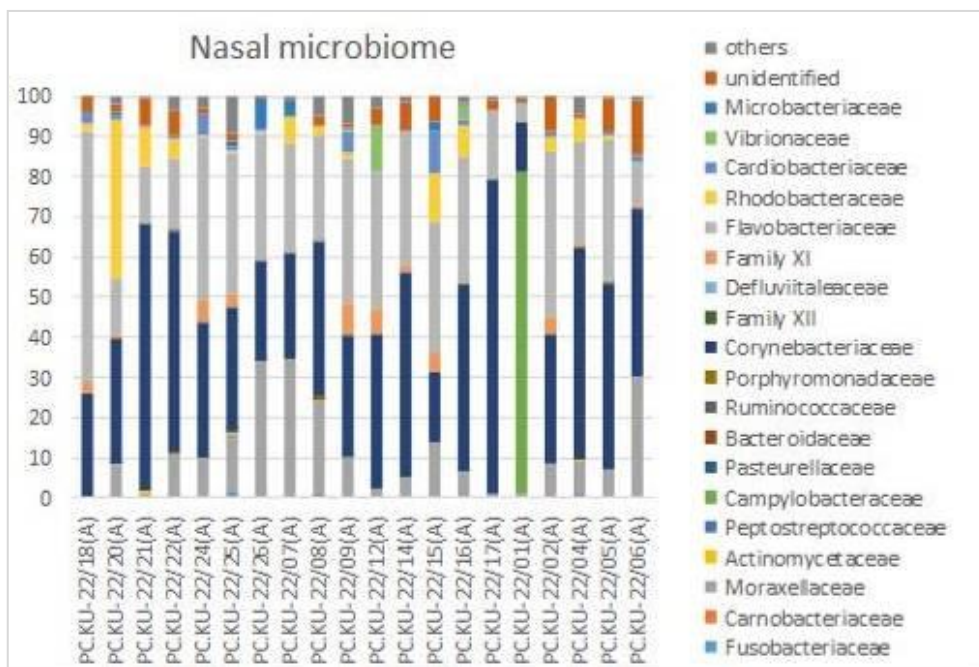


Рисунок 4.5.14 Структура микробиома назальной слизи каспийской нерпы на уровне семейств

В изучаемых микробных сообществах были выделены наиболее характерные микроорганизмы, встречающие более, чем у 80% особей с долей не менее 0,1% – так называемый – core microbiome (рисунок 4.5.15).

Для назальной слизи таковыми являются:

- *Corynebacterium (phocae)*. Аналогичные нуклеотидные последовательности выделялись до этого только у других тюленей: *Arctocephalus gazella* (MH728200.1) и *Phoca vitulina* (NR_026379.1) и более нигде не встречались;
- *Coenonia (anatine)*. Аналогичные последовательности выделялись у *Arctocephalus gazella* (MH728227.1), а также с назальных слизистых уток и гусей, погибших от респираторных инфекций;
- *Arcanobacterium (phocae)*. Аналогичные последовательности выделялись, как у других тюленей, так и у других плотоядных и растительноядных млекопитающих;
- *Moraxella sp.* Неспецифический симбионт слизистых млекопитающих;
- *Psychrobacter sp.* Присутствовал у всех особей в небольшом количестве. Ранее выделялся у *Arctocephalus gazella* (MH728394.1), а также в самых разных других субстратах;
- У пяти особей №№ 12, 18, 23, 24, 25 присутствовал микроорганизм предположительно рода *Thioclava* (сем. *Rhodobacteraceae*). Подобные последовательности со степенью сходства выше 97% ранее не поступали в базы данных.

В целом, для назальной слизи каспийской нерпы порядка 40% микроорганизмов являются уникальными для тюленей, еще порядка 30% ранее выделялись в том числе у тюленей, а также из других локусов. И еще 30% являются неспецифическими микробами.

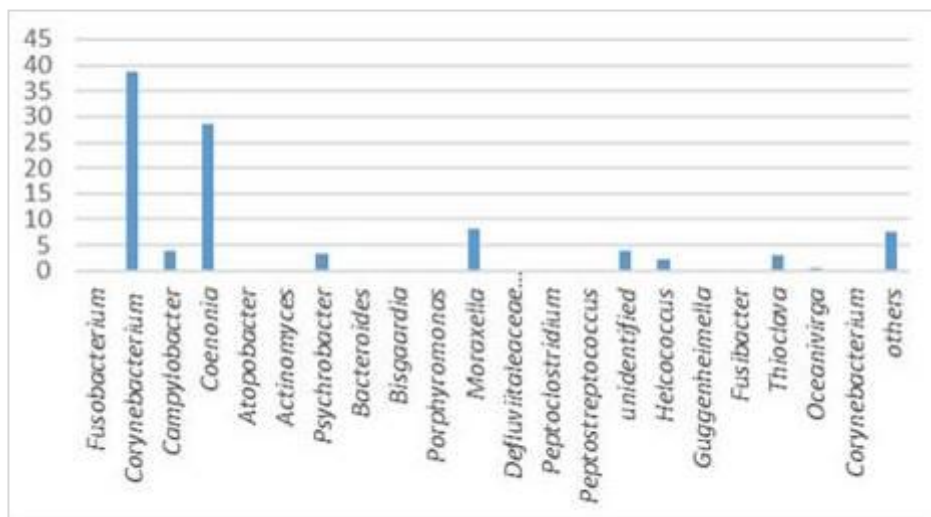


Рисунок 4.5.15 Преобладающие рода микроорганизмов назальной слизистой каспийского тюленя

4.5.2.2. Ректальный микробиом

Заднекишечный микробиом характеризуется следующими параметрами альфа-разнообразия:

- индекс Шеннона составляет 3,45,
- индекс Чао составляет 40,7,
- индекс Симпсона – 0,85.

Сниженные величины разнообразия (при умеренной выравненности) наблюдалось у особей №2 и №12. Доминирующими филумами являются: Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Epsilonbacteraeota. Также присутствует небольшое количество представителей Patescibacteria и Spirochaetes (рисунок 4.5.16).

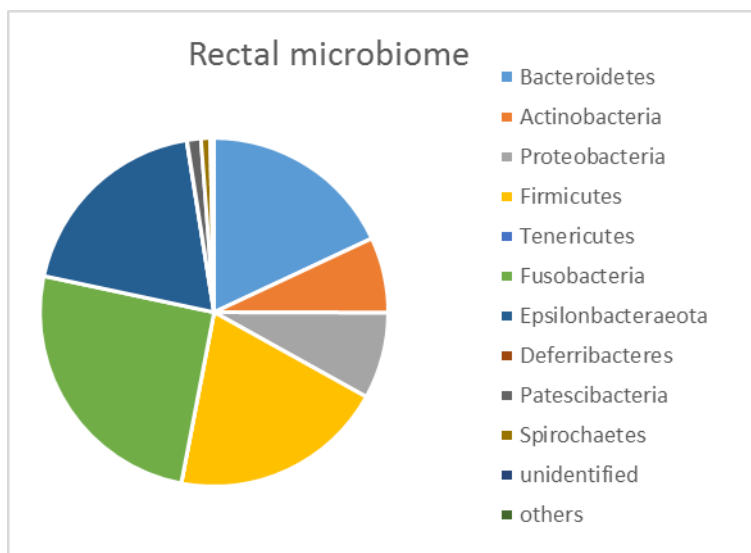


Рисунок 4.5.16 Структура микробиома ректальной слизистой каспийской нерпы на уровне филумов

Высококонсервативными филумами оказались: Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Epsilonbacteraeota, Actinobacteria, Proteobacteria (рисунок 4.5.17). Spirochaetes присутствовали только у особей №№ 22, 8, 15; Patescibacteria – у №15 и №16.

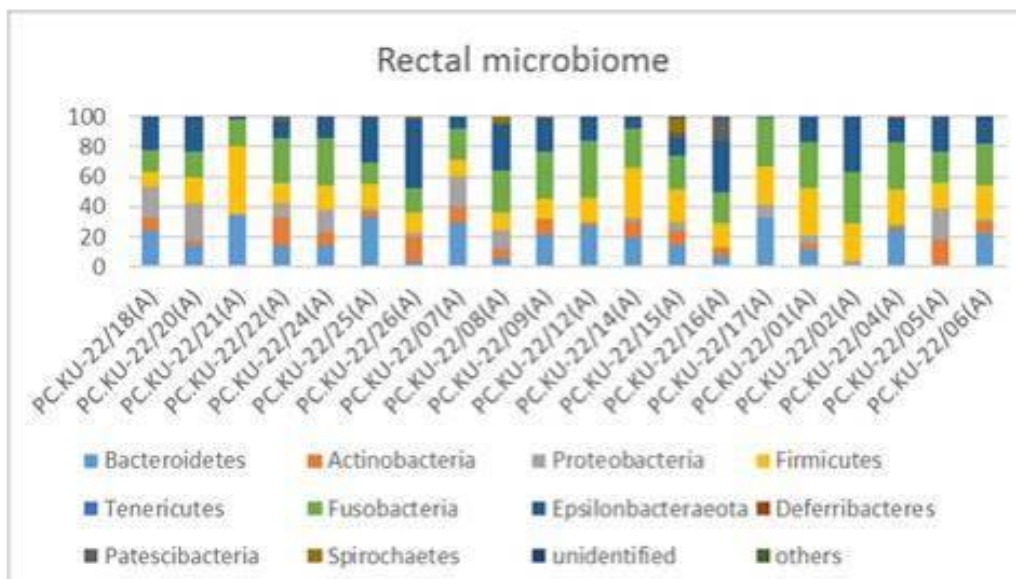


Рисунок 4.5.17 Индивидуальная структура микробиома ректальной слизи каспийского тюленя на уровне филумов

Во всех особях присутствовали представители Fusobacteriaceae и Campylobacteriaceae. В большинстве особей: Actinomycetaceae, Peptostreptococcaceae, Pasteurellaceae, Clostridiales fam. XII, Defluviitaleaceae (рисунок 4.5.18).

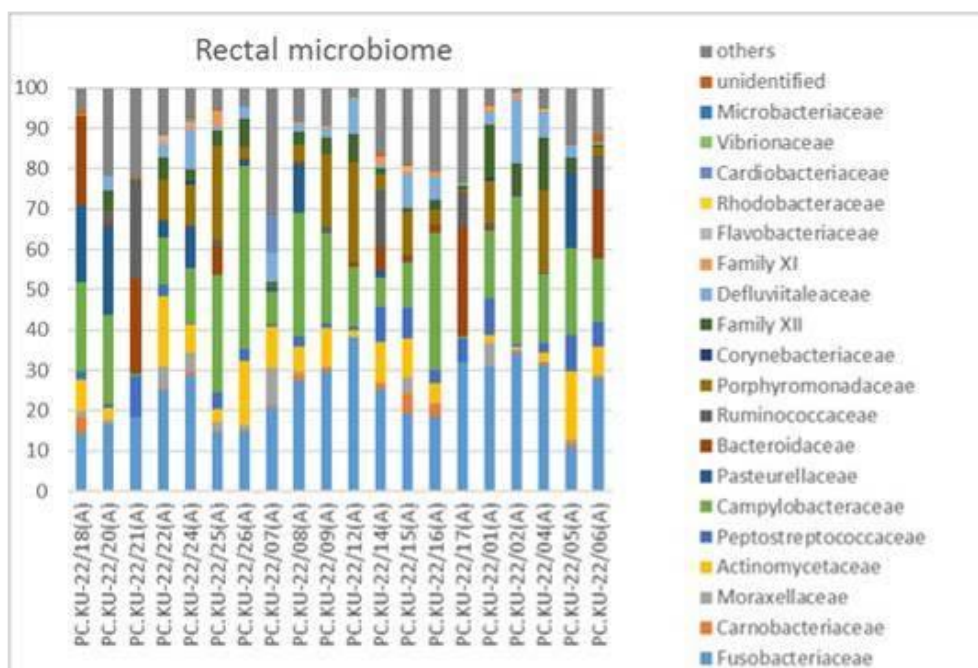


Рисунок 4.5.18 Индивидуальная структура микробиома ректальной слизи каспийского тюленя на уровне семейств

Для ректальной слизи характерными бактериями являются:

- *Fusobacterium* sp. Аналогичные последовательности выделялись до этого у *Zalophus californianus* (JQ204533.1), *Arctocephalus gazelle* (MH728206.1), *Tursiops truncatus* (JQ210313.1), а также других животных;

- *Campylobacter* sp. Аналогичные последовательности выделялись до этого только у тюленей *Phoca vitulina* (CP053841.1), *Zalophus californianus* (JQ207528.1), *Leptonychotes weddellii* (KM100397.1);
- *Porphyromonas* sp. Аналогичные последовательности выделялись до этого только у тюленей *Zalophus californianus* (JQ205526.1) и *Arctocephalus gazella* (MH728397.1);
- *Actinomyces* (*marimammalium*). Аналогичные последовательности выделялись, как у других тюленей, так и у других плотоядных и растительноядных млекопитающих;
- *Guggenheimella* sp. Аналогичные последовательности выделялись до этого только у *Tursiops truncatus* (JQ208973.1);
- *Psychrobacter* sp. Присутствовал у всех особей в небольшом количестве. Ранее выделялся у *Arctocephalus gazella* (MH728394.1), а также в самых разных других субстратах.

Отметим, что *Arcanobacterium*, не показанный на диаграмме, поскольку он не вошел в список типичных родов, у трех особей встречается с очень большой долей (более 20%).

Также не вошел в список типичных, но доминировавший у некоторых особей род *Bergeyella*. Его последовательность ранее встречалась только у морских млекопитающих, в том числе *Neomonachus schauinslandi* (GU196264).

В целом, для ректальной слизистой каспийской нерпы порядка 50% микроорганизмов являются уникальными для тюленей, еще порядка 50% ранее выделялись, в том числе у тюленей, а также из других локусов. Эврибионтные микроорганизмы на ректальной слизистой встречаются только в исключительных случаях.

4.5.2.3. Урогенитальный микробиом

Микробиом урогенитальной слизистой характеризуется следующими параметрами альфа-разнообразия:

- индекс Шеннона: 3,74;
- индекс Чао: 54,2;
- индекс Симпсона – 0,86.

Выраженное снижение разнообразия и резкое снижение выравненности наблюдается у особи №8. Микробиом имеет высокое сходство с ректальным микробиомом и включает: Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Epsilonbacteraeota (рисунк 4.5.19).

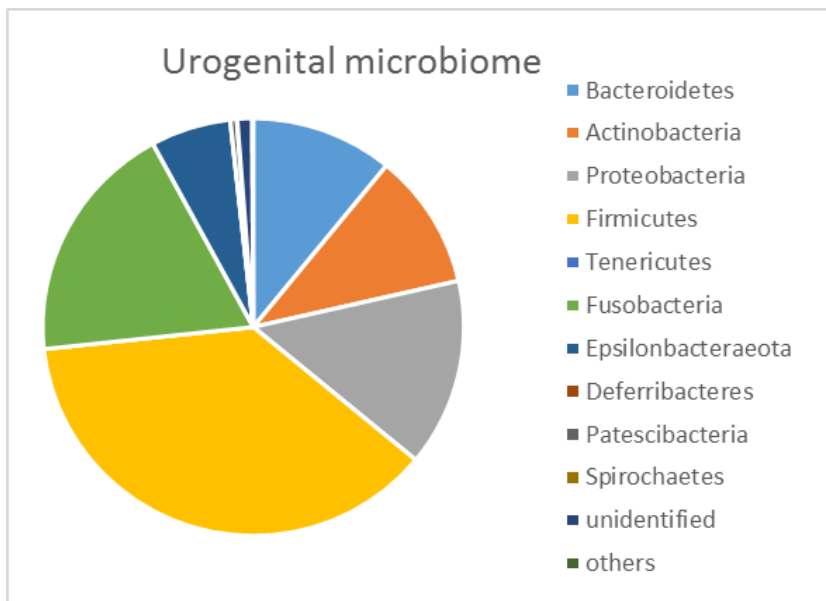


Рисунок 4.5.19 Структура микробиома урогенитальной слизистой каспийского тюленя на уровне филумов

На индивидуальном уровне у двух особей отсутствовали Bacteroidetes (№5 и №21), у одной (№21) отсутствовали одновременно и Bacteroidetes и Proteobacteria, у №25 – отсутствовали только Proteobacteria (**Ошибка! Источник ссылки не найден.** 4.5.20). Интересно, что в ректальном микробиоме у особи №21 также отсутствуют Bacteroidetes, а у особи №5 – Proteobacteria. Также, как и в ректальном микробиоме у особи №15 присутствовали Spirochaetes, а у №16 - Patescibacteria.

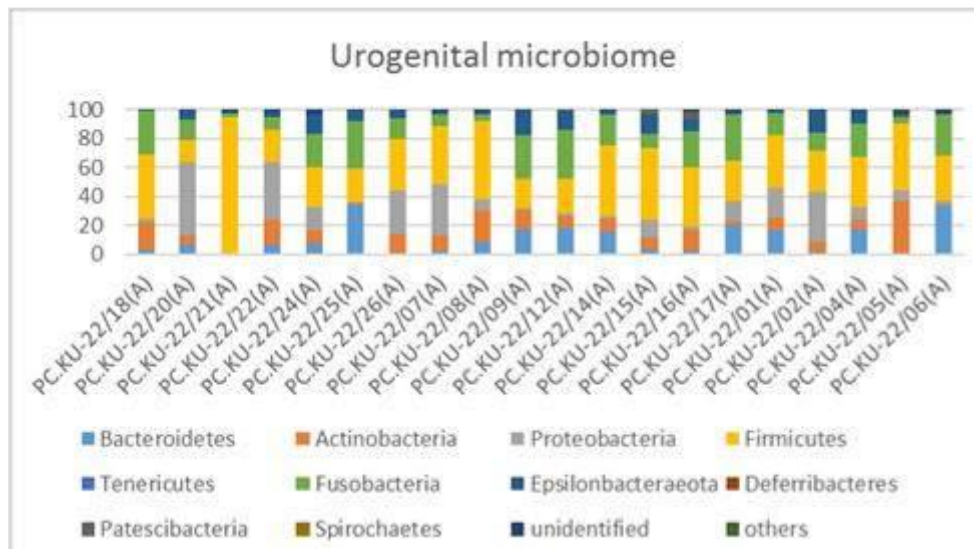


Рисунок 4.5.20 Индивидуальная структура микробиома урогенитальной слизистой каспийского тюленя на уровне филумов

Несмотря на отсутствие заметных межиндивидуальных различий на уровне филумов, на уровне семейств наблюдалась большая разнородность (рисунок 4.5.21). Единственное семейство, представители которого доминировали у всех особей было Fusobacteriaceae, у всех кроме №6 – Carnobacteriaceae. У всех, кроме №18 – Campylobacteriaceae.

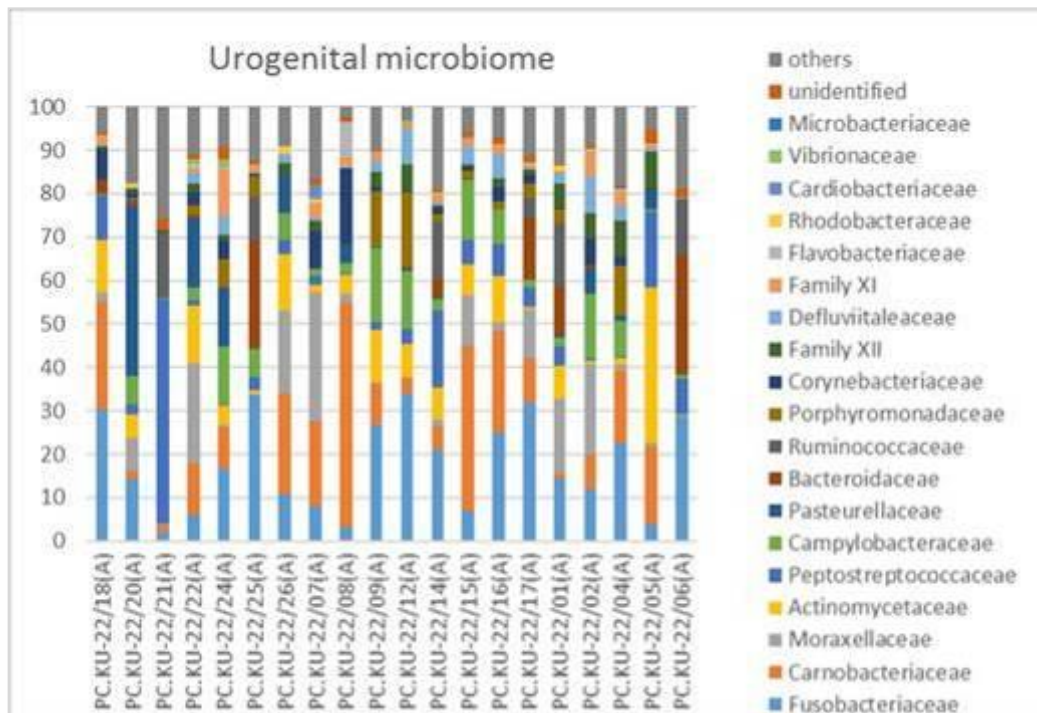


Рисунок 4.5.21 Индивидуальная структура микробиома урогенитальной слизистой каспийского тюленя на уровне семейств

Для урогенитальной слизи были характерны почти все микробы, характерные для ректальной слизи (рисунок 4.5.22): *Fusobacterium* sp., *Campylobacter* sp., *Actinomyces* (*marimammalium*), *Porphyromonas* sp., *Psychrobacter* sp., а также дополнительно:

- *Atopobacter* (*phocae*). Аналогичные последовательности выделялись до этого у *Phoca vitulina* (NR_119263.1), *Leptonychotes weddellii* (KM100404.1), *Arctocephalus gazella* (MH728078.1), а также из других субстратов;
- *Lachnospiraceae* sp. Аналогичные последовательности выделялись до этого у *Arctocephalus gazella* (MH728193.1), а также других животных;
- *Bisgaardia* (*hudsonensis*/ *miroungae*). Уникальная ситуация, когда нуклеотидная последовательность выделялась у большинства изученных тюленей: *Pusa hispida* (CP016605.1), *Phoca vitulina* (HM626620.1, NR_117488.1), *Mirounga angustirostris* (KF871287.1), *Arctocephalus gazella* (MH728268.1), *Zalophus californianus* (JQ204979.1) и более не встречалась ни где.

Интересно, что *Corynebacterium* (*caspium*), ранее описанный именно для каспийской нерпы, встречался только у 80% исследованных особей. Причем аналогичная последовательность не встречалась у других тюленей, зато обнаруживалась у человека и грызунов.

Также у трех особей (№8, 15, 22) и в ректальном и урогенитальном микробиомах присутствуют представитель рода *Трепонета*, имеющий отдаленное сходство со штаммом, выделенным от *Zalophus californianus* (JQ205096.1, 97,2% сходства). Подобная последовательность никогда больше не встречалась в международных базах данных.

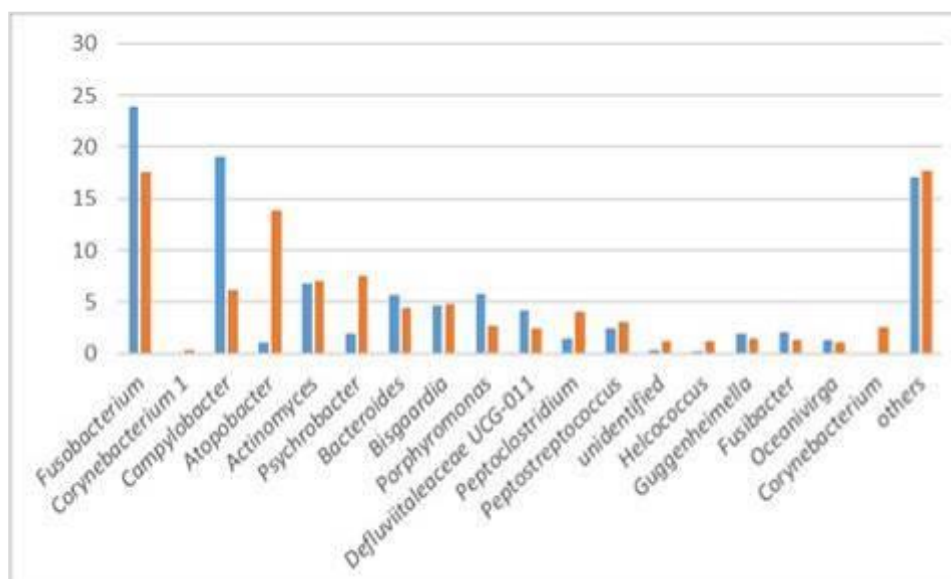


Рисунок 4.5.22 Преобладающие рода микроорганизмов ректальной (синий) и урогенитальной (оранжевый) слизистых каспийского тюленя

4.5.2.4. Функциональные возможности микробиома каспийского тюленя

Путем биоинформатического анализа 16SpPHK-структуры микробиома с помощью алгоритма PICRUST на основе базы данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) были получены данные о ферментативных возможностях сообщества. Несмотря на то, что это косвенные данные, точность используемой модели оценивается как высокая (Langille et al., 2013). Так, было показано, что сообщества всех трех слизистых обладают близкими возможностями по метаболизму аминокислот, углеводов и липидов (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). При этом ректальный и вагинальный микробиомы достоверно не отличались по представленности ферментов, а вот назальный микробиом значительно превосходил ректальный и вагинальный по представленности ферментов жирнокислотного (тест Манна-Уитни, $p = 0,0000001$) и аминокислотного (тест Манна-Уитни, $p = 0,000001$) обмена. На основе метода главных компонент (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**) по совокупности функциональных возможностей ректальный и вагинальный микробиомы занимали близкое

положение (PERMANOVA, $p > 0,05$). А назальный достоверно отличался (PERMANOVA, $p = 0,0012$).

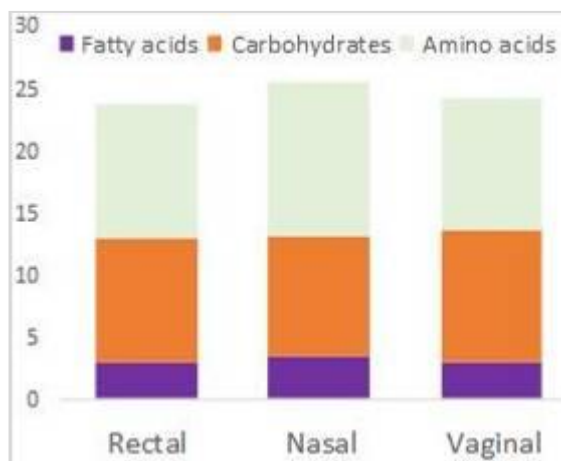


Рисунок 4.5.23 Представленность ферментов катаболизма жирных кислот, углеводов и аминокислот на ректальной, назальной и вагинальной слизистой каспийской нерпы по данным PICRUST-анализа

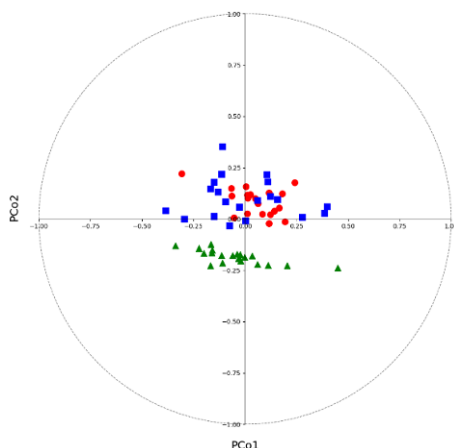


Рисунок 4.5.24 Демонстрация сходства функциональных возможностей ректального микробиома (красные маркера), вагинального микробиома (синие маркера) и назального микробиома (зеленые маркера) методом главных компонент

Несмотря на количественное сходство представленности ферментов углеводного обмена, между микробиомами разных слизистых наблюдались принципиальные функциональные отличия. Если сгруппировать ферменты по метаболическим путям, то наблюдается, что ректальный и вагинальный микробиомы формируют единый паттерн, а назальный резко отличается от них.

В назальном микробиоме выше представленность ферментов окислительного пути деградации углеводов и жиров. А для ректального и вагинального микробиомов более характерна анаэробная деградация углеводов, слабая вовлеченность жиров, более интенсивная фиксация углекислоты и неоглюкогенеза. Так, в назальном микробиоме сильнее представлены ферменты, участвующие в кислородном катаболизме углеводов: pyruvate dehydrogenase [EC:2.3.1.12] в два раза, D-lactate dehydrogenase (cytochrome) [EC:1.1.2.4] в 3 раза. Также, в назальном микробиоме была более чем в три раза выше активность ферментов циклов цитрата: 2-oxoglutarate dehydrogenase [EC:1.2.4.2], isocitrate lyase [EC:4.1.3.1], 2-oxoglutarate dehydrogenase [EC:2.3.1.61], succinyl-CoA:acetate CoA-transferase [EC:2.8.3.18], succinate dehydrogenase / fumarate reductase [EC:1.3.5.1 1.3.5.4] и цикла метилцитрата: methylisocitrate lyase [EC:4.1.3.30], 2-methylcitrate synthase [EC:2.3.3.5], 2-methylcitrate dehydratase [EC:4.2.1.79]. Аналогично, в назальном микробиоме была выше представленность ферментов, участвующих в окислительном метаболизме жиров. Так, представленность 2-methylnaconitate isomerase

(деградация жиров) и 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.35] была выше 10 раз, и представленность pyruvate dehydrogenase (quinone) [EC:1.2.5.1], acetoacetyl-CoA reductase [EC:1.1.1.36] была выше в 3 раза.

Ферменты бескислородного катаболизма, напротив сильнее представлены в ректальном и вагинальном микробиомах: 6-phospho-beta-glucosidase [EC:3.2.1.86] - в 10 раз, 4-alpha-glucanotransferase [EC:2.4.1.25] в два раза, pyruvate, orthophosphate dikinase [EC:2.7.9.1] в 10 раз, 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase [EC:5.4.2.12] более чем в 2 меньше. В том числе особенно хорошо представлены ферменты пентозофосфатного пути – одного из вариантов бескислородного метаболизма гексоз: 2-dehydro-3-deoxygluconokinase [EC:2.7.1.45] в 2,5 раза, xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolase [EC:4.1.2.9 4.1.2.22] в 10 раз, diphosphate-dependent phosphofructokinase [EC:2.7.1.90] в 20 раз. Также в ректальном и вагинальном микробиоме сильнее представлены ферменты, отвечающие за последующие этапы анаэробного метаболизма, в том числе брожение: butanol dehydrogenase [EC:1.1.1.-] меньше в 2 раза, formate C-acetyltransferase [EC:2.3.1.54] более чем в 3 раза. Кроме того, для них характерна существенно более активная фиксация углекислоты: phosphoenolpyruvate carboxylase [EC:4.1.1.31] в 5 раз, fumarate hydratase subunit alpha [EC:4.2.1.2] и pyruvate carboxylase subunit B [EC:6.4.1.1], 2-oxoglutarate/2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase subunit alpha [EC:1.2.7.3 1.2.7.11] в 10 раз. На порядки сильнее (в 100 раз) происходит неоглюкогенез: fructose-1,6-bisphosphatase III [EC:3.1.3.11].

При сравнении функциональных ферментативных паттернов (рисунок 4.5.25) оказалось, что инфекционные возможности назального микробиома уступают ректальному и вагинальному (тест Манна-Уитни, $p = 0,000009$). Наличие инфекционных возможностей указывает на то, что часть микробиома является факультативными патогенами. То есть при снижении сопротивляемости организма (голодание, стресс, травмы) нормальный микробиом может запустить патологический процесс. Для этого не потребуется специализированного внешнего патогена. Но назальная слизистая в этом отношении более безопасна.

При этом такой важный для инфекционного процесса показатель, как способность к формированию биопленок, напротив, был выше именно в назальном сообществе (тест Манна-Уитни, $p = 0,000007$). Это означает, что при возникновении инфекционного процесса, назальные патогены смогут дольше сопротивляться секретируемым антителам и другим факторам иммунитета. А также более успешно смогут сопротивляться антибиотикотерапии. Ожидаемая антибиотикорезистентность была сопоставима для всех трех слизистых, однако для ректальной была несколько меньше (тест Манна-Уитни, $p = 0,001413$). Наличие невысокой антибиотикорезистентности, не зависящей от локализации слизистой является типовым вариантом. Это благоприятный показатель, указывающий, что животные не испытывают влияние сельскохозяйственных сливов, которые обычно богаты ванкомицином.

Обращает на себя внимание также развитая система защита от ксенобиотиков ароматического ряда для всех слизистых. Эта способность была выше для сообщества носа (тест Манна-Уитни, $p = 0,0000001$). Это косвенно указывает на наличие в воде антропогенных загрязнителей ароматического ряда, на которые реагируют в первую очередь назальная микробиома. Вероятно, до попадания на ректальную и вагинальную слизистую ксенобиотики метаболизируются организмом-хозяином. Важным отличием именно ректального микробиома от остальных является достоверно большие возможности по рециклизации азота благодаря уреазной активности (тест Манна-Уитни, $p = 0,002$). Эта способность микробиома оказывает один из самых сильных физиологических эффектов на метаболизм травоядных животных. Благодаря этой способности микробиома травоядные могут питаться бедной азотом пищей. Наличие этого пути у микробиома нерпы (плотоядного животного, не нуждающегося в рециклизации) говорит о том, что не все способности микробиома следует обязательно считать приспособительными для хозяина.

Интересно, что возможности синтеза витаминов были максимальны для назального микробиома, а не ректального (тест Манна-Уитни, $p = 0,00007$). Что также показывает, что данное свойство микробиома не является важным для нерпы. Хотя для ряда животных указано, что микробиом является одним из ключевых источников витамином.

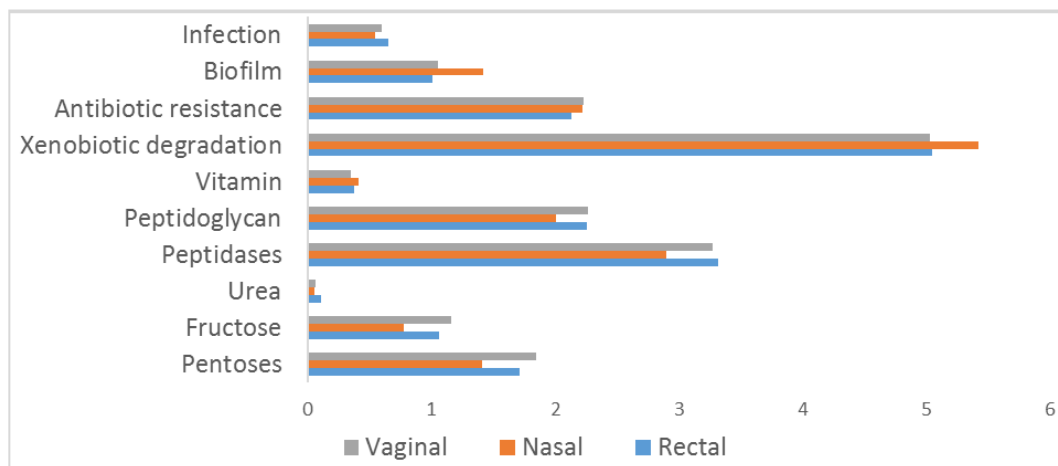


Рисунок 4.5.25 Сравнение функциональных возможностей микробиомов ректальной, назальной и вагинальной слизистых каспийской нерпы по данным KEGG-анализа

Во всех трех микробиомах в существенных количествах отсутствовали гидролазы, позволяющие расщеплять растительную и животную клетчатку: целюлазы, целлобиозогидролазы, лакказы, пектиназы, хитиназы. Исключение: петидазы, присутствовавшие в микробиомах всех слизистых, имевших максимальную представленность на вагинальной слизи и минимальную – на назальной (тест Манна-Уитни, $p = 0,00000013$). Это означает, что микробиом нерпы не участвует в переваривании сложной пищи: водорослей, хитиновых панцирей.

4.5.3. Токсикологические исследования

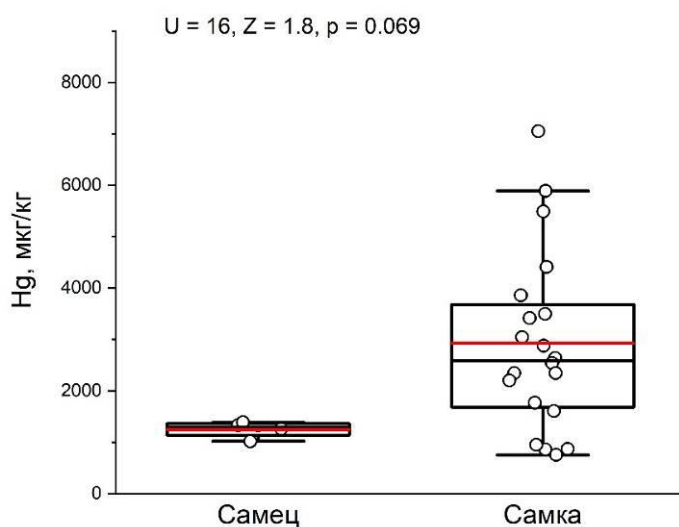
4.5.3.1. Содержание ртути в шерсти

Среднее содержание ртути в шерсти каспийских тюленей, отловленных осенью 2023 года, составило 2643 ± 1708 мкг/кг ($n = 24$), минимальная концентрация – 754 мкг/кг, максимальная – 7052 мкг/кг. Частотное распределение концентраций ртути в исследуемой выборке представлено в таблице 4.5-5.

Таблица 4.5-5 Частотное распределение концентраций ртути в шерсти исследованных особей каспийского тюленя

Нг в шерсти, мкг/кг	Частота встречаемости, число особей	Кумулятивная частота встречаемости, число особей	Процент от общего числа	Кумулятивный процент
0–1000	4	4	17	17
1000–2000	6	10	25	42
2000–3000	6	16	25	67
3000–4000	4	20	17	84
4000–5000	1	21	4	88
5000–6000	2	23	8	96
6000–7000	0	23	0	95.8
7000–8000	1	24	4	100

Средняя концентрация ртути в шерсти самок и самцов составила 2921 ± 1742 ($n = 20$) и 1250 ± 163 ($n=4$) (рисунок 4.5.26). Несмотря на разницу в средних величинах статистически значимые отличия содержания Нг в шерсти между тюленями разного пола не установлены ($M-W: U = 16$, $Z = 1.8$, $p = 0.069$).



Черной горизонтальной полосой отмечена медиана, красной – среднее значение

Рисунок 4.5.26 Содержание ртути в шерсти самцов и самок исследованных особей каспийского тюленя

Содержание ртути в шерсти в исследуемой выборке положительно коррелировало с возрастом, массой и длиной тела – $R_S = 0.74, 0.74$ и 0.78 , соответственно ($p < 0.05$) (рисунки 4.5.27-4.5.28).

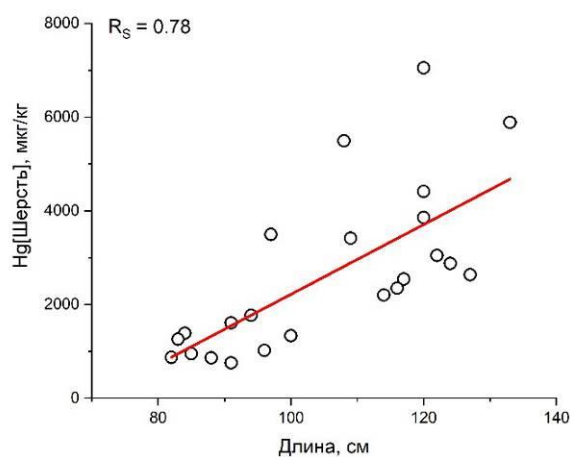


Рисунок 4.5.27 Связь концентраций ртути в шерсти с длиной тела каспийского тюленя

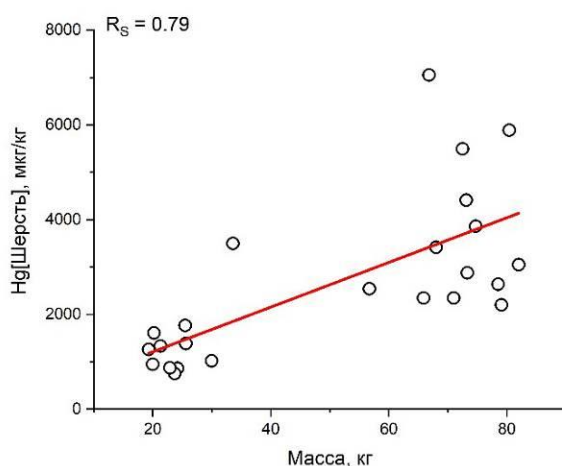


Рисунок 4.5.28 Связь концентраций ртути в шерсти с массой тела каспийского тюленя

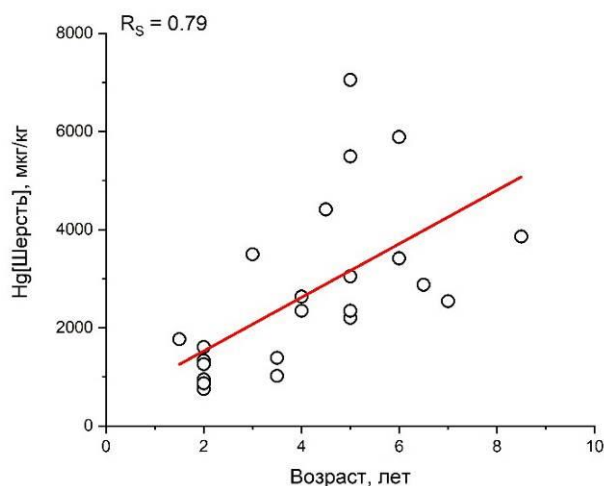


Рисунок 4.5.29 Связь концентраций ртути в шерсти с возрастом каспийского тюленя

4.5.3.2. Содержание ртути в вибриссах

Среднее содержание ртути в вибриссах нерп составляет 3394 ± 1129 мкг/кг, с минимальной и максимальной концентрацией 1734 и 5908 мкг/кг, соответственно. Наиболее часто встречаются концентрации ртути в диапазоне 2000–4000 мкг/кг – у 16 особей (66% от общего числа особей) (таблица 4.5-6).

Таблица 4.5-6 Частотное распределение концентраций ртути в вибриссах исследованных особей каспийского тюленя

Нг в шерсти, мкг/кг	Частота встречаемости, число особей	Кумулятивная частота встречаемости, число особей	Процент от общего числа	Кумулятивный процент
0–1000	0	0	0	0
1000–2000	2	2	8	8
2000–3000	7	9	29	37
3000–4000	9	18	37	74
4000–5000	2	20	8	82
5000–6000	4	24	17	100

Средняя концентрация ртути в вибриссах самок и самцов составила 3550 ± 1157 ($n = 20$) и 2614 ± 573 ($n=4$) соответственно. Как и для шерсти, статистически значимых отличий концентраций ртути в вибриссах между тюленями разного пола не установлено (M-W: $U = 20$, $Z = 1.5$, $p = 0.135$) (рисунок 4.5.30).

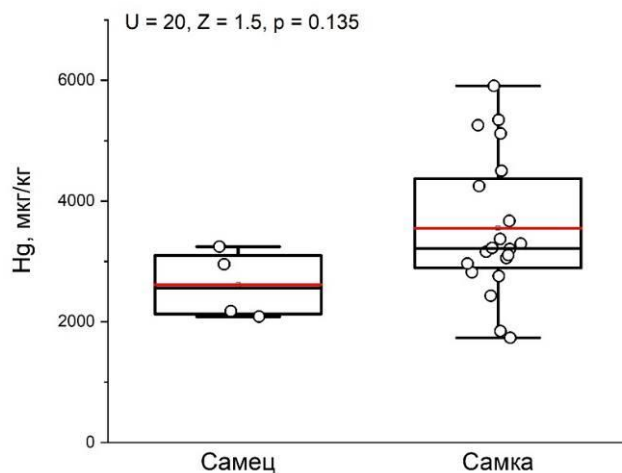


Рисунок 4.5.30 Сравнительное содержание ртути в вибриссах у самцов и самок каспийского тюленя

Содержание ртути в вибриссах статистически значимо выше, чем в шерсти (M-W: $U = 180$, $Z = 2.2$, $p = 0.026$) (рисунок 4.5.31).

Содержание ртути в вибриссах тюленей сильно положительно коррелирует с содержанием ртути в шерсти ($R=0.75$, $p < 0.05$) (рисунок 4.5.32).

Корреляция концентраций ртути в вибриссах с возрастом, массой и длиной тела так же положительная – $RS = 0.44$, 0.49 и 0.52 , соответственно ($p < 0.05$) (рисунок 4.5.33).

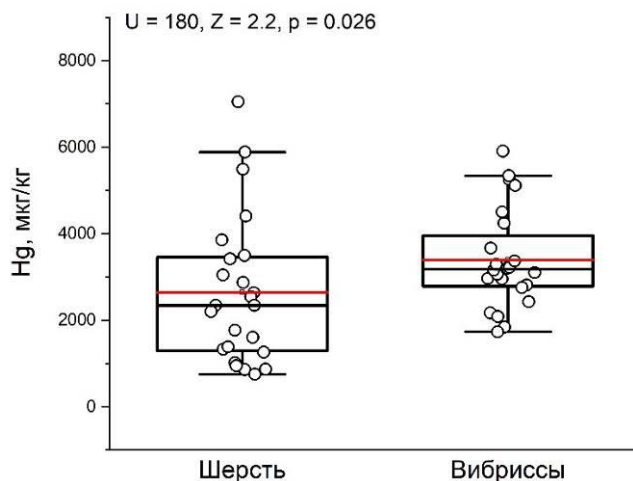


Рисунок 4.5.31 Сравнительное содержание ртути в шерсти и вибриссах каспийского тюленя

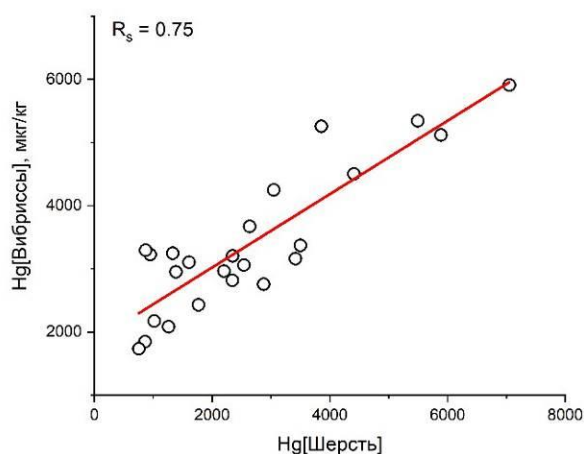


Рисунок 4.5.32 Связь концентраций ртути в вибриссах и шерсти каспийского тюленя

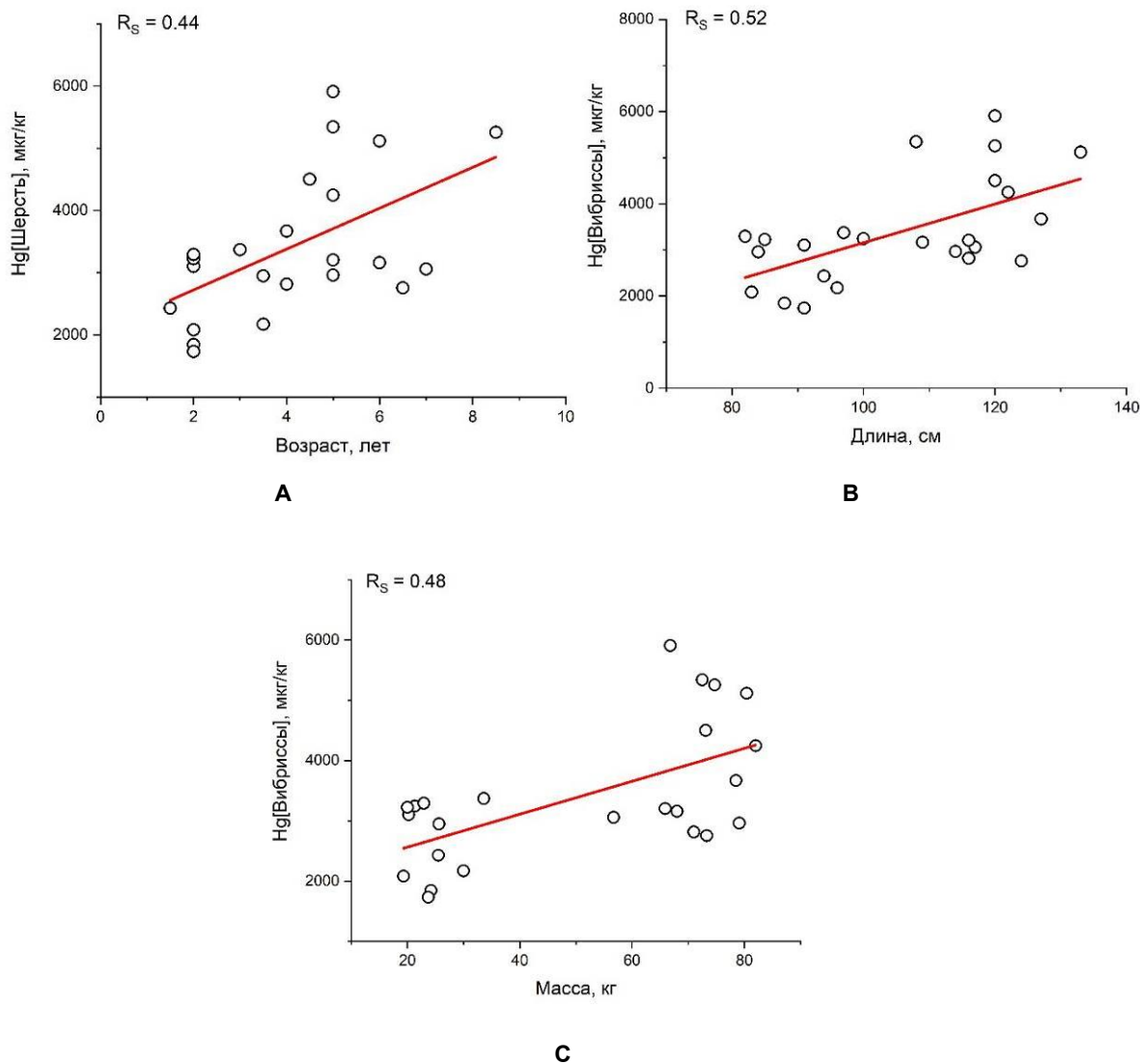


Рисунок 4.5.33 Содержание ртути в вибриссах исследованных особей каспийского тюленя в зависимости от возраста (А), длины (В) и массы (С) тела

4.5.3.3. Содержание ртути в крови

Средняя концентрация ртути в крови каспийского тюленя составила 106 ± 34 мкг/л и варьировала от 54 до 184 мкг/л. Частотное распределение концентраций ртути в крови приведено в таблице 4.5-7.

Таблица 4.5-7 Частотное распределение концентраций ртути в крови исследованных особей каспийского тюленя

Нг в шерсти, мкг/л	Частота встречаемости, число особей	Кумулятивная частота встречаемости, число особей	Процент от общего числа	Кумулятивный процент
0–50	0	0	0	0
50–100	9	9	39	39
100–150	12	21	52	91
150–200	2	23	9	100

Достоверных отличий по концентрации ртути в крови между самцами и самками не выявлено (M-W: $U = 24$, $Z = 1.1$, $p = 0.286$). Концентрация ртути в крови положительно коррелирует только с содержанием ртути в вибриссах ($R_s = 0.42$, $p < 0.05$) (рисунок 4.5.34).

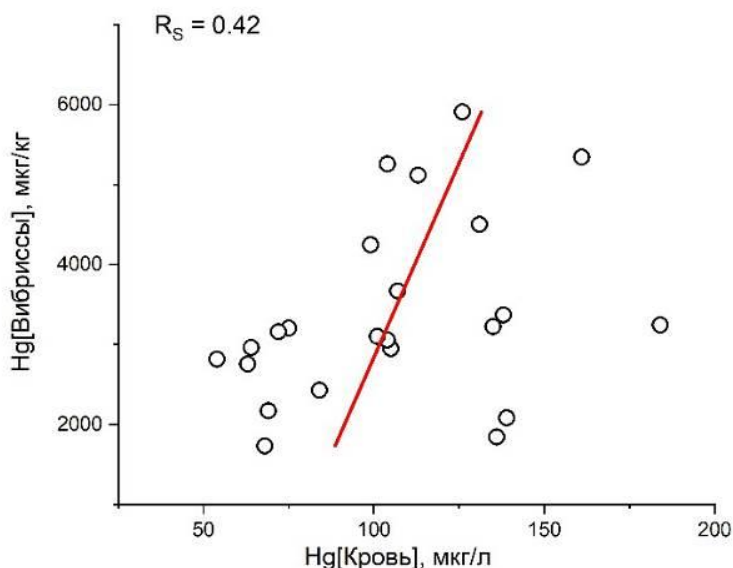


Рисунок 4.5.34 Связь концентраций ртути в крови и в вибриссах каспийского тюленя

Статистически значимых корреляций концентрации ртути в крови с ее концентрацией в шерсти, возрастом, длиной тела и массой тела тюленей не установлено (рисунок 4.5.35).

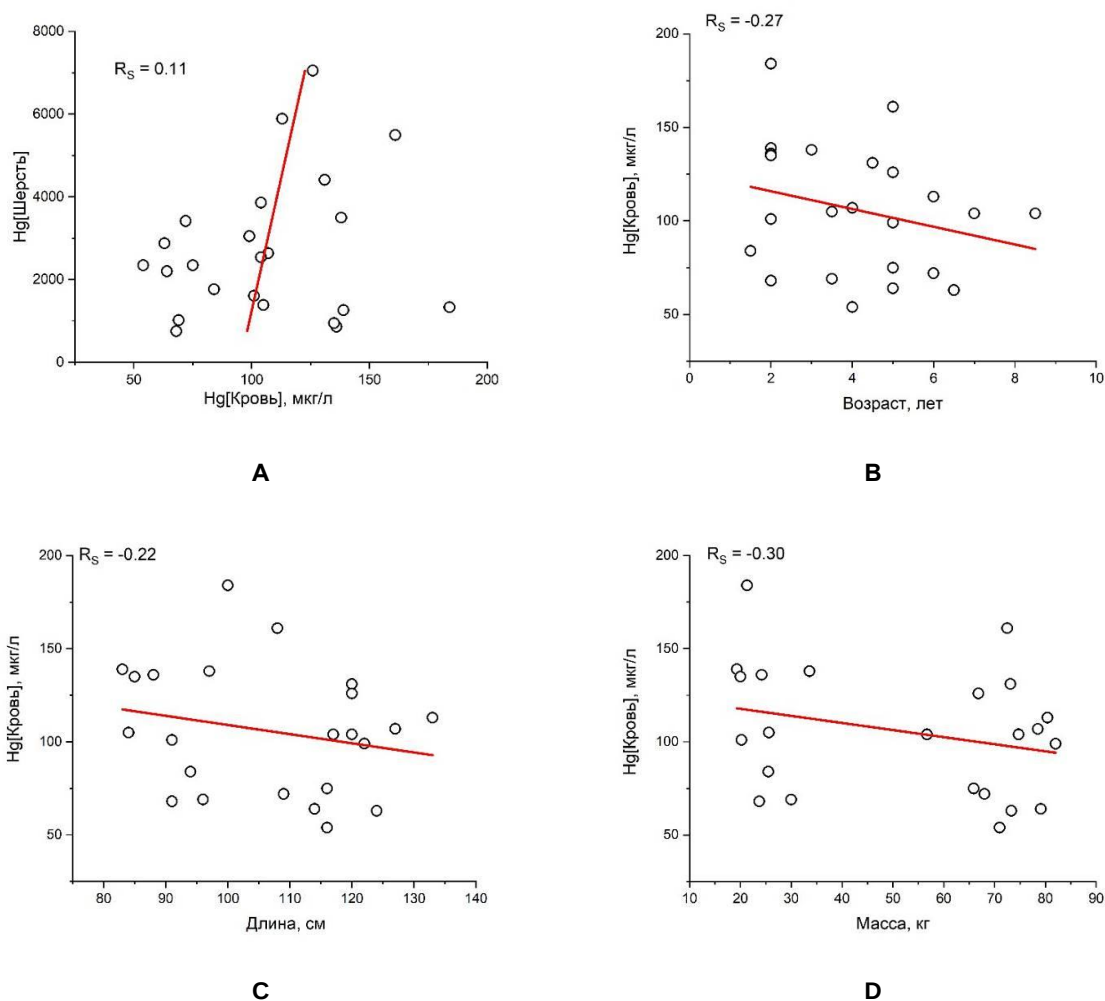


Рисунок 4.5.35 Содержание ртути в крови каспийского тюленя в зависимости от содержания ртути в шерсти (А), возраста (В), длины тела (С) и массы тела (Д) животного

4.5.4. Гормональные исследования

4.5.4.1. Гормоны в крови

В ходе полевых работ были собраны пробы крови с 20 особей каспийского тюленя. В сыворотке крови этих животных был проведен анализ концентраций трех основных стероидных гормонов (прогестерона, тестостерона и кортизола). Результаты измерений приведены в таблице 4.5-8.

Таблица 4.5-8 Концентрация гормонов в плазме крови каспийского тюленя

Номер зверя	Пол	Возраст, лет	Кортизол, нг/мл	Тестостерон, нг/мл	Прогестерон, нг/мл
PC23-01	самка	4	326,25	0,24	153,50
PC23-02	самка	4	1806,50	NA*	21,26
PC23-03	самка	5	348,75	2,37	58,95
PC23-04	самка	8	440,75	5,21	283,50
PC23-05	самка	6	454,00	3,21	55,44
PC23-06	самка	4	408,00	0,76	140,90
PC23-07	самка	5	357,20	4,32	126,60
PC23-08	самка	5	278,95	3,75	170,40
PC23-09	самка	7	320,80	0,12	18,56
PC23-10	самка	5	275,65	1,64	78,75
PC23-11	самка	6	399,35	3,35	105,20

Номер зверя	Пол	Возраст, лет	Кортизол, нг/мл	Тестостерон, нг/мл	Прогестерон, нг/мл
PC23-12	самка	5	480,90	7,57	47,51
PC23-13	самка	6	309,60	5,58	287,50
PC23-14	самка	2	354,65	0,16	82,66
PC23-15	самец	2	560,50	0,07	125,40
PC23-16	самка	2	395,45	0,19	137,60
PC23-17	самка	2	397,85	0,03	84,19
PC23-18	самец	3	380,45	0,36	72,48
PC23-19	самка	2	307,70	0,25	66,07
PC23-20	самка	3	165,15	0,15	6,95
Среднее±se			439,16±62,47	1,75±0,46	95,14±15,17

*NA – значение ниже чувствительности прибора и реагентов

Кортизол

Концентрация кортизола в крови каспийских нерп варьировала от 165,15 до 1806,5 нг/мл (среднее±se: 439,16±62,47 нг/мл). Половые различия в концентрации кортизола в крови при сравнении молодых самцов (n=2) и самок (n=5) каспийских нерп не выявлены (W=9, p=0,41, тест Манна-Уитни). Возрастные различия между взрослыми (n=13) и молодыми самками (n=5) в концентрации кортизола в крови не обнаружены (W=50, p=0,76, тест Манна-Уитни).

Среди особей выборки 2023 года была выявлена особь с крайне высоким уровнем кортизола в крови - 1806,5 нг/мл (PC23-02). Визуально у особи не выявлено проблем со здоровьем. По данным серологического анализа данная особь имеет антитела к 4 из 8 проанализированных заболеваний (см. раздел 4.5.5). Однако у других особей, у которых выявлены антитела к 5 из 8 проанализированных заболеваний, такие высокие уровни кортизола не наблюдаются. Возможно, такой высокий уровень кортизола определяется индивидуальной реакцией данной особи на отловные процедуры.

Тестостерон

Концентрация тестостерона в крови особей отлова 2023 года принимала значения от 0,03 до 7,57 нг/мл (среднее±se: 1,75±0,46 нг/мл). Половые различия в концентрации тестостерона в крови между молодыми самцами (n=2) и самками (n=5) не выявлены (W=16, p=0,79, тест Манна-Уитни). Концентрация тестостерона в крови взрослых самок (n=13) была выше, чем у молодых самок (n=5) (W=75, p<0,01, тест Манна-Уитни, (рисунок 4.5.36).

Прогестерон

Концентрация прогестерона в крови особей отлова 2023 года составила от 6,95 до 287,5 нг/мл (среднее±se: 95,14±15,17 нг/мл). Половые различия в концентрациях прогестерона в крови между молодыми самцами (n=2) и самками (n=5) не выявлены (W=14, p=0,79, тест Манна-Уитни), что косвенно подтверждает отсутствие половой активности у молодых животных. Не обнаружены различия в концентрации прогестерона в крови между взрослыми (n=13) и молодыми самками (n=5) (W=63, p=0,18, тест Манна-Уитни).

Для более точного определения наличия беременности были сопоставлены результаты УЗИ и концентрации прогестерона в крови. В анализ вошли самки из категорий «взрослые беременные самки», «взрослые самки, вероятно, не беременные», «молодые самки» и самцы. Влияние статуса беременности на концентрацию прогестерона в крови не выявлено (Kruskal-Wallis chi-squared=5,44, p=0,14, тест Краскела-Уоллиса, (рисунок 4.5.37).

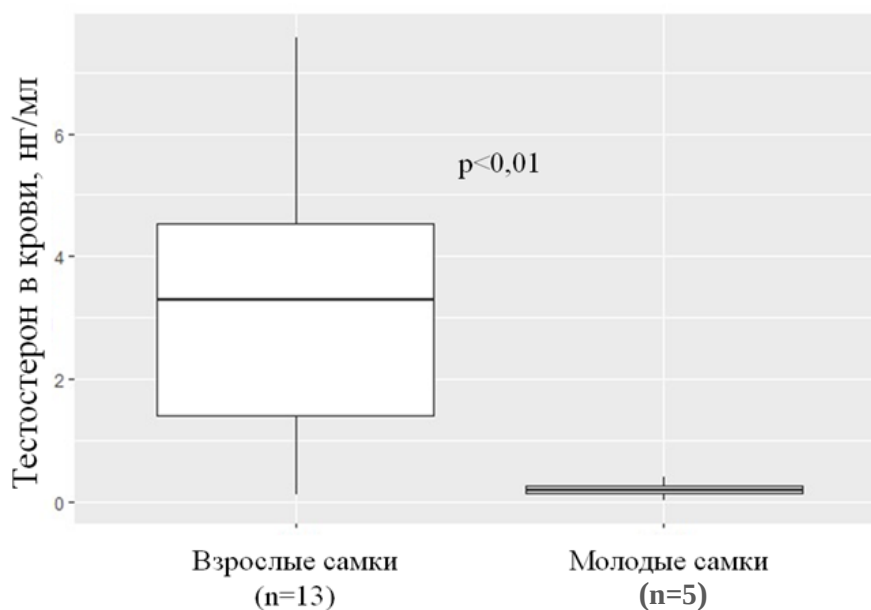


Рисунок 4.5.36 Концентрация тестостерона в крови у взрослых и молодых самок каспийского тюленя

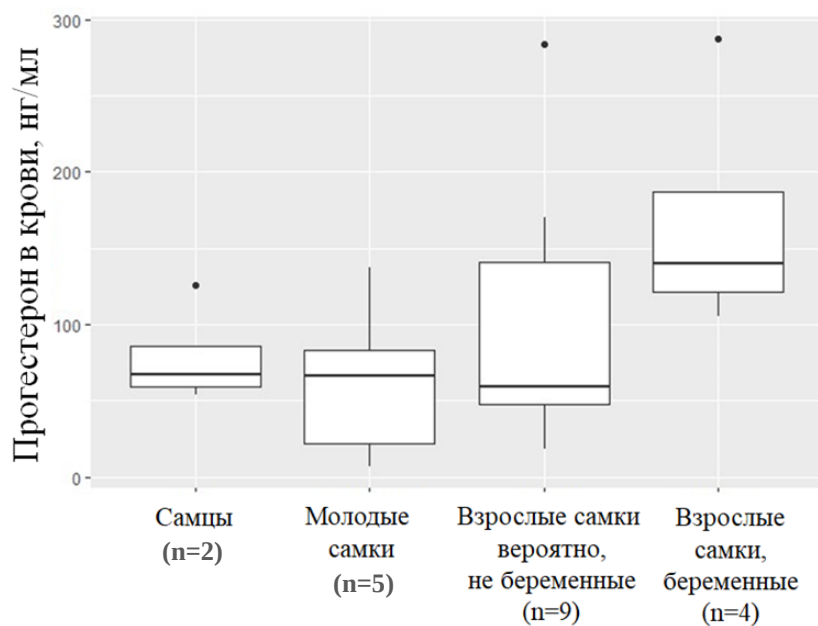


Рисунок 4.5.37 Концентрация прогестерона в крови у каспийских тюленей с разным статусом наличия беременности

4.5.4.2. Гормоны в волосах

Пробы волос были собраны с 20 особей каспийских нерп (волосы из области поясницы и холки). Концентрации трех стероидных гормонов (кортизола, тестостерона и прогестерона) в волосах каспийских нерп приведены в таблице 4.5-9.

Таблица 4.5-9 Концентрация гормонов в волосах каспийского тюленя

Номер животного	Волосы из области поясницы			Волосы из области холки		
	Кортизол, нг/г	Тестостерон, нг/г	Прогестерон, нг/г	Кортизол, нг/г	Тестостерон, нг/г	Прогестерон, нг/г
PC23-01	4,28	0,38	3,79	6,35	0,56	2,78
PC23-02	11,84	1,09	9,49	8,02	1,35	9,66
PC23-03	16,84	0,93	8,88	11,25	1,36	10,09
PC23-04	30,64	0,85	14,83	46,97	1,55	19,76
PC23-05	14,08	0,93	11,53	36,64	1,43	18,72
PC23-06	69,87	0,84	10,14	31,27	1,45	15,29
PC23-07	21,61	0,75	23,17	3,93	0,55	5,75
PC23-08	11,60	0,60	15,61	NA*	0,69	4,09
PC23-09	4,51	0,71	9,14	9,82	0,68	6,65
PC23-10	47,37	1,03	13,02	43,75	1,69	53,01
PC23-11	9,51	0,67	9,57	10,00	1,31	12,40
PC23-12	139,40	1,42	20,16	11,76	1,02	9,53
PC23-13	17,96	0,83	12,15	9,40	0,99	9,65
PC23-14	22,20	0,41	6,97	NA	0,48	3,66
PC23-15	NA	3,35	15,99	16,12	1,09	9,02
PC23-16	223,61	1,26	NA	9,35	0,37	1,66
PC23-17	53,59	1,04	6,48	743,97	3,05	30,41
PC23-18	37,55	1,14	8,72	7,62	0,89	7,05
PC23-19	464,60	2,83	19,22	172,14	1,29	29,84
PC23-20	38,40	1,07	19,66	26,30	0,43	18,77
Среднее±se	98,24±39,93	1,23±0,17	13,00±1,29	67,27±36,70	1,19±0,16	14,91±2,78

*Значение ниже уровня чувствительности прибора.

Гормоны в волосах из разных участков тела

Для сравнения концентраций гормонов в волосах, собранных с разных участков тела каспийского тюленя (области холки и поясницы) использовался критерий Вилкоксона для сопряженных пар (wilcox.test). Не обнаружено статистически значимых различий в концентрациях всех трех гормонов (кортизола, тестостерона и прогестерона) в волосах с холки и области поясницы ($p > 0,05$) (рисунок 4.5.38). В данной работе для дальнейших сравнений будут использованы концентрации гормонов в волосах, собранных с области поясницы.

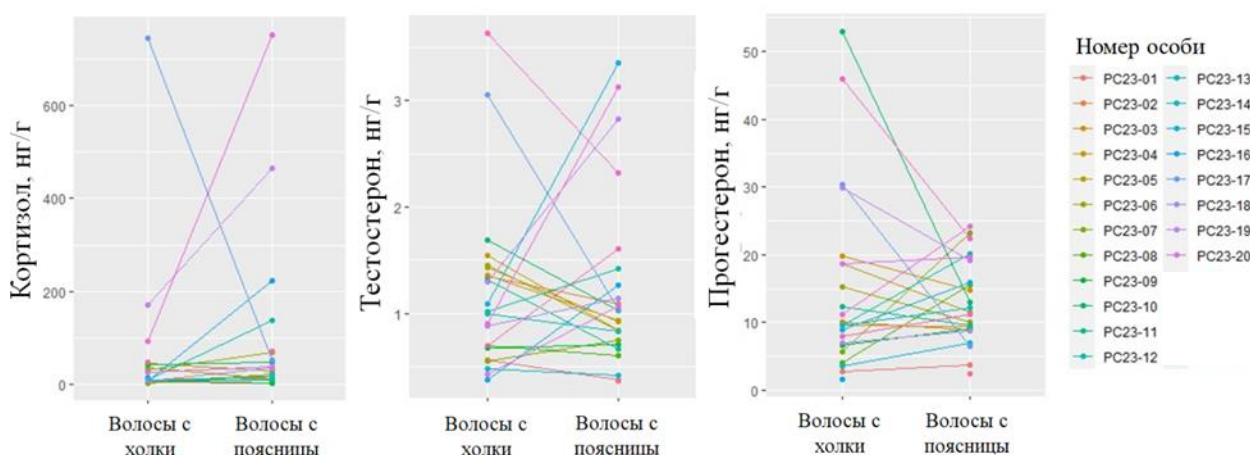


Рисунок 4.5.38 Концентрация гормонов в волосах каспийского тюленя, собранных из области холки и поясницы

Кортизол

Концентрации кортизола в волосах, собранных с области поясницы, варьировали от 4,28 до 752,25 нг/г (среднее±se: 98,24±39,93 нг/г). В волосах, собранных с холки – от 3,93 до 743,97 нг/г (среднее±se: 67,27±36,70 нг/г).

Не выявлены половые различия в концентрации кортизола в волосах при сравнении молодых самцов ($n=2$) и самок ($n=5$) каспийских нерп ($W=6$, $p=0,5$, тест Манна-Уитни). У молодых самок ($n=5$) концентрация кортизола в волосах выше, чем у взрослых самок ($n=13$) ($W=10$, $p=0,0034$, тест Манна-Уитни) (рисунок 4.5.39).

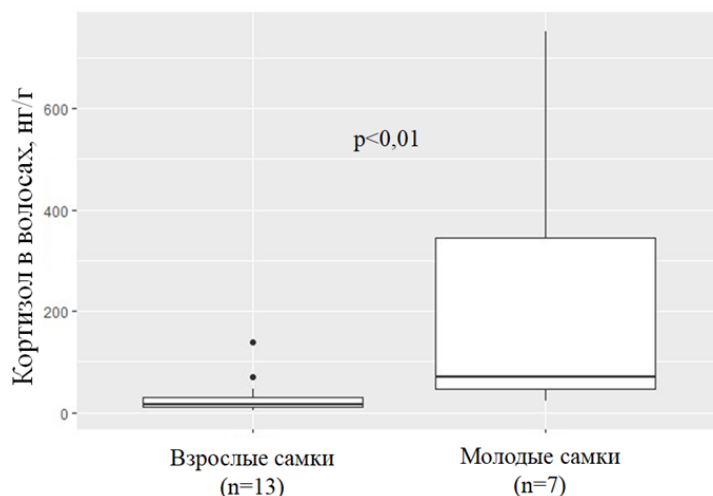


Рисунок 4.5.39 Концентрация кортизола в волосах взрослых и молодых самок каспийского тюленя

Тестостерон

Концентрации тестостерона в волосах, собранных с области поясницы, варьировали от 0,37 до 3,35 нг/г (среднее±se: 1,23±0,17 нг/г). В волосах, собранных с холки – от 0,37 до 3,64 нг/г (среднее±se: 1,19±0,16 нг/г).

Не выявлены половые различия в концентрациях тестостерона в волосах между молодыми самцами ($n=2$) и самками ($n=5$) ($W=7$, $p=0,23$, тест Манна-Уитни). Не обнаружены возрастные различия между концентрациями тестостерона в волосах взрослых самок ($n=13$) и молодых самок ($n=5$) ($W=30$, $p=0,24$, тест Манна-Уитни).

Прогестерон

Концентрации прогестерона в волосах, собранных с области поясницы, варьировали от 2,37 до 24,23 нг/г (среднее±se: 13,00±1,29 нг/г). В волосах, собранных с холки – от 1,66 до 53,01 нг/г (среднее±se: 14,91±2,78 нг/г).

Не выявлены половые различия в концентрациях прогестерона в волосах между молодыми самцами ($n=2$) и самками ($n=5$) ($W=10$, $p=0,76$, тест Манна-Уитни). Не обнаружены возрастные различия между концентрациями прогестерона в волосах взрослых самок ($n=13$) и молодых самок ($n=5$) ($W=41$, $p=0,90$, тест Манна-Уитни).

4.5.4.3. Гормоны в вибриссах

Были измерены концентрации трех гормонов (кортизола, прогестерона и тестостерона) в сегментах вибрисс 13 особей каспийского тюленя (PC23-01-06; PC23-14-20) (таблица 4.5-10). Концентрация кортизола варьировала от 0,06 до 66,01 нг/г (среднее±se: 13,88±1,42 нг/г), тестостерона – от 0,12 до 1,09 нг/г (среднее±se: 0,42±0,02 нг/г), прогестерона – от 0,46 до 24,42 нг/г (среднее±se: 5,39±0,39 нг/г).

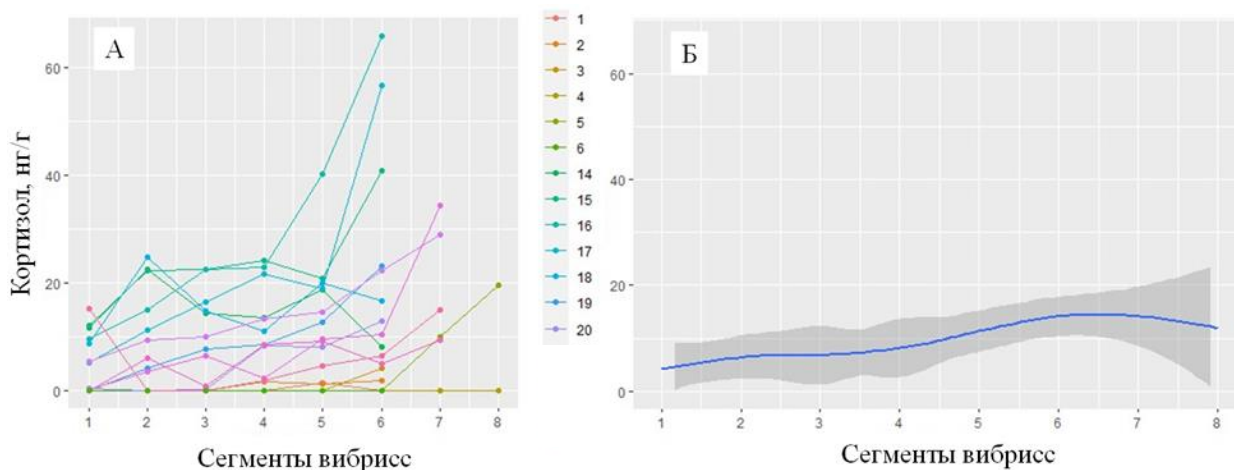
Таблица 4.5-10 Концентрация гормонов в сегментах вибрисс каспийского тюленя

Номер особи	Пол	Возраст	Часть вибриссы	Кортизол, нг/г	Тестостерон, нг/г	Прогестерон, нг/г
PC23-01	самка	4	1	0	0,26	3,27
			2	0	0,59	7,23
			3	0	0,59	7,74
			4	0	0,48	6,64
			5	1,51	0,61	6,37
			6	0	0,56	5,70
			7	0	0,65	7,52

Номер особи	Пол	Возраст	Часть вибриссы	Кортизол, нг/г	Тестостерон, нг/г	Прогестерон, нг/г
PC23-02	самка	4	1	0	0,48	3,15
			2	0	0,19	2,79
			3	0	0,53	4,18
			4	1,70	0,83	7,26
			5	1,15	0,87	9,33
			6	1,94	0,61	5,84
PC23-03	самка	5	1	0	0,31	3,45
			2	0	0,48	3,98
			3	0	0,59	2,89
			4	0	0,37	2,97
			5	0	0,44	3,42
			6	4,15	0,63	3,63
PC23-04	самка	8	1	0	0,30	3,09
			2	0	0,33	4,07
			3	0	0,39	4,90
			4	0	0,65	6,86
			5	0	0,71	6,12
			6	0	0,54	6,44
			7	0	0,75	9,21
			8	0	0,87	7,55
PC23-05	самка	6	1	0	0,20	3,51
			2	0	0,31	3,11
			3	0	0,39	2,72
			4	0	0,58	3,55
			5	0	0,86	5,03
			6	0	0,39	2,59
			7	10,00	0,60	3,12
			8	19,55	0,56	3,91
PC23-06	самка	4	1	0	0,16	1,95
			2	0	0,19	2,26
			3	0	0,17	1,72
			4	0	0,20	1,97
			5	0	0,23	2,35
			6	0	0,28	2,66
PC23-14	самка	2	1	11,67	0,40	4,22
			2	22,60	0,55	7,05
			3	14,31	0,47	6,35
			4	13,55	0,73	10,72
			5	18,67	1,08	14,78
			6	8,15	0,39	4,56
PC23-15	самец	2	1	12,12	0,27	0,77
			2	22,30	0,43	2,46
			3	22,50	0,47	3,05
			4	24,14	0,46	7,74
			5	20,75	0,49	6,96
			6	40,80	0,51	6,12
PC23-16	самка	2	1	9,60	0,30	1,70
			2	14,97	0,39	2,77
			3	22,54	0,51	3,56
			4	22,95	0,61	6,74
			5	40,28	1,09	24,42
			6	66,01	0,68	10,85
PC23-17	самка	2	1	5,27	0,17	4,09
			2	11,25	0,30	3,84
			3	16,41	0,44	2,37
			4	21,63	0,71	7,75
			5	18,98	0,76	18,44
			6	56,76	0,70	19,03
PC23-18	самец	3	1	8,82	0,26	1,96
			2	24,89	0,25	2,66
			3	14,68	0,47	8,39
			4	10,92	0,51	7,45
			5	19,96	NA	17,45
			6	16,60	0,56	5,04

Номер особи	Пол	Возраст	Часть вибриссы	Кортизол, нг/г	Тестостерон, нг/г	Прогестерон, нг/г
PC23-19	самка	2	1	0	0,28	1,27
			2	4,17	0,24	2,36
			3	7,68	0,24	3,30
			4	8,63	0,34	10,29
			5	12,74	0,52	16,51
			6	23,17	0,38	10,32
PC23-20	самка	3	1	0,48	0,14	0,67
			2	0	0,15	0,46
			3	0,09	0,12	0,55
			4	8,42	0,16	1,24
			5	8,20	0,24	6,16
			6	12,81	0,28	3,57
Среднее±se				9,13±1,12	0,42±0,02	5,39±0,39

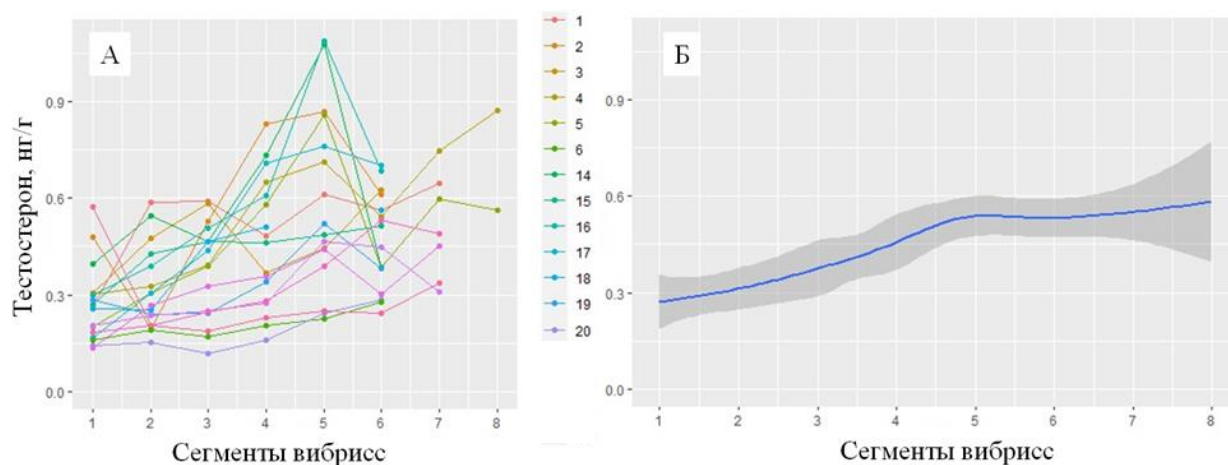
В характере распределения кортизола и тестостерона вдоль вибрисс прослеживается увеличение концентраций этих гормонов ближе к дистальному концу вибрисс (рисунки 4.5.40-4.5.41).



А – распределение кортизола вдоль вибрисс у каждой особи выборки,

Б – сглаженное среднее и доверительный интервал распределения кортизола (функция ggplot, geom_smooth)

Рисунок 4.5.40 Концентрация кортизола в сегментах вибрисс каспийского тюленя

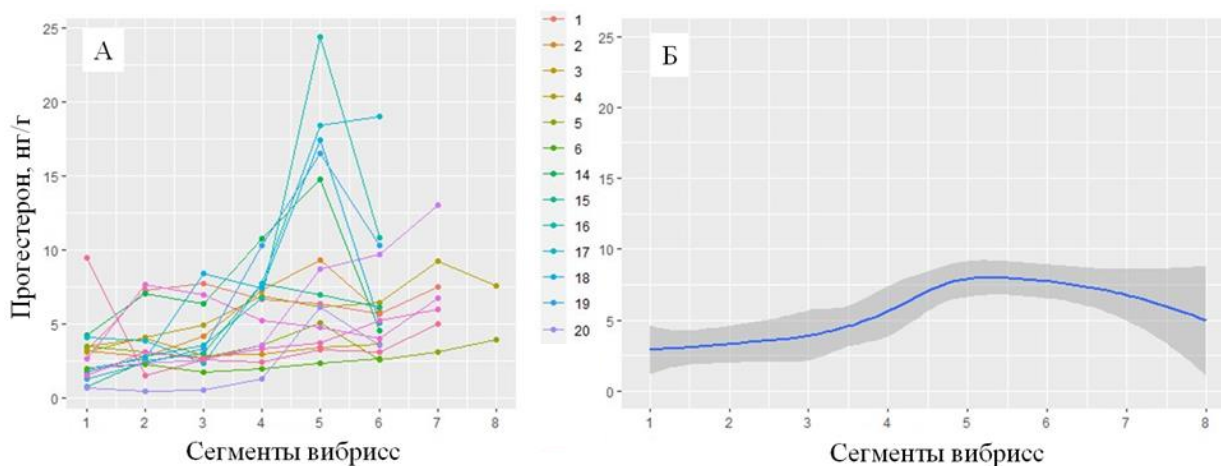


А – распределение кортизола вдоль вибрисс у каждой особи выборки,

Б – сглаженное среднее и доверительный интервал распределения кортизола (функция ggplot, geom_smooth)

Рисунок 4.5.41 Концентрация тестостерона в сегментах вибрисс каспийского тюленя

В характере распределения прогестерона вдоль вибрисс заметен пик на 5-ых сегментах вибрисс (рисунок 4.5.42).



А – распределение кортизола вдоль вибрисс у каждой особи выборки,
Б – сглаженное среднее и доверительный интервал распределения кортизола (функция ggplot, geom_smooth)

Рисунок 4.5.42 Концентрация прогестерона в сегментах вибрисс каспийского тюленя

Половозрастные характеристики

Основываясь на результатах УЗИ и концентрациях прогестерона в крови, мы выделили категорию беременных самок (взрослые самки, концентрация прогестерона в крови выше 100 нг/мл) и разделили выборку 2023 года по половозрастным характеристикам. В выборке 2023 года присутствовало 2 молодых самца, 5 молодых самок, 6 взрослых яловых самок, 7 взрослых беременных самок. Взрослые самцы в выборке 2023 года отсутствовали.

В характере распределения кортизола вдоль вибрисс прослеживаются возрастные различия – у молодых самцов и самок концентрация кортизола в вибриссах была выше, чем у взрослых яловых и беременных самок (рисунок 4.5.43). Концентрации кортизола в вибриссах беременных самок имели низкое значение, близкое 0 нг/мл; у взрослых яловых самок – низкие значения кортизола были характерны для 1-5 сегментов вибрисс, в более дистальных сегментах концентрация увеличивалась.

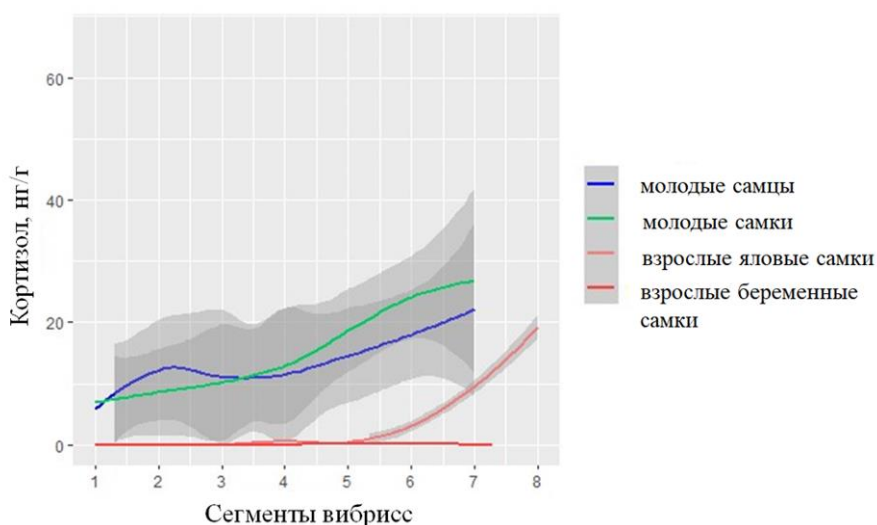


Рисунок 4.5.43 Концентрация кортизола в сегментах вибрисс каспийского тюленя разного пола, возраста и статуса наличия беременности

У молодых самцов и взрослых самок выявлено увеличение концентрации тестостерона ближе к дистальному концу вибрисс, особенно выраженное повышение концентрации характерно для беременных самок (рисунок 4.5.44). У молодых самок выявлен пик тестостерона на 5-6 сегменте вибрисс.

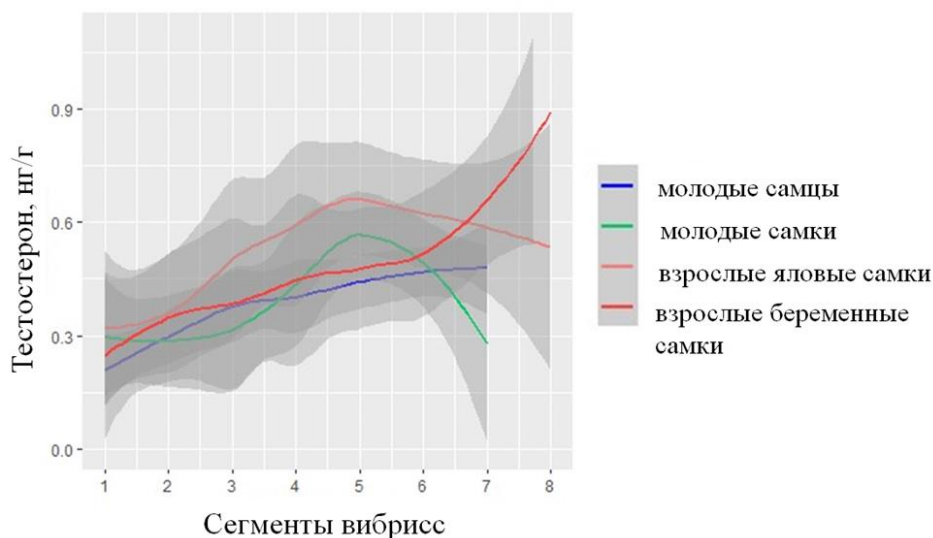


Рисунок 4.5.44 Концентрация тестостерона в сегментах вибрисс каспийского тюленя разного пола, возраста и статуса наличия беременности

В характере распределения прогестерона в вибриссах молодых самок выявлен пик на 5-6 сегменте (рисунок 4.5.45). В вибриссах молодых самцов и взрослых самок концентрация прогестерона имеет более равномерное распределение.

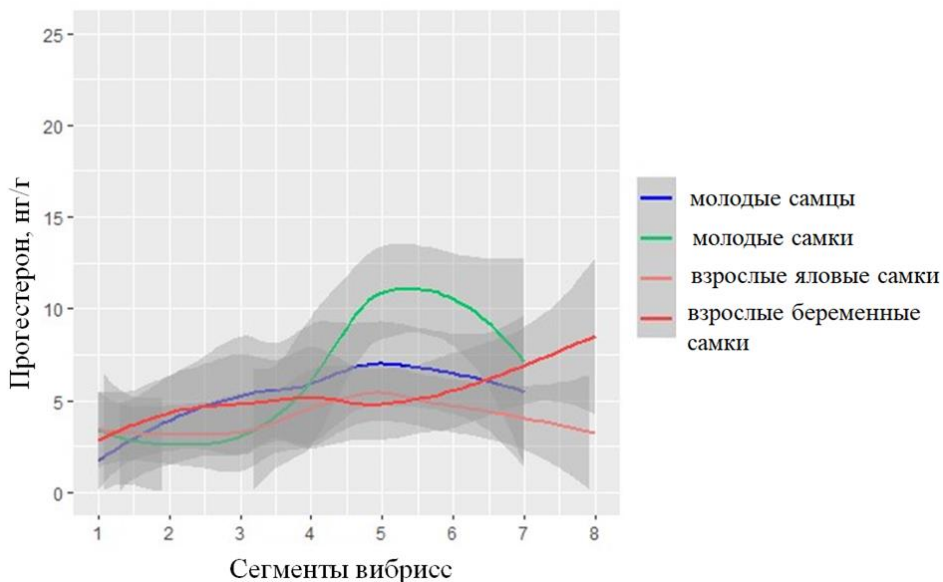


Рисунок 4.5.45 Концентрация прогестерона в сегментах вибрисс каспийского тюленя разного пола, возраста и статуса наличия беременности

4.5.5. Серологические исследования

Серологические исследования были проведены на 20 пробах сывороток от тюленей различных возрастов. Все пробы были проанализированы на присутствие антител к вирусу простого герпеса, вирусу чумы плотоядных, *Toxoplasma gondii*, микоплазме, хламидии, кандиде и *Trichinella* sp.) (таблица 4.5-11).

Таблица 4.5-11 Серопозитивность каспийского тюленя к различным патогенам

Номер особи	Вирус простого герпеса	Toxoplasma gondii	Chlamydia sp.	Mycoplasma sp.	Candida sp.	Morbillivirus	Trichinella sp.	Кол-во положительных результатов
PC23-01	негативен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	негативен	5
PC23-02	негативен	негативен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	негативен	4
PC23-03	негативен	негативен	негативен	негативен	негативен	позитивен	негативен	1
PC23-04	негативен	негативен	сомнителен	сомнителен	позитивен	позитивен	негативен	2
PC23-05	негативен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	негативен	5
PC23-06	негативен	негативен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	негативен	4
PC23-07	негативен	негативен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	негативен	4
PC23-08	негативен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	негативен	5
PC23-09	негативен	негативен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	негативен	4
PC23-10	негативен	негативен	сомнителен	сомнителен	сомнителен	сомнительный	негативен	0
PC23-11	негативен	негативен	негативен	позитивен	позитивен	сомнительный	негативен	2
PC23-12	негативен	сомнителен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	негативен	4
PC23-13	негативен	негативен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	негативен	4
PC23-14	негативен	негативен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	негативен	4
PC23-15	негативен	негативен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	негативен	4
PC23-16	негативен	негативен	позитивен	позитивен	позитивен	сомнительный	негативен	3
PC23-17	негативен	негативен	позитивен	негативен	позитивен	негативен	негативен	2
PC23-18	негативен	сомнителен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	негативен	4
PC23-19	негативен	негативен	позитивен	позитивен	позитивен	позитивен	негативен	4
PC23-20	негативен	негативен	позитивен	негативен	позитивен	сомнительный	негативен	3

В 2023 году не было выявлено животных, серопозитивных к вирусу простого герпеса и трихинелле. К остальным пяти патогенам были выявлены серопозитивные животные. Минимальной серопозитивность была к токсоплазме (13%), к остальным патогенам серопозитивность была существенно выше: к ВЧП – 67%, к микоплазме – 71%, к хламидии – 79%, к кандиде – 92% (таблица 4.5-12).

Таблица 4.5-12 Сводные данные по серопозитивности к различным патогенам к различным патогенам

Патоген	Число проб	Число позитивных	Серопозитивность, %
Toxoplasma gondii	24	3	13
Вирус простого герпеса	24	0	0
Trichinella sp.	24	0	0
Morbillivirus	24	16	67
Mycoplasma sp.	24	17	71
Chlamydia sp.	24	19	79
Candida sp.	24	22	92

Не имеющими ни одного положительного результата по всем семи патогенам, оказалась лишь одна нерпа - PC23-10, серопозитивных к 1 патогену – 2 нерпы, серопозитивных к двум патогенам – 4 нерпы, серопозитивных к трем патогенам – 3 нерпы, серопозитивных одновременно к четырём патогенам оказалось больше всего – 10 животных. К пяти патогенам одновременно серопозитивны 3 животных.

4.5.6. Исследования иммунитета

При анализе параметров иммунной системы не было выявлено существенных различий в активности системы комплемента (средний титр в тесте убийства бактерий составлял 3-3,4 для животных различных возрастных групп), иммуноглобулинов G (53,8-60,1 мг/мл) и общей активности иммуноглобулинов в тесте гемагглютинации с эритроцитами барана (титр всегда и у всех животных был равен 0). Достоверные отличия были отмечены только в концентрации лизоцима, концентрация которого была существенно ниже, чем у двух других возрастных групп животных (рисунок 4.5.46).

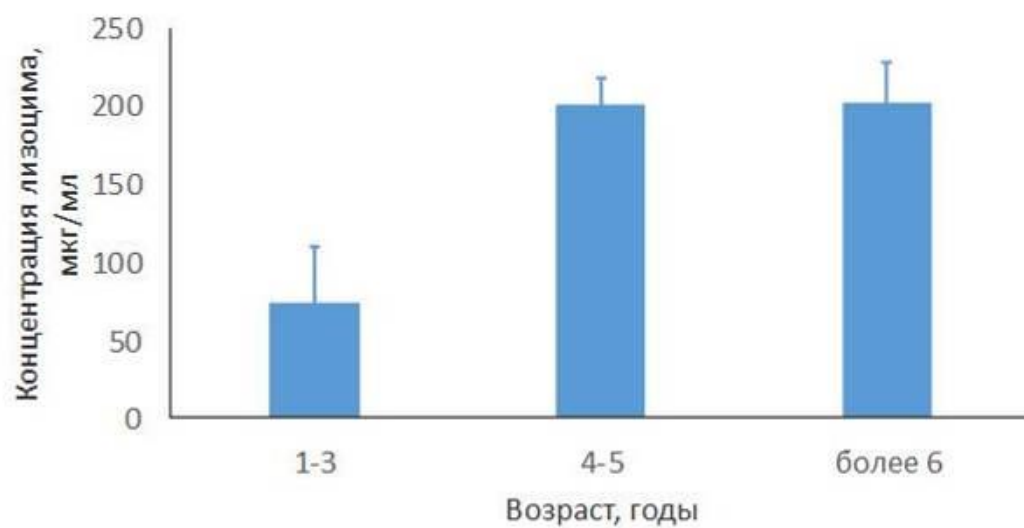


Рисунок 4.5.46 Уровень лизоцима у каспийского тюленя различных возрастных групп

5. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ С ДАННЫМИ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

5.1. Учет численности

За время рейса на НИС «Наутилус-один» (07.11.2023- 16.11.2023 гг.) в казахстанской акватории Каспийского моря, было зарегистрировано 200 встреч каспийского тюленя (217 особи).

При подготовке к отлову тюленей были осмотрены 6 шалыг, из них 4 (КТ1, - КТ4) были притоплены в следствии нагона и поднятия уровня воды в море (таблица 4.2-1). На шалыге КТ5 и КТ6 зафиксированы залежки каспийского тюленя, за 2 дня отлова было учтено 9836 особей каспийского тюленя. При движении к шалыге КТ2 зафиксировано четыре погибших тюленя.

В таблице 5.1-1 приведен расчет плотности встреченных тюленей казахстанской части Северного Каспия за время работ в 2019-2020 и 2022-2023 годах.

Таблица 5.1-1 Результаты учета численности каспийского тюленя в акватории

Дата	Место наблюдения	Длина маршрута*, км	Ширина учетной полосы, км	Площадь учетной полосы, км ²	Количество учтенных тюленей, особь.	Плотность, особь/км ²
2019 г.						
04.11.19	«Алина»	67	3	201,0	24	0,12
09.11.19	«Алина»	83	3	261,0	25	0,10
Среднее значение с судна						0,11
04.11.19	Моторная лодка	26	0,7	18,2	76	4,18
07.11.19	Моторная лодка	31	0,7	21,7	189	8,71
08.11.19	Моторная лодка	34	0,6	20,4	216	10,59
Среднее значение с лодки						7,82
2020 г.						
01.11.20-03.11.20	НИС «Алина»	282	1	282	44	0,15
03.11.20	Моторная лодка	26	0,6	15,6	88	5,64
06.11.20	Моторная лодка	26	0,6	15,6	142	9,10
Среднее значение с лодки						7,37
2022 г.						
03.11.22	Т/Х «Наутилус-один»	96	1	96,0	29	0,30
04.11.22	Моторная лодка	15,6	0,8	12,5	41	3,28
	Моторная лодка	15,6	0,8	12,5	90	7,20
05.11.22	Моторная лодка	15,6	0,8	12,5	56	4,48
06.11.22	Моторная лодка	15,6	0,8	12,5	21	1,68
07.11.22	Моторная лодка	15,6	0,8	12,5	42	3,36
08.11.22	Моторная лодка	15,6	0,8	12,5	34	2,72
Среднее значение с лодки						3,79
2023 г.						
11.11.2023	Т/Х «Наутилус-один»	217	1	217	147	0,68
16.11.2023	Т/Х «Наутилус-один»	118	1	118	70	0,59
11.11.2023	Моторная лодка	34	0,8	27,2	18	0,66
13.11.2023	Моторная лодка	24,6	0,8	19,7	46	4,5
14.11.2023	Моторная лодка	8,0	0,8	6,4	60	9,4
Среднее значение с лодки						4,85

Примечание: * - суммарная длина отрезков маршрута, на которых проводились наблюдения

Учеты в районах мелководья (у морских шалыг севернее о. Кулалы и Морского, севернее и южнее СКМК над глубинами 0,5-4 м), проводившиеся с моторных лодок в 2023 г., имеют схожие результаты с данными за 2019-2022 гг. и находятся в пределах 0,68-9,4 экз/км². Учеты с исследовательского судна за период с 2019 по 2023 г показали постепенное увеличение плотности каспийского тюленя по судовому маршруту от Баутино до участка Седловины и далее в район Северо-каспийского морского канала (СКМК). Плотность тюленей возрасла от 0,12 экз/км² до 0,68 экз/км², вероятно это связано с обмелением прибрежных участков и постепенным изменением путей миграции рыб в сторону глубоководья, западнее о.Кулалы (килька обыкновенная и кефаль).

5.2. Прослеживание тюленей

В период проведения исследований на каспийских тюленей были установлены спутниковые передатчики: в 2019 году - 9 передатчиков, в 2020 году – 11, в 2022 г. - 20 меток (на самок каспийского тюленя), и в 2023 году – 13 (на самок каспийского тюленя). Район мечения в 2019, 2020 и 2023 гг., располагался примерно на 200-250 км северо-восточнее района мечения 2022 г.

Анализ полученных данных выявил некоторые сходства и различия показателей.

Для всех лет наблюдений отмечается способность животных перемещаться на дальние расстояния на юг, причем в 2020, 2022 и 2023 гг. отдельные животные в период прослеживания уходили в южный Каспий (рисунок 5.2.1). Замечено активное использование тюленями акватории среднего Каспия на протяжении всех лет и месяцев прослеживания.

В 2019 и 2022 гг. животные практически не использовали западную часть Каспийского моря для перемещений, в то время как в 2020 г. отдельные особи регистрировались в районе о. Тюлений, а также вдоль западного побережья Каспия в Республике Дагестан.

В 2022 г. значительное количество локаций было приурочено к восточному побережью Каспия, в то время как в 2020 г. всего 2 особи активно использовали этот участок акватории, а в 2019 г. тюлени вдоль восточного побережья Каспия практически не регистрировались.

В 2023 г. животные использовали для перемещений как западное, так и восточное побережье акватории. В 2022 и 2023 гг. акватории, приуроченные к восточному побережью, использовались наиболее активно.

Сравнение перемещений 2019, 2020, 2022 и 2023 гг. по месяцам показывает:

- В ноябре основной ключевой участок обитания лежал в районе мечения. В 2019 и 2020 гг. отдельные животные в ноябре совершали перемещения в юго-западную часть северного Каспия и в средний Каспий, в 2022 и 2023 гг. животные также перемещались в средний Каспий, однако использовали для этого, в том числе, акваторию в районе восточного побережья (рисунок 5.2.2, А, В, С, D);
- В декабре (рисунок 5.2.2, Н), январе (рисунок 5.2.2, L) и феврале (рисунок 5.3.2, Р) местоположение ключевых участков 2023 г. схоже с таковым для мечения 2020 и 2022 гг. и располагалось для обоих лет в районе Тюленьих островов.

При этом для всех указанных месяцев для мечения 2020 и 2022 г. отмечаются перемещения животных в средний Каспий. Отмечается также, что в декабре и январе для указанных годов тюлени перемещались вдоль восточного побережья.

Следует заметить, что в 2022 г. животные практически не использовали западную часть акватории Каспийского моря, в отличие от 2019 и 2020 г. Наиболее сильно отличаются перемещения животных, помеченных в 2019 г. – для мечения этого года отмечается смещенность крупных ключевых участков обитания в северо-восточную часть Каспийского моря. Перемещения в марте между тремя годами мечения сравнить не удастся из-за малого количества локаций, полученных в марте, для мечения 2019 и 2020 гг.

Для всех указанных месяцев для мечения 2020, 2022 и 2023 гг. отмечаются перемещения животных в средний Каспий. В декабре и январе указанных годов тюлени перемещались вдоль восточного побережья. Кроме того, в январе 2024 гг. животные также использовали для перемещений западную часть акватории.

В отличие от животных, помеченных в 2019, 2020 и 2023 гг., использовавших западную часть акватории Каспия, тюлени, помеченные в 2022 г., практически не использовали эту часть для перемещений. Наиболее сильно отличаются перемещения животных, помеченных в 2019 г. – для мечения этого года отмечается смещенность крупных ключевых участков обитания в северо-восточную часть Каспийского моря.

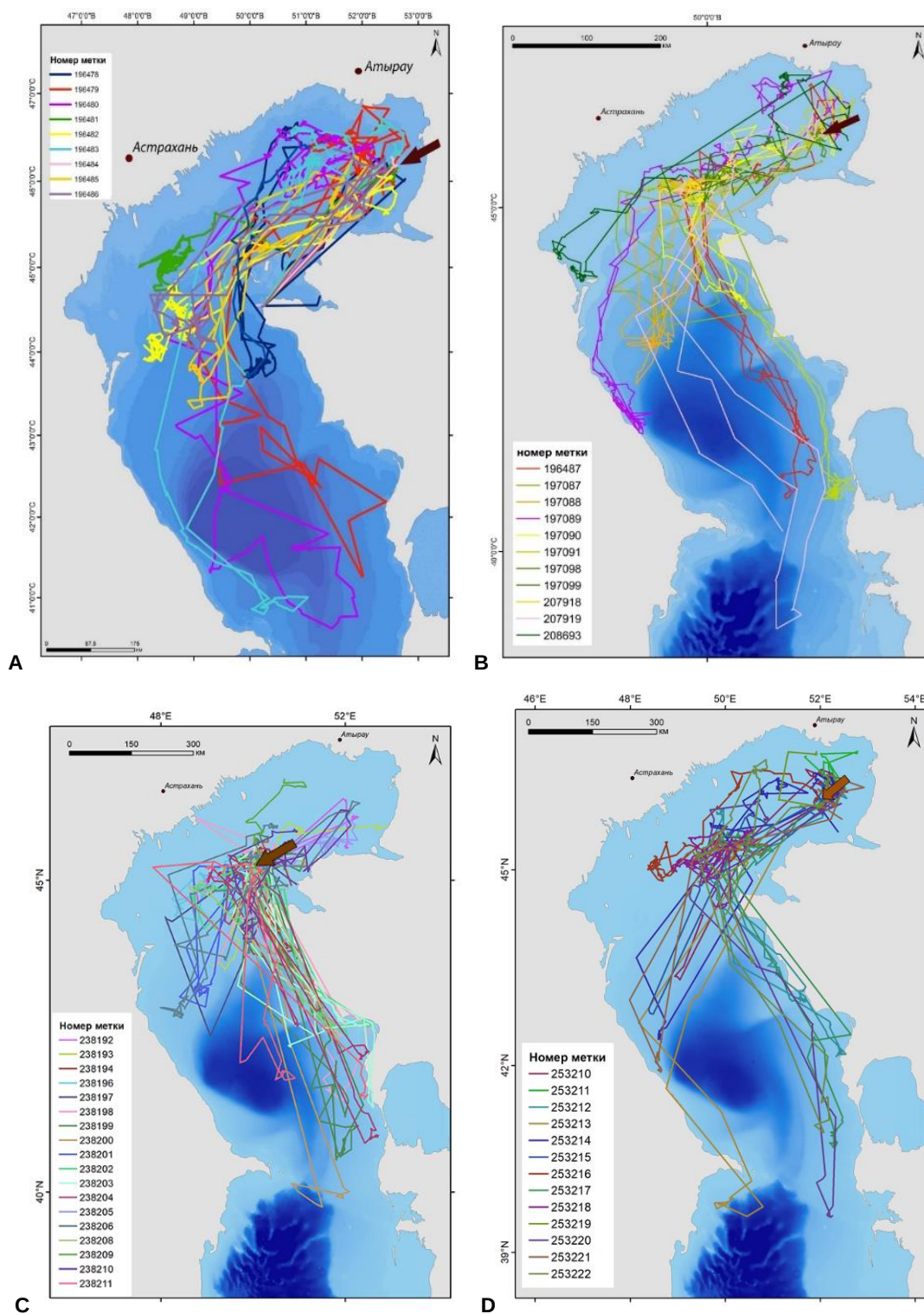
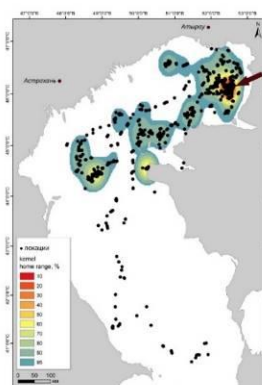
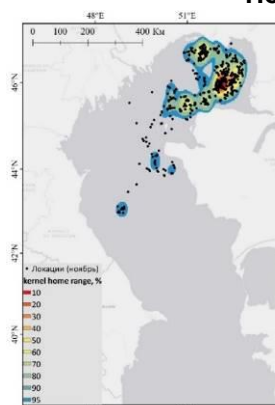


Рисунок 5.2.1 Треки помеченных тюленей

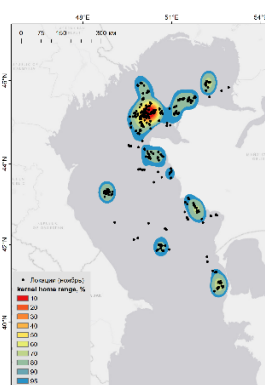
Ноябрь



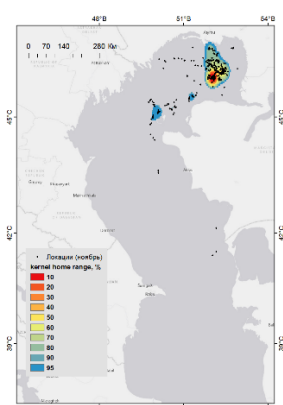
A



B

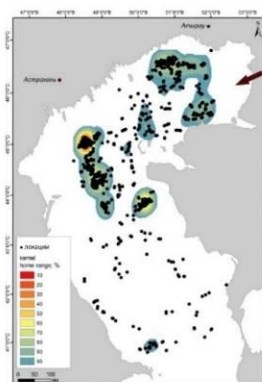


C

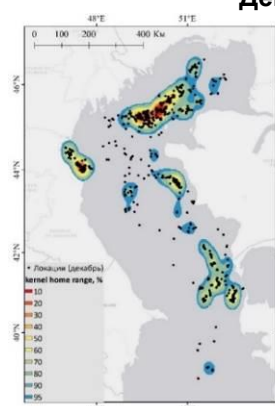


D

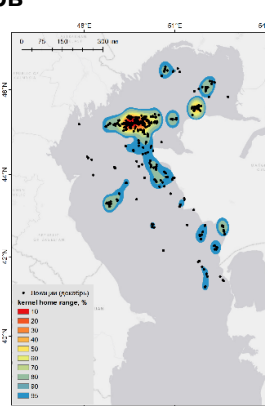
Декабрь



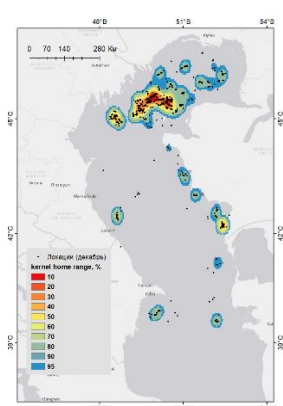
E



F

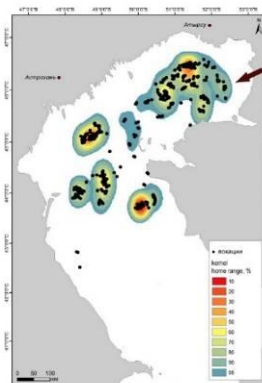


G

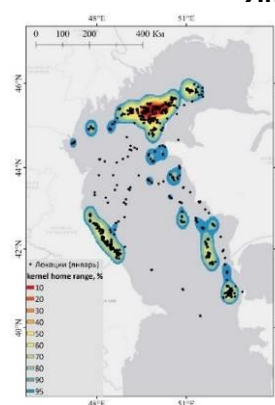


H

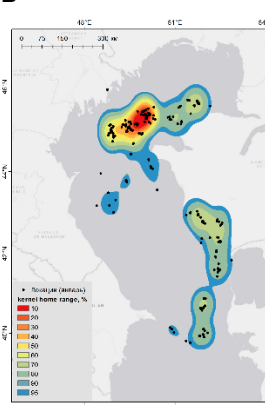
Январь



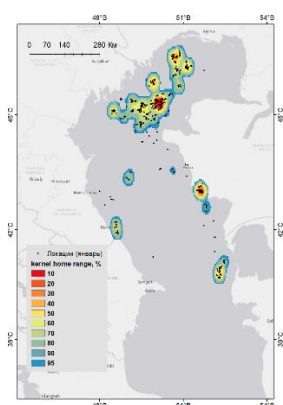
I



J



K



L

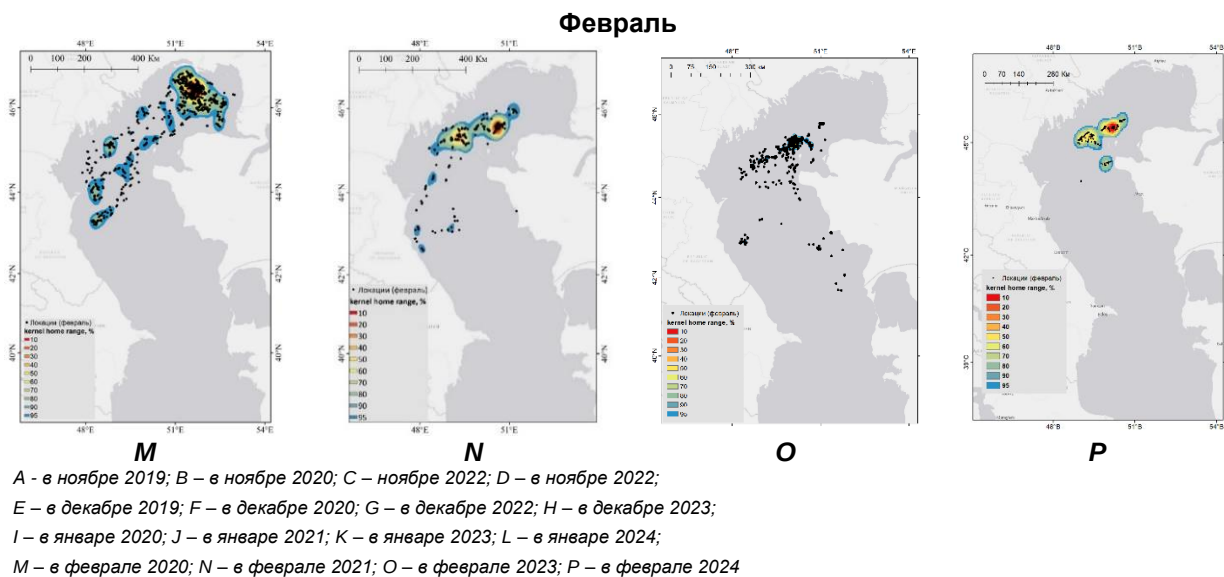


Рисунок 5.2.2 Ключевые участки обитания помеченных тюленей

Вероятно, наблюдаемые особенности расположения ключевых участков связаны, как и ранее, с особенностями ледовой обстановки и расположением ледовых полей – распределение каспийских тюленей в зимний период сильно зависит от ледовых условий [Иванов, Сокольский, 2000].

Зима 2019-2020 отличалась крайне низкой степенью развития ледового покрова, лёд едва покрывал самую северную часть Каспийского моря (рисунок 5.2.3 А). Судя по всему, в 2019 г. распределение тюленей было связано с расположением ледовых полей, которые в этом году находились близко к северному побережью.

Метеорологические условия в зимние сезоны 2020-2021 гг., 2022-2023 гг. и 2023-2024 гг. были более типичными, и льдом покрывалась большая часть Северного Каспия.

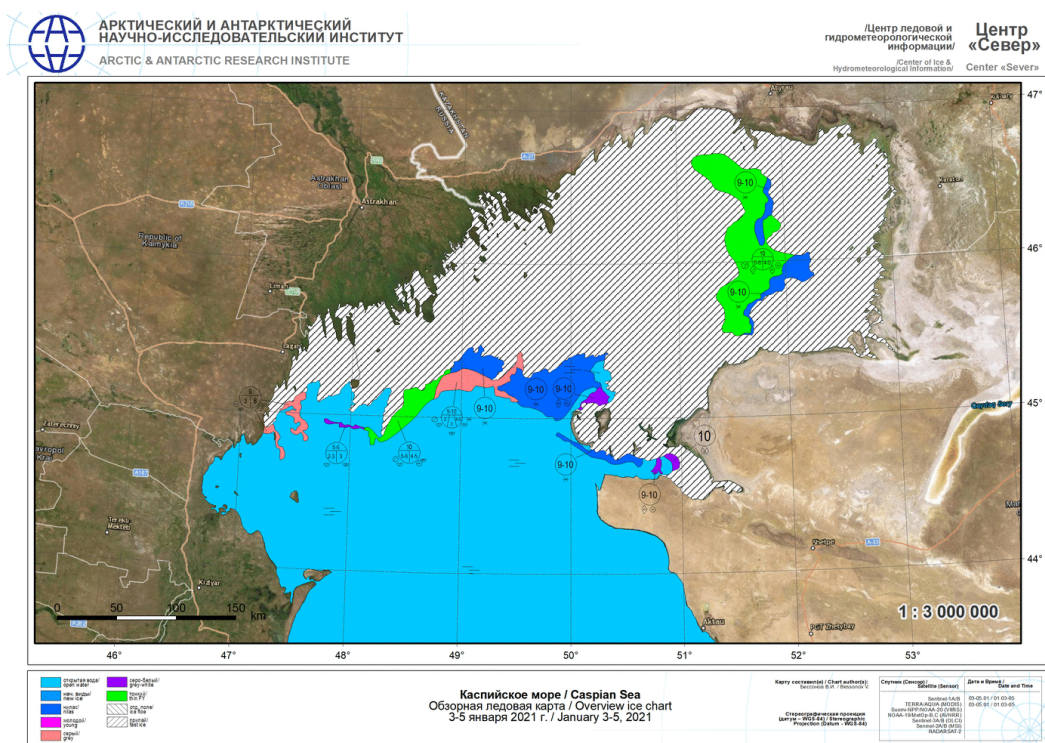
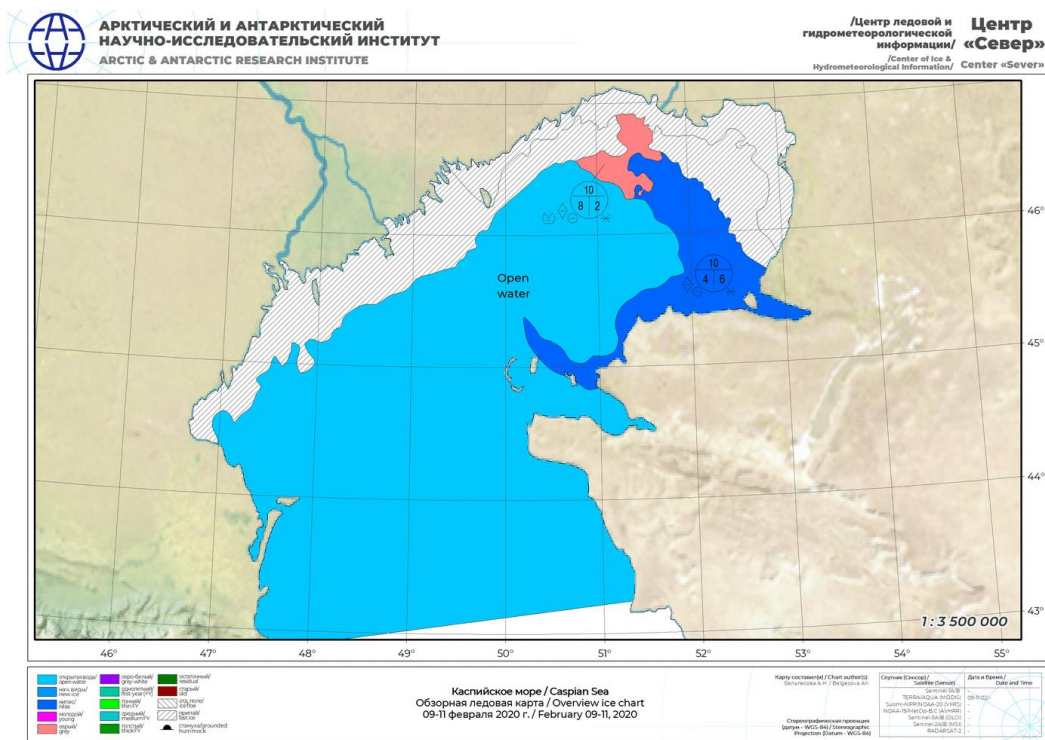
В годы с нормальной ледовитостью Мангышлакский порог оказывается покрыт льдом, который подходит для зимнего залегания и размножения тюленей (рисунок 5.2.3 В, С). Кроме того, гидрологические и геоморфологические особенности данного района могут определять приуроченность к ним пищевых ресурсов каспийского тюленя.

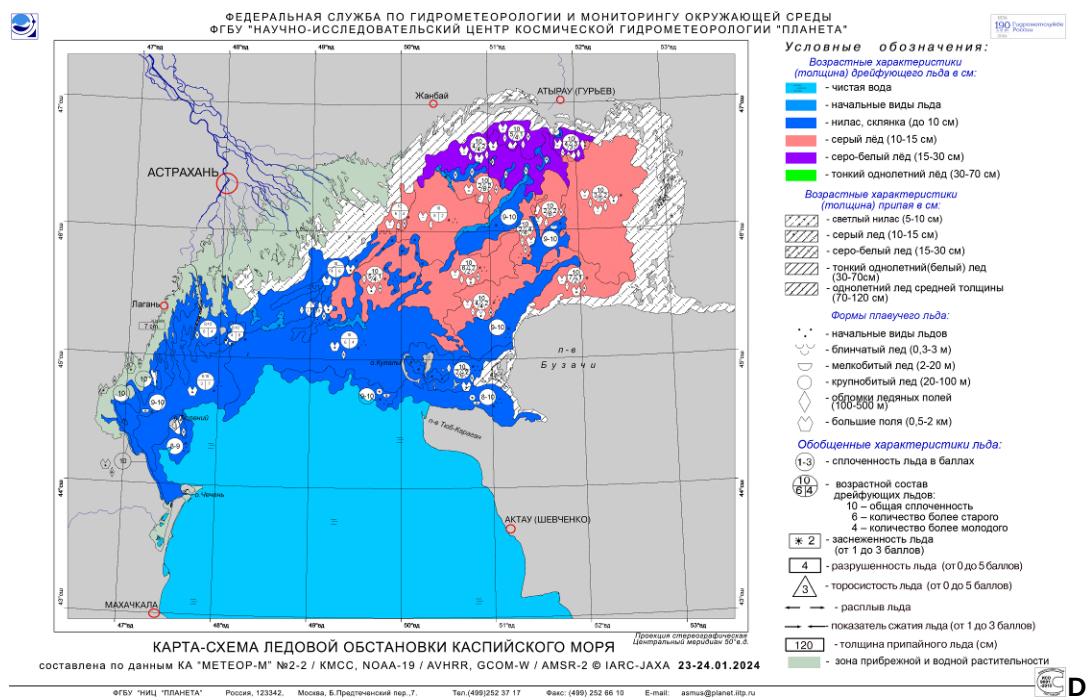
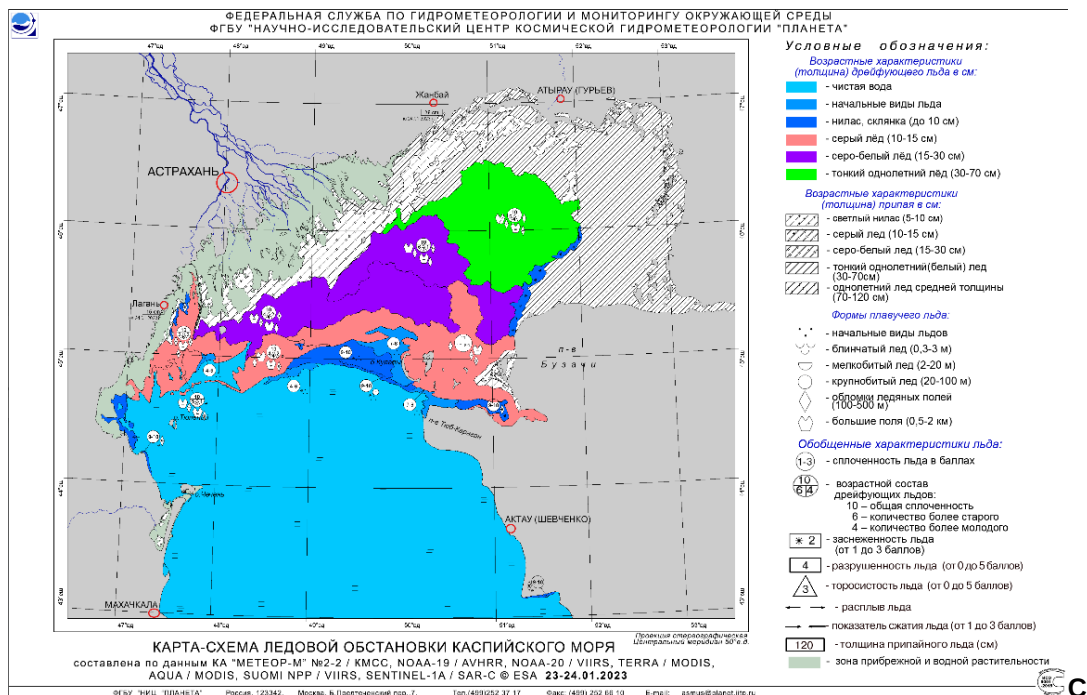
В январе 2023 года, как и в январе 2021 года, тюлени отделились от северного побережья Каспийского моря (рисунок 5.2.3 J, K) и переместились ближе к границе ледовых полей, где в этот момент наблюдался плотный лед, пригодный для залегания животных (рисунок 5.2.3 В, С). При этом в январе 2024 г. наибольшее количество локаций животных располагалось севернее, чем в январе 2021 и 2023 гг., и ключевые участки в этот период были также приурочены к районам распространения сплоченного льда наибольшей доступной на тот момент толщины (10-30 см; рисунок 5.2.3 D).

Необходимо отметить, что зимой 2023-2024 гг. лед так же, как и в 2020-2021 гг. и 2022-2023 гг. покрывал большую часть акватории северного Каспия, и в целом характеризовался меньшей толщиной по сравнению с указанными годами (наиболее распространенными типами льда в январе и феврале 2024 г., по данным ФГБУ НИЦ «Планета», были нилас (до 10 см толщины), серый лед (10-15 см толщины) и серо-белый лед (15-30 см толщины)). Для февраля 2024 г. отмечается расположение ключевых участков животных севернее Тюленых островов, где, по данным ФГБУ НИЦ «Планета», располагалась граница ледовых полей с толщиной льда 10-30 см.

Для животных, помеченных в 2023 г., как и для животных, помеченных в 2020 и 2022 гг., характерно более активное по сравнению с мечением 2019 г. использование животными средней части Каспийского моря. Также в эти годы отмечается активное использование восточного побережья Каспийского моря, в то время как для мечения 2019 г. тюлени чаще использовали для перемещений акваторию у западного побережья Каспийского моря.

Использование животными прибрежных акваторий для перемещений (особенно восточной части моря вдоль побережья Казахстана) ранее было отмечено в литературе как «миграционный коридор» для осенних перемещений животных [Dmitrieva et al., 2016]. По всей видимости, «миграционный коридор», отмеченный ранее в литературе, существует не только в осенний, но и в зимний сезон для внутрисезонных миграций животных, и возможно связан с местами концентрации объектов питания тюленей. Перспективным представляется продолжение мечения для увеличения выборки, а также мечение в другие сезоны для составления полной картины миграций каспийского тюленя в течение года.





Источники - <http://www.aari.ru>, <http://planet.rssi.ru>

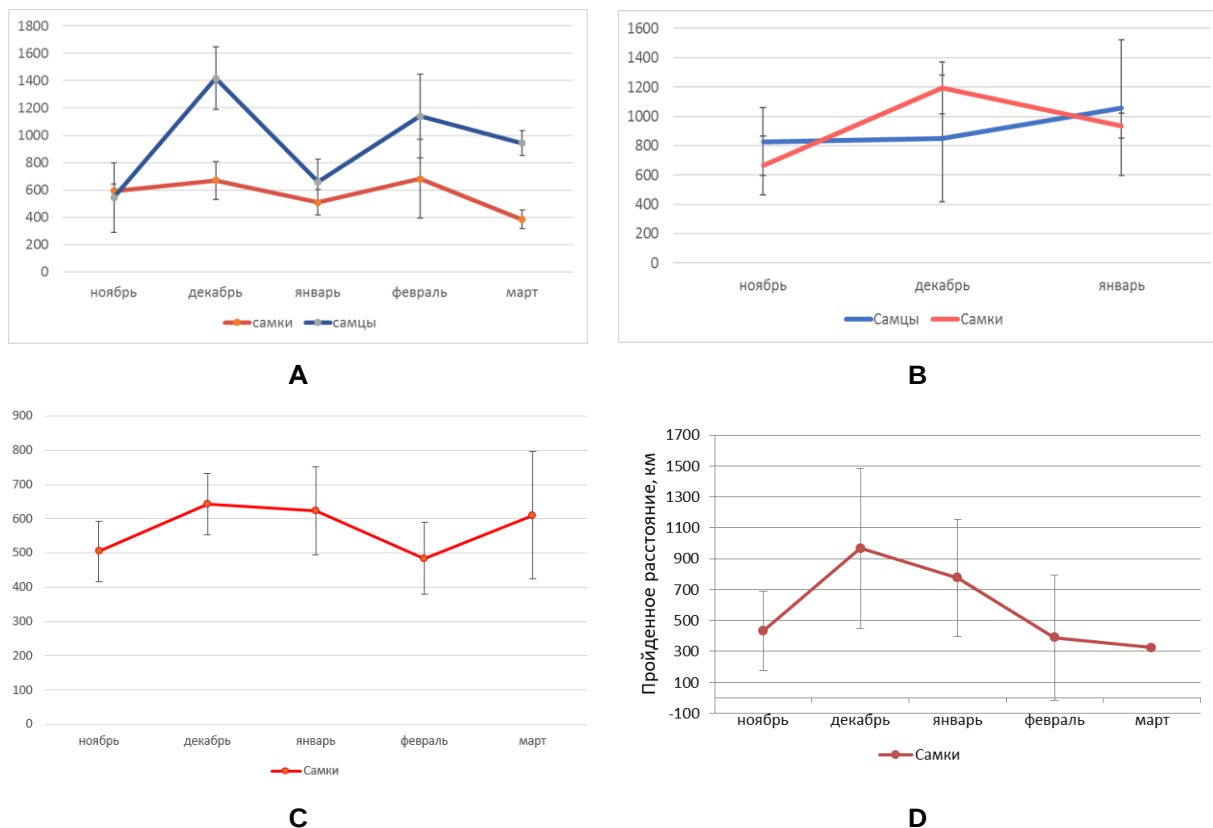
A – 09-11 февраля 2020 года; B – 3-5 января 2021; C – 23-24 января 2023; D – 23-24 января 2024 г.

Рисунок 5.2.3 Ледовые карты Северного Каспия

Проводить сравнение 2022 и 2023 гг. с мечением 2019 и 2020 г. возможно только в отношении активности перемещений самок, так как в 2022 и 2023 гг. метки устанавливались только на них.

В активности перемещений в 2019, 2020, 2022 и 2023 гг. мечения как общие черты, так и различия (рисунок 5.2.4), однако в них не прослеживается никаких закономерностей.. Активность самок во все года мечения схожа в отношении увеличения пройденных дистанций с ноября по декабрь с дальнейшим уменьшением показателя в январе. Сходства также обнаруживаются между показателями для 2022 и 2023 гг. мечения – в феврале средние

значения показателя так же уменьшались и были ниже, чем в январе (рисунок 5.2.4 С, D). Показатели для марта не подлежат сравнению, так как в марте 2024 г. работу продолжала только одна метка, а сами данные были получены только для начала месяца (прослеживание было закончено 10.03.2024). В 2020 г. самки проходили большие расстояния, чем в другие годы.



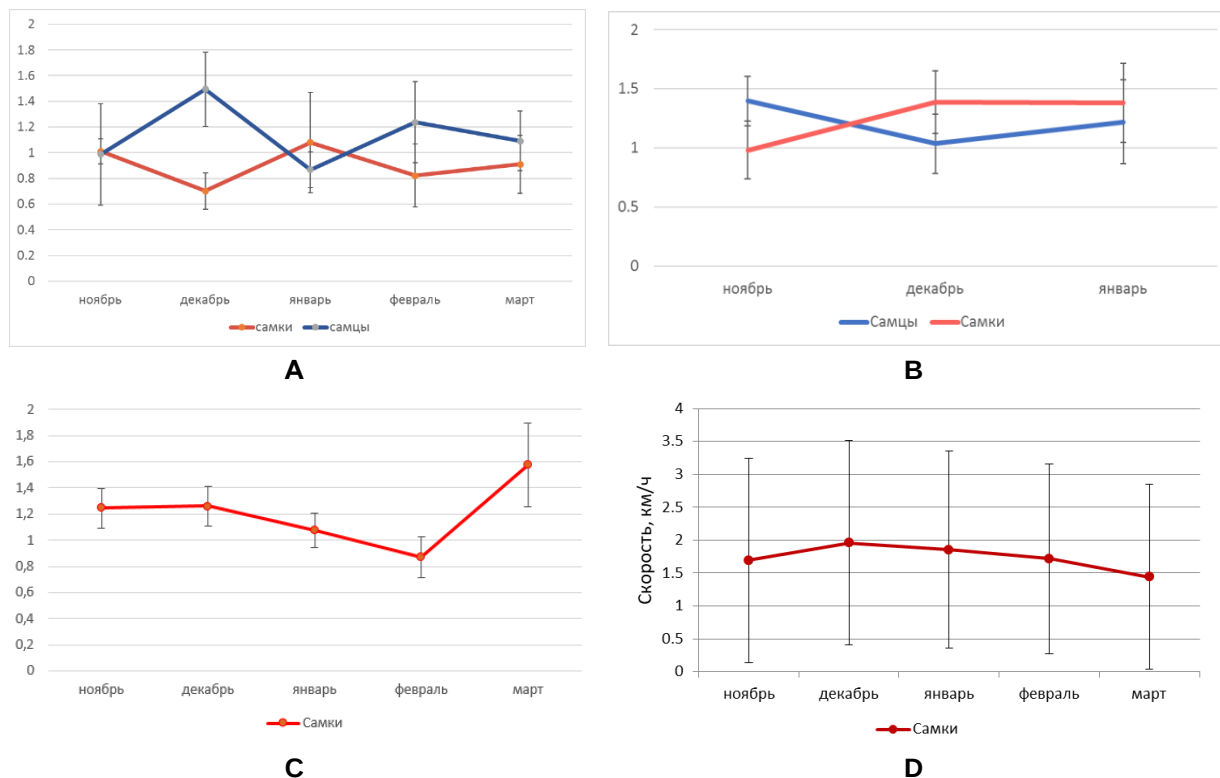
А – помеченных в 2019 году, В – помеченных в 2020 году, С – помеченных в 2022 году, Д – помеченных в 2023 году. По оси X – месяц, по оси Y – пройденное расстояние (км±SD)

Рисунок 5.2.4 Активность перемещений тюленей

Динамика показателей скорости отличается для всех четырех лет мечения, единственное отмеченное сходство – снижение показателей скорости в феврале относительно январских значений для животных, помеченных в 2019, 2022 и 2023 гг. (рисунок 5.2.5) Отсутствие прослеживаемых закономерностей может быть связано с качеством данных для некоторых месяцев – в 2022 г. многие метки не передали ни одной локации, что влияет на размер и качество выборки. Для прослеживания закономерности в изменениях указанных параметров необходим больший временной охват прослеживания, чего можно добиться путем мечения животных в разные сезоны, а не только в осенний период.

Согласно литературным данным, у каспийских тюленей отмечаются меридиональные миграции, которые происходят в весенний и осенний сезоны (Сокольский, 1998; Иванов, Сокольский, 2000; Dmitrieva et al., 2016). Были проанализированы данные, полученные от самок за 2019, 2020, 2022 и 2023 гг. мечения относительно нахождения их на определенной широте (рисунок 5.3.6).

Перемещения самок в 2019 году в основном происходили в пределах северного Каспия – они почти не выходили в средний Каспий. В случаях, если животные регистрировались в среднем Каспии, это происходило только в пределах 43 параллели (рисунок 5.2.6 А). В 2020 году из пяти самок три долго находились в среднем Каспии, а одна самка (№ 207919) уходила вплоть до южного Каспия (рисунок 5.2.6 В). В 2022 году 11 из 18 самок уходили в средний Каспий, и большинство из них проводили в этом регионе суммарно больше месяца (рисунок 5.2.6 С). В 2023 г. 8 из 13 помеченных особей перемещались в средний Каспий (рисунок 5.2.6 D). В 2020 и 2022 г. отмечен заход отдельных особей в южный Каспий за 40 параллель (для декабря 2020 года для самки №197087, для января 2022 года – для самки №238200). В 2023 г., так же, как и в 2020 и 2022 гг., некоторые особи перемещались в южный Каспий (метки №253213 и 253220).



А – помеченных в 2019 году, В – помеченных в 2020 году, С – помеченных в 2022 году; Д – помеченных в 2023 году

Рисунок 5.2.5 Индексы скорости (для 2019 и 2020 гг.) и абсолютное значение скорости (для 2022 и 2023 гг.), км/ч

Широты локаций 2019 г. сильно отличаются от широт 2020, 2022 и 2023 гг. мечения. Данные 2020, 2022 и 2023 гг. мечения имеют сходства относительно заходов отдельных особей в южный Каспий. При этом данные 2020 и 2022 гг. также имеют сходства относительно общего количества времени, которое животные проводили в среднем Каспии (суммарно более месяца для каждого животного, которое регистрировалось в среднем и южном Каспии), в то время как животные, помеченные в 2023 г. и регистрировавшиеся в среднем и южном Каспии, проводили в этих частях акватории не более месяца.

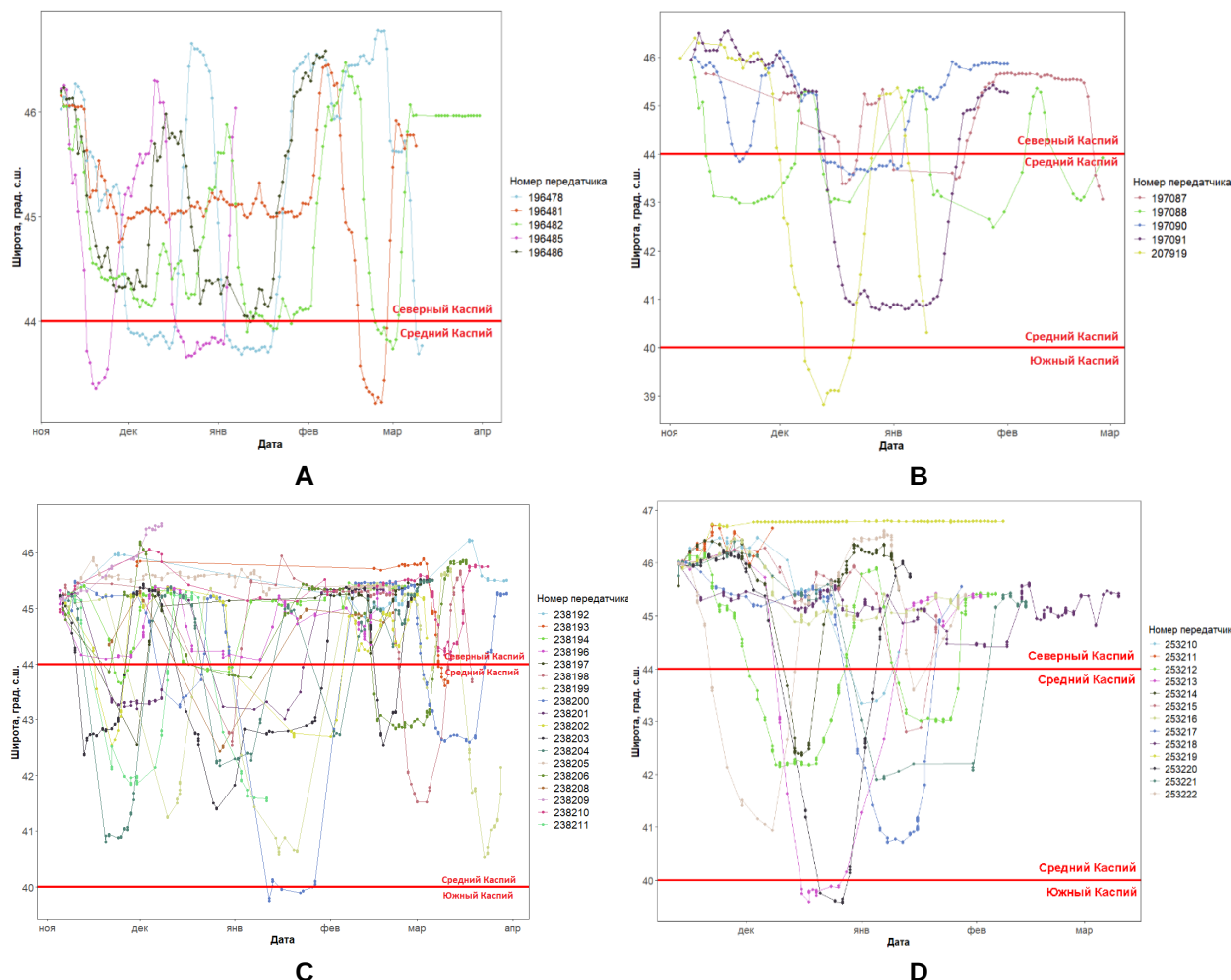
Осенне-зимний сезон 2019 г. сильно отличался по метеорологическим условиям от соответствующих сезонов в 2020, 2022 и 2023 гг., когда зима была более «типична» по метеорологическим характеристикам. Отмеченная разница в меридиональных миграциях может быть связана с формирующимся под воздействием метеорологических условий распределением пищевых объектов тюленей.

Сравнение динамики показателя дистанции животных до берега показано на рисунке 5.2.7.

В 2019 году в ноябре-январе животные больше удалялись от берега, чем в 2020, однако меньше, чем в 2022 г. Для 2023 г. мечения также характерно увеличение показателей расстояния до берега с ноября по январь, однако медианные значения для февраля были ниже, чем для января. В целом, в феврале животные 2019 г. мечения находились ближе к берегу, чем животные в 2020, 2022 и 2023 гг. Для мечения 2020 и 2022 гг. в феврале отмечаются максимальные медианные значения удаленности животных от берега.

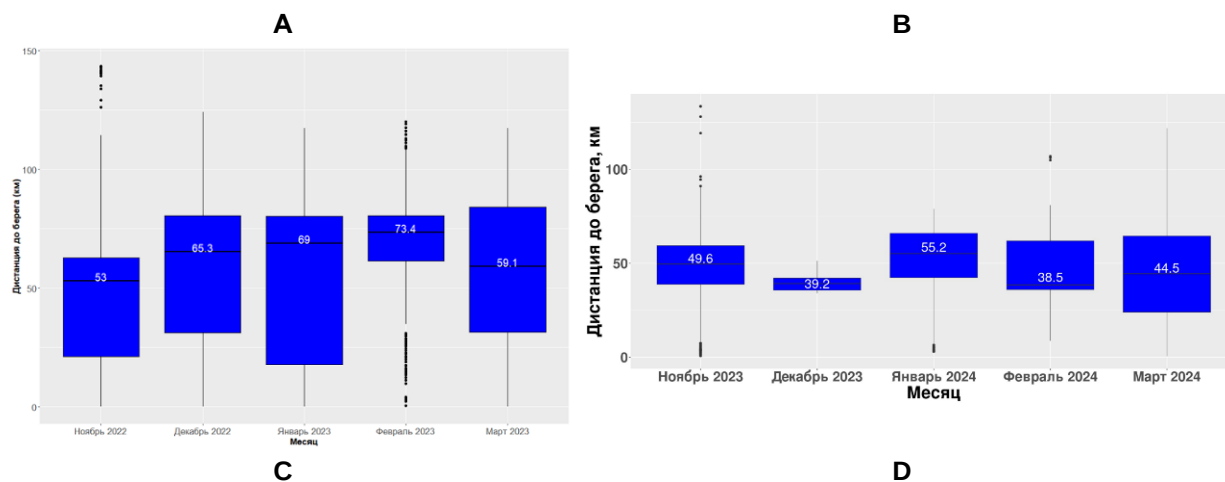
Указанные различия для разных лет могут быть также связаны с особенностями формирования ледовых условий. В 2019 году ледовый покров формировался в основном вблизи береговой линии, в то время как в 2020 и 2022 гг. льдом покрывалась почти вся северная часть Каспийского моря, что и могло обусловить высокие февральские показатели удаленности животных от берега. В 2023 г. же, несмотря на то, что ледовый покров покрывал большую часть северного Каспия, большая его часть на юге распространения была занята ниласом с толщиной меньше 10 см, в то время как участки с максимальной толщиной 10-30 см располагались севернее Тюленьих островов, и, соответственно, ближе к северному побережью Каспия.

Стоит отметить, что для всех рассматриваемых периодов отмечается сильное перекрытие ежемесячных данных, что говорит об отсутствии достоверных различий показателя удаленности по месяцам. Также во всех случаях регистрировались локации в непосредственной близости от береговой линии, что отражает перемещения животных вдоль береговой линии.



А – помеченных в 2019 году, В – помеченных в 2020 году, С – помеченных в 2022 году; D – помеченных в 2023 году

Рисунок 5.2.6 График изменения широты сигналов (1 точка в день), полученных от самок

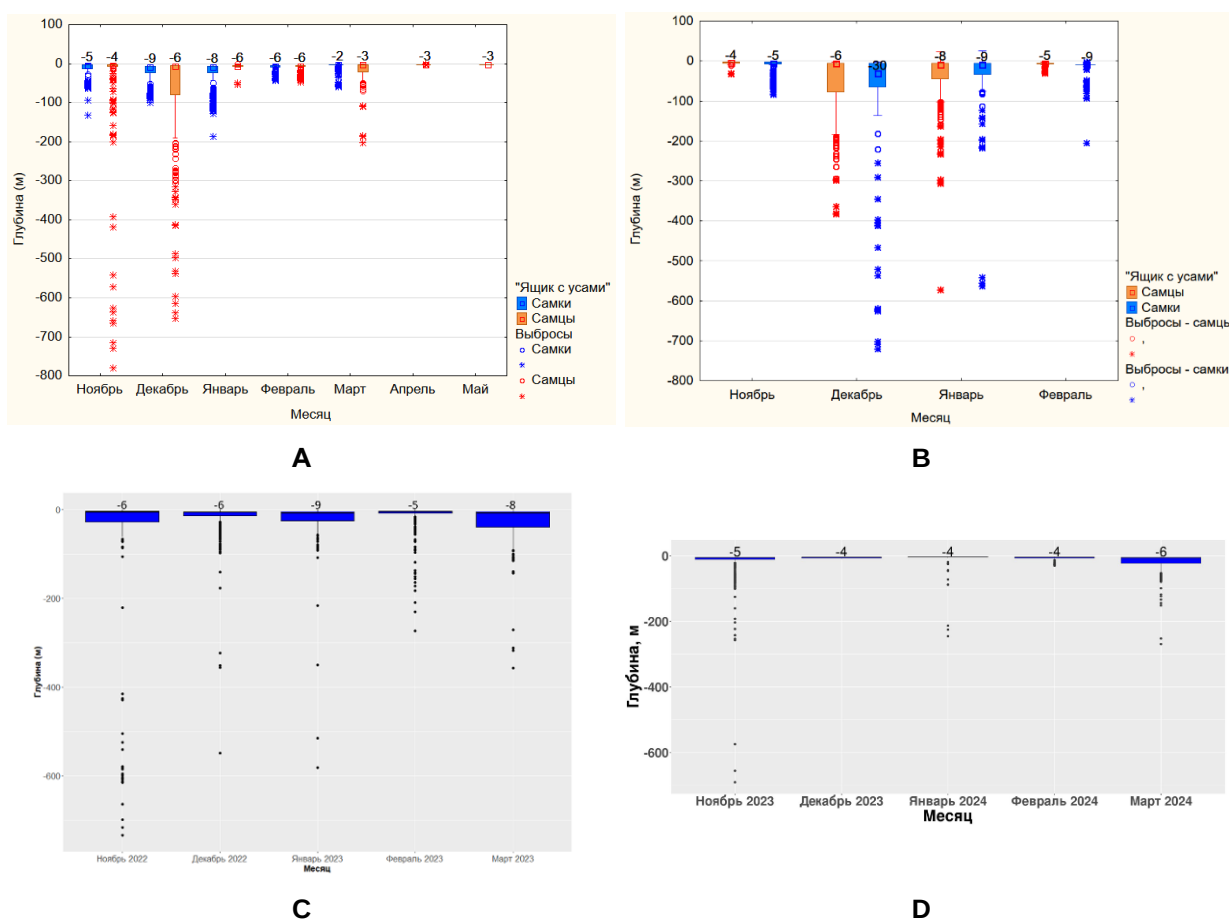


А – мечение 2019 года; В – мечение 2020 года; С – мечение 2022 года; D- мечение 2023 года

Рисунок 5.2.7 Расстояние до береговой линии

Для всех периодов прослеживания большая часть локаций отмечается в пределах изобаты 150 м (рисунок 5.2.8). Это подтверждает другие исследования по распределению каспийского тюленя относительно батиметрических показателей – более 80% всех погружений тюленей, прослеживаемых с 2009 по 2012 г., приходилось на глубины менее 15 м [Dmitrieva et al., 2016].

Небольшие значения батиметрических показателей в локациях тюленей объясняются, прежде всего, нахождением животных в мелководном северном Каспии в течение большей части периода прослеживания. Кроме того, данные показатели также отражают перемещения животных вдоль прибрежных участков акватории. В 2023 г. животные достаточно редко регистрировались в местах с глубинами более 500 метров, а случаи нахождения в акваториях с глубинами 200-500 м имели единичный характер. Это связано с тем, что животные оказываются в глубоководных районах в ходе своих перемещений по акватории Каспийского моря, не задерживаясь в них на длительное время.

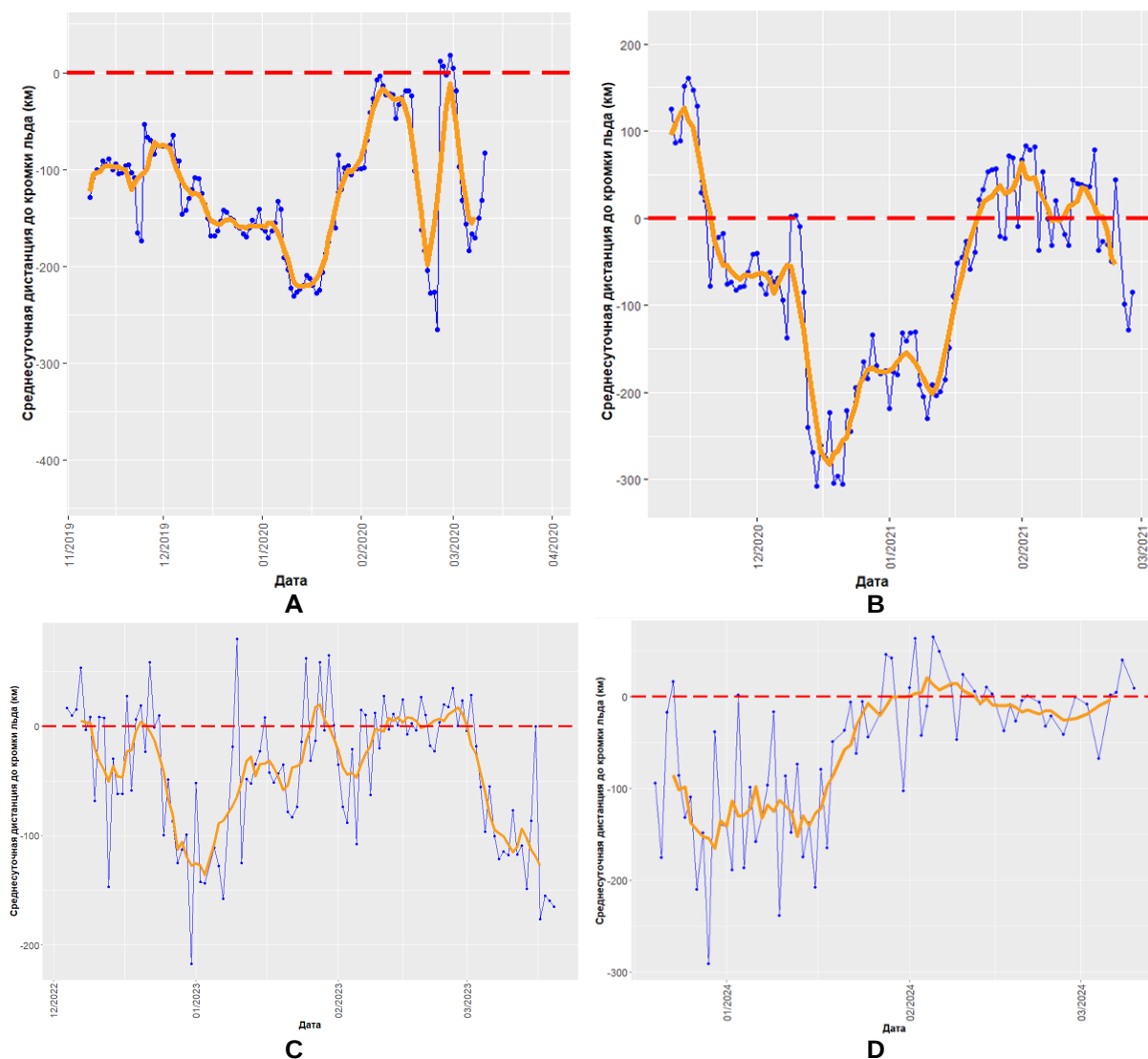


А – мечение 2019 года; В – мечение 2020 года; С – мечение 2022 года; D- мечение 2023 года

Рисунок 5.2.8 Глубины районов обитания по месяцам для самок и самцов

Каспийский тюлень – пагофильный вид, распределение которого тесно связано с параметрами ледовой обстановки. Перемещения половозрелых животных в осенне-зимний период прежде всего обусловлены сроками становления и схода ледового покрова, сплоченностью и толщиной льда, и положением ледовой кромки [Иванов, Соколовский, 2000].

В связи с невозможностью сравнения параметров льда в локациях тюленей в 2022-2023 гг. с параметрами льда в локациях тюленей в 2019 и 2020 гг. (отсутствие метаданных ледового покрова ФГБУ «ААНИИ» с 2022 года), проведено сравнение удаленности локаций тюленей от ледовой кромки. Для сравнения данных о положении тюленей относительно ледовой кромки была использована 7-дневная скользящая средняя (moving average) (рисунок 5.2.9).



А – мечение 2019 года; В – мечение 2020 года; С – мечение 2022 года; D- мечение 2023 года.

Красная пунктирная линия – положение кромки льда.

Положительные значения – нахождение в пределах ледового поля, отрицательные – на открытой воде.

Синяя линия – средние значения для каждой даты.

Оранжевая линия – 7-дневная скользящая средняя.

Рисунок 5.2.9 Расстояние до кромки льда для самок

Значения показателей расстояния до кромки льда для всех периодов прослеживания схожи. За исключением ноября 2020 года во все периоды прослеживания животные практически всегда находились либо на открытой воде, либо вблизи ледовой кромки, не заходя вглубь распространения ледовых полей. Нахождение животных в глубине распространения ледовых полей в ноябре 2020 года, возможно, объясняется тем, что начальные типы льда, формировавшиеся в ноябре 2020 года, не препятствовали перемещению животных внутри ледовых полей.

Динамика перемещений животных относительно ледовой кромки по месяцам также схожа для всех периодов прослеживания – в декабре-середине января животные отдалялись от ледовой кромки, а в феврале, в период размножения тюленей, находились в непосредственной близости от границы распространения льда.

Сходства отмечаются для марта 2020 и 2023 гг., когда животные после долгого пребывания вблизи ледовой кромки затем удалялись от нее на значительные расстояния в районы, свободные ото льда. Отдельно стоит отметить сходство показателей расстояния до кромки льда с конца января до начала марта для мечения 2022 и 2023 гг. – в эти периоды самки

находились в непосредственной близости от ледовой кромки. Указанное сходство можно объяснить тем, что в 2023, как и в 2022 г. абсолютное большинство помеченных особей оказались половозрелыми самками, которые перемещались к ледовой кромке в конце января-феврале для щенки и спаривания.

Полученные данные, а также сравнение данных мечения 2023 г. с данными мечений 2019, 2020, 2022 гг., формируют начальное представление о миграционном поведении каспийского тюленя в осенне-зимний период. Для составления полной картины перемещений каспийского тюленя необходимо дальнейшее мечение животных, в том числе в другие сезоны, что позволит значительно увеличить выборку, верифицировать полученные ранее данные, а также выявить закономерности в перемещениях тюленей не только в осенне-зимний период, но и в другие сезоны года.

5.3. Вирусологические исследования

В результате вирусологического анализа в пробах каспийских тюленей не выявлены нуклеиновые кислоты возбудителей гриппозных (вирусы гриппа А и В), коронавирусных, парамиксовирусных (в т.ч. морбилливируса плотоядных), гепивирусных (гепатит Е), поксвирусных, лиссавирусных, ретровирусных инфекций животных. Продукты ПЦР соответствующие ожидаемым размерам фрагментов генов аденовирусов и герпесвирусов выявлены в пробах носовых смывов собранные в 2023 г. казахстанской части моря, от животных с признаками респираторной инфекции. Полученные данные свидетельствуют о наличии смешанной респираторной инфекций среди исследованной группы животных, вызванные с аденовирусами и герпесвирусами тюленей серотипа 2. Доминирующая роль вирусов в инфекционной патологии требует дополнительных исследований.

В виrome каспийских тюленей нами установлены наличие двух больших групп, состоящих из разных семейств вирусов: первая группа состоит из семейств *Circoviridae* и *Parvoviridae*, связанных с водной экосистемой. Первичными хозяевами этих вирусов являются различные организмы морской среды Каспийского моря. Например, беспозвоночные в случае циркувирусов или насекомые и ракообразные в случае денсовирусов семейства *Parvoviridae*. Следует отметить, что эта группа составляет 72% всего виroma каспийского тюленя. Возможно, они имеют диетическое происхождение. Ко второй группе относятся вирусы млекопитающих: *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Caliciviridae*, *Anelloviridae*, *Adenoviridae*, *Orthomyxoviridae* и *Paramyxoviridae*. Вирусы этой группы потенциально могут вызывать различные патологии у млекопитающих или протекать бессимптомно.

В микробиоме каспийских тюленей были обнаружены таксоны, представляющие 22 типа бактерий, в наборе данных преобладали пять типов: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Fusobacteria*. Установлены сходства профиля микробиома смывов респираторного, алиментарного и урогенитального трактов животных, собранных в 2020-2023 гг. Отмечалось вариация процентных соотношении семейств бактерии, в зависимости от вида образца от каспийского тюленя. Проведенное исследование указывает на необходимость постоянного мониторинга микробиома каспийских тюленей для выявления интродукции клинически значимых бактериальных патогенов в их популяцию. В целом результаты этого исследования обеспечивают хорошую основу для будущих исследований, и способствуют пониманию взаимодействия хозяина и микробов в популяции каспийского тюленя.

Полученные серологические данные дополняют результаты ПЦР-скрининга на наличие вируса гриппа А в пробах тюленей, павших в казахстанской и российской частях моря в конце 2022 г., и косвенно свидетельствует о причастности возбудителя к вспышке эпизоотии гриппозной инфекции среди тюленей с высокой летальностью. антитела к CDV не обнаружены в сыворотках тюленей, собранных в 2020 г., в выявлены до 28% в образцах 2022 г. Одна сыворотка полученный в 2019 г. и две пробы 2023 г. Также были положительными на наличие антител к вирусу чумы плотоядных. Полученные данные свидетельствуют о недавней вспышки узазанных инфекций в популяции этих животных.

По результатам исследований 22 проб фекалий тюленей методами Дарлинга и Щербова яиц гельминтов, в том числе гельминта *Anisakis chupakovi* не выявлено. Отсутствие яиц гельминтов в фекалиях тюленей указывает на малую выборку исследуемого материала или отсутствие инвазированных тюленей в период исследований.

5.4. Микробиологические исследования

Показатели альфа-разнообразия назального микробиома каспийского тюленя указывают на умеренную консервативность и невысокую устойчивость этого сообщества. Это нормально для морских хищников, у которых назальная слизистая обычно заселена небольшим количеством микроорганизмов. Это обуславливает ее уязвимость перед патогенными микробами. Особенно это актуально для особей №1 и №17. Структура назального микробиома на уровне филумов полностью повторяет человеческий [Ramakrishnan et al., 2018] и собачий микробиомы [Horsman et al., 2023]. Однако на родовом уровне включает весьма специфические рода, в том числе *Coenonia* (больше характерная для водоплавающих птиц [Vandamme et al., 1999] и *Thioclava*. Для тюленей такая работа выполняется впервые, поэтому не имеет прямых референсов для сравнения. Типичные для других животных *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Oligella*, *Bergiella* не встречались.

Показатели альфа-разнообразия микробиома ректальной слизи имеют весьма типичные значения. Высокий индекс Шеннона и довольно высокий индекс Симпсона говорят об ненарушенном сообществе с высокой устойчивостью. Структура заднекишечного сообщества тюленей раньше была хорошо описана для: *Phoca vitulina* [Numberger et al., 2016; Pacheco-Sandoval et al., 2019], *Mirounga leonina*, *Hydrurga leptonyx* [Nelson et al., 2012]. Во всех случаях он был представлен четырьмя основными филумами: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria и Fusobacteria. При анализе результатов исследования каспийского тюленя выделено шесть филумов, указанных выше, а также Actinobacteria и Epsilonbacteraeota. Epsilonbacteraeota раньше являлся частью Proteobacteria, поэтому его появление является техническим и ничего не меняет, а вот доминирование Actinobacteria можно считать уникальным свойством каспийского тюленя. Хотя для *Neophocaena phocaenoides* [McLaughlin et al., 2012] и *Cystophora cristata* также было показано доминирование Actinobacteria, хотя и не в такой степени как у каспийского тюленя.

Вызывает большой интерес практически полное отсутствие представителей семейства Enterobacteriaceae, обычно имеющих большое клиническое значение. Это резко отличает каспийского тюленя как от наземных плотоядных [Pilla R and Suchodolski, 2020], так и от морских млекопитающих [Bik et al., 2016; Ley, R. E. et al. 2018; Wan et al., 2018; Sehnal et al., 2021]. Также обращает на себя внимание низкая доля представителей Lactobacillales: как *Lactobacillus*, так и *Streptococcus*.

Показатели альфа-разнообразия микробиома урогенитальной слизи имеют весьма высокие значения. Индексы Шеннона и Симпсона выше, чем в ректальном микробиоме. Однако этот локус еще слабо изучен, поэтому референсы для тюленей отсутствуют. На уровне филумов микробиом имеет много общего с вагинальным микробиомом других животных [Barba et al., 2012]. На урогенитальной слизи практически полностью отсутствуют представители Enterobacteriaceae, *Lactobacillus*.

Анализ бета-разнообразия показывает, что пути колонизации кишечной и вагинальной слизи могут быть близкими. Скорее всего имеет место энтеровагинальный путь. На это указывает и близкая позиция при анализе главных координат (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**) и количество общих ОТЕ (рисунок 5.4.2). Даже несмотря на высокую гетерогенность образцов, назальное сообщество достоверно отличается от урогенитального и ректального (PERMANOVA, $p < 0,05$).

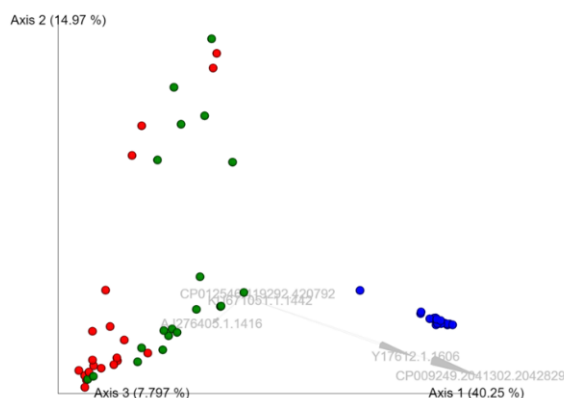


Рисунок 5.4.1 Анализ бета-разнообразия ректального (красный маркер), вагинального (зеленый маркер) и назального (синий маркер) микробиомов каспийского тюленя

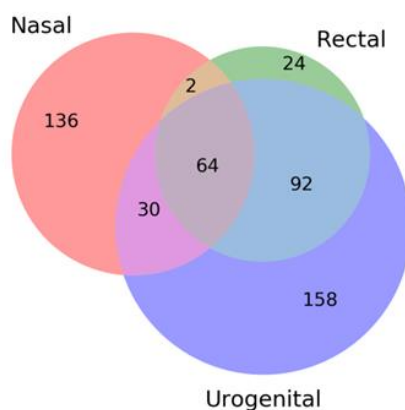


Рисунок 5.4.2 Диаграмма Вена распределения ОТЕ между слизистыми

Для нерп предполагается следующий список факультативных патогенов [Siebert et al., 2001, Sonne et al., 2020]: *Aeromonas* spp., *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli* var. *haemolytica*, *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, α - и β -haemolytic streptococci, *Vibrio anguillarum*. При этом указывалось, что стрептококки являются основными возбудителями заболеваний как минимум для кольчатой нерпы [Bergman, 2007].

У каспийского тюленя стрептококки не входят в число характерных родов, что резко отличает его от большинства животных, в том числе: ластоногих. Также интересно отсутствие кишечной палочки. Другие факультативные патогены семейства Enterobacteriaceae также практически отсутствуют.

Представители Pasteurellaceae и Campylobacteriaceae традиционно считаются факультативными патогенами плотоядных и возбудителями раневых инфекций у человека. У каспийского тюленя представители этих семейств являются облигатными симбионтами и не должны рассматриваться как патогенные.

В микробиоме касийского тюленя присутствуют микроорганизмы, которые ранее выделялись именно у ластоногих животных (тюленей, в том числе обитающих на другом полушарии): *Corynebacterium* (phocae), *Campylobacter* sp., *Porphyromonas* sp., *Guggenheimella* sp., *Bergeyella* sp., *Bisgaardia* (hudsonensis).

Исследование 2023 г. позволило скорректировать данные проекта 2019 и 2022 гг. Структура микробиома была существенно расширена, рассчитаны показатели альфа-разнообразия. Расширение выборки позволило исключить роды: *Peptoniphilus*, *Atopobacter*, *Clostridium*, *Arcanobacterium*, *Salinicoccus*, *Coenonia*, *Gemella*, *Capnocytophaga*, *Bisgaardia* из списка типичных представителей как урогенитальной, так и ректальной микробиоты. Эти микробы хоть и широко представлены у каспийской нерпы, но встречаются менее, чем у 80% особей. При этом *Cardiobacteriaceae* sp., *Ornithobacterium* и *Salimicrobium* вообще встречаются только у единичных особей и не могут характеризовать вид в целом. Напротив, *Campylobacter* и *Fusobacterium* должны быть включены в список типичных представителей урогенитальной микробиоты. Подробная аннотация всех полученных последовательностей позволила дополнительно выявить два неописанных микроорганизма, а также шесть микроорганизмов, которые встречаются только у ластоногих.

5.5. Токсикологические исследования

За все время исследований (2019-2023 гг.) содержание ртути в шерсти определено у 115 особей каспийского тюленя возрастом от нескольких месяцев до 9 лет. Концентрация ртути в шерсти варьировала от 258 мкг/кг до 10285 мкг/кг. Наиболее часто встречались значения между 1000 и 3000 мкг/кг (53% особей) (таблица 5.5-1).

Таблица 5.5-1 Частотное распределение концентраций ртути в шерсти каспийского тюленя

Нг в шерсти, мкг/кг	Частота встречаемости, число особей	Кумулятивная частота встречаемости, число особей	Процент от общего числа	Кумулятивный процент
0–1000	13	13	11	11
1000–2000	29	42	35	36
2000–3000	32	74	28	64
3000–4000	17	91	15	79
4000–5000	11	102	10	89
5000–6000	4	106	3	92
6000–7000	2	108	2	94
7000–8000	3	111	3	97
8000–9000	2	113	2	99
9000–10000	1	115	0.5	99.5
10000–11000	1	115	0.5	100

За период работ (2019-2023 гг.) содержание ртути в вибриссах определено у 102 особей каспийского тюленя. Минимальное значение – 954 мкг/кг, максимальное – 12957 мкг/кг. Наиболее часто встречались концентрации между 2000 и 4000 мкг – у 66 особей (64% от общего числа) (таблица 5.5-2).

Таблица 5.5-2 Частотное распределение концентраций ртути в вибриссах каспийского тюленя

Нг в вибриссах, мкг/кг	Частота встречаемости, число особей	Кумулятивная частота встречаемости, число особей	Процент от общего числа	Кумулятивный процент
0–1000	1	1	1	1
1000–2000	13	14	13	14
2000–3000	30	44	29	43
3000–4000	36	80	35	78
4000–5000	10	90	9	87
5000–6000	7	97	7	94
6000–7000	2	99	2	96
7000–8000	2	101	2	98
8000–9000	0	101	0	98
9000–10000	0	101	0	98
10000–11000	0	101	0	98
11000–12000	0	101	0	98
12000–13000	2	103	2	100

Концентрации ртути в крови определены в 2020, 2022 и 2023 году у 64 особей каспийского тюленя и варьировали от 29 до 350 мкг/л сырой крови. Наиболее часто встречались концентрации в пределах 100–150 мкг/л – 54 особи (84% от общего числа особей) (таблица 5.5-3).

Таблица 5.5-3 Частотное распределение концентраций ртути в крови каспийской нерпы

Нг в крови, мкг/л	Частота встречаемости, число особей	Кумулятивная частота встречаемости, число особей	Процент от общего числа	Кумулятивный процент
0–50	1	1	2	2
50–100	33	34	52	54
100–150	22	56	34	88
150–200	5	61	6	94
200–250	1	62	2	96
250–300	1	63	2	98
300–350	1	64	2	100

Достоверных отличий по концентрации ртути в шерсти, в вибриссах и в крови между нерпами, исследованными в разные годы, не выявлено (K-W (3, n = 115) $H = 5.43$, $p = 0.142$; K-W (2, n = 103) $H = 0.59$, $p = 0.746$) (рисунки 5.5.1-5.5.3). Отсутствие отличий позволяет предположить, что биогеохимические условия, влияющие на миграцию ртути по трофическим сетям Каспийского моря, остаются стабильными год от года.

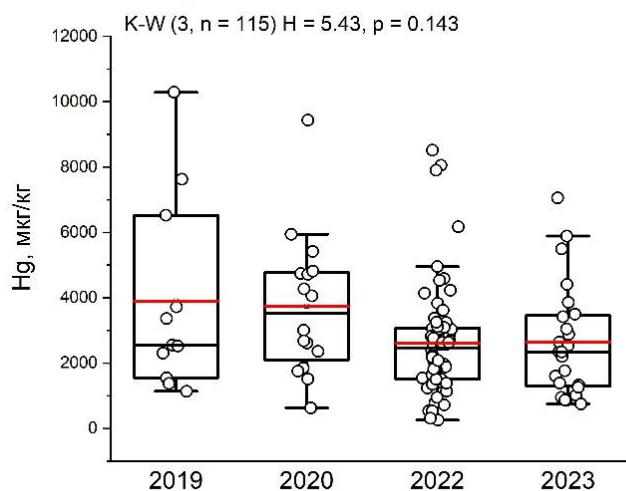


Рисунок 5.5.1 Содержание ртути в шерсти каспийского тюленя в разные годы исследований

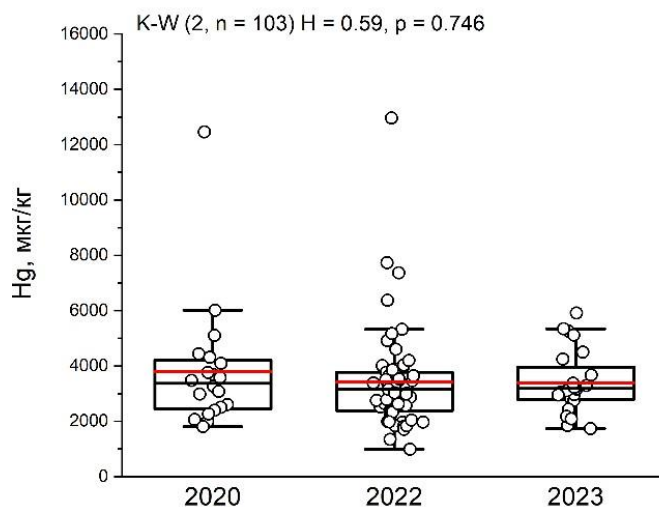


Рисунок 5.5.2 Содержание ртути в вибриссах каспийского тюленя в разные годы исследований

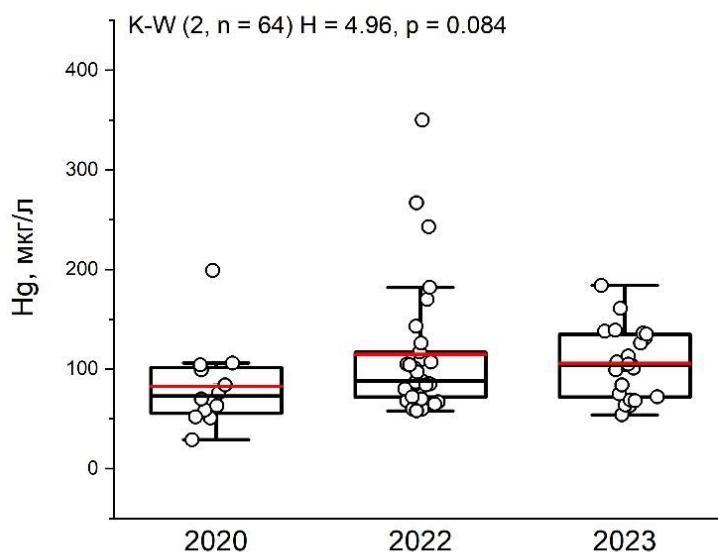


Рисунок 5.5.3 Содержание ртути в крови каспийского тюленя в разные годы исследований

Результаты попарного сравнения концентраций в биоматериалах самцов и самок каспийского тюленя, а также корреляционного анализ приводятся в таблицах (таблицы 5.5-4 – 5.5-5).

Таблица 5.5-4 Результаты попарного сравнения концентраций ртути в биоматериалах каспийского тюленя разного пола (U критерий Манна-Уитни) и коэффициенты корреляции Спирмена между концентрацией ртути в биоматериалах с длиной, массой и возрастом тюленей в разные годы исследований

Годы исследования	2019	2020	2022	2023	Все годы
Ртуть в шерсти					
Отличия между самцами и самками	U = 7 Z = 1.5	U = 21 Z = 0.32	U = 361 Z = 1.3	U = 16 Z = 1.8	U = 1310 Z = 0.9
Длина	0.73	-0.02	0.37	0.78	0.68
Масса	0.77	0.30	0.27	0.79	0.69
Возраст	0.76	0.01	0.34	0.74	0.36
Ртуть в вибриссах					
Отличия между самцами и самками	-	U = 18 Z = 0.71	U = 471 Z = 1.9	U = 20 Z = 1.5	U = 852 Z = 1.9
Длина	-	0.54	-0.17	0.52	0.12
Масса	-	0.17	-0.17	0.48	0.23
Возраст	-	0.03	0.15	0.44	0.23
Ртуть в крови					
Отличия между самцами и самками	-	U = 15 Z = 0.40	U = 48 Z = 0.06	U = 24 Z = 1.1	U = 323 Z = 0.43
Длина	-	0.31	-0.42	-0.22	-0.22
Масса	-	-0.10	-0.48	-0.30	-0.30
Возраст	-	-0.04	-0.19	-0.27	-0.19

Полужирным шрифтом выделены достоверные значения коэффициента корреляции при уровне значимости $p < 0.05$

Таблица 5.5-5 Коэффициенты корреляции Спирмена (RS) между концентрацией ртути в биоматериалах каспийского тюленя в разные годы исследования

Годы исследования	2020	2022	2023	Все годы
Hg в шерсти/Hg вибриссах	0.68	0.57	0.75	0.67
Hg в шерсти/ Hg в крови	0.51	0.33	0.11	0.26
Hg в вибриссах/ Hg в крови	0.31	0.63	0.42	0.47

Концентрации ртути в шерсти каспийского тюленя выше или сопоставимыми с концентрациями ртути в шерсти других видов ластоногих обитающих в РФ (таблица 5.5-6).

Различия концентрации ртути в организме каспийского тюленя по сравнению с другими видами ластоногих могут быть связаны с их предпочитаемыми объектами питания. Повышенные концентрации ртути по сравнению с байкальской могут быть связаны, с тем, что рыбы Каспийского моря содержат больше ртути (60–670 мкг/кг), чем рыбы из оз. Байкал (20–30 мкг/кг) [Пастухов, 2011; Tabatabaie et al., 2011; Manavi and Mazumder, 2018].

Таблица 5.5-6 Уровни содержания ртути в шерсти различных видов ластоногих

Вид	Регион	Возраст	Hg, мкг/кг	Источник
Ртуть в шерсти				
Каспийская нерпа <i>Pusa Caspica</i>	Каспийское море	Взрослые и ювенильные особи	560–3500	Ikemoto at al., 2004
Морской заяц <i>Erignathus barbatus</i>	Россия, Белое Море	Взрослые и ювенильные самцы и самки	540–920	Medvedev et al., 1997
Кольчатая нерпа <i>Phoca hispida hispida</i>			2500–6600	
Пестрая нерпа <i>Phoca largha</i>	Россия, Японское море	ювенильные особи	1520–6680	Trukhin and Kalinchuk, 2018
Байкальская нерпа <i>Phoca sibirica</i>	оз. Байкал	Взрослые и ювенильные особи	640–3740	Пастухов и др. 2011
				Ikemoto at al., 2004
Северный морской котик <i>Callorhinus ursinus</i>	Аляска	Взрослые самки	7840±1780	Beckmen et al., 2002
Обыкновенный тюлень <i>Phoca vitulina</i>	Юго-Запад США	Взрослые самцы и самки	210–19620	McHuron et al., 2012
	Юго-Запад США	Взрослые самцы и самки	5230–144310	Peterson et al., 2016
	Юго-Запад США	Молодые щенки	2800–36900	Van Hooymissen et al., 2015
Сивуч <i>Eumetopias jubatus</i>	Аляска	Особь в возрасте 1-2 года	770–3950	Castellini et al., 2012
	Аляска	Взрослые самки	5400-41020	Peterson et al., 2016
Калифорнийский морской лев	Юго-Запад США	Взрослые самки	5100–21000	Peterson et al., 2016
Ртуть в крови				
Обыкновенный тюлень <i>Phoca vitulina</i>	Побережье Германии	Взрослые и ювенильные самцы и самки	808–2420	Damseaux et al., 2020
Длинномордый тюлень <i>Halichoerus grypus</i>			370–1285	
Обыкновенный тюлень <i>Phoca vitulina</i>	Побережье Шотландии		122–945	
Длинномордый тюлень <i>Halichoerus grypus</i>			179–544	

Анализ содержания ртути в тканях ластоногих, основу рациона которых составляют рыбы и крупные беспозвоночные, служит объективным показателем не только интенсивности поступления металла в водные экосистемы, но и структуры сообществ гидробионтов [Brown et al., 2015; Cipro et al., 2017]. Исследования накопления ртути в шерсти, и вибриссах ластоногих до сих пор немногочисленны. Поэтому определение уровней накопления ртути в этих тканях, а также крови каспийского тюленя необходимо при оценке риска для существования вида.

Результаты исследования концентрации ртути в шерсти каспийской нерпы и немногочисленные литературные данные, позволяют заключить, что для у большинства видов тюленей (в том числе и для каспийского тюленя) отсутствуют межполовые отличия по содержанию ртути в организме.

Сопоставимые между самцами и самками концентрации ртути в исследованных биоматериалах каспийского тюленя подтверждают то, что диета у представителей разного пола одинаковая [Бадамшин, 1948; Ворожцов и др., 1972]. Отсутствие различий между особями на разной стадии половой зрелости свидетельствует, что изменения гормонального фона при различном физиологическом состоянии организма каспийской нерпы не приводит к изменению концентрации ртути в шерсти.

Слабая корреляция между содержанием ртути в шерсти и возрастом, позволяет считать, что в течении жизни отдельной особи ртуть накапливается в организме, что отражается на ее содержании в шерсти сразу после линьки. Возможно, что корреляция между возрастом и содержанием ртути в органах (в первую очередь почках и печени), может быть выражена сильнее, чем между возрастом и содержанием ртути в шерсти.

В 2023 году выявлена значимая положительная корреляция между содержанием ртути в вибриссах и размерами тела. При этом в выборках предыдущих лет такой корреляция не было. По всей видимости корреляция 2023 года связана с нерепрезентативной выборкой и не отражает реальный физиологический эффект.

За референтное значение концентрации ртути в крови человека, выше которой проявляется нейротоксический эффект принято 200 мкг/л [Clarkson and Magos, 2006]. Если допустить что функционирование нервной системы у ластоногих нарушается при такой же концентрации ртути в крови, то из исследуемой выборки в зоне потенциального риска находится 3 особи каспийского тюленя (5%). Это значительно ниже, чем в сопоставимой выборке обыкновенного тюленя с западного побережья США ($n = 36$), где концентрация ртути в крови превышала референтное значение у 28% особей ([an Hoornissen et al., 2015].

По результатам проведенных исследований можно сделать вывод, что в настоящее время уровни поступления ртути в экосистему Каспийского моря не приводят к повышенным концентрациям ртути в биоте.

5.6. Гормональные исследования

Гормональные исследования проводили, используя три различных субстрата: сыворотку крови, волосы и вибриссы животных.

Большинство проб крови были отобраны у половозрелых животных. При этом отбор проб крови проходил в ноябре, что у взрослых самок соответствует периоду беременности. Было выявлено, что уровень прогестерона у взрослых животных был чрезвычайно высок, существенно выше, чем во время более ранних сборов в 2020 и 2021 гг. В 2020 г и 2021 гг. практически все пробы были отобраны у неполовозрелых животных, что и определяло низкий уровень половых гормонов. В 2022 г. большая часть животных была половозрелой и судя по гормональному профилю – беременными.

5.6.1. Межгодовые различия гормонов в раздных половозрастных группах

При анализе межгодовых различий в уровне гормонов животные были разделены на 2 возрастные категории: особи в возрасте от 0 до 3 лет относились к молодым животным, особи 4 лет и старше считались взрослыми.

Количество особей разных половозрастных категорий и статуса беременности за все года исследований представлено в таблице 5.6-1.

Таблица 5.6-1 Количество каспийских тюленей разных половозрастных категорий и статуса наличия беременности в выборках 2019-2023 гг.

Год исследования	Количество молодых самцов	Количество взрослых самцов	Количество молодых самок	Количество взрослых яловых самок	Количество взрослых беременных самок
2019	2 живых, 1 погибший	3	4	0	0
2020	4	2	5	2	0
2022	3 погибших	2 живых, 17 погибших	4 живых, 7 погибших	8 живых, 0 погибших	12 живых, 12 погибших
2023	2	0	5	6	7

Сравнения были проведены во всех группах, кроме взрослых самцов, поскольку их количество в каждый год было недостаточным для статистического анализа.

Сравнение показателей молодых самцов

Было проведено межгодовое сравнение уровней гормонов в крови и волосах у живых молодых самцов 2020 ($n=4$) и 2023 годов ($n=2$). Не выявлено межгодовых различий при сравнении концентраций тестостерона в крови и волосах и прогестерона в волосах молодых самцов ($p>0,05$, тест Манна-Уитни). В 2023 году концентрация кортизола и прогестерона в крови молодых самцов была выше, чем у особей в выборке 2020 года ($p<0,05$, тест Манна-Уитни, рисунки 5.6.1-5.6.2).

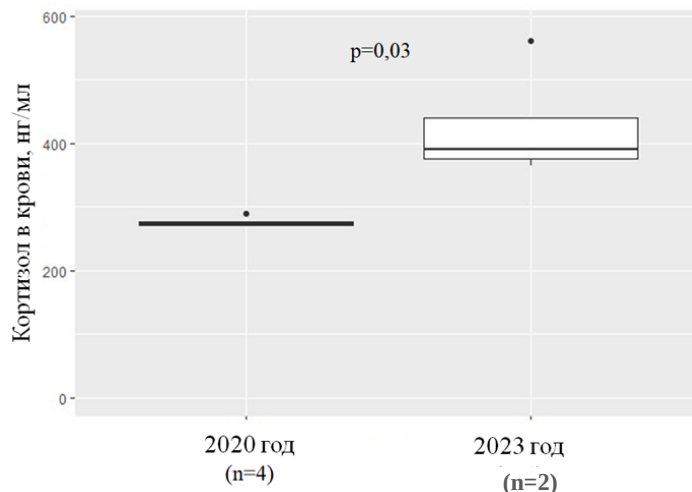


Рисунок 5.6.1 Концентрация кортизола в крови молодых самцов из выборок 2020 и 2023 гг.

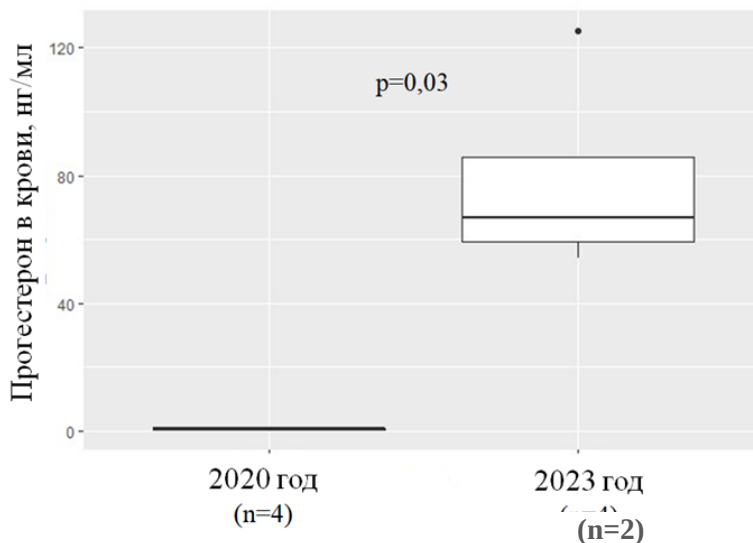


Рисунок 5.6.2 Концентрация прогестерона в крови молодых самцов из выборок 2020 и 2023 гг.

Сравнение показателей молодых самок

Было проведено межгодовое сравнение уровня гормонов в крови и волосах у живых молодых самок 2019 ($n=4$), 2020 ($n=5$), 2022 ($n=4$) и 2023 годов ($n=5$). Не выявлено влияние фактора «год» на уровень тестостерона в крови и волосах, а также кортизола в крови ($p>0,05$, тест Краскела-Уоллиса). Выявлено влияние фактора «год» на концентрацию кортизола в волосах (Kruskal-Wallis chi-squared = 12,532, $df = 3$, $p=0,006$, тест Краскела-Уоллиса) – в 2023 году концентрация кортизола в волосах была выше по сравнению со всеми предыдущими годами ($p<0,05$, тест Манна-Уитни), в 2022 году концентрация кортизола была выше по сравнению с 2019 годом ($W = 0$, $p=0,03$, тест Манна-Уитни, рисунок 5.6.3).

Концентрация прогестерона в крови у молодых самок в 2020 году была ниже по сравнению с 2022 и 2023 годами ($p < 0,05$, тест Манна-Уитни), различий между 2022 и 2023 годами не обнаружено ($W = 9$, $p = 0,41$, тест Манна-Уитни, рисунок 5.6.4). В 2023 году концентрация прогестерона в волосах молодых самок была выше по сравнению с 2022 годом ($W = 2$, $p = 0,04$, тест Манна-Уитни, рисунок 5.6.5).

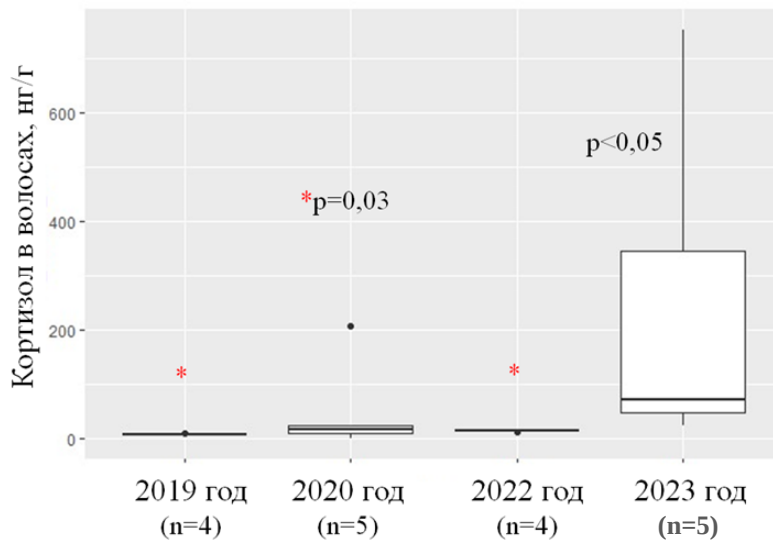


Рисунок 5.6.3 Концентрация кортизола в волосах молодых самок из выборок 2020, 2020 и 2023 гг.

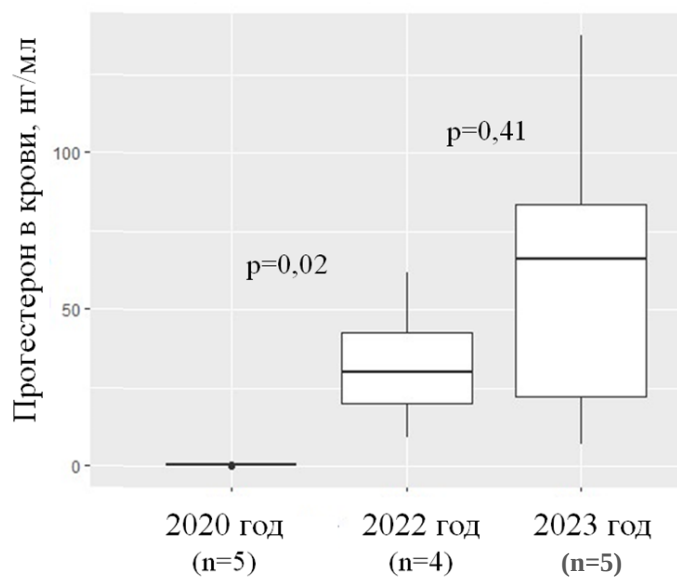


Рисунок 5.6.4 Концентрация прогестерона в крови молодых самок из выборок 2020, 2022 и 2023 гг.

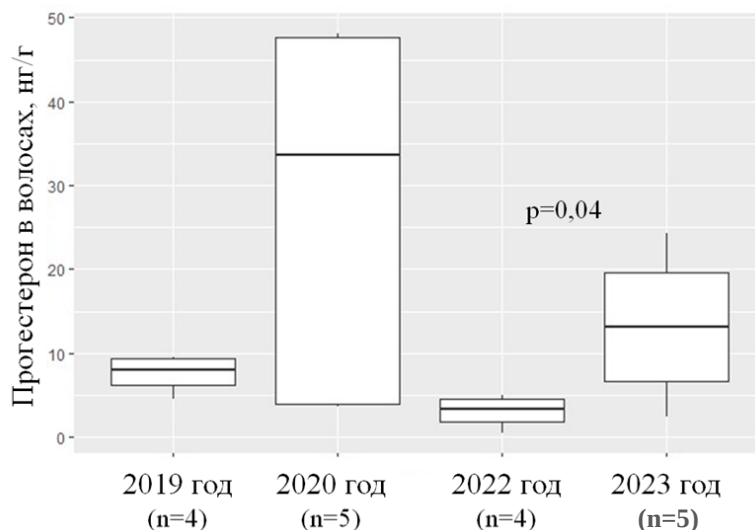


Рисунок 5.6.5 Концентрация прогестерона в волосах молодых самок

Сравнение показателей яловых самок

Было проведено межгодовое сравнение уровня гормонов в крови и в волосах у живых яловых самок 2020 (n=2), 2022 (n=8) и 2023 годов (n=6). Не выявлены межгодовые различия в концентрациях кортизола, тестостерона в крови и волосах яловых самок ($p > 0,05$, тест Манна-Уитни). В 2022 году концентрация прогестерона в крови была выше, чем в 2020 году ($W = 0$, $p = 0,04$, тест Манна-Уитни, рисунок 5.6.6), различий между прогестероном в крови у самок 2022 и 2023 годов не обнаружено ($p > 0,05$, тест Манна-Уитни).

В 2023 году концентрация прогестерона в волосах была выше, чем в 2022 году ($W = 6$, $p = 0,02$, тест Манна-Уитни, рисунок 5.6.7), различия между 2020 и 2022 годом не обнаружены ($p > 0,05$, тест Манна-Уитни).

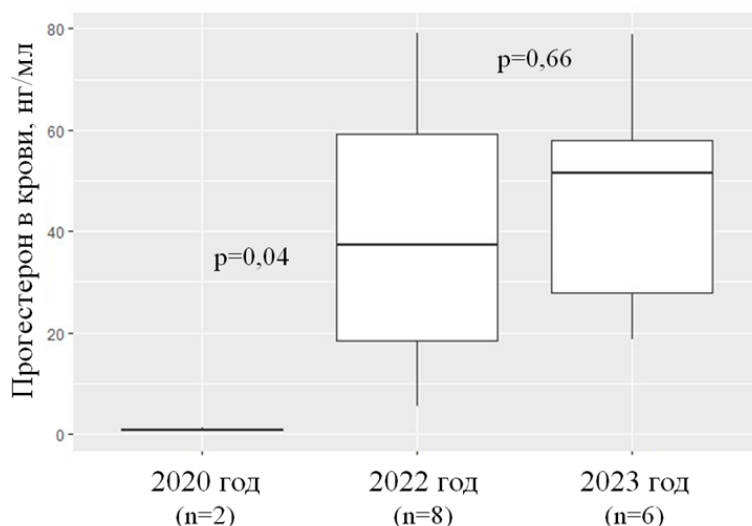


Рисунок 5.6.6 Концентрация прогестерона в крови яловых самок из выборок 2020, 2022 и 2023 гг.

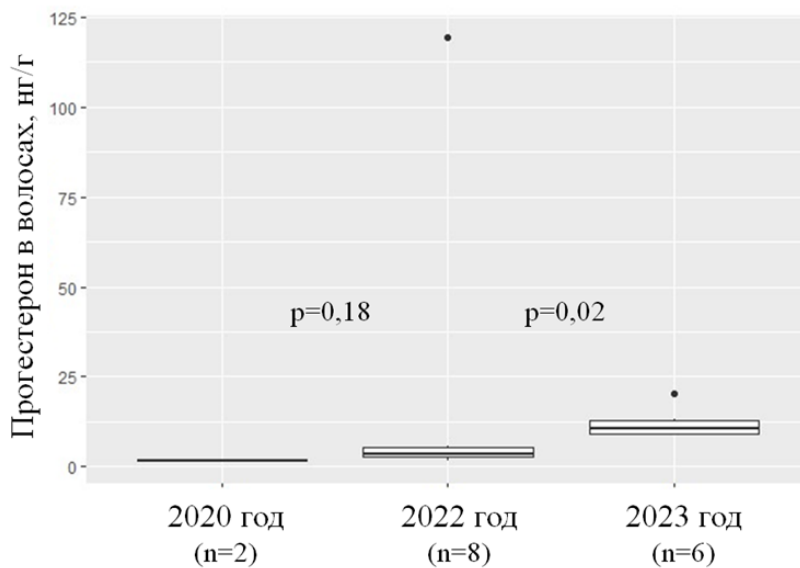


Рисунок 5.6.7 Концентрация прогестерона в волосах яловых самок из выборок 2020, 2022 и 2023 гг.

Сравнение показателей беременных самок

Было проведено межгодовое сравнение уровней гормонов в крови и в волосах у живых беременных самок 2022 (n=12) и 2023 годов (n=7). Не выявлены межгодовые различия в концентрациях кортизола, тестостерона и прогестерона в крови беременных самок ($p > 0,05$, тест Манна-Уитни). В 2023 году у самок выявлена более высокая концентрация кортизола ($W = 18$, $p = 0,045$, тест Манна-Уитни, рисунок 5.5.8) и прогестерона в волосах ($W = 7$, $p < 0,01$, тест Манна-Уитни, рисунок 5.5.9) по сравнению с показателями беременных самок 2022 года.

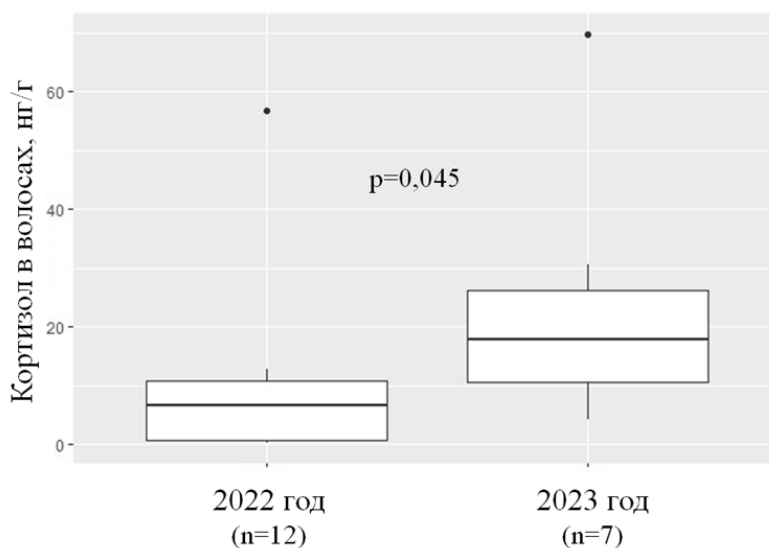


Рисунок 5.6.8 Концентрация кортизола в волосах беременных самок из выборок 2020, 2022 и 2023 гг.

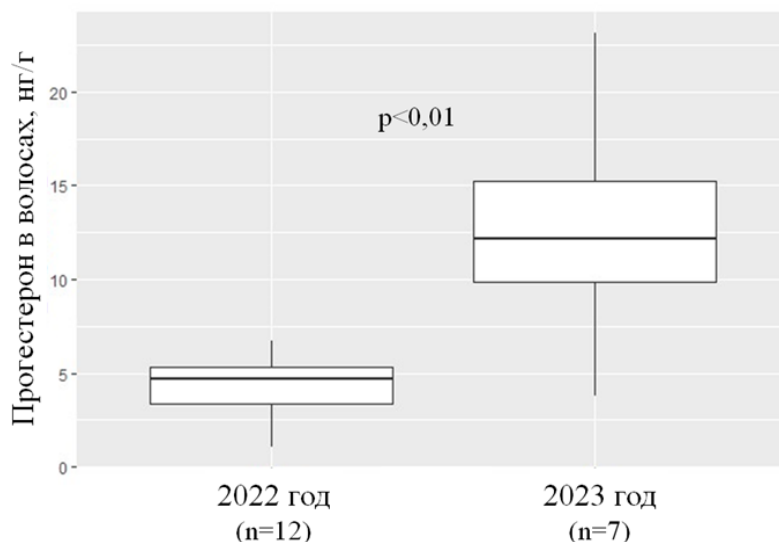


Рисунок 5.6.9 Концентрация прогестерона в волосах беременных самок из выборок 2020, 2022 и 2023 гг

5.6.2. Анализ шерсти разных участков тела

При проведении исследований у каспийского тюленя не было обнаружено статистически значимых различий в концентрациях всех трех гормонов (кортизола, тестостерона и прогестерона) в волосах с холки и области поясницы в выборках 2022 и 2023 гг. Так как возобновление волосяного происхождения не одновременно на всех участках тела тюленей, отсутствие различий в концентрациях кортизола, тестостерона и прогестерона в волосах с разных областей тела может являться свидетельством отсутствия значительной изменчивости в гормональном статусе животных во время линьки.

Несмотря на отсутствие статистически значимых различий в исследуемых выборках, у отдельных особей концентрации гормонов в волосах с разных областей тела различались в 5-20 раз (например, у особи PC23-17 концентрация кортизола в волосах с области поясницы составила 53,59 нг/г, а в области холки – 743,97 нг/г), что затрудняет объединение этих показателей при дальнейшем сравнительном анализе.

5.6.3. Кортизол

Кортизол – глюкокортикоид, который секретируется надпочечниками в результате активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового пути при воздействии на организм стресс-факторов. Комплексное действие глюкокортикоидов на организм является частью механизма адаптации организма к стрессовому воздействию, что позволяет использовать кортизол в качестве показателя благополучия организма.

Концентрации кортизола в крови отражают гормональный статус животного в период сбора материала, однако, интерпретация результатов анализа этого показателя при работе с данными каспийского тюленя затруднена. Продолжительность и амплитуда стрессового ответа часто коррелирует с общим состоянием здоровья животного, наличием хронического стресса [Boonstra et al., 1998; Sapolsky, 1993].

Отсутствие статистически значимых половых и возрастных различий может свидетельствовать о сходной реакции на отлов у особей разных половозрастных категорий. Обнаруженные межгодовые различия в концентрации кортизола в крови молодых самцов могут быть связаны с наличием хронического стресса у особей 2023 году – при наличии хронического стресса может наблюдаться увеличение амплитуды стрессового ответа [Sapolsky, 1993]. Наличие патологии глаз, вероятно, не приводит к возникновению повышенной амплитуды ответа на процесс отлова – концентрации кортизола в крови у большинства особей близки к средним значениям.

В 2023 г. у молодых самок каспийских нерп концентрация кортизола в волосах была выше, чем у взрослых самок, однако в 2022 г. подобная закономерность не прослеживалась (анализ выборов 2019 и 2020 гг. был затруднен из-за малого числа взрослых особей).

Более высокая концентрация кортизола в волосах у молодых животных по сравнению с более взрослыми показана для некоторых млекопитающих, в том числе ластоногих [Keogh et al., 2020], в том числе данная закономерность выявлена для байкальской нерпы (неопубликованные данные). Полученные различия могут быть связаны разной степенью успешности протекания линьки у животных разного возраста.

В характере распределения кортизола в вибриссах тюленей выборки 2023 г. наблюдается увеличение концентрации ближе к дистальному концу вибриссы. Дистальный конец вибриссы вероятно соотносится с периодом линьки. Для молодых животных отмечены более высокие концентрации кортизола в вибриссах по сравнению с взрослыми самками (беременными и яловыми), что согласуется с результатами анализа волос.

Стоит отметить, что в 2022 г. увеличение кортизола в дистальных сегментах было выражено слабее, что может свидетельствовать об увеличении воздействия какого-либо фактора среды на каспийского тюленя в период начала линьки в 2023 г.

У особей из выборки 2023 года наблюдался повышенный уровень кортизола в волосах у молодых самок и беременных особей по сравнению с предыдущими годами. Весной 2023 года, когда эти животные линяли, наблюдалось длительное наличие льдов в акватории моря (лед держался до 27 марта). Это создает благоприятные условия для линьки, поэтому повышенные концентрации кортизола в волосах скорее всего служат косвенным признаком наличия какого-либо дополнительного стрессирующего фактора в этот сезон.

5.6.4. Тестостерон

Тестостерон является половым гормоном группы андрогенов, обладающим широким спектром действия на системы органов организма. Основная его функция – развитие и поддержание функционирования репродуктивной системы самцов. Для млекопитающих с сезонным размножением характерно повышение концентрации тестостерона во время периода спаривания и возвращение к базовому уровню вне периода размножения, что может быть характерно как для самцов, так и для самок [Naidenko et al., 2022].

Отсутствие половых различий в концентрации тестостерона в крови у молодых животных, вероятно, связано с отсутствием половой активности у молодых животных. Повышенная концентрация тестостерона в крови взрослых самок по сравнению с молодыми особями может свидетельствовать о наличии изменчивости тестостерона вне сезона размножения, что требует дальнейших исследований.

Процесс окончания периода спаривания, предшествующий линьке, отражается на концентрациях тестостерона в сегментах вибрисс – в распределении тестостерона наблюдается снижение концентрации гормона от кончиков вибрисс к основанию. Данная закономерность прослеживается как для каспийских нерп выборки 2022 года, для байкальских нерп, а также для ларги (неопубликованные данные). Отсутствие выраженных половых и возрастных различий в концентрации тестостерона в волосах согласуется с результатами анализа вибрисс.

5.6.5. Прогестерон

Прогестерон является половым гормоном, основная функция которого заключается в сохранении и поддержании беременности.

Значение концентрации прогестерона в сыворотке крови может быть показателем наличия беременности у самок многих видов млекопитающих, в том числе ластоногих [Reijnders, 1990; Gardiner et al., 1996; Hall et al., 2020] - в последние несколько месяцев беременности возрастает концентрация прогестерона в крови, что позволяет в этот период отличить беременных самок от яловых. У каспийского тюленя концентрация прогестерона увеличивается на последних сроках беременности, о чем свидетельствует повышенная концентрация половых гормонов в волосах абортированных эмбрионов (данные 2022 года).

В ходе анализа выборки каспийского тюленя 2022 г. были выявлены диапазоны концентраций прогестерона в крови, по которым можно предполагать наличие беременности – при

концентрации больше 200 нг/мл - высокая вероятность беременности самки, от 100 до 200 нг/мл - возможность наличия беременности. В выборке 2023 года у всех самок, определенных по результатам УЗ-диагностики как «беременные» (PC23-01, PC23-07, PC23-11, PC23-13) концентрация прогестерона в крови была выше 100 нг/мл, однако только у одной особи концентрация была выше 200 нг/мл (PC23-13). У трех, определенных по результатам УЗ-диагностики как «вероятно, не беременных» взрослых самок (PC23-04, PC23-06, PC23-08), одного молодого самца (PC23-15) и молодой самки (PC23-16), прогестерон в крови также превышал 100 нг/мл. У одной «вероятно, не беременной» самки концентрация прогестерона превышала 200 нг/мл (PC23-04). Учитывая результаты, полученные в ходе УЗ-диагностики и гормональных исследований, можно заключить, что беременность с большой вероятностью наблюдается у 9 из 13 взрослых самок каспийских нерп (PC23-01, PC23-04, PC23-06, PC23-07, PC23-08, PC23-11, PC23-13).

Основываясь на результатах УЗ-диагностики и концентрации прогестерона в крови были выделены группы беременных и яловых самок в выборках прошлых лет. Процент яловости составил от 0 до 40% в 2022 г. и 52,8% в 2023 г. Отсутствие яловых особей среди погибших самок, обнаружение абортированных эмбрионов и следов прерванной беременности у живых самок в 2022 году и высокий процент яловых самок в обоих выборках живых особей могут свидетельствовать о том, что яловость самок объясняется в основном не низким процентом спаривающихся самок, а высоким риском потерять эмбрион на более поздних стадиях беременности.

Период линьки каспийских нерп совпадает со временем протекания эмбриональной диапаузы у беременных самок, при которой концентрация прогестерона имеет невысокие значения по сравнению с поздними сроками [Reijnders, 1990], что может быть причиной отсутствия возрастных различий в концентрации прогестерона в волосах и равномерного распределения прогестерона вдоль вибрисс взрослых особей, сходного с показателями молодых самцов.

В 2023 году у молодых и взрослых самок наблюдался повышенный уровень прогестерона в волосах по сравнению с 2022 годом. Повышенные уровни прогестерона в крови молодых особей и яловых самок в 2022-2023 года по сравнению с предыдущими годами могут быть связаны с стресс-факторами среды в осенний период (прогестерон является одним из продуктов при синтезе кортизола).

5.6.6. Оценка процентяловости самок

Не выявлены беременные самки в выборках 2019 и 2020 годов (в 2019 г. в выборке была одна взрослая самка, в 2020 – 2 взрослые самки). В 2022 году 12 самок из 20 живых особей (60%) были определены как беременные по концентрации прогестерона в крови, при вскрытии погибших животных у всех 12 взрослых самок был обнаружен плод.

В 2023 году было выявлено 7 беременных самок из 13 взрослых самок (53,8%), у 4 самок наличие плода было подтверждено с помощью УЗ-диагностики. Таким образом, процент яловости в 2022 году составил от 0 до 40%, в 2023 году – 52,8%.

5.7. Серологические исследования

Для выявления серопозитивности каспийских тюленей к различным патогенам, результаты, полученные в 2023 г., сопоставлялись с данными, собранными в 2020 (16 проб, включая 3 пробы 2019 г.), 2021 г (7 проб) и 2022 г. (29 проб) (таблица 5.7-1).

Таблица 5.7-1 Сводные данные по проценту серопозитивности каспийских тюленей к различным патогенам в течение всех лет исследований

Патоген	2019 и 2020 (16 проб)	2021 (7 проб)	2022 (29 проб)	2023 (24 пробы)	ИТОГО (76 проб)	Среднее за 4 года
<i>Toxoplasma gondii</i>	0	0	24	13	13.2	9.2
Вирус простого герпеса	0	29	24	0	11.8	13.2
<i>Trichinella</i> sp.	8	0	0	0	1.3	1.9
Morbillivirus	25	71	83	67	64.5	61.5
Mycoplasma sp.	77	14	17	71	43.4	44.8
<i>Chlamydia</i> sp.	93	71	72	79	76.3	79.0
<i>Candida</i> sp.	92	71	83	92	82.9	84.5

Среди исследованных животных ни одного положительного теста не выявлено только у 4 зверей. Большинство животных было одновременно серопозитивно к 3 патогенам (20 тюленей), чуть меньше – к 2 или 4 патогенам одновременно (по 16 тюленей). Одновременно серопозитивность ко всем 7 патогенам не была выявлена ни у одного тюленя. Максимальное одновременно зарегистрированное количество положительных тестов – к 6 патогенам (у двух тюленей) (рисунок 5.7.1).



Рисунок 5.7.1 Количество животных, серопозитивных к различному числу патогенов

В 2023 году не было выявлено серопозитивных по отношению к *трихинелле* тюленей. Всего за 4 года исследований к серопозитивным по отношению к трихинелле было всего одно животное (в 2019 году) из 76 проанализированных, что составило чуть более 1% как в целом, так и в среднем.

К *вирусу простого герпеса* в 2023 году так же не выявлено серопозитивных животных. Однако в предыдущие годы исследований процент серопозитивности по отношению к этому патогену достигала почти 30%. Всего за 4 года исследований серопозитивными по отношению к данному патогену оказались 9 животных из 76 (11.8% всего, 13.2% в среднем).

К остальным 5 исследованным патогенам в 2023 году выявлялись серопозитивные животные.

Максимальной в 2023 году стала серопозитивность к *кандиде* (92%). В предыдущие годы исследований серопозитивность не была настолько высока, однако никогда не опускалась ниже 70% (рисунок 5.7.2 А). Всего за все годы исследований серопозитивными к кандиде оказались 63 тюленя из 76 (82.9%). В среднем каждый год серопозитивными были 80.2% тюленей.

Вторым по частоте встречаемости патогеном в 2023 году стала *хламидия* (79% исследованных животных). Серопозитивность к хламидии была высока во все годы, не опускалась ниже 71%, а в целом среди всех исследованных животных составила 76,3% (в среднем в год серопозитивными были 79% тюленей) (рисунок 5.7.2 В).

Наиболее интересной была ситуация с серопозитивными животными к *вирусу чумы плотоядных* из группы морбилливирусов (рисунок 5.7.2 С). Всего за четыре года составила 64%, в среднем каждый год выявлялось 61.5% серопозитивных тюленей. В 2023 году она была достаточно высока – 67%, однако, несколько ниже (83%), чем в 2022 г и существенно выше чем в 2020 г (25%). Вообще, доля серопозитивных животных к вирусу чумы плотоядных показывала достаточно четкий тренд: резкое увеличение в 2021 г по сравнению с 2020 г, достижения пика на следующий год и снижения в 2023 г.

Доля серопозитивных животных к микоплазме составила в среднем 45% за четыре года (рисунок 5.7.2 D). В 2023 г доля серопозитивных животных составила 71%, что было существенно выше, чем в два предыдущих года, и была на уровне 2020 г.

Доля серопозитивных животных к токсоплазме была невысока и составляла всего 13% (в среднем – 9.2% в год) (рисунок 5.7.2 E). Вместе с тем, ее совсем не отмечали в два первых года, максимальными значения были в 2022 г, а в 2023 г составляла все те же 13%.

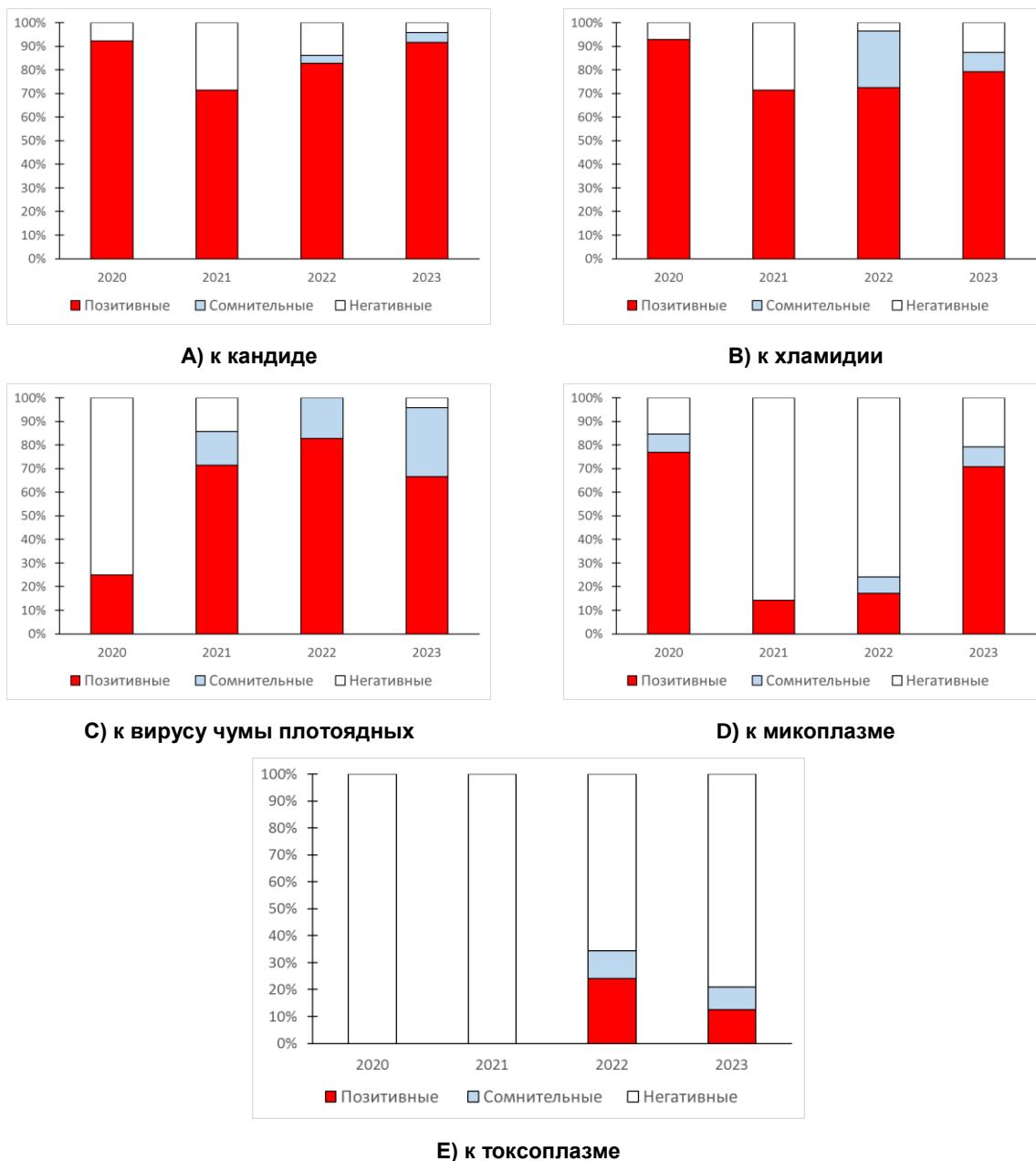


Рисунок 5.7.2 Доля серопозитивных животных

Токсоплазма (*Toxoplasma gondii*) является одним из наиболее широко распространённых паразитов в мире, способным поражать практически все теплокровные организмы. Токсоплазма широко встречается и у морских млекопитающих, в том числе у ластоногих. Предполагалось, что у каспийского тюленя серопозитивность к токсоплазме составляет более 80% [Namroodi et al., 2018]. При этом все взрослые животные имеют антитела к токсоплазме, у животных в возрасте до одного года 60% особей были серопозитивны к этому патогену. Токсоплазмоз может вести к иммуносупрессии хозяев и приводить даже к смерти животных [Greene, 2006]. Серопозитивность к токсоплазме редко превышала 20%, составляя в среднем 13%. По данным казахстанских ученых, по результатам 10-летнего исследования, антитела к токсоплазме выявлены лишь у 2,6% животных [Kudyrmanov et al., 2023].

Морбилливирусы неоднократно рассматривались как причина гибели различных видов ластоногих, в том числе и каспийского тюленя [Pollack et al., 2001; Jo et al., 2019]. Диагностика серопозитивности к различным его формам (вирус чумы плотоядных, вирусу чумы тюленей и морбилливирусу китообразных) крайне затруднена, так как из-за сходства вирусов между собой

вырабатываемые животными антитела обладают большой кросс-реактивностью ко всем трем патогенам. Использованные наборы на определение антител к вирусу чумы плотоядных, обладали кросс-реактивностью и к вирусу чумы тюленей. По-видимому, вирус/вирусы циркулирует в популяции (что подтверждают полученные данные), иногда приводя к массовой гибели животных. Вместе с тем, в ноябре 2022 г у 83% каспийских тюленей были выявлены антитела к морбилливирусу.

Высокий процент серопозитивных животных в 2021 г и еще более высокий осенью 2022 г, говорит о развитии эпизоотии в популяции в этот период, однако, уже в 2023 г отмечено снижение доли серопозитивных животных. Интересно, что в более ранний период серопозитивность каспийских тюленей к CDV была существенно ниже (в 2007-2017 г – 8%). [Kydyrmanov et al., 2023].

Зимой 2022-2023 гг были отмечены случаи массовой гибели тюленей, которые согласно проведенным анализам, не были вызваны вирусными агентами. В этой ситуации становится интересным почему вирус, постоянно встречающийся у каспийских тюленей, приводит к массовой гибели лишь в редких случаях. Возможно, причина еще и в мутациях патогена, как было показано, например, для африканского льва [Nikolin et al., 2017]. Еще одно возможное объяснение – наличие у животных антител после эпизоотии, которая, однако, в отличие от описанной в 2019 г [Jo et al., 2019], не была описана в открытых источниках. Долговременные исследования и регулярные заборы проб, в том числе и ассоциированные с периодами гибели животных позволяют четче оценить ситуацию.

Работы по серопозитивности каспийских тюленей к остальным перечисленным патогенам выполнены впервые (начаты с 2020 г.). Присутствие трихинеллы у ряда ластоногих, в частности кольчатой нерпы, лахтаки и моржа, подтверждается различными авторами [Roth, Madsen 1953]. Поскольку циркулирование трихинеллы в природе связано с потреблением мяса теплокровных животных, то предполагается, что в популяциях, где моржи чаще питаются другими ластоногими уровень трихинеллеза должен быть выше, но доля серопозитивных животных в любом случае была невысока и составляла 0,2-13,5% [Fay, 1960]. Вероятно, все ластоногие, включая моржа, играют важную роль в переносе трихинеллы в экосистемах, в том числе и в заражении человека при их употреблении в пищу. В 2022-2023 гг. каспийских тюленей серопозитивных к трихинелле выявлено не было.

Обнаружение почти у всех животных антител к *Candida sp.* говорит о ее широком распространении в регионе. Кандида, как и микоплазма с хламидией (наиболее распространенные патогены у каспийского тюленя), скорее способствуют ослаблению иммунной системы и увеличивают риск заражения другими патогенами, чем приводят к более тяжелым последствиям для животных. Микоплазму очень часто отмечали у серого и обыкновенного тюленей, в том числе ее присутствие в ротовой полости животных, и как следствие в местах укусов животными друг друга на плавниках и коже [Ayling et al., 2011]. Присутствие *Candida* у каспийских тюленей ранее не описано, но отмечено у других морских млекопитающих, в частности белух.

Мониторинг серопозитивности каспийских тюленей к этим и ряду других патогенов необходим на протяжении ряда лет для оценки уровня благополучия всей популяции, в том числе для оценки факторов, влияющих на ее сезонные изменения.

5.8. Исследования иммунитета

Анализ состояния иммунной системы каспийского тюленя проводился впервые в 2022 г. Показано, что уровень активности системы комплемента (определяемого в тесте убийства бактерий) у каспийских нерп был существенно выше такового у большинства наземных млекопитающих (показатель в среднем составлял 3, что соответствовало титру 8, тогда как у большинства наземных хищников он соответствовал 2 или 4), а также обыкновенного тюленя. Напротив, концентрация иммуноглобулинов G у каспийского тюленя была вдвое ниже, чем у обыкновенных тюленей.

Не выявлено существенных возрастных отличий в большинстве показателей активности иммунной системы, что говорит о том, что у животных уже в возрасте одного года иммунная система полностью сформирована. Вместе с тем, уровень лизоцима в крови полувзрослых и половозрелых животных был существенно выше, чем у молодых. Одной из причин этого может быть протекание беременности у животных двух первых возрастных групп (полувзрослые 4-5

летние животные имели очень высокий уровень тестостерона, что говорит о вероятной беременности). По-видимому, в период беременности лизоцим, как фермент эффективно воздействующий на стенки грамм-положительных бактерий, приобретает чрезвычайно важное значения для успешного вынашивания потомства у нерп.

Таким образом, в целом охарактеризована специфика иммунной системы каспийского тюленя – относительно невысокий уровень иммуноглобулинов (как всех классов, так и IgG), с высокой антибактериальной активностью сывороток (как в тесте убийства бактерий, так и концентраций лизоцима). Эти особенности врожденного иммунитета тюленя, позволяют, по-видимому, успешно противостоять различным патогенам бактериальной природы.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мониторинг состояния популяций морских млекопитающих – одна из важных направлений в экологических исследованиях, как неотъемлемый компонент стратегии сохранения дикой природы и контроля потенциальной угрозы здоровью людей и животных. Морские млекопитающие многих акваторий используются как виды-индикаторы для средне- и долгосрочных наблюдений за изменениями, происходящими во внешней среде [Aguilar, Borrell, 1994].

Каспийский тюлень *Pusa caspica* (Gmelin, 1788) – единственное морское млекопитающее, обитающее в Каспийском море. Эндемик, играет уникальную роль в его экосистеме, являясь замыкающим звеном в трофической цепи каспийской водной экосистемы, обитает во всей акватории моря и потому может считаться видом-индикатором ее состояния.

Казахстанские и Российские территориальные воды Каспия, особенно северная часть, являются наиболее важной зоной для каспийского тюленя. С осени до ранней весны основная часть популяции, совершающая миграции по всему морю, концентрируется на Северном Каспии для одного из значимых этапов жизненного цикла – размножения.

В результате *вирусологического анализа* в 2023 г. в пробах каспийских тюленей не выявлены нуклеиновые кислоты возбудителей гриппозных (вирусы гриппа А и В), коронавирусных, парамиксовирусных (в т.ч. морбилливируса плотоядных), гепивирусных (гепатит Е), поксвирусных, лиссавирусных, ретровирусных инфекций животных. Продукты ПЦР соответствующие ожидаемым размерам фрагментов генов аденовирусов и герпесвирусов выявлены в пробах носовых смывов собранные в 2023 г. казахстанской части моря, от животных с признаками респираторной инфекции. Полученные данные свидетельствуют о наличии смешанной респираторной инфекций среди исследованной группы животных, вызванные с аденовирусами и герпесвирусами тюленей серотипа 2. Доминирующая роль вирусов в инфекционной патологии требует дополнительных исследований.

В виrome каспийских тюленей нами установлены наличие двух больших групп, состоящих из разных семейств вирусов: первая группа состоит из семейств *Circoviridae* и *Parvoviridae*, связанных с водной экосистемой. Первичными хозяевами этих вирусов являются различные организмы морской среды Каспийского моря. Например, беспозвоночные в случае цирковирусов или насекомые и ракообразные в случае денсовирусов семейства *Parvoviridae*. Следует отметить, что эта группа составляет 72% всего вирома каспийского тюленя. Возможно, они имеют диетическое происхождение. Ко второй группе относятся вирусы млекопитающих: *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Caliciviridae*, *Anelloviridae*, *Adenoviridae*, *Orthomyxoviridae* и *Paramyxoviridae*. Вирусы этой группы потенциально могут вызывать различные патологии у млекопитающих или протекать бессимптомно.

В микробиоме каспийских тюленей были обнаружены таксоны, представляющие 22 типа бактерий, в наборе данных преобладали пять типов: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Fusobacteria*. Установлены сходства профиля микробиома смывов респираторного, алиментарного и урогенитального трактов животных, собранных в 2020-2023 гг. Отмечалось вариация процентных соотношении семейств бактерии, в зависимости от вида образца от каспийского тюленя. Проведенное исследование указывает на необходимость постоянного мониторинга микробиома каспийских тюленей для выявления интродукции клинически значимых бактериальных патогенов в их популяцию. В целом результаты этого исследования обеспечивают хорошую основу для будущих исследований, и способствуют пониманию взаимодействия хозяина и микробов в популяции каспийского тюленя.

Полученные серологические данные дополняют результаты ПЦР-скрининга на наличие вируса гриппа А в пробах тюленей, павших в казахстанской и российской частях моря в конце 2022 г., и косвенно свидетельствует о причастности возбудителя к вспышке эпизоотии гриппозной инфекции среди тюленей с высокой летальностью. антитела к CDV не обнаружены в сыворотках тюленей, собранных в 2020 г., в выявлены до 28% в образцах 2022 г. Одна сыворотка полученный в 2019 г. и две пробы 2023 г. Также были положительными на наличие антител к вирусу чумы плотоядных. Полученные данные свидетельствуют о недавней вспышки указанных инфекций в популяции этих животных.

По результатам исследований 22 проб фекалий тюленей методами Дарлинга и Щербовича яиц гельминтов, в том числе гельминта *Anisakis chupakovi* не выявлено. Отсутствие яиц гельминтов в фекалиях тюленей указывает на малую выборку исследуемого материала или отсутствие инвазированных тюленей в период исследований.

Проведена подготовка библиотек из биологических образцов каспийского тюленя для характеристики микробиома респираторного и желудочно-кишечного трактов путем секвенирования гена 16S рибосомальной РНК микрофлоры.

Микробиологические исследования в 2023 г. показали, что микробиом слизистых оболочек каспийского тюленя включает шесть доминантов, которые встречаются только у ластоногих. Ректальный и урогенитальный микробиом лишен эврибионтных микроорганизмов и на 90% состоит из бактерий, которые существуют и у других ластоногих. Назальный микробиом имеет высокую консервативность и устойчивость по сравнению с назальной микробиотой многих других морских млекопитающих, и в норме лишен представителей рода *Streptococcus*.

В ректальном и урогенитальном микробиоме практически полностью отсутствует *Enterobacteriaceae*. В урогенитальном микробиоме практически полностью отсутствуют лактобациллы. Представители *Pasteurellaceae* и *Campylobacteriaceae* являются представителями нормальной микробиоты каспийского тюленя и не могут рассматриваться в качестве патогенов.

Микробиом слизистых каспийского тюленя способен метаболизировать углеводы, липиды и белки. При этом сообщества урогенитальной и ректальной слизистой более склонны к быстрому анаэробному сбраживанию углеводов. Назальный микробиом более склонен к аэробному метаболизму углеводов и жирных кислот по пути цитрата и метилцитрата.

Микробиом кишечника каспийского тюленя не способен к ферментации пищевых полимеров (целюллозы, пектинов, хитина), но способен гидролизовать пептиды и аминокислоты. Таким образом, тюлени не способны усваивать структурные полисахариды водорослей и хитиновые панцири ракообразных.

Невысокая антибиотикорезистентность, не зависящая от локализации слизистой, указывает на то, что животные не испытывают влияние сельскохозяйственных сливов, которые обычно богаты ванкомицином.

Развитая система защита от ксенобиотиков ароматического ряда для всех слизистых косвенно указывает на наличие в воде антропогенных загрязнителей ароматического ряда, на которые реагируют в первую очередь назальный микробиом.

Токсикологические исследования 2023 г. были проведены с целью выявления содержания ртути в крови, шерсти и вибриссах каспийского тюленя.

Концентрация ртути в шерсти варьировала от 258 мкг/кг до 10285 мкг/кг, в вибриссах – от 954 мкг/кг до 12957 мкг/кг, в крови - от 29 до 350 мкг/л. Полученные уровни накопления ртути в организме каспийского тюленя находятся в пределах значений, типичных для других ластоногих как арктических, так и умеренных широт.

Концентрации ртути в биоматериалах каспийской нерпы остаются на одном уровне в течении всего периода исследований, что свидетельствует о стабильности уровней загрязнителей в Каспийском море и отсутствии серьезных поступлений ртути.

Содержание ртути во всех исследованных биоматериалах не зависит от пола тюленей, что свидетельствует об однородном рационе самцов и самок. Концентрация ртути в вибриссах выше чем в шерсти каспийской нерпы, что может быть следствием более длительного срока накопления ртути в вибриссах между их сменой. Концентрации ртути во всех биоматериалах статистически значимо положительно коррелируют между собой.

Концентрация ртути в шерсти и вибриссах постепенно увеличивается с возрастом, однако, остаётся не ясным, связано это с накоплением в организме или особенностями рациона нерп разных возрастов. Для крови установлены отрицательные корреляции с возрастом и размерами тела.

За всё время исследований концентрации ртути выше значений при которых могут возникать нейротоксические нарушения при анализе шерсти отмечены у 11% от общего числа исследованных тюленей, при анализе крови – у 5%. Для большинства исследованных особей концентрации ртути не представляют опасности для здоровья, и по всей видимости, не могут нанести ущерб популяции.

Результаты исследований *гормонального* и *иммунного статуса* каспийского тюленя в 2023 году существенно дополняют более ранние исследования и показывают возможность определения ключевых показателей физиологического состояния животных.

Однако, даже результаты исследований в течение трех лет показывают существенные межгодовые различия, например, в *серопозитивности* животным к отдельным патогенам, позволяя выявлять протекание эпизоотий (например, морбилливируса в 2022 г.). Это показывает необходимость регулярных и мониторинговых исследований каспийского тюленя малоинвазивными методами в различных частях ареала.

Прослеживание животных. Полученные данные в дополнение к данным работ 2019, 2020 и 2022 гг. расширяют представления о миграциях каспийских тюленей. В перемещениях животных наблюдается несколько закономерностей, но выборка, необходимая для понимания всех вариантов миграционного поведения каспийского тюленя, недостаточна.

Основной район обитания тюленей в осенне-зимние месяцы находится в северной части Каспийского моря, хотя отдельные особи уходят в акваторию среднего Каспия и даже достигают южных его районов.

Распределение животных в феврале-марте находится в прямой зависимости от распределения ледового покрова. Зимой 2019-2020 гг., в год с низкой ледовитостью, животные в основном распределялись в восточной части Северного Каспия, близко к береговой линии. В более сыровые зимы 2020-2021 и 2022-2023 гг. лёд закрывал большую часть Северного Каспия и тюлени располагались на его кромке.

Для животных, помеченных в 2023 г., как и для животных, помеченных в 2020 и 2022 гг., характерно более активное по сравнению с мечением 2019 г. использование животными средней части Каспийского моря. Также в эти годы отмечается активное использование восточного побережья Каспийского моря, в то время как для мечения 2019 г. тюлени чаще использовали для перемещений акваторию у западного побережья Каспийского моря.

Проведенные исследования подтверждают наличие «миграционного коридора» в восточной части Каспийского моря у побережья Казахстана, отмеченного ранее в литературе [Dmitrieva et al., 2016].

7. РЕКОМЕНДАЦИИ

Несмотря на возросшее в последние годы количество исследований каспийского тюленя на казахстанской акватории моря, многие аспекты его биологии и экологии остаются неизученными или малоизученными.

Все исследования распределения тюленей последних лет проводились локально. Существующие современные данные о численности и распределении тюленей в зимний и ранне-весенний периоды в КСКМ (периоды щенки и линьки) являются ценной научной информацией, однако отсутствует общее представление о современном распределении тюленей в летний период в Северном Каспии.

Рекомендуемые подходы изучения и совместной обработки получаемых данных.

- Распространение, численность и пути миграции:
 - *Авиаучет по всему Северному Каспию (минимум в течение пяти лет подряд, по 4 сезонам);*
 - *Обследование залежек тюленей дистанционными методами (обследование с помощью дронов, данных ДЗЗ, фотоловушек и др.);*
 - *Продолжение спутникового мечения (изучение маршрутов миграции тюленей в разные сезоны и годы), мечение проводить после полной линьки животных весной и/или осенью;*
 - *Судовые наблюдения по распределению и концентрации тюленей в акватории Каспийского моря в различные сезоны года, по маршрутам движения судов, на участках работы маломерного флота, морских островах и шалыгах;*
 - *Разработка единой ГИС для сбора данных о местах отдыха, нагула и ценных залежках.*
- Популяционная структура:
 - *Генетические исследования (доказать или опровергнуть гипотезу о существовании нескольких субпопуляций каспийского тюленя);*
 - *Демографическая структура популяции (сформировать таблицы зависимости линейных размеров от возраста).*
- Благополучие популяции каспийского тюленя:
 - *Приоритетные задачи вирусологических исследований (выявления интродукции клинически значимых вирусных патогенов, анализ сыворотки крови тюленя на серопозитивность к вирусу чумы плотоядных, токсоплазме, вирусу гриппа А, В, трихинелле, микоплазме, хламидии, пастерелле);*
 - *Паразитологические исследования (полное гельминтологическое вскрытие по К.И. Скрябину (погибших тюленей), исследование фекалий животных, метабаркодирование ДНК образцов фекалий и ректальных смывов);*
 - *Микробиологические исследования (изучение микробиома респираторного и желудочно-кишечного трактов тюленей путем секвенирования 16S рибосомальной РНК микрофлоры);*
 - *Токсикологические исследования (анализ подкожного жира печени, почек и т.п. по следующим компонентам – нефтепродукты, ХОП, ТМ, фенолы, биогены;*
 - *Оценка питания каспийского тюленя (изучение питания тюленей методом анализа экскрементов и анализа жирных кислот в образцах биопсии, собранных малоинвазивными методами);*
 - *Оценка гормонального статуса (разработка метода оценки уровня стресса животного);*
 - *Сбор материалов от живых и погибших тюленей (разработка общего протокола измерений, вскрытия и сбор биоматериала, учет живых и павших животных).*

- Состояние местообитаний каспийского тюленя (оценка качества среды обитания):
 - *Ледовая обстановка и ее динамика (дистанционное зондирование Земли – радиолокационная спутниковая съемка и дешифрирование и анализ космоснимков);*
 - *Залежки тюленей в неледовый период (выявление мест залегания тюленей в безледный период, отслеживание их динамики, создание постоянно обновляемой карты таких мест, внесение этих данных в создаваемую базу ГИС и планирование на перспективу, моделирование пригодности среды обитания для тюленей в безледный период);*
 - *Мониторинг антропогенной нагрузки (мониторинг аварий при нефтедобыче и транспортировке, оценка судового трафика судов, мониторинг загрязнения основных районов нагула и щенки каспийского тюленя);*
 - *Контроль качества воды и донных отложений в Северном Каспии в соответствии с Перечнем определяемых компонентов и показателей окружающей среды, согласно «Правил организации и проведения фоновых экологических исследований при проведении нефтяных операций в КСКМ» [Приказ Министра энергетики РК от 07.09.2015 г. №559].*

8. ЛИТЕРАТУРА

Отчеты:

Оценка численности и распределения каспийского тюленя на казахстанской и российской акватории Северного Каспия. КАПЭ, ВНИРО. – Алматы, 2019. – 146 с.

Исследования каспийского тюленя в акватории Северного Каспия // КАПЭ, ИПЭЭ РАН. – 2020. – 255 с.

Исследования каспийского тюленя в акватории Северного Каспия // КАПЭ, ИПЭЭ РАН. – 2021. – 298 с.

Исследования каспийского тюленя в акватории Северного Каспия // КАПЭ, ИПЭЭ РАН, НПЦ МиВ. РК. – 2023. – 174 с.

Учет каспийского тюленя на акватории Северного Каспия в зимний и весенний периоды 2020 года. КАПЭ, ВНИРО. - Алматы, 2020.- 93 с.

Учет каспийского тюленя на акватории Северного Каспия в зимний и весенний периоды 2021 года. КАПЭ, ВНИРО. - Алматы, 2021.- 81 с.

Учет каспийского тюленя на акватории Северного Каспия в зимний и весенний периоды 2022 года. КАПЭ, ВНИРО. - Алматы, 2022.- 116 с.

Программа исследований каспийского тюленя в акватории Северного Каспия (2019-2023 гг.) // НКОК Н.В., ИПЭЭ РАН, КАПЭ. Нур-Султан – Москва. – 2019. – 44 с.

Noise report. Review of Kashagan Development Underwater Noise Sources and Monitoring in the NE Caspian // KG00-00-000-RS-H-RE-0001-000. - 2010. – 116 p.

Нормативно-правовые и нормативно-технические документы:

Постановление Правительства Республики Казахстан от 9 ноября 2020 года №746 О внесении дополнения в постановление Правительства Республики Казахстан от 31 октября 2006 года №1034 «Об утверждении Перечней редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений и животных».

Постановление Правительства Республики Казахстан от 31 декабря 2004 года № 1469. Об утверждении Правил выдачи разрешений на пользование животным миром.

Приказ Министра сельского хозяйства Республики Казахстан от 10 ноября 2004 года № 652 Об утверждении Правил использования животных, кроме редких и находящихся под угрозой исчезновения, в научных, культурно-просветительских, воспитательных и эстетических целях, в том числе для создания зоологических коллекций.

Экологический кодекс Республики Казахстан № 400-VI г. от 02.01.2021 г.

Стокгольмская конвенция о стойких органических загрязнителях, Стокгольм, 2001.

Боннская конвенция по сохранению мигрирующих видов диких животных // Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals (CMS). - 2003. – 8 с.

Annexes I et II de la Convention sur la conservation des espèces migratrices appartenant à la faune sauvage (CMS), telles qu'amendées par la Conférence des Parties en 1985, 1988, 1991, 1994, 1997, 1999, 2002, 2005, 2008, 2011, 2014 et 2017). - 2018.

Marine Mammal Necropsy: An introductory guide for stranding responders and field biologists. Woods Hole Oceanog. Inst. Tech.Rept. WHOI-2007-06.

Office International des Epizooties (OIE), Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. - Paris, 2000

TITLE IV, Marine Mammal Health and Stranding Response. – 1972.

WHO/CDS/CSR/NCS/ Manual for on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance/ - Geneva, 2002. – P. 15-18.

CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, Boca Raton, Florida: CRC Press, 2018, 3rd ed.

Научная литература:

1. Бадамшин Б.И. О питании каспийского тюленя // Труды Волго-Каспийской научной рыбохозяйственной станции. 1948. Т. 10. С. 129-134.
2. Бизиков В. А., Беляев В. А., Черноок В. И., Сидоров Л.К., Шипулин С.В., Кузнецов В.В., Васильев А.Н., Скольский В.А., Климов Ф.В., Марабаев Е.Н., Ербулеков С.Т., Куанышев Е.К. Оценка численности популяции каспийского тюленя по результатам инструментальных авиаучётов на льдах в северной части Каспийского моря в 2012, 2020 и 2021 гг. / [и др.] // Использование и охрана природных ресурсов в России. – 2021. – № 4(168). – С. 81-93. – EDN CHVTOS
3. Бизиков В.А., Рожнов В.В., Климов Ф.В., Скольский В.А., Шипулин С.В., Сидоров Л.К., Соловьёва М.А. ОПЫТ СОВМЕСТНЫХ РОССИЙСКО-КАЗАХСТАНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПОПУЛЯЦИИ КАСПИЙСКОГО ТЮЛЕНЯ В СЕВЕРНОМ КАСПИИ // Тезисы конференции II Международной научно-практической конференции «Рыбохозяйственный комплекс России: 300 лет российской академической науки», Москва, 26-27 марта 2024 г.
4. Болтнев, А.И., Грачёв, А.И., Жариков, К.А., Забавников, В.Б., Корнев, С.И., Кузнецов В.В., Литовка Д.И., Мясников В.Г., Шафиков И.Н. Ресурсы морских млекопитающих и их промысел в 2013 г. // Труды ВНИРО. Водные биологические ресурсы. 2016. Т. 160. С. 230–249
5. Ворожцов Г. А., Румянцев В.Д., Скларова Г.А., Хураськин Л.С. Питание тюленя в Северном Каспии // Труды ВНИРО. 1972. Т. 89. С. 19–28
6. Кузнецов В.В., Черноок В.И., Шипулин С.В. Оценка численности популяции каспийского тюленя в современный период // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. № 5. 2013. С. 86–91.
7. Касымбеков Е.Т., Карамендин К.О., Кыдырманов А.И. Массовое параллельное секвенирование виroma каспийских тюленей. Современные вызовы для биотехнологии, ветеринарии и медицины: матер. межд. науч.-прак. конф. Гвардейский, 2020. С.204.
8. Касымбеков Е.Т., Карамендин К.О., Кыдырманов А.И. Массовое параллельное секвенирование виroma каспийских тюленей. Современные вызовы для биотехнологии, ветеринарии и медицины: матер. межд. науч.-прак. конф. Гвардейский, 2020.-С.204
9. Кыдырманов А.И., Карамендин К.О., Касымбеков Е.Т., Гудман С. Циркуляция тюленьего герпесвируса PhHV-1 в популяции каспийских тюленей (*Pusa Caspica*). Морские млекопитающие Голарктики // Сборник научных трудов. Москва. Т.1. – 2019 - С.171-173. DOI: 10.35267/978-5-9904294-0-6-2019-1-171-174
10. Найдено С.В., Ерофеева М.Н., 2005. Изменения уровня стероидных гормонов в крови рысьят (*Lynx lynx* L.) в раннем постнатальном онтогенезе. Доклады РАН. Сер. биологич. Т. 400. N 3: С. 423-425
11. Пастухов В.Д. Нерпа Байкала // Новосибирск: Наука, 1993. – 271 с.
12. Пастухов М.В., Эпов В.Н., Чещельский Т., Алиева В.И., Гребенщикова В.И. 2011. Распределение и аккумуляция ртути в байкальской нерпе. Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология и экология», 1, С. 56–66
13. Петрова Е.С., Львов Д.К., Гамбарян А.С., Федякина И.Т., Ямникова С.С., Шилов А.А. Мониторинг за циркуляцией вирусов гриппа А в популяциях диких птиц Северного Каспия. Вопросы вирусологии, 2001. №4. С.39-43
14. Рожнов В. В., В. А. Бизиков, М.-Р.Д. Магомедов, М.А. Соловьёва, С. В. Шипулин, В. В. Кузнецов, И. В. Суворова, Л. К. Сидоров, И. Ф. Белокобыльский, В. В. Проскурина. О гибели каспийских тюленей на дагестанском побережье Каспийского моря осенью 2020 г. и её возможных причинах // ТРУДЫ ВНИРО. 2022 г. Т. 187. С. 87-109
15. Снежинский В. А. Практическая океанография. - Л.: Гидрометеиздат, 1954. 672 с.
16. Сплочённость льда // Морской энциклопедический справочник / Под ред. Н. Н. Исанина. - Ленинград: Судостроение, 1987. - Т. 2. - С. 403. - 520 с.

17. Acker, M., Mastromonaco, G., Schulte-Hostedde, A. I., 2018. The effects of body region, season and external arsenic application on hair cortisol concentration// *Conservation Physiology*. V.6, №16 p.1–9
18. Aguilar A., Borrell A. Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990–1992 Mediterranean epizootic // *Science of the Total Environment*. 1994. V. 154. №. 2. P. 237–247
19. Agusa, T., Nomura, K., Kunito, T., Anan, Y., Iwata, H., Tanabe, S., 2011. Accumulation of trace elements in harp seals (*Phoca groenlandica*) from Pangnirtung in the Baffin Island, Canada. *Marine Pollution Bulletin* 63, 489–499. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.02.022>
20. Anthony, S. J., St Leger, J. A., Liang, E., Hicks, A. L., Sanchez-Leon, M. D., Jain, K., Lefkowitz, J. H., Navarrete-Macias, I., Knowles, N., Goldstein, T., Pugliares, K., Ip, H. S., Rowles, T., & Lipkin, W. I. (2015). Discovery of a Novel Hepatovirus (Phopivirus of Seals) Related to Human Hepatitis A Virus. *mBio*, 6(4), e01180-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01180-15>
21. Ashwell-Erickson, S., Fay, F. H., Elsner, R., Wartzok, D., 1986. Metabolic and hormonal correlates of molting and regeneration of pelage in Alaskan harbor and spotted seals (*Phoca vitulina* and *Phoca largha*) . *Canadian Journal of Zoology*. V.64, №5, p.1086–1094
22. Aubail, A., Teilmann, J., Dietz, R., Rigét, F., Harkonen, T., Karlsson, O., Rosing-Asvid, A., Caurant, F., 2011. Investigation of mercury concentrations in fur of phocid seals using stable isotopes as tracers of trophic levels and geographical regions. *Polar Biol* 34, 1411–1420. <https://doi.org/10.1007/s00300-011-0996-z>
23. . Ausubel F.M. et.al eds. *Current Protocols in Molecular Biology* // Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience. - New York. - 1990. - Vol. 2. - 15 p.
24. Ayling R.D., Bashiruddin S., Davison N.J., Foster G., Dagleish M.P., Nicholas R.A.J., 2011. The Occurrence of *Mycoplasma phocicerebrale*, *Mycoplasma phocidae*, and *Mycoplasma phocirhinis* in Grey and Common Seals (*Halichoerus grypus* and *Phoca vitulina*) in the United Kingdom // *Journal of Wildlife Diseases*, 47(2), 2011, pp. 471–475
25. Barba, M.; Martínez-Boví, R.; Quereda, J.J.; Mocé, M.L.; Plaza-Dávila, M.; Jiménez-Trigos, E.; Gómez-Martín, Á.; González-Torres, P.; Carbonetto, B.; García-Roselló, E. Vaginal Microbiota Is Stable throughout the Estrous Cycle in Arabian Mares. *Animals* 2020, 10, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10112020>
26. Barbara K Linnehan, Sho M Kodera, Sarah M Allard, Erin C Brodie, Celeste Allaband, Rob Knight, Holly L Lutz, Maureen C Carroll, Jennifer M Meegan, Eric D Jensen, Jack A Gilbert, Evaluation of the safety and efficacy of fecal microbiota transplantations in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) using metagenomic sequencing, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 135, Issue 2, February 2024, lxae026, <https://doi.org/10.1093/jambio/lxae026>
27. Basu, N., Scheuhammer, A.M., Bursian, S.J., Elliott, J., Rouvinen-Watt, K., Chan, H.M. 2007. Mink as a sentinel species in environmental health. *Environmental Research* 103, 130–144 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.04.005>
28. Beckmen, K.B., Duffy, L.K., Zhang, X., Pitcher, K.W., 2002. Mercury concentrations in the fur of Steller sea lions and northern fur seals from Alaska. *Marine Pollution Bulletin* 44, 1130–1135. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00167-4](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00167-4)
29. Bergman A. Pathological changes in seals in Swedish waters: the relation to environmental pollution. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden (2007)
30. Bik EM, Costello EK, Switzer AD, Callahan BJ, Holmes SP, Wells RS, Carlin KP, Jensen ED, Venn-Watson S, Relman DA. Marine mammals harbor unique microbiotas shaped by and yet distinct from the sea. *Nat Commun*. 2016 Feb 3;7:10516. doi: 10.1038/ncomms10516
31. Bodewes R., Contreras G.J., Garcia A. R., Hapsari R., van de Bildt, M.W., Kuiken T., Osterhaus AD. Identification of DNA sequences that imply a novel gammaherpesvirus in seals. *Journal of General Virology*. 2015. Vol.96, P.1109-14. doi: 10.1099/vir.0.000029. Epub 2014 Dec 18. PMID: 25524165

32. Bodewes R, Rubio García A, Brasseur SM, Sanchez Conteras GJ, van de Bildt MWG, Koopmans MPG, et al. (2015) Seroprevalence of Antibodies against Seal Influenza A(H10N7) Virus in Harbor Seals and Gray Seals from the Netherlands. PLoS ONE 10(12): e0144899. doi:10.1371/journal.pone.0144899
33. Boonstra, R., Hik, D., Singleton, G. R., Tlnnikov, A., 1998. The impact of predator-induced stress on the snowshoe hare cycle// Ecological Monographs. V.68, №3, p. 371–394.
34. Braune, B., Chételat, J., Amyot, M., Brown, T., Clayden, M., Evans, M., Fisk, A., Gaden, A., Girard, C., Hare, A., Kirk, J., Lehnher, I., Letcher, R., Loseto, L., Macdonald, R., Mann, E., McMeans, B., Muir, D., O'Driscoll, N., Poulain, A., Reimer, K., Stern, G., 2015. Mercury in the marine environment of the Canadian Arctic: Review of recent findings. Science of The Total Environment 509–510, 67–90. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.133>
35. Brookens, T., Harvey, J., Ohara, T., 2007. Trace element concentrations in the Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardii*) in central and northern California. Science of The Total Environment 372, 676–692. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.10.006>
36. Brown, T.M., Fisk, A.T., Wang, X., Ferguson, S.H., Young, B.G., Reimer, K.J., Muir, D.C.G., 2016. Mercury and cadmium in ringed seals in the Canadian Arctic: Influence of location and diet. Science of The Total Environment 545–546, 503–511. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.030>
37. Burnett, T. A., Madureira, A. M. L., Silper, B. F., Nadalin, A., Tahmasbi, A., Veira, D. M., Cerri, R. L. A., 2014. Short communication: Factors affecting hair cortisol concentrations in lactating dairy cows// Journal of Dairy Science. V.97, №12, p. 7685–7690.
38. Callan RJ, Early G, Kida H, Hinshaw VS (1995) The appearance of H3 influenza viruses in seals. Journal of General Virology 76:199 – 203.
39. Castellini, J.M., Rea, L.D., Lieske, C.L., Beckmen, K.B., Fadely, B.S., Maniscalco, J.M., O'Hara, T.M., 2012. Mercury Concentrations in Hair from Neonatal and Juvenile Steller Sea Lions (*Eumetopias jubatus*): Implications Based on Age and Region in this Northern Pacific Marine Sentinel Piscivore. EcoHealth 9, 267–277. <https://doi.org/10.1007/s10393-012-0784-4>
40. Canova R, Budaszewski RF, Weber MN, da Silva MS, Puhl DE, Battisti LO, Soares JF, Wagner PG, Varela APM, Mayer FQ, Canal CW. Spleen and lung virome analysis of South American fur seals (*Arctocephalus australis*) collected on the southern Brazilian coast. Infection, genetics and evolution. 2021 Aug;Vol.92 P:104862. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104862. Epub 2021 Apr 10. PMID: 33848685.
41. Chiappetta CM, Cibulski SP, Lima FES, Varela APM, Amorim DB, Tavares M, Roehe PM. Molecular Detection of Circovirus and Adenovirus in Feces of Fur Seals (*Arctocephalus* spp.). Ecohealth. 2017 Mar; Vol.14(1). P.:69-77. doi: 10.1007/s10393-016-1195-8. Epub 2016 Nov 1. PMID: 27803979; PMCID: PMC7087719.
42. Chomczynski P.; Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. - 1987. - Vol. 162. - P. 156-159.
43. Cipro, C.V.Z., Montone, R.C., Bustamante, P., 2017. Mercury in the ecosystem of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica: Occurrence and trophic distribution. Marine Pollution Bulletin 114, 564–570. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.09.024>
44. Citta J.J., Quakenbush L.T., George J.C., Small R.J., Heide-Jørgensen M.P., Brower H., Adams B., Brower L. (Winter movements of bowhead whales (*Balaena mysticetus*) in the Bering Sea // Arctic. 2012. P. 13–34.
45. Chomczynski P.; Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. - 1987. - Vol. 162. - P. 156-159
46. Clarkson, T.W., Magos, L. 2006. The toxicology of mercury and its chemical compounds. Critical Reviews in Toxicology 36, 609–662 <https://doi.org/10.1080/10408440600845619>
47. Colston, T.J. and Jackson, C.R. (2016) Microbiome evolution along divergent branches of the vertebrate tree of life: what is known and unknown. Mol Ecol 25, 3776–3800. <https://doi.org/10.1111/mec.13730>.

48. Damseaux, F., Siebert, U., Pomeroy, P., Lepoint, G., Das, K., 2020. Habitat and resource segregation of two sympatric seals in the North Sea. *Science of The Total Environment* 142842. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142842>
49. De Benedictis, P. et al. A diagnostic algorithm for detection of antibodies to influenza A viruses in dogs in Italy (2006-2008). *J. Vet Diagn Invest* 22:914-920 (2010)
50. Desforges, J.P., Mikkelsen, B., Dam, M., Rigét, F., Sveegaard, S., Sonne, C., Dietz, R., Basu, N., 2021. Mercury and neurochemical biomarkers in multiple brain regions of five Arctic marine mammals. *NeuroToxicology* 84, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.03.006>
51. Dietz, R., Sonne, C., Basu, N., Braune, B., O'Hara, T., Letcher, R.J., Scheuhammer, T., Andersen, M., Andreasen, C., Andriashek, D., Asmund, G., Aubail, A., Baagøe, H., Born, E.W., Chan, H.M., Derocher, A.E., Grandjean, P., Knott, K., Kirkegaard, M., Krey, A., Lunn, N., Messier, F., Obbard, M., Olsen, M.T., Ostertag, S., Peacock, E., Renzoni, A., Rigét, F.F., Skaare, J.U., Stern, G., Stirling, I., Taylor, M., Wiig, Ø., Wilson, S., Aars, J., 2013. What are the toxicological effects of mercury in Arctic biota? *Science of The Total Environment* 443, 775–790. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.046>
52. Dmitrieva L, Kondakov AA, Oleynikov E, Kydyrmanov A, Karamendin K, et al. Assessment of Caspian Seal By-Catch in an Illegal Fishery Using an Interview-Based Approach. *PLoS One*. 2013;8(6):e67074. Published 2013 Jun 26. doi:10.1371/journal.pone.0067074
53. Dmitrieva, L., Jüssi, M., Jüssi, I., Kasymbekov, Y., Verevkin, M., Baimukanov, M., Wilson, S., & Goodman, S. J. (2016) Individual variation in seasonal movements and foraging strategies of a land-locked, ice-breeding pinniped. *Marine Ecology Progress Series*, 2016, Vol.554. P:241-256. doi: 10.3354/meps11804.
54. Driscoll, C.T., Mason, R.P., Chan, H.M., Jacob, D.J., Pirrone, N., 2013. Mercury as a Global Pollutant: Sources, Pathways, and Effects. *Environ. Sci. Technol.* 47, 4967–4983. <https://doi.org/10.1021/es305071v>
55. Durymanova A.A., Dimov S.K., Kuznetsov V.N., Khuras'kin L.N., Zolotykh S.I., Shestopalov A.M., 2004. Antibodies to Brucella in caspian seals. //Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, i Immunobiologii.
56. Fedak M.A., Anderson S.S., Curry M.G. Attachment of a radio tag to the fur of seals //Journal of Zoology. 1983. V. 200. №. 2. P. 298–300
57. Freitas C., Kovacs K.M., Ims R.A., Fedak M.A., Lydersen C., 2008. Ringed seal post-moulting movement tactics and habitat selection // *Oecologia*. V. 155. № 1. P. 193 – 204
58. Foster, G; Higgins, R; Leclair, D; Korczak, BM; Mikaelian, I; Patterson, IA; Kuhnert, P (December 2011). "Proposal of *Bisgaardia hudsonensis* gen. nov., sp. nov. and an additional genomospecies, isolated from seals, as new members of the family Pasteurellaceae". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61 (Pt 12): 3016–22. doi:10.1099/ijs.0.028027-0
59. Freitas C., Kovacs K.M., Ims R.A., Fedak M.A., Lydersen C., 2008. Ringed seal post-moulting movement tactics and habitat selection // *Oecologia*. V. 155. № 1. P. 193 – 204
60. Gardiner, K.J., Boyd, I.L., Racey, P.A., Reijnders, P.J.H., Thompson, P.M., 1996. Plasma progesterone concentrations measured using an enzyme-linked immunosorbent assay useful for diagnosing pregnancy in harbor seals (*Phoca vitulina*)// *Marine Mammal Science*, №12, p. 265-273
61. Geoghegan JL, Pirotta V, Harvey E, Smith A, Buchmann JP, Ostrowski M, Eden JS, Harcourt R, Holmes EC. Virological Sampling of Inaccessible Wildlife with Drones. *Viruses*. 2018 Jun 2;10(6):300. doi: 10.3390/v10060300.
62. Goodman, S. & Dmitrieva, L. 2016. *Pusa caspica*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T41669A45230700. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T41669A45230700.en>. Downloaded on 12 June 2019.
63. Gong Y., Yang S., Chen G., Chen Y, Huang Y., Ning H., Tsao K. A metagenomics study for the identification of respiratory viruses in mixed clinical specimens: an application of the iterative mapping approach. *Archives of Virology*, 2017. Vol.162, Vol.2003–2012. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3367-4>

64. Gray, R., Canfield, P., Rogers, T., 2008. Trace element analysis in the serum and hair of Antarctic leopard seal, *Hydrurga leptonyx*, and Weddell seal, *Leptonychotes weddellii*. *Science of The Total Environment* 399, 202–215. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.03.039>
65. Greaves, D. K., Hammill, M. O., Eddington, J. D., Pettipas, D., Schreer, J. F., 2004. Growth rate and shedding of vibrissae in the gray seal, *Halichoerus grypus*: A cautionary note for stable isotope diet analysis. *Marine Mammal Science*. V.20, №2, p.296–304
66. Greene C.E., 2006. Infectious diseases of the dog and cat: Elsevier Health Sciences.
67. Green, K.Y., Ando, T., Balayan, M.S., Berke, T., Clarke, I.N., Estes, M.K., Matson, D.O., Nakata, S., Neill, J.D., Studdert, M.J., Thiel, H.J., 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *J. Infect. Dis.* 181, S322–S330
68. Gulland FM, Lowenstine LJ, Lapointe JM, Spraker T, King DP. Herpesvirus infection in stranded Pacific harbor seals of coastal California. *J Wildl Dis.* 1997 Jul;33(3):450-8. doi: 10.7589/0090-3558-33.3.450.
69. Gulyaeva M., Sobolev I., Sharshov K., Kurskaya O., Alekseev A., Shestopalova L., Kovner A., Bi Y., Shi W., Shchelkanov M., Shestopalov A. Characterization of Avian-like Influenza A (H4N6) Virus Isolated from Caspian Seal in 2012. *Virologica Sinica*. 2018 Oct;33(5):449-452. doi: 10.1007/s12250-018-0053-y. Epub 2018 Oct 17.
70. Hale, V. L. et al. Diet versus phylogeny: a comparison of gut microbiota in captive colobine monkey species. *Microb. Ecol.* 75, 515–527. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1041-8> (2018)
71. Hall, A., Hewitt, R., Civil M.A., 2020. Determining pregnancy status in harbour seals using progesterone concentrations in blood and blubber//*General and Comparative Endocrinology*
72. Harkonen T, Backlin BM, Barrett T, Bergman A., Corteyn M., Dietz R., Harding K., Malmsten J., Roos A., Teilmann J. Mass mortality in harbor seals and harbor porpoises caused by an unknown pathogen // *Veterinary Record*. - 2008. – Vol. 162. - P. 555-556. PMID: 18441352
73. History of this Virus. // *Viruses*, 11, 894; doi:10.3390/v11100894
74. Horsman, S., Meler, E., Mikkelsen, D. et al. Nasal microbiota profiles in shelter dogs with dermatological conditions carrying methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus* species. *Sci Rep* 13, 4844 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31385-2>
75. Horvat M., Gibicar D. 2005. Speciation of mercury: Environment, food, clinical, and occupational health. In: *Handbook of Elemental Speciation, Handbook of Elemental Speciation II: Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*, Cornelis R, Crews H, Heurmann K (editors), Sussex (UK): Wiley
76. Ian L. Boyd, W. Don Bowen, Sara J. Iverson. *Marine Mammal Ecology and Conservation: a Handbook of Techniques* // Oxford University press. – 2010. – 449 pp.
77. Ikemoto, T., Kunito, T., Watanabe, I. 2004 Comparison of trace element accumulation in Baikal seals (*Pusa sibirica*), Caspian seals (*Pusa caspica*) and northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). *Environ Pollut* 127, 83–97
78. Ikemoto, T., Kunito, T., Watanabe, I., Yasunaga, G., Baba, N., Miyazaki, N., Petrov, E.A., Tanabe, S., 2004. Comparison of trace element accumulation in Baikal seals (*Pusa sibirica*), Caspian seals (*Pusa caspica*) and northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). *Environmental Pollution* 127, 83–97. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(03\)00251-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00251-3)
79. Jo W.K., Peters M., Kydyrmanov A., van de Bildt M.W.G., Kuiken T., Osterhaus A., Ludlow M., 2019. The Canine Morbillivirus Strain Associated with An Epizootic in Caspian Seals Provides New Insights into the Evolutionary History of this Virus. // *Viruses*, 11, 894; doi:10.3390/v11100894
80. Karamendin K.O., Kydyrmanov A.I., Kasymbekov E.T., Daulbaeva K.D., Sayatov M.Kh., Fereidouni S. Application of massive parallel sequencing for the investigation of wild birds viruses. *Bulletin of National Academy of Sciences of The Republic of Kazakhstan*. 2018, №4, Vol.374. P:13–17. ISSN 2518-1467 (Online), ISSN 1991-3494 (Print)

81. Karpovich, S. A., Skinner, J. P., Kapronczai, L. A., Smith, J. A., Janz, D. M. , 2019. Examination of relationships between stable isotopes and cortisol concentrations along the length of phocid whiskers. *Marine Mammal Science*. V.35, №2, p. 395–415
82. Kehrig, H.A., Hauser-Davis, R.A., Muelbert, M.M.C., Almeida, M.G., Di Benedetto, A.P.M., Rezende, C.E., 2022. Mercury and stable carbon and nitrogen isotopes in the natal Fur of two Antarctic pinniped species. *Chemosphere* 288, 132500. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132500>
83. Kennedy S., Kuiken T., Jepson P., Deaville R., Forsyth M., Barrett T., van De Bildt M., Osterhaus A., Eybatov T., Duck C., Kydyrmanov A., Mitrofanov I., Wilson S. Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2000. Vol.6. №6. P.637-639
84. Keogh M.J., Gastaldi A., Charapata P., Melin S., Fadely B.S., 2020. Stress-related and reproductive hormones in hair from three north Pacific otariid species: Steller sea lions, California sea lions and northern fur seals // *Conservation Physiology*. V. 8. № 1. P. 1–13
85. Kershaw, J. L., Hall, A. J., 2016. Seasonal variation in harbour seal (*Phoca vitulina*) blubber cortisol - A novel indicator of physiological state? *Scientific Reports*. V.6, № 1
86. Kim, M. Cho, H., & Lee, W.Y. (2020). Distinct gut microbiotas between southern elephant seals and Weddell seals of Antarctica. *Journal of Microbiology*, 58(12), 1018–1026. 10.1007/s12275-020-0524-3
87. Kim JE, Tun HM, Bennett DC, Leung FC, Cheng KM. Microbial diversity and metabolic function in duodenum, jejunum and ileum of emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Sci Rep*. 2023 Mar 18;13(1):4488. doi: 10.1038/s41598-023-31684-8
88. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
89. Kuiken T., Kennedy S, Barrett T., van de Bildt M.W.G., Borgsteede F.H., Brew S.D., Codd G.A., Duck C., Deaville R., Eybatov T., Forsyth M.A., Foster G., Jepson P.D., Kydyrmanov A., Mitrofanov I., Ward C.J., Wilson S., and Osterhaus A.D.M.E. The 2000 Canine Distemper Epidemic in Caspian Seals (*Phoca caspica*): Pathology and Analysis of Contributory Factors. *Veterinary Pathology*. 2006, Vol.43. P:321–338
90. Kluge M, Campos FS, Tavares M, de Amorim DB, Valdez FP, Giongo A, et al. (2016) Metagenomic Survey of Viral Diversity Obtained from Feces of Subantarctic and South American Fur Seals. *PLoS ONE* 11(3): e0151921.
91. Kyathanahalli C, Snedden M and Hirsch E (2021) Human Anelloviruses: Prevalence and Clinical Significance During Pregnancy. *Front. Virol*. 1:782886
92. Kydyrmanov A, Karamendin K, Kassymbekov Y, Kumar M, Mazkirat S, Suleimenova S, Baimukanov M, Carr IM and Goodman SJ (2023) Exposure of wild Caspian seals (*Pusa caspica*) to parasites, bacterial and viral pathogens, evaluated via molecular and serological assays. *Frontiers in Marine Science*. Sec. Marine Megafauna, Volume 10 - 2023 doi: 10.3389/fmars.2023.1087997
93. Kydyrmanov A, Karamendin K, Kassymbekov Y, Kumar M, Mazkirat S, Suleimenova S, Baimukanov M, Carr IM and Goodman SJ (2023) Exposure of wild Caspian seals (*Pusa caspica*) to parasites, bacterial and viral pathogens, evaluated via molecular and serological assays. // *Front. Mar. Sci*. 10:1087997. doi: 10.3389/fmars.2023.1087997
94. Kydyrmanov A.I., Karamendin K.O., Kasymbekov E.T. Study of the Caspian seal (*Pusa caspica*) virome. *Морские млекопитающие Голарктики. Сборник научных трудов*. 2023. Москва, стр. 189-193. doi: 10.35267/978-5-9904294-8-1-2023-189-193
95. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, et al.. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* 2013;31:814–21. 10.1038/nbt.2676
96. Ley, R. E. et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320, 1647–1651. <https://doi.org/10.1126/science.1155725> (2008)
97. Li L, Shan T, Wang C, et al. The fecal viral flora of California sea lions. *Journal of Virology*. 2011; Vol.85(19) P.:9909-9917. doi:10.1128/JVI.05026-11

98. Loshchagina J., Tsvey A., Naidenko S., 2018. Baseline and stress-induced corticosterone levels are higher during spring than autumn migration in European robins // *Hormones and behavior* 98: 96-102.
99. Lübcker, N., Reisinger, R. R., Oosthuizen, W. C., Nico De Bruyn, P. J., Van Tonder, A., Pistorius, P. A., Bester, M. N., 2017. Low trophic level diet of juvenile southern elephant seals *Mirounga leonina* from Marion Island: A stable isotope investigation using vibrissal regrowths. *Marine Ecology Progress Series*. V.577 (August 2017), p. 237–250
100. Manavi, P.N., Mazumder, A., 2018. Potential risk of mercury to human health in three species of fish from the southern Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin* 130, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.03.004>
101. Mastromonaco G.F., Gunn K., McCurdy-Adams H., Edwards D.B., Schulte-Hostedde A.I., 2014. Validation and use of hair cortisol as a measure of chronic stress in eastern chipmunks (*Tamias striatus*). // *Conserv. Physiol.* 5; 2(1):cou055. doi: 10.1093/conphys/cou055
102. Mazzaro L.M., Dunn J.L. Descriptive account of long-term health and behavior of two satellite-tagged captive harbor seals *Phoca vitulina* // *Endangered Species Research*. 2009. T. 10. C. 159–163.
103. McHuron, E. A., Walcott, S. M., Zeligs, J., Skrovan, S., Costa, D. P., Reichmuth, C., 2016. Whisker growth dynamics in two North Pacific pinnipeds: Implications for determining foraging ecology from stable isotope analysis. *Marine Ecology Progress Series*. V. 554, p.213–224.
104. McHuron, E.A., Harvey, J.T., Castellini, J.M., O'Hara, T.M., 2012. Hair sampling location in harbor seals (*Phoca vitulina*) affects selenium and mercury concentrations: Implications for study design of trace element determination in pinnipeds. *Marine Pollution Bulletin* 64, 2519–2522. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.08.027>
105. McHuron, E.A., Peterson, S.H., Ackerman, J.T., Melin, S.R., Harris, J.D., Costa, D.P., 2016. Effects of Age, Colony, and Sex on Mercury Concentrations in California Sea Lions. *Arch Environ Contam Toxicol* 70, 46–55. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0201-4>
106. McLaren I. A.. The biology of the ringed seal (*Phoca hispida* Schreber) in the eastern Canadian Arctic// *Bulletin no. 118. Fisheries Research Board of Canada*, Ottawa. – 1958.
107. McLaughlin R.W., Chen M., Zheng J., Zhao Q., Wang D. Analysis of the bacterial diversity in the fecal material of the endangered Yangtze finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*. *Mol. Biol. Rep.* 2012;39:5669–5676. doi: 10.1007/s11033-011-1375-0
108. Medvedev, N., Panichev, N., Hyvarinen, H., 1997. Levels of heavy metals in seals of Lake Ladoga and the White Sea. *Science of The Total Environment* 206, 95–105. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(97\)80001-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(97)80001-0)
109. Meyer, J. S., Novak, M. A., 2012. Minireview: Hair cortisol: A novel biomarker of hypothalamic-pituitary- adrenocortical activity. *Endocrinology*. V.153, №9, p. 4120–4127.
110. Miller, E.A.; Beasley, D.E.; Dunn, R.R.; Archie, E.A. Lactobacilli Dominance and Vaginal pH: Why Is the Human Vaginal Microbiome Unique? *Front. Microbiol.* 2016, 7, 1936.
111. Munusamy Ponnas S, Thiruvengadam K, Tellapragada C, Ambikan AT, Narayanan A, Kathirvel S, Mathayan M, Shankar J, Rajaraman A, Afshan Amanulla M, Dinesha TR, Poongulali S, Saravanan S, Murugavel KG, Swaminathan S, Velu V, Shacklett B, Neogi U, Hanna LE. Deciphering the Role of Mucosal Immune Responses and the Cervicovaginal Microbiome in Resistance to HIV Infection in HIV-Exposed Seronegative (HESN) Women. *Microbiol Spectr.* 2021 Oct 31;9(2):e0047021. doi: 10.1128/Spectrum.00470-21.
112. Murillo-Cisneros, D.A., McHuron, E.A., Zenteno-Savín, T., Castellini, J.M., Field, C.L., O'Hara, T.M., 2022. Fetal mercury concentrations in central California Pacific harbor seals: Associated drivers and outcomes. *Science of The Total Environment* 820, 153246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153246>
113. Naidenko S.V., Alekseeva G.S., Klyuchnikova P.S., Erofeeva M.N.. Application of felid hair for non-invasive tracking of animal reproductive status and adrenal activity // *Animals* 2022. – 2022. - Vol. 12, № 2792

114. Namroodi S., Shirazi A.S., Khaleghi S.R., Mills J.N., Kheirabady V., 2018. Frequency of exposure of endangered Caspian seals to Canine distemper virus, *Leptospira interrogans*, and *Toxoplasma gondii*. // PLoS ONE 13(4): e0196070
115. Nelson T.M., Rogers T.L., Carlini A.R., Brown M.V. Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: A comparison of wild and captive animals. *Environ. Microbiol.* 2012;15:1132–1145. doi: 10.1111/1462-2920.12022
116. Nelson, T.M., Rogers, T.L. & Brown, M.V. (2013). The gut bacterial community of mammals from marine and terrestrial habitats. *PLoS One*, 8(12), e83655. 10.1371/journal.pone.0083655
117. Ng T.F., Suedmeyer W.K., Wheeler E., Gulland F., Breitbart M. Novel anellovirus discovered from a mortality event of captive California sea lions. *Journal of General Virology*. 2009. Vol.90, P.:1256-61.
118. Ng T.F., Wheeler E., Greig P., Waltzek T.B., Gulland F., Breitbart M. Metagenomic identification of a novel anellovirus in Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsii*) lung samples and its detection in samples from multiple years. *Journal of General Virology*. 2011. Vol.92. P.:1318-1323
119. Nikolin, V.M.; Olarte-Castillo, X.A.; Osterrieder, N.; Hofer, H.; Dubovi, E.; Mazzoni, C.J.; Brunner, E.; Goller, K.V.; Fyumagwa, R.D.; Moehlman, P.D.; et al. Canine distemper virus in the Serengeti ecosystem: Molecular adaptation to different carnivore species. *Mol. Ecol.* 2017, 26, 2111–2130
120. Noël, M., Jeffries, S., Lambourn, D.M., Telmer, K., Macdonald, R., Ross, P.S., 2016. Mercury Accumulation in Harbour Seals from the Northeastern Pacific Ocean: The Role of Transplacental Transfer, Lactation, Age and Location. *Arch Environ Contam Toxicol* 70, 56–66. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0193-0>
121. Nollens, H., Wellehan J., Archer L., Lowenstine L., Gulland F. Detection of a respiratory coronavirus from tissues archived during a pneumonia epizootic in free ranging Pacific harbor seals *Phoca vitulina richardsii*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2010. Vol. 90. P.113-120
122. Numberger D., Herlemann D.P.R., Jürgens K., Dehnhardt G., Schulz-Vogt H. Comparative analysis of the fecal bacterial community of five harbor seals (*Phoca vitulina*) *Microbiology*. 2016;5:782–792. doi: 10.1002/mbo3.369
123. Ohishi K., Ninomiya A., Kida H., Park C., Maruyama T., Arai T., Katsumata E., Tobayama T., Boltunov A., Khuraskin L., Miyazaki N. Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (*Phoca caspica*). *Microbiology and Immunology*. 2002. Vol.46(9). P. 639-44. PMID:12437032
124. Ohishi K., Abe E., Amano A., Miyazaki N., Boltunov A., Katsumata E., Maruyama T., 2018. Detection of serum antibodies to Brucella in Russian aquatic mammals. // *J Vet Med Sci. Nov*; 80(11): 1696–1701
125. Oliveira, C.S., Nogara, P.A., Ardisson-Araújo, D.M.P., Aschner, M., Rocha, J.B.T., Dórea, J.G., 2018. Neurodevelopmental Effects of Mercury, in: *Advances in Neurotoxicology*. Elsevier, pp. 27–86. <https://doi.org/10.1016/bs.ant.2018.03.005>
126. Pacheco-Sandoval, A., Schramm, Y., Heckel, G., Brassea-Pérez, E., Martínez-Porchas, M., and Lago-Lestón, A. (2019). The Pacific harbor seal gut microbiota in Mexico: its relationship with diet and functional inferences. *PLoS One* 14:221770. doi: 10.1371/journal.pone.0221770
127. Palacios G., Wellehan J., Raverty S., Bussetti A., Hui J., Savji N., Nollens H., Lambourn D., Celone C., Hutchison S., Calisher C., Nielsen O., Lipkin W. Discovery of an orthoreovirus in the aborted fetus of a Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*). *Journal of General Virology*, 2011. Vol. 92.P. 2549-57
128. Payungporn S., Phakdeewirot P., Chutinimitkul S. et al. Single-Step Multiplex Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for Influenza A Virus Subtype H5N1 Detection // *Viral Immunology*. - 2004. - Vol. 17. – P. 588-593
129. Peterson, S.H., McHuron, E.A., Kennedy, S.N., Ackerman, J.T., Rea, L.D., Castellini, J.M., O'Hara, T.M., Costa, D.P., 2016. Evaluating Hair as a Predictor of Blood Mercury: The Influence of Ontogenetic Phase and Life History in Pinnipeds. *Arch Environ Contam Toxicol* 70, 28–45. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0174-3>

130. Pilla R and Suchodolski JS (2020) The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Front. Vet. Sci.* 6:498. doi: 10.3389/fvets.2019.00498
131. Pilsner, J.R., Lazarus, A.L., Nam, D.H., Letcher, R.J., Sonne, C., Dietz, R., Basu, N. 2010. Mercury-associated DNA hypomethylation in polar bear brains via the LUMInometric Methylation Assay: a sensitive method to study epigenetics in wildlife. *Molecular Ecology* 19, 307–314
132. Pollack J.D., 2001. Caspian seal die-off is caused by canine distemper virus. //TRENDS in Microbiology Vol.9 No.3. P. 108.
133. Powell R.A., 2000. Animal home ranges and territories and home range estimators // *Research Techniques in Animal Ecology*. N.Y.: Columbia University Press. 442 p.
134. Powell R.A., 2000. Animal home ranges and territories and home range estimators // *Research Techniques in Animal Ecology*. N.Y.: Columbia University Press. 442 p.
135. QIAamp® Viral RNA Vini Handbook 12/2005. – 43 p. <http://www.qiagen.com>
136. R Development Core Team, 2011. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. www.r-project.org
137. Ramakrishnan VR, Holt J, Nelson LF, Ir D, Robertson CE, Frank DN. Determinants of the Nasal Microbiome: Pilot Study of Effects of Intranasal Medication Use. *Allergy & Rhinology*. 2018;9. doi:10.1177/2152656718789519
138. Rea, L.D., Castellini, J.M., Avery, J.P., Fadely, B.S., Burkanov, V.N., Rehberg, M.J., O'Hara, T.M., 2020. Regional variations and drivers of mercury and selenium concentrations in Steller sea lions. *Science of The Total Environment* 744, 140787. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140787>
139. Rea, L.D., Christ, A.M., Hayden, A.B., Stegall, V.K., Farley, S.D., Stricker, C.A., Mellish, J.-A.E., Maniscalco, J.M., Waite, J.N., Burkanov, V.N., Pitcher, K.W., 2015. Age-specific vibrissae growth rates: A tool for determining the timing of ecologically important events in Steller sea lions. *Mar Mam Sci* 31, 1213–1233. <https://doi.org/10.1111/mms.12221>
140. Reijnders, P.J.H., 1990. Progesterone and Estradiol-17-Beta concentration profiles throughout the reproductive cycle in harbor seals (*Phoca vitulina*)// *Journal of Reproduction and Fertility*, №90, p. 403-409
141. Rosario K, Schenck RO, Harbeitner RC, Lawler SN and Breitbart M (2015) Novel circular single-stranded DNA viruses identified in marine invertebrates reveal high sequence diversity and consistent Predicted intrinsic disorder patterns within putative structural proteins. *Front. Microbiol.* 6:696. doi:10.3389/fmicb.2015.00696
142. Ryg M., Oritsland N. A.. Estimates of energy expenditure and energy consumption of ringed seals (*Phoca hispida*) throughout the year// *Polar Research*. – 1991. Vol. 10.
143. Sapolsky, R. M., 1993. *Endocrinology alfresco: Psychoendocrine studies of wild baboons* Recent Progress in Hormone Research// ACADEMIC PRESS, INC., V. 48., p. 437–468- P.595–602
144. Scheuhammer A. M., Meyer M. W., Sandheinrich M. B., Murray M. W. Effects of Environmental Methylmercury on the health of wild birds, mammals, and fish//*Ambio*. 2007. Vol. 36, № 1. P. 12 - 18.
145. Sehnal L, Brammer-Robbins E, Wormington AM, Blaha L, Bisesi J, Larkin I, Martyniuk CJ, Simonin M, Adamovsky O (2021) Microbiome Composition and Function in Aquatic Vertebrates: Small Organisms Making Big Impacts on Aquatic Animal Health. *Front Microbiol* 12:567408. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.567408>
146. Selin, N.E., 2009. Global Biogeochemical Cycling of Mercury: A Review. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 34, 43–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.environ.051308.084314>
147. Shaw SD (2002) An investigation of persistent organic pollutants (POP's) and heavy metals in tissues of harbor seals and grey seals in the Gulf of Maine. Final report to the Maine Department of Env. Protection pp 1-17
148. Sheriff, M. J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., Boonstra, R., 2011. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids// *Oecologia*. V.166, №4, p. 869–887.

149. Siebert, Wünschmann, Weiss, Frank, Benke, Frese. Post-mortem findings in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German North and Baltic Seas. *J. Comp. Pathol.*, 124 (2001), pp. 102-114, 10.1053/jcpa.2000.0436
150. Smeele ZE, Burns JM, Van Doorsaler K, et al. Diverse papillomaviruses identified in Weddell seals. *Journal of General Virology*. 2018. Vol.99 (4). P.:549-557. doi:10.1099/jgv.0.001028. Epub 2018 Feb 22.
151. Smith, A.W., Akers, T.G., Madin, S.H., Vedros, N.A., 1973. San Miguel sea lion virus isolation, preliminary characterization and relationship to vesicular exanthema of swine virus. *Nature (London)* 244, 108–110
152. Sonne C, Lakemeyer J, Desforges JP, Eulaers I, Persson S, Stokholm I, Galatius A, Gross S, Gonnens K, Lehnert K, Andersen-Ranberg EU, Tange Olsen M, Dietz R, Siebert U. A review of pathogens in selected Baltic Sea indicator species. *Environ Int.* 2020 Apr;137:105565. doi: 10.1016/j.envint.2020.105565. Epub 2020 Feb 18.
153. Stewart B.S. et al. Harbor seal tracking and telemetry by satellite // *Marine Mammal Science*. 1989. V. 5. №. 4. P. 361–375.
154. Stoffel MA, Acevedo-Whitehouse K, Morales-Durán N, Grosser S, Chakarov N, Krüger O, Nichols HJ, Elorriaga-Verplancken FR, Hoffman JI. Early sexual dimorphism in the developing gut microbiome of northern elephant seals. *Mol Ecol.* 2020 Jun;29(11):2109-2122. doi: 10.1111/mec.15385. Epub 2020 Mar 5. PMID: 32060961
155. Tabatabaie, T., Ghomi, M.R., Amiri, F., Zamani-ahmadmahmoodi, R., 2011. Comparative Study of Mercury Accumulation in Two Fish Species, (*Cyprinus carpio* and *Sander lucioperca*) from Anzali and Gomishan Wetlands in the Southern Coast of the Caspian Sea. *Bull Environ Contam Toxicol* 87, 674–677. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0413-x>
156. Thometz, N. M., Hermann-Sorensen, H., Russell, B., Rosen, D. A. S., Reichmuth, C.. Molting strategies of Arctic seals drive annual patterns in metabolism// *Conservation Physiology*. – 2021. - Vol. 9, №1.
157. Treu, G., Krone, O., Unnsteinsdóttir, E.R., Greenwood, A.D., Czirják, G.Á., 2018. Correlations between hair and tissue mercury concentrations in Icelandic arctic foxes (*Vulpes lagopus*). *Science of The Total Environment* 619–620, 1589–1598. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.143>
158. Trukhin, A.M., Kalinchuk, V.V., 2018. Hair mercury concentrations in the spotted seal (*Phoca largha*) pups from the Sea of Japan. *Environ Sci Pollut Res* 25, 27133–27140. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2731-6>
159. Trukhin, A.M., Simokon, M.V., 2018. Mercury in organs of Pacific walruses (*Odobenus rosmarus divergens*) from the Bering Sea. *Environ Sci Pollut Res* 25, 3360–3367. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0566-1>
160. UN Environment, 2019. Global Mercury Assessment 2018. UN Environment Programme, Chemicals and Health Branch Geneva, Switzerland
161. Van Bresse, M.F., Van Waerebeek, K., Raga, J.A., 1999. A review of virus infections of cetaceans and the potential impact of morbilliviruses, poxviruses and papillomaviruses on host population dynamics. *Dis. Aquat. Organ.* 38, 53–65
162. Van Hooissen, S., Gulland, F.M.D., Greig, D.J., Margaret Castellini, J., O'Hara, T.M., 2015. Blood and Hair Mercury Concentrations in the Pacific Harbor Seal (*Phoca vitulina richardii*) Pup: Associations with Neurodevelopmental Outcomes. *EcoHealth* 12, 490–500. <https://doi.org/10.1007/s10393-015-1021-8>
163. Vandamme P, Vancanneyt M, Segers P, Ryll M, Köhler B, Ludwig W, Hinz KH. *Coenonia anatina* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium associated with respiratory disease in ducks and geese. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Apr;49 Pt 2:867-74. doi: 10.1099/00207713-49-2-867
164. Wan XL, McLaughlin RW, Zheng JS, Hao YJ, Fan F, Tian RM, Wang D (2018) Microbial communities in different regions of the gastrointestinal tract in East Asian finless porpoises (*Neophocaena asiaeorientalis sunameri*). *Sci Rep* 8:14142. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32512-0>

165. Watanabe, I., Tanabe, S., Amano, M., Miyazaki, N., Petrov, E.A., Tatsukawa, R., 1998. Age-Dependent Accumulation of Heavy Metals in Baikal Seal (*Phoca sibirica*) from the Lake Baikal. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 518–526. <https://doi.org/10.1007/s002449900411>
166. Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016. <https://www.R-project.org/>
167. Wiener, J.G., 2013. Mercury exposed: Advances in environmental analysis and ecotoxicology of a highly toxic metal: Advances in environmental mercury research. *Environ Toxicol Chem* 32, 2175–2178. <https://doi.org/10.1002/etc.2333>
168. Worthy, G.A.J., Morris, P.A., Costa, D.P., Le Boeuf, B.J. Moulting energetics of the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*)// *Journal of Zoology (Lond)*. – 1992. - Vol. 227. - P.257-265
169. Worton B.J., 1989. Kernel methods for estimating the utilization distribution in home range studies // *Ecology*. V. 70. P. 164–168.
170. Wylie KM, Mihindukulasuriya KA, Zhou Y, Sodergren E, Storch GA, Weinstock GM. Metagenomic analysis of double-stranded DNA viruses in healthy adults. *BMC Biol* 2014;10(12):71.
171. Yongfeng H., Fan Y., Jie P., Jian Y., Ting Z., Lilian S., Jin Q. Direct pathogen detection from swab samples using a new high-throughput sequencing technology. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011, Vol.17, P.241-244.
172. Zhao, L., Schell, D. M., 2004. Stable isotope ratios in harbor seal *Phoca vitulina* vibrissae: effects of growth patterns on ecological records. V.281, p.267–273

ПРИЛОЖЕНИЕ А ОБЪЕМ РАБОТ

ИССЛЕДОВАНИЯ КАСПИЙСКОГО ТЮЛЕНЯ В АКВАТОРИИ СЕВЕРНОГО КАСПИЯ. ОСЕНЬ 2023 г.

1. ВВЕДЕНИЕ

Отделом охраны окружающей среды Компании для получения достоверных данных о численности и местоположении скоплений каспийского тюленя на акватории Северного Каспия в 2022 году, а также дальнейшего формирования базы данных в области сохранения популяции тюленей определен нижеследующий объем работ:

- определение текущего статуса популяции и тенденций популяции каспийского тюленя на Северном Каспии;
- подготовка отчетности с приложением картографического и фотографического материалов по проведенным работам;
- подготовка рецензированных научных публикаций, основанных на результатах работ.

2 ОБЪЕМ РАБОТ – ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

В данном документе представлен объем работ на период с **3 февраля по 29 декабря 2023 года**, включая обработку данных и составление отчетности.

ПОДРЯДЧИК должен выполнить работы по мультиспектральной авиасъемке залежек и исследования современного состояния популяции каспийского тюленя в зимний и весенний периоды 2023 года.

ПОДРЯДЧИК может вовлекать субподрядные компании для выполнения исследований по данному Объему работ, услуги которых будут возмещены, согласно условиям действующего Контракта UI176768.

Цель исследований: Оценка численности, распределения и благополучия популяции каспийского тюленя на акватории Северного Каспия в 2023 году.

Задачи исследований:

- мультиспектральный авиаучет численности маточного поголовья популяции и приплода с применением инфракрасной, видео и фото-съемок с самолета в соответствии с международной Программой работ «Оценка численности, распределения и естественного воспроизводства каспийского тюленя на казахстанской и российской акваториях Северного Каспия в 2020-2024 г., утвержденной уполномоченными государственными органами РК и РФ;
- определение характера и плотности распределения ледовых залежек животных;
- определение соотношения количества самок и детенышей;
- авиасъемка лежбищ и линных залежек тюленей в весенний период;
- отлов тюленей, выполнение морфометрических исследований, отбор биологического материала для токсикологических, физиологических (серологических и гормональных), вирусологических и микроскопических исследований согласно Программы «Исследования каспийского тюленя в акватории северного Каспия в 2019-2023 г.г.», утвержденной Компанией от 3 июля 2019 г.;
- изучение путей перемещения каспийского тюленя с применением спутниковой телеметрии путем установки до 10 спутниковых радиомаяков на отловленных животных в акватории Северного Каспия в осенний период;
- проведение учета численности тюленей на маршрутах движения судов, залежках, в местах проведения полевых работ в осенний период;

- первичная камеральная обработка материалов авиасъёмок, верификация материалов, их компоновка и подготовка к оценке численности каспийского тюленя;
- картирование мест концентрации тюленей;
- разработка предложений по сохранению популяции;
- подготовка аналитических отчетов.

Исследования выполняются в два этапа:

- зимний авиаучет численности тюленей на ледовых залежках в феврале месяце;
- весенняя авиасъемка лежбищ, линных залежек тюленей, установка спутниковых радиомаяков на отловленных животных и отбор биологических проб в ноябре.

В рамках настоящего Объема работ выпускаются два Наряд-заказа на:

- авиаучет численности тюленей в зимний и весенний периоды;
- комплексные исследования тюленей.

3. ТРЕБОВАНИЯ К УСЛУГАМ

3.1 Общие требования

Алгоритм обработки материалов мультиспектральной съемки ценных залежек каспийского тюленя должен состоять в следующем:

Обработку материалов Подрядчику следует проводить в несколько этапов, включающих следующие работы:

- дешифровка мультиспектральной съемки (фото, ИК-съемки, навигация) и построение сводных таблиц подсчета тюленей;
- расчет плотностей населения тюленей по инструментальным данным;
- экстраполяция плотностей тюленей на обследованную акваторию и расчет оценок численности тюленей.

Подрядчику вначале следует производить дешифровку всех полученных материалов: фотоснимков, видеоизображений и др. При этом телевизионные изображения обрабатываются совместно с фотоснимками. По инфракрасным изображениям производится обнаружение залегающих на льду тюленей, а по соответствующим фотоснимкам идентифицируются тюлени. Дешифровка материалов должна производиться тремя независимыми счетчиками, что позволяет определить погрешности подсчета. В результате дешифровки материалов получают сводные таблицы данных подсчета тюленей в хронологической последовательности, совместно с навигационными параметрами учета. Во всех таблицах время суток приводится к единому значению, задержки и рассогласования устраняются. Для различных величин, включая дату, время, координаты и т. д., используются единые, общепринятые форматы величин.

Далее должны производиться подсчет и суммирование количества тюленей на каждом маршруте и определяется величина снятой при этом площади. Определяется плотность залегания тюленей (детенышей и взрослых) по данным инструментального учета.

Для расчета численности животных полученные плотности тюленей (щенков и взрослых) экстраполируются на площадь обследованной акватории.

Расчет численности тюленей должен производиться по традиционным алгоритмам экстраполяции плотности тюленей. Наряду со средневзвешенной оценкой численности тюленей вычисляются, также, двухсторонний нижний и верхний доверительные интервалы, соответствующие заданной доверительной вероятности (0,95).

На каждом этапе обработки данных должны производиться оценки и расчеты статистических и иных ошибок. Методы и соответствующие им формулы расчета ошибок определяются в зависимости от выбранных моделей, сделанных допущений и ограничений, методов фильтрации данных и составления выборок, способов разбиения площади при экстраполяции и других условий.

ПОДРЯДЧИК должен передать КОМПАНИИ все первичные (исходные) материалы, полученные во время фото, видео и ИК-съемок, на электронном носителе.

3.2 Требования к качеству услуг

Анализ фотоснимков по трансектам, а также материалов видео- и ИК-съемки должен быть проведен не менее чем тремя специалистами, имеющими опыт анализа фотографий, видео и ИК данных авиаучета ластоногих животных.

Индивидуальная ошибка специалиста по оценке численности детенышей и взрослых животных на учетных трансектах не должна превышать 5 %.

Результаты подсчета животных должны быть привязаны к координатам по маршруту съемки тюленей.

Статистическая обработка результатов анализа материалов фото-, видео- и ИК-съемок должна быть проведена не менее чем двумя методами специального статистического анализа (площадной, по Кинсли и др.).

4. ОТЧЕТНОСТЬ

ПОДРЯДЧИК представляет КОМПАНИИ отдельные **Полевые отчеты** о выполненных работах в течение 10 рабочих дней после завершения зимних и весенних полевых работ в электронном виде.

На основе результатов обработки полученных материалов по мультиспектральной съемке и изучению современного состояния популяции каспийского тюленя ПОДРЯДЧИК должен составить **Подробный итоговый отчет** «Исследования каспийского тюленя в акватории северного Каспия в зимний и весенний периоды 2023 года», который состоит из двух основных разделов:

1. Оценка численности и рождаемости каспийского тюленя в акватории Северного Каспия в 2023 году.
2. Изучение современного состояния популяции каспийского тюленя, как вида-индикатора состояния экосистемы Каспийского моря.

Структура Подробного отчета должна быть согласована Компанией.

Предварительная версия Подробного итогового отчета на английском и русском языках предоставляется до **29 декабря 2023 г.**

Заключительный вариант Подробного отчета, после согласования с Компанией, должен быть представлен как в цифровом формате на электронном носителе, так и в бумажном твердом переплете в пяти экземплярах на русском языке и в одном – на английском языке

Рецензированные научные публикации должны быть выпущены на основе результатов работ. При этом участие Компании в проведении данных работ должны указываться в каждой публикации.

ПРИЛОЖЕНИЕ В ПЕРЕЧЕНЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБ

Таблица В.1 Перечень биологических проб, отобранных специалистами НПЦ МиВ (РК) с живых тюленей. Ноябрь 2023 г.

Номер животного	Вид материала / количество биопроб					
	Смыв:					Сыворотка крови
	конъюнктивный	носовой	ротовой	урогенитальный	ректальный	
PC.PR-11/23-01(A*)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-02(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-03(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-04(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-05(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-06(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-07(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-08(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-09(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-10(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-11(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-12(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-13(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-14(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-15(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-16(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-17(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-18(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-19(A)	1	1	1	1	1	1
PC.PR-11/23-20(A)	1	1	1	1	1	1
Всего:	20	20	20	20	20	20
Итого проб:	120					

Примечание: (A)* – Alive / живой.

Таблица В.2 Перечень биологических проб, отобранных специалистами НПЦ МиВ (РК) у погибших тюленей дополнительно. Ноябрь 2023 г.

Номер	Пол	Вид материала / количество биопроб									
		ткани органов									
		мозг	мозжечок	легкие	сердце	печень	селезенка	почка	лимфоузел	плацента	кишечник
PC.KU-11/23-21(D*)	самка	1	-	1	1	1	1	-	1	-	-
PC.KU-11/23-22(D)	самец	-	1	1	1	1	1	1	1	-	-
PC.KU-11/23-23(D)	самец	-	-	1	-	1	1	-	1	-	1
PC.KU-11/23-24(D)	самка	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1
Итого проб:		24									

Примечание: (D)* – Dead / павший

Таблица В.3 Перечень биологических проб, отобранных специалистами ИПЭЭ РАН с живых каспийских нерп в ноябре 2023 г.

Номер животного-го	Нозаль-ный смыв, шт	Ректаль-ный смыв, шт	Вагиналь-ный смыв, шт	Волосы, для гормональных исследований, образец	Волосы для токсиколо-гических исследований, образец	Вибриссы для гормональных и токсиколо-гических исследований, образец	Цельная кровь для исследований на тяжелые металлы, мл	Цельная кровь для токсиколо-гических исследований, мл	Плазма крови, пробирок	Мазки крови, шт	Форменные элементы крови для генетических исследований, пробирок
PC23-01	3	3	3	2	1	2	1	9	3	2	2
PC23-02	3	3	3	2	1	2	1	13	3	2	2
PC23-03	3	3	3	2	1	2	1	11	3	2	2
PC23-04	3	3	3	2	1	2	1	17	3	2	2
PC23-05	3	3	3	2	1	2	1	32	3	2	2
PC23-06	3	3	3	2	1	2	1	16	3	2	2
PC23-07	3	3	3	2	1	2	1	12	3	2	2
PC23-08	3	3	3	2	1	2	1	11	3	2	2
PC23-09	3	3	3	2	1	2	1	20	3	2	2
PC23-10	3	3	3	2	1	2	1	14	3	2	2
PC23-11	3	3	3	2	1	2	1	19	3	2	2
PC23-12	3	3	3	2	1	2	1	16	3	2	2
PC23-13	3	3	3	2	1	2	1	15	3	2	2
PC23-14	3	3	3	2	1	2	1	2	3	2	2
PC23-15	3	3	0	2	1	2	1	23	3	2	2
PC23-16	3	3	3	2	1	2	1	1	3	2	2
PC23-17	3	3	3	2	1	2	1	5	3	2	2
PC23-18	3	3	0	2	1	2	1	6	3	2	2
PC23-19	0	0	0	2	1	2	1	8	3	2	2
PC23-20	0	0	0	2	1	2	1	11	3	2	2
Всего:	54	54	48	40	20	40	20	20 образца	60	40	40
Итого проб:	436										

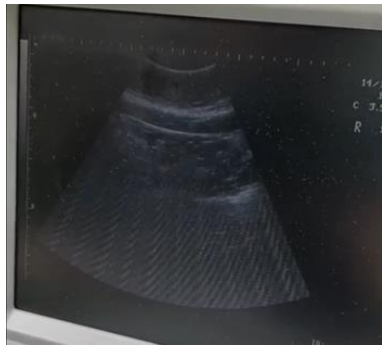
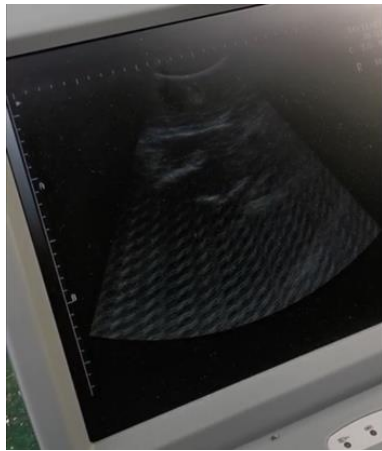
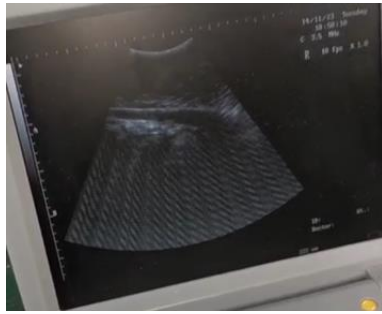
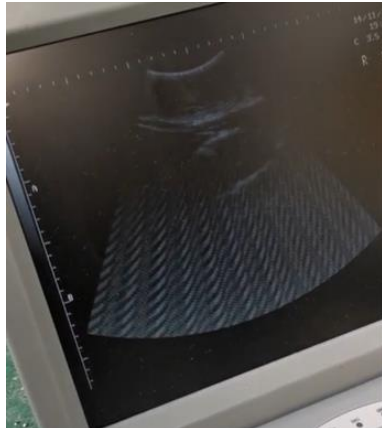
ПРИЛОЖЕНИЕ С ТАБЛИЧНЫЕ ДАННЫЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИССЛЕДОВАНИЙ

Таблица С.1 Метеорологические условия в период выполнения работ, 2023 г.

Дата	Время	Скорость ветра (м/с)		Направление ветра	Температура, °C	Атмосферное давление (мм/рт)	Облачность (октант) / осадки	Примечание
		средняя	порывы (max)					
06.11.2023	6:00	9	12	SSE	4	763	4	Мобилизация
	12:00	8	14	SSE	8	763	4	
	18:00	9	12	SSE	16	764	2	
	24:00	11	13	SSE	14	764	2	
07.11.2023	6:00	6	8	WSW	4	764	9	Мобилизация. Выход в море
	12:00	9	12	WSW	9	764	9	
	18:00	7	10	WSW	14	764	7	
	24:00	7	10	WSW	12	764	7	
08.11.2023	6:00	10	15	WSW	7	763	3	Ожидание улучшения погодных условий. Волна более 1.м
	12:00	10	13	WSW	12	762	2	
	18:00	12	15	SW	14	763	1	
	24:00	10	12	WSW	8	763	1	
09.11.2023	6:00	7	10	ESE	4	764	3	Ожидание улучшения погодных условий. Волна около 1.2м
	12:00	12	14	ESE	9	765	1	
	18:00	14	18	SES	13	765	1	
	24:00	12	16	SES	8	765	1	
10.11.2023	6:00	7	11	WSW	2	766	1	Ожидание улучшения погодных условий
	12:00	11	15	WSW	12	766	3	
	18:00	11	14	SW	12	766	8	
	24:00	12	16	WSW	8	767	9	
11.11.2023	6:00	3	5	N	2	770	1	Выход на двух рабочих лодках в район морских шалыг. Учет тюленя с судна
	12:00	3	4	NE	7	770	2	
	18:00	5	5	N	8	772	1	
	24:00	3	4	NE	6	773	2	
12.11.2023	6:00	8	10	ESE	5	774	2	Ожидание улучшения погодных условий
	12:00	10	15	ESE	10	774	2	
	18:00	12	16	ESE	9	774	1	
	24:00	7	9	ESE	6	774	1	
13.11.2023	6:00	12	15	SE	6	774	4	Выход на двух рабочих лодках в район морских шалыг. Мечение и отбор проб.
	12:00	7	10	SE	10	775	4	
	18:00	2	4	ESE	10	775	2	
	24:00	7	10	ESE	2	775	2	
14.11.2023	6:00	10	14	SE	6	775	2	Выход на двух рабочих лодках в район морских шалыг. Мечение и отбор проб.
	12:00	8	10	SE	11	774	2	
	18:00	1	2	SE	10	774	4	
	24:00	6	11	E	7	774	5	
15.11.2023	6:00	8	12	NNW	5	775	4	Отбор проб у каспийского тюленя.
	12:00	5	8	NNW	10	775	3	
	18:00	5	7	W	12	775	2	
	24:00	7	10	W	7	775	2	
16.11.2023	6:00	6	10	SE	6	775	6	Учет тюленя на маршруте движения судна
	12:00	7	12	SSE	13	776	7	
	18:00	3	10	SE	15	776	9	
	24:00	5	9	SE	8	775	9	
17.11.2023	6:00	6	9	SES	7	775	7	Демобилизация
	12:00	6	11	NW	10	776	7	
	18:00	7	11	W	11	776	5	
	24:00	10	15	NW	8	775	5	

Таблица С.2 Результаты УЗИ самок каспийского тюленя

Номер животного	Возраст, лет	Возрастная категория	Беременность по результатам УЗИ	Фото аппарата УЗ-диагностики
PC23-01	4	взрослый	беременна	
PC23-02	4	взрослый	вероятно, нет беременности	
PC23-03	5	взрослый	вероятно, нет беременности	
PC23-04	8	взрослый	вероятно, нет беременности	

Номер животного	Возраст, лет	Возрастная категория	Беременность по результатам УЗИ	Фото аппарата УЗИ-диагностики
PC23-05	6	взрослый	вероятно, нет беременности	
PC23-06	4	взрослый	вероятно, нет беременности	
PC23-07	5	взрослый	беременна	
PC23-08	5	взрослый	вероятно, нет беременности	

Номер животного	Возраст, лет	Возрастная категория	Беременность по результатам УЗИ	Фото аппарата УЗИ-диагностики
PC23-09	7	взрослый	вероятно, нет беременности	
PC23-10	5	взрослый	вероятно, нет беременности	
PC23-11	6	взрослый	беременна	

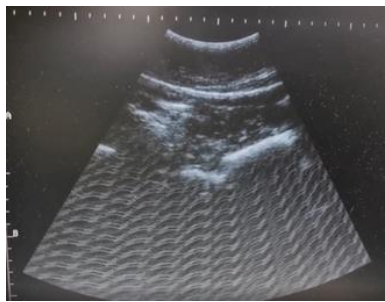
Номер животного	Возраст, лет	Возрастная категория	Беременность по результатам УЗИ	Фото аппарата УЗИ-диагностики
PC23-12	5	взрослый	вероятно, нет беременности	
PC23-13	6	взрослый	беременна	
PC23-14	2	молодой	с большой вероятностью нет беременности	

Таблица С.3 Результаты морфометрических исследований живых тюленей, 2023 г.

Номер тюленя	Координаты места отлова	Дата исследования	Место исследования	Пол животного	Возраст, полных лет	Масса, кг	Зоологическая длина тела, см	Обхват грудной клетки, см	Длина хвоста, см	Клинический статус
PC23-01	45.95093° N; 52.264° E	13.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	4	71	116	119	9	Бодрый, повреждений нет
PC23-02	45.95093° N; 52.264° E	13.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	4	73,1	120	130	9	Бодрый, повреждений нет
PC23-03	45.95093° N; 52.264° E	13.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	5	66,8	120	115	8	Бодрый, обнаружены клещи на лапах
PC23-04	45.95093° N; 52.264° E	13.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	8	74,7	120	125	7	Бодрый, шрам на левом боку и шрамы, раны на правой передней лапе; раздражение у анального отверстия
PC23-05	45.95093° N; 52.264° E	13.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	6	73,3	124	125	11	Бодрый, повреждений нет
PC23-06	45.95093° N; 52.264° E	13.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	4	78,5	127	115	10	Бодрый, шрам и рана у рта
PC23-07	45.95093° N; 52.264° E	13.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	5	82	122	132	8	Бодрый, повреждений нет
PC23-08	45.95093° N; 52.264° E	13.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	5	79,1	114	128	9	Бодрый, мелкие шрамы на задних конечностях, нет нескольких когтей на задней конечности, зеленовато-желтые выделения из глаз
PC23-09	45.95093° N; 52.264° E	13.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	7	56,7	117	117	10	Бодрый, спина и лапы в крупных и мелких шрамах, есть небольшие лысые участки тела, нет когтя на левой передней лапе
PC23-10	45.95093° N; 52.264° E	13.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	5	65,9	116	117	7	Бодрый, небольшие шрамы на голове
PC23-11	45.95093° N; 52.264° E	13.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	6	68	109	118	7	Бодрый, несколько небольших шрамов и рана на спине, сломан коготь на передней лапе
PC23-12	45.95093° N; 52.264° E	13.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	5	72,5	108	115	10	Бодрый, рана у когтя на правой передней лапе
PC23-13	45.95093° N; 52.264° E	13.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	6	80,4	133	128	7	Бодрый, повреждений нет
PC23-14	45.95093° N; 52.264° E	14.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	2	24,2	88	85	8	Бодрый, повреждений нет
PC23-15	45.95093° N; 52.264° E	14.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самец	2	21,3	100	83	8	Бодрый, повреждений нет
PC23-16	45.95093° N; 52.264° E	14.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	2	20,2	91	81	7	Бодрый, шрамы на задней лапе
PC23-17	45.95093° N; 52.264° E	14.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	1	25,5	94	87	9	Бодрый, раздражение слизистой глаз

Номер тюленя	Координаты места отлова	Дата исследования	Место исследования	Пол животного	Возраст, полных лет	Масса, кг	Зоологическая длина тела, см	Обхват грудной клетки, см	Длина хвоста, см	Клинический статус
PC23-18	45.95093° N; 52.264° E	14.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самец	3	30	96	96	7	Бодрый, нет по несколько когтей на обеих передних лапах
PC23-19	45.95093° N; 52.264° E	14.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	2	20	85	78	9	Бодрый, повреждений нет
PC23-20	45.95093° N; 52.264° E	14.11.2023	РК, шалыга в районе СКМК	самка	3	33,6	97	99	7	Бодрый, повреждений нет

Таблица С.4 Данные о меченых каспийского тюленя в ноябре 2023 г.

Номер тюленя	Место отлова/выпуска	Дата установки передатчика	Пол	Возраст, лет	Время установки передатчика (сватывания клея), ч (UTC + 5)	Время выпуска животного, ч (UTC + 5)	Место прикрепления передатчика	Номер передатчика
PC23-01	РК, шалыга в районе СКМК	13.11.2023	самка	4	10:30	15:00	между лопатками	253210
PC23-02	РК, шалыга в районе СКМК	13.11.2023	самка	4	11:42	15:00	между лопатками	253211
PC23-03	РК, шалыга в районе СКМК	13.11.2023	самка	5	12:35	15:01	между лопатками	253212
PC23-04	РК, шалыга в районе СКМК	13.11.2023	самка	8	13:08	15:01	между лопатками	253213
PC23-05	РК, шалыга в районе СКМК	13.11.2023	самка	6	14:09	15:02	между лопатками	253214
PC23-06	РК, шалыга в районе СКМК	13.11.2023	самка	4	15:47	22:14	между лопатками	253215
PC23-07	РК, шалыга в районе СКМК	13.11.2023	самка	5	16:21	22:16	между лопатками	253216
PC23-08	РК, шалыга в районе СКМК	13.11.2023	самка	5	17:11	22:09	между лопатками	253217
PC23-09	РК, шалыга в районе СКМК	13.11.2023	самка	7	18:09	22:13	между лопатками	253218
PC23-10	РК, шалыга в районе СКМК	13.11.2023	самка	5	18:39	22:07	между лопатками	253219
PC23-11	РК, шалыга в районе СКМК	13.11.2023	самка	6	19:10	22:05	между лопатками	253220
PC23-12	РК, шалыга в районе СКМК	13.11.2023	самка	5	19:30	22:03	между лопатками	253221
PC23-13	РК, шалыга в районе СКМК	13.11.2023	самка	6	20:00	22:10	между лопатками	253222

ПРИЛОЖЕНИЕ D ДАННЫЕ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Таблица D.1 Наличие антител к вирусу гриппа A (anti-NP Ig G) в сыворотках крови каспийских тюленей, собранных в 2020-2022 гг. (НПЦ МиВ РК)

Sample	OD	S/N	Calculation of S/Nav ratio (sample/K-) S/N ≥ 0.6 – negative S/N < 0.6 – positive	
K+	0,2468	0,2997		
K-	1,3000	1,5788		
1 Seal/2020	0,4606	0,3657	≥ 0,6	Positive
2 Seal/2020	1,1235	0,8919	< 0,6	Negative
3 Seal/2020	1,1235	0,8919	< 0,6	Negative
4 Seal/2020	0,4997	0,3967	≥ 0,6	Positive
5 Seal/2020	0,9303	0,7386	< 0,6	Negative
6 Seal/2020	0,4882	0,3876	≥ 0,6	Positive
7 Seal/2020	1,1674	0,9268	< 0,6	Negative
8 Seal/2020	1,0237	0,8127	< 0,6	Negative
9 Seal/2020	0,9560	0,7590	< 0,6	Negative
10 Seal/2020	0,4554	0,3615	≥ 0,6	Positive
11 Seal/2020	1,2085	0,9594	< 0,6	Negative
12 Seal/2020	1,1779	0,9351	< 0,6	Negative
13 Seal/2020	1,0077	0,8000	< 0,6	Negative
1 Seal/2022	0,4222	0,3352	≥ 0,6	Positive
2 Seal/2022	0,2447	0,1943	≥ 0,6	Positive
3 Seal/2022	0,4843	0,3845	≥ 0,6	Positive
4 Seal/2022	0,4819	0,3826	≥ 0,6	Positive
5 Seal/2022	0,2620	0,2080	≥ 0,6	Positive
6 Seal/2022	0,1070	0,0849	≥ 0,6	Positive
7 Seal/2022	0,4112	0,3265	≥ 0,6	Positive
8 Seal/2022	0,2570	0,2040	≥ 0,6	Positive
9 Seal/2022	0,1324	0,1051	≥ 0,6	Positive
10 Seal/2022	0,1955	0,1552	≥ 0,6	Positive
11 Seal/2022	1,1760	0,9336	< 0,6	Negative
12 Seal/2022	1,1411	0,9059	< 0,6	Negative
14 Seal/2022	0,2088	0,1658	≥ 0,6	Positive
15 Seal/2022	0,7326	0,5816	≥ 0,6	Positive
16 Seal/2022	1,0095	0,8014	< 0,6	Negative
17 Seal/2022	0,6439	0,5112	≥ 0,6	Positive
18 Seal/2022	0,6068	0,4817	≥ 0,6	Positive
19 Seal/2022	0,2872	0,2280	≥ 0,6	Positive
20 Seal/2022	0,3300	0,2620	≥ 0,6	Positive
21 Seal/2022	0,6112	0,4852	≥ 0,6	Positive
22 Seal/2022	0,4861	0,3859	≥ 0,6	Positive
23 Seal/2022	0,0940	0,0746	≥ 0,6	Positive
24 Seal/2022	0,3296	0,2617	≥ 0,6	Positive
25 Seal/2022	0,2514	0,1996	≥ 0,6	Positive

Таблица D.2 Наличие антител к вирусу чумы плотоядных (CDV IgG ELISA TEST) в сыворотках крови каспийских тюленей, собранных в 2019-2023 гг. (НПЦ МиВ РК)

Sample	Reader	Results (U)	Interp.
1 Seal/PR/19	0,1679	3	Negative
3 Seal/PR/19	0,0648	1	Negative
4 Seal/PR/19	0,0746	2	Negative
5 Seal/PR/19	0,5299	11	Positive
1 Seal/PR/20	0,0609	1	Negative
2 Seal/PR/20	0,0793	1	Negative
3 Seal/PR/20	0,0857	2	Negative
4 Seal/PR/20	0,2884	5	Negative
5 Seal/PR/20	0,3344	6	Equivocal
6 Seal/PR/20	0,2298	4	Negative
7 Seal/PR/20	0,1419	3	Negative
8 Seal/PR/20	0,1072	2	Negative

Sample	Reader	Results (U)	Interp.
9 Seal/PR/20	0,1129	2	Negative
10 Seal/PR/20	0,2823	5	Negative
11 Seal/PR/20	0,0983	2	Negative
12 Seal/PR/20	0,0780	1	Negative
13 Seal/PR/20	0,1677	3	Negative
01/Seal/KU/2022	0,5615	10	Positive
02/Seal/KU/2022	0,2248	4	Negative
03/Seal/KU/2022	0,1838	3	Negative
04/Seal/KU/2022	0,1364	2	Negative
05/Seal/KU/2022	0,3432	6	Equivocal
06/Seal/KU/2022	0,1505	3	Negative
07/Seal/KU/2022	0,4496	8	Positive
08/Seal/KU/2022	0,4560	8	Positive
09/Seal/KU/2022	отсутствует	отсутствует	-
10/Seal/KU/2022	0,4205	8	Positive
11/Seal/KU/2022	0,0499	1	Negative
12/Seal/KU/2022	0,1175	2	Negative
14/Seal/KU/2022	0,5963	11	Positive
15/Seal/KU/2022	0,5155	9	Positive
16/Seal/KU/2022	0,1247	2	Negative
17/Seal/KU/2022	0,2302	4	Negative
18/Seal/KU/2022	0,0504	1	Negative
19/Seal/KU/2022	0,2706	5	Negative
20/Seal/KU/2022	0,2129	4	Negative
21/Seal/KU/2022	0,3012	5	Negative
22/Seal/KU/2022	0,1114	2	Negative
23/Seal/KU/2022	0,1172	2	Negative
24/Seal/KU/2022	0,2678	5	Negative
25/Seal/KU/2022	0,0863	2	Negative
26/Seal/KU/2022	0,0818	1	Negative
1 Seal/PR/23	0,1156	2	Negative
2 Seal/PR/23	0,1445	3	Negative
3 Seal/PR/23	0,3321	7	Equivocal
4 Seal/PR/23	0,5989	12	Positive
5 Seal/PR/23	0,1006	2	Negative
6 Seal/PR/23	0,3867	8	Positive
7 Seal/PR/23	0,1692	3	Negative
8 Seal/PR/23	0,3031	6	Equivocal
9 Seal/PR/23	0,1713	3	Negative
10 Seal/PR/23	0,0555	1	Negative
11 Seal/PR/23	0,2065	4	Negative
12 Seal/PR/23	0,1262	3	Negative
13 Seal/PR/23	0,1054	2	Negative
14 Seal/PR/23	0,0914	2	Negative
15 Seal/PR/23	0,0895	2	Negative
16 Seal/PR/23	0,1262	3	Negative
17 Seal/PR/23	0,0727	1	Negative
18 Seal/PR/23	0,1116	2	Negative
19 Seal/PR/23	0,1156	2	Negative
20 Seal/PR/23	0,0548	1	Negative
21 Seal/PR/23	0,0888	2	Negative
22 Seal/PR/23	0,1127	2	Negative
23 Seal/PR/23	0,0784	2	Negative
24 Seal/PR/23	0,2577	5	Negative

Таблица D.3 Определение вируснейтрализующих антител в сыворотках крови каспийских тюленей, собранных в 2020-2022 гг. (НПЦ МиВ РК)

ID of serum	Volume (µl)	Slot	Разведение сывороток и результаты						Активность в четырех проворностях
			1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
01/Seal/KU/2022	1000	1	--	--	--	++	++	++	1:8, 1:8, 1:8, 1:8,
02/Seal/KU/2022	1000	2	--	--	--	++	++	++	1:8, 1:8, 1:8, 1:4,
03/Seal/KU/2022	1000	3	++	++	++	++	++	++	отрицательный
04/Seal/KU/2022	1000	4	++	++	++	++	++	++	отрицательный
05/Seal/KU/2022	1000	5	--	--	--	++	++	++	1:8, 1:8, 1:8, 1:8,
06/Seal/KU/2022	1000	6	--	--	++	++	++	++	1:4, 1:4, 1:4, 1:4,
07/Seal/KU/2022	1000	7	--	--	+-	++	++	++	1:8, 1:4, 1:8, 1:8,
08/Seal/KU/2022	1000	8	--	--	--	++	++	++	1:8, 1:8, 1:8, 1:8,
09/Seal/KU/2022	1000	9	++	++	++	++	++	++	отрицательный
10/Seal/KU/2022	1000	10	--	--	--	++	++	++	1:8, 1:8, 1:8, 1:8,
11/Seal/KU/2022	1000	11	++	++	++	++	++	++	отрицательный
12/Seal/KU/2022	1000	12	++	++	++	++	++	++	отрицательный
14/Seal/KU/2022	1000	13	--	--	--	++	++	++	1:8, 1:8, 1:8, 1:8,
15/Seal/KU/2022	1000	14	--	--	--	++	++	++	1:8, 1:8, 1:8, 1:8,
16/Seal/KU/2022	1000	15	++	++	++	++	++	++	отрицательный
17/Seal/KU/2022	1000	16	--	--	++	++	++	++	1:4, 1:4, 1:4, 1:4,
18/Seal/KU/2022	1000	17	++	++	++	++	++	++	отрицательный
19/Seal/KU/2022	1000	18	--	--	+-	++	++	++	1:4, 1:8, 1:4, 1:8,
20/Seal/KU/2022	1000	19	--	--	+-	++	++	++	1:4, 1:8, 1:8, 1:8,
21/Seal/KU/2022	1000	20	--	--	+-	++	++	++	1:4, 1:8, 1:4, 1:8,
22/Seal/KU/2022	1000	21	--	--	--	++	++	++	1:8, 1:8, 1:8, 1:8,
23/Seal/KU/2022	1000	22	++	++	++	++	++	++	отрицательный
24/Seal/KU/2022	1000	23	--	+-	+-	++	++	++	1:4, 1:8, 1:4, 1:8,
25/Seal/KU/2022	1000	24	++	++	++	++	++	++	отрицательный
26/Seal/KU/2022	1000	25	++	++	++	++	++	++	отрицательный
05/Seal/PR/2020	500	26	--	--	--	++	++	++	1:8, 1:8, 1:8, 1:8,
06/Seal/PR/2020	500	27	--	--	+-	++	++	++	1:8, 1:4, 1:8, 1:8,
07/Seal/PR/2020	500	28	++	++	++	++	++	++	отрицательный
09/Seal/PR/2020	500	29	++	++	++	++	++	++	отрицательный
10/Seal/PR/2020	500	30	--	--	--	++	++	++	1:8, 1:8, 1:8, 1:8,
12/Seal/PR/2020	500	31	++	++	++	++	++	++	отрицательный

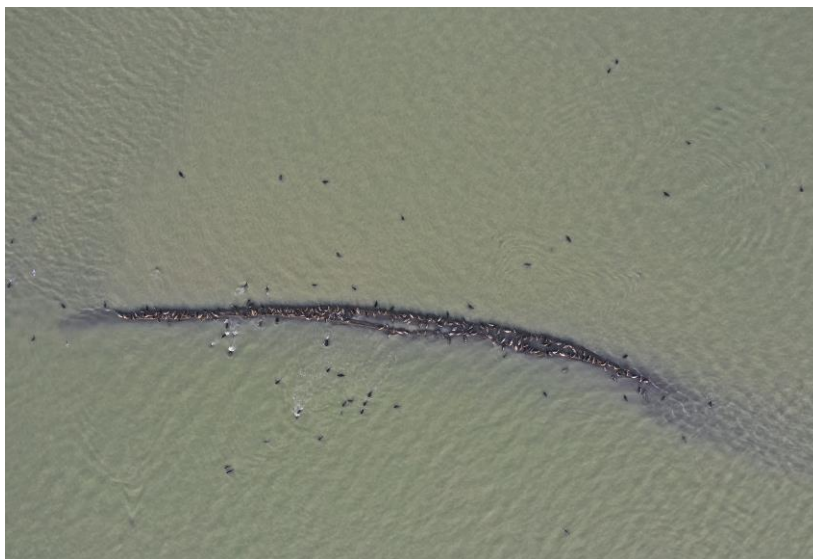
ID of serum	Volume (µl)	Slot	Разведение сывороток и результаты						Активность в четырех проворностях
			1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
Позитив контроль			--	--	--	--	+-	++	1:16, 1:32, 1:32, 1:32,
Негатив контроль			++	++	++	++	++	++	отрицательный

Примечания: «+» – ЦГД в монослое культуры клеток.

«-» – нет ЦГД в монослое культуры клеток, то есть сыворотка нейтрализует вирус.

ПРИЛОЖЕНИЕ Е ФОТОМАТЕРИАЛЫ

I. Отлов тюленей



Шалыга КТ5 (13.11.2023 г.)



Шалыга КТ6, подход лодки (13.11.2023 г.)



Отлов тюленей на шалыге КТ6 (13.11.2023 г.)

II. Исследование тюленей



Взвешивание тюленя



Измерение, обхват грудной клетки



Определение возраста по когтям



Отбор шерсти



Отбор глазного смыва



Отбор назального смыва



Отбор вибрисс



Отбор крови



Установка радиомаяка



Выпуск тюленя со спутниковым радиомаяком



УЗИ обследование плода и жировых накоплений