

Комягин Григорий Алексеевич

магистрант, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления имени К. Г. Разумовского (ПКУ)», факультет аквакультуры и биотехнологий рыбного хозяйства, Центр «Аквакультура»

г. Москва

КОМПЛЕКСНАЯ МЕТОДИКА ОЦЕНКИ АТТРАКТИВНОСТИ ПИЩЕВЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ *Danio rerio*: СОЧЕТАНИЕ ВКУСОВОГО ГРАНУЛЬНОГО ТЕСТА И АВТОМАТИЗИРОВАННОГО ВИДЕОТРЕКИНГА

Аннотация. Предложена и апробирована комплексная методика оценки аттрактивности пищевых веществ для *Danio rerio* (*Cyprinidae*), объединяющая классический гранульный поведенческий тест, характеризующий ответ вкусовой системы через индекс вкусовой привлекательности (ИВП), и автоматизированный видеотрекинг с анализом кинематических параметров траекторий и двумерных карт плотности (тепловых карт), отражающих обонятельно-двигательный компонент пищевого поведения. Использованы четыре аттрактанта: анис (*Pimpinella anisum*), меласса, чеснок (*Allium sativum*) и гаммарус (положительный контроль). Установлена иерархия вкусовой привлекательности; показано, что среднеквадратическое отклонение координаты Y (σ_y) является единственным кинематическим параметром, значимо различающим группы, и коррелирует с данными вкусового теста. Обнаружена высокая корреляция между длиной пройденного пути и временем до захвата гранулы. Методика рекомендована для скрининга потенциальных аттрактантов в аквакультуре.

Ключевые слова: *Danio rerio*, хемосенсорика, пищевые аттрактанты, видеотрекинг, DeepLabCut, тепловые карты, индекс вкусовой привлекательности.

Annotation. A comprehensive methodology for assessing the attractiveness of food substances to *Danio rerio* (Cyprinidae) has been proposed and validated. The approach combines a classical granular behavioral test, which characterizes the gustatory system response through the palatability index, with automated video tracking that analyzes kinematic parameters of movement trajectories and two-dimensional density maps (heat maps), reflecting the olfactory–motor component of feeding behavior. Four attractants were tested: anise (*Pimpinella anisum*), molasses, garlic (*Allium sativum*), and gammarus (positive control). A hierarchy of taste attractiveness was established. The standard deviation of the Y-coordinate (σ_y) was shown to be the only kinematic parameter that significantly distinguished the groups and correlated with the taste test data. A high correlation was found between the total distance traveled and the latency to grasp a granule. The proposed methodology is recommended for screening potential attractants in aquaculture.

Keywords: *Danio rerio*, chemosensory, food attractants, video tracking, DeepLabCut, heat maps, palatability index.

Введение

Хеморецепция остаётся одним из древнейших механизмов регуляции пищевого поведения позвоночных, а обонятельная и вкусовая системы рыб, будучи функционально взаимосвязанными, традиционно исследуются отдельными методическими подходами: электрофизиологическими и поведенческими для обонятельной системы, гранульными тестами — для вкусовой (Касумян, Довинг, 2003). Раздельное рассмотрение этих систем ограничивает интерпретацию данных, поскольку обонятельная система, за счёт дистантности действия, формирует первый «контур» реагирования рыбы на потенциальный кормовой объект, инициируя поисковое поведение, которое впоследствии дополняется вкусовой оценкой при непосредственном контакте с кормом.

Составление баз данных о вкусовой и обонятельной привлекательности химических соединений востребовано в первую очередь в аквакультуре, где

оптимизация состава кормовых аттрактантов позволяет снижать долю неусвоенного корма и связанную с этим нагрузку на системы биофильтрации [2]. Однако методики, синтезирующие данные двух хемосенсорных каналов, применяются ограниченно.

Целью настоящей работы являлась разработка и апробация методики анализа веществ-аттрактантов путём сопоставления данных классического гранульного теста и автоматизированного видеотрекинга траекторий передвижения. В качестве модельного объекта использован *Danio rerio* — классический и предсказуемый представитель *Cyprinidae*, широко применяемый в физиологических и фармакологических исследованиях.

Материалы и методы

Объект исследования и условия содержания

Использованы половозрелые особи *D. rerio* средней длиной тела 1.3 ± 0.5 см ($n = 30$), полученные из маточного аквариума Центра «Аквакультура» МГУТУ им. Разумовского. Для опытов отбирали клинически здоровых рыб без повреждений эпителия и признаков избыточного слизиотделения. Рыб содержали в идентичных аквариумах без грунта объёмом 10 л (эксперимент по обонятельной чувствительности) и 5 л (эксперимент по вкусовой чувствительности) с непрерывной аэрацией, световым режимом 12 ч свет / 12 ч темнота и предварительной акклиматизацией (2 сут для группового содержания, 2–3 сут для индивидуального). За 24 ч до каждого опыта кормление прекращали.

Аттрактивные вещества

В работе использованы 5%-ные водные растворы (экстракты) четырёх веществ: чеснока (*Allium sativum*), аниса (*Pimpinella anisum*), мелассы и гаммаруса (положительный контроль, безусловный пищевой стимул). Выбор веществ основан на различии их химического профиля и предполагаемого механизма хемотимуляции: чеснок содержит серосодержащие соединения

(аллицин и его производные)[12], анис — гидрофобный трансанетол эфирного масла, меласса — гидрофильный бетаин и сахара.

Схема экспериментов

Эксперимент включал два независимых блока. В первом (обонятельная/экстраоральная чувствительность) в аквариум вносили 0.5 мл 5%-ного раствора аттрактанта, поведенческий ответ фиксировали видеосъёмкой (60 к/с, 1.5 мин на повтор). Во втором (экстраоральная/интраоральная чувствительность) рыбам индивидуально предлагали агар-агаровые гранулы, приготовленные по методике Виноградской и Касумяна [3][4] с добавлением исследуемого вещества и красителя Ронсеау 4R; порядок предъявления рандомизировали. Регистрировали время до первого схватывания гранулы, число схватываний, продолжительность удержания гранулы во рту и факт её поедания или отвержения. Хронометраж проводили электронным секундомером RGK SWE-02. Всего выполнено 130 опытов (10 — обонятельный блок, 120 — вкусовой блок, $n = 30$ на вещество).

Видеотрекинг и кинематический анализ

Видеозаписи обрабатывали в программном пакете DeepLabCut (тип анализа multianimal) с обучением детектора поз на архитектуре ResNet-50 на размеченной в среде parafí выборке кадров. Автоматический трекинг включал детекцию ключевых точек, сборку скелетов по полям аффинности частей (Part Affinity Fields) венгерским алгоритмом и сшивание треклетов методом поиска потока минимальной стоимости [7][8][9]. Из анализа исключали кадры с достоверностью детекции $p(t) < p_0 = 0.6$; кадры со скачком координат $d(t) > d_0 = 80$ пикселей относили к артефактам идентификации и исключали (5 итераций), пропуски заполняли линейной интерполяцией. Траектории сглаживали фильтром Савицкого–Голая (окно $w = 51$, степень полинома $r = 3$). По сглаженным траекториям рассчитывали общую длину пути L , среднюю скорость $\bar{v} = L/(T-1)$ и среднеквадратические отклонения координат σ_x и σ_y .

Пространственное распределение активности визуализировали в виде тепловых карт: плоскость аквариума разбивали на сетку 120×120 ячеек, гистограмму встречаемости координат сглаживали гауссовым ядром ($\sigma = 4$ бина).

Индекс вкусовой привлекательности

Долю поедаемых гранул использовали для расчёта индекса вкусовой привлекательности (ИВП) по формуле [1]:

$$\text{ИВП} = ((R - C) / (R + C)) \times 100,$$

где R — потребление гранул с веществом (%), C — потребление контрольных гранул (%).

Статистическая обработка

Ввиду отклонения распределений от нормального (тест Шапиро–Уилка) и высокой доли нулевых значений применяли непараметрические методы: критерий Манна–Уитни (парные сравнения), критерий Краскела–Уоллиса (множественные сравнения кинематических параметров) и коэффициент ранговой корреляции Спирмена (ρ). Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Расчёты выполнены в Python (NumPy, SciPy, Matplotlib), Statistica-10/12 и Stadia-5.1/7.95.

Результаты

По данным гранульного теста установлена следующая иерархия вкусовой привлекательности: гаммарус (ИВП = 48.7%) > чеснок (ИВП = 45.9%) > меласса (ИВП = 42.9%) > анис (ИВП = 37.5%) > контроль. Все опытные группы достоверно превосходили контроль по продолжительности удержания гранулы (критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$ во всех сравнениях); значимых различий между чесноком и мелассой не обнаружено ($U = 371$, $p = 0.312$).

Кинематический анализ траекторий показал, что общая длина пути L и средняя скорость $\bar{v}$ не различались между группами (критерий Краскела–

Уоллиса: $H = 0.904$, $p = 0.825$ и $H = 4.580$, $p = 0.205$ соответственно). Единственным параметром, значимо дифференцирующим группы, оказалось σ_u ($H = 9.747$, $p = 0.021$): минимальное значение отмечено у гаммаруса (252 пкс), максимальное — у мелассы (295 пкс). Обнаружена высокая положительная корреляция между длиной пути L и временем до захвата гранулы по данным вкусового теста ($r_s = +0.80$).

Аттрактант	ИВП, %	σ_u , пкс	Время захвата, с	Удержание, с
Гаммарус	48.7	252*	5.4 ± 1.4	7.0 ± 1.4
Чеснок	45.9	268	8.9 ± 2.1	3.9 ± 1.2
Меласса	42.9	295*	15.1 ± 3.0	4.6 ± 1.5
Анис	37.5	261	12.5 ± 2.9	1.9 ± 0.9
Контроль	—	312	20.3 ± 5.6	0.4 ± 0.7

Таблица 1 Сопоставление данных вкусового теста (ИВП, время захвата, удержание) и кинематического параметра σ_u по группам. * — значимое отличие по критерию Краскела–Уоллиса, $p < 0.05$.

Качественный анализ траекторий и тепловых карт выявил различные пространственные стратегии: у гаммаруса и чеснока формировались компактные ядра высокой плотности (целенаправленное поведение, патрулирование в случае чеснока), у мелассы — диффузное распределение с широким освоением акватории, у аниса — близкое к равномерному исследование площади аквариума без выраженной хемотаксической ориентации.

Обсуждение

Совместное применение гранульного теста и видеотрекинга показало высокую взаимную согласованность: высоким значениям ИВП соответствовали компактные тепловые карты с выраженным ядром плотности, низким — диффузное распределение активности, что можно рассматривать в рамках представления о «хемосенсорной конвергенции» — вещества,

эффективно активирующие обонятельную систему, как правило, характеризуются и более высокой вкусовой привлекательностью.

Анис и меласса демонстрируют полярные стратегии хемосенсорного воздействия (Таблица 1): анис, за счёт гидрофобности трансанетола, формирует устойчивый запаховый коридор, инициируя поисковое поведение, но слабо стимулирует интраоральные вкусовые рецепторы (ИВП = 37.5%); меласса, напротив, за счёт гидрофильного бетаина медленно диффундирует в воде (наибольшее время обнаружения — 15.1 с), но обеспечивает выраженную вкусовую реакцию при контакте (удержание 5.5 ± 1.2 с) — бетаин описан как потенциатор вкусовой чувствительности [5][11]. Чеснок занимает промежуточное, «сбалансированное» положение: серосодержащие соединения (аллицин и родственные ему цистеинсодержащие структуры) действуют как структурные аналоги серосодержащих аминокислот, к которым обонятельные и вкусовые рецепторы карповых проявляют высокое сродство [10], что обеспечивает синергичную активацию обеих систем.

Отсутствие межгрупповых различий по L и $\bar{v}$ при значимости σ_u указывает на то, что аттрактанты не изменяют общий уровень двигательной активности, но модифицируют пространственную организацию поиска — рыбы концентрируются в узкой полосе по ширине аквариума при воздействии наиболее аттрактивных стимулов. Это согласуется с представлениями о клино- и тропотаксисе как механизмах ориентации рыб по градиенту концентрации одоранта [6].

Практическая ценность методики определяется её низкой стоимостью (DeepLabCut — программное обеспечение с открытым исходным кодом) и неинвазивностью видеотрекинга. К ограничениям следует отнести использование единственной концентрации растворов (5%) и фиксацию только горизонтальной составляющей движения при съёмке сверху, что не позволяет анализировать вертикальную стратификацию поведения. Параметр

су предлагается в качестве первичного скринингового критерия обонятельной специфичности при разработке новых аттрактантов для аквакормов.

Заключение

Апробирована комплексная неинвазивная методика оценки аттрактивности пищевых веществ для *D. rerio*, объединяющая гранульный вкусовой тест и автоматизированный видеотрекинг с анализом тепловых карт. Показано, что параметр *су* предоставляет диагностическую информацию, не отражаемую традиционными показателями гранульного теста, а сочетание двух подходов повышает внешнюю валидность оценки аттрактивности. Методика рекомендуется для скрининга потенциальных пищевых аттрактантов в задачах разработки искусственных кормов в аквакультуре.

Список литературы

1. Касумян А. О., Морси А. М. Х. Вкусовая чувствительность карпа *Cyprinus carpio* к аминокислотам и классическим вкусовым веществам // Вопросы ихтиологии. 1996. Т. 36, № 3. С. 386–399.
2. Касумян А. О., Морси А. М. Х. Вкусовые предпочтения классических вкусовых веществ молоди белого амура *Stenopharyngodon idella*, выращенной на животном и растительном корме // Доклады Академии наук. 1997. Т. 357, № 2. С. 284–286.
3. Виноградская М. И., Касумян А. О. Вкусовая привлекательность желчных веществ для рыб // Вопросы ихтиологии. 2019. Т. 59, № 4. С. 473–482.
4. Виноградская М. И., Михайлова Е. С., Касумян А. О. Вкусовые предпочтения, оросенсорное тестирование и генерация звуков при питании у жемчужного гурами *Trichopodus leerii* // Вопросы ихтиологии. 2017. Т. 57, № 3. С. 324–337.

5. Kasumyan A. O., Doving K. B. Taste preferences in fishes // Fish and Fisheries. 2003. Vol. 4, № 4. P. 289–347.
6. Kasumyan A. O. The taste system in fishes and the effect of environmental variables // Journal of Fish Biology. 2019. Vol. 94. P. 540–555.
7. Mathis A. et al. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning // Nature Neuroscience. 2018. Vol. 21, № 9. P. 1281–1289.
8. Lauer J. et al. Multi-animal pose estimation, identification and tracking with DeepLabCut // Nature Methods. 2022. Vol. 19, № 4. P. 496–504.
9. Cao Z. et al. Realtime multi-person 2D pose estimation using part affinity fields // Proc. IEEE Conf. on Computer Vision and Pattern Recognition. 2017. P. 7291–7299.
10. Blin M., Rétaux S., Yamamoto Y. Evolution and function of olfactory receptors in teleost fishes // Cell and Tissue Research. 2024. Vol. 395, № 1. P. 1–19.
11. Li X. et al. Betaine: a promising feed additive for aquaculture? A comprehensive review // Aquaculture. 2024. Vol. 578. P. 740032.
12. Pamungkas G. Y., Arief M., Arif M. A. A. The influence of garlic and turmeric extract as attractant in commercial feed on feeding rate and fat retention in gouramy (*Osphronemus gouramy*) // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2021. Vol. 679, № 1. P. 012076.

References

1. Kasumyan A. O., Morsi A. M. H. Taste sensitivity of carp *Cyprinus carpio* to amino acids and classical taste substances. Journal of Ichthyology. 1996. Vol. 36, No. 3. P. 386–399.
2. Kasumyan A. O., Morsi A. M. H. Taste preferences of classical taste substances in juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idella* reared on animal and plant food. Doklady Akademii Nauk. 1997. Vol. 357, No. 2. P. 284–286.

3. Vinogradskaya M. I., Kasumyan A. O. Taste attractiveness of bile substances for fish. *Journal of Ichthyology*. 2019. Vol. 59, No. 4. P. 473–482.
4. Vinogradskaya M. I., Mikhailova E. S., Kasumyan A. O. Taste preferences, orosensory testing and sound generation during feeding in pearl gourami *Trichopodus leerii*. *Journal of Ichthyology*. 2017. Vol. 57, No. 3. P. 324–337.
5. Kasumyan A. O., Døving K. B. Taste preferences in fishes. *Fish and Fisheries*. 2003. Vol. 4, No. 4. P. 289–347.
6. Kasumyan A. O. The taste system in fishes and the effect of environmental variables. *Journal of Fish Biology*. 2019. Vol. 94. P. 540–555.
7. Mathis A. et al. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nature Neuroscience*. 2018. Vol. 21, No. 9. P. 1281–1289.
8. Lauer J. et al. Multi-animal pose estimation, identification and tracking with DeepLabCut. *Nature Methods*. 2022. Vol. 19, No. 4. P. 496–504.
9. Cao Z. et al. Realtime multi-person 2D pose estimation using part affinity fields. *Proc. IEEE Conf. on Computer Vision and Pattern Recognition*. 2017. P. 7291–7299.
10. Blin M., Rétaux S., Yamamoto Y. Evolution and function of olfactory receptors in teleost fishes. *Cell and Tissue Research*. 2024. Vol. 395, No. 1. P. 1–19.
11. Li X. et al. Betaine: a promising feed additive for aquaculture? A comprehensive review. *Aquaculture*. 2024. Vol. 578. P. 740032.
12. Pamungkas G. Y., Arief M., Arif M. A. A. The influence of garlic and turmeric extract as attractant in commercial feed on feeding rate and fat retention in gouramy (*Osphronemus gouramy*). *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 2021. Vol. 679, No. 1. P. 012076.