

A-33158

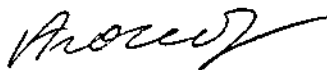
На правах рукописи

Пономарев Андрей Константинович

**ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГАМЕТОГЕНЕЗА И
СОСТОЯНИЯ ГЕПАТОПАНКРЕАСА У PROCAMBARUS CLARKII ПРИ
РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ КОРМЛЕНИЯ**

03.00.18 - Гидробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Москва, 2003

Работа выполнена в Московской Государственной Технологической Академии (МГТА)

Научный руководитель

доктор биологических наук,
профессор Симаков Ю.Г.

Официальные оппоненты

доктор биологических наук
Микодина Е.В.

кандидат биологических наук,
Полосьянец Т.Ю.

Ведущая организация - Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства (ВНИИПРХ)

Защита состоится "25" июля 2003 г. в 11 часов, на заседании диссертационного совета К 212.122.03 при Московской государственной технологической академии (МГТА), по адресу:
125040, г. Москва, ул. Болотниковская, д. 15

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московской государственной технологической академии (МГТА)

Автореферат разослан "19" мая 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук

 Николаева И.Ф.

Гистологический и гистохимический анализ гаметогенеза и состояния гепатопанкреаса у *Procambarus clarkii* при различных вариантах кормления.

Актуальность проблемы. Аквакультура асташин сталкивается с двумя очень существенными неблагоприятными факторами – с загрязнением рыбохозяйственных водоемов и с вспышками эпизоотических заболеваний, особенно «рачьей чумой». Это привело к резкому снижению производства продукции раков в Европе. Начиная с 50-х годов этот рынок стал заполняться переработанными продуктами из США. Значительное развитие получило производство (добыча и культивирование) прокамбарусов (*Procambarus* sp.). Основной объект американского производства - *Procambarus clarkii*, обладает высокой скоростью роста.

Помимо этого, наличие значительных площадей для субтропической экстенсивной астакокультуры и хорошее ее технологическое оснащение, позволили США увеличить ежегодные объемы Мирового производства красного рака на порядок. В среднегодовой ракопродукции (около 50 тыс. тонн/год) за последние годы камбарины в среднем составили 95 % (из них болотный или красный рак занимал 80 %), оставшиеся 5 % продукции давали все остальные виды культивируемых речных раков (Александрова, 1997, 1999).

Вспышки «рачьей чумы» привели к тому, что и в России произошло резкое снижение природных запасов раков. В последние 50 лет наша страна утратила роль поставщика раков в Западную Европу (Полосьянц 2002). Поэтому вопросы культивирования раков приобретают особую актуальность.

По данным астакологов, занимающихся исследованиями процессов культивирования раков, разведение американских раков рода *Procambarus* является более выгодным по сравнению с культивированием аборигенных видов, например, асташин. В настоящий момент известен ряд оригинальных технологий выращивания американских раков в искусственных установках (Александрова, 1999; Киселев, 1995; Черкашина, 1991; Унтон, 1985; Цукерзис 1989).

Однако основные усилия в разрабатываемых технологиях направлены на техническое обеспечение процесса культивирования раков.

Другое направление - биологическое (интенсификация прироста биомассы культивируемых объектов, а также стимуляция их размножения) разрабатывается в меньшей степени, хотя оно и является определяющим в при воспроизводстве раков.

Цели и задачи исследования. Цель работы – исследование воздействия различных кормов и кормосмесей на гаметогенез и состояние гепатопанкреаса, поиск наиболее эффективных репродуктивных кормов, стимулирующих

ЦНБ МСХА
Фонд научной литературы
№ А-33258

созревание гонад у красного болотного рака при индивидуальном культивировании.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ процессов гаметогенеза и роста при групповом и индивидуальном содержании раков в культивационных установках.
2. Изучить влияние различных вариантов кормления на темп роста раков.
3. Изучить гистологические и гистохимические изменения в гепатопанкреасе красного болотного рака при использовании различных вариантов кормов и определить наиболее эффективные корма, способствующие секреторной стимуляции гепатопанкреаса.
4. Изучить процессы оогенеза и сперматогенеза при различных вариантах кормления *Procambarus clarkii* и выявить наиболее оптимальные корма, ускоряющие созревание гонад.
5. На основе полученных данных выбрать наиболее оптимальные корма, способствующие быстрому созреванию гонад *Procambarus clarkii*.

Научная новизна:

- впервые исследуется оогенез и сперматогенез у *Procambarus clarkii* при культивировании на живых кормах и комбикормах на гистологическом и гистохимическом уровне;
- впервые рассматривается влияние различных кормов на процессы секреции и морфологические показатели в гепатопанкреасе красного болотного рака;
- впервые изучена динамика роста и созревания красного болотного рака при культивировании в индивидуальных ячейках на различных кормах.

Практическое значение:

- предложено содержание маточных стад американских раков в индивидуальных прозрачных ячейках общих емкостей, повышающие интенсивность их роста и созревания за счет исключения конкуренции и каннибализма среди особей и позволяющих сохранить количество особей, изначально посаженных в установку;
- предложена рецептура кормления, основанная на результатах гистологического и гистохимического анализа состояния гепатопанкреаса и гаметогенеза. Использование данных исследований позволяет ускорить процесс созревания гонад.

Апробация. Результаты исследований были доложены на научной конференции «Водные экосистемы и организмы» МГУ, 2000, на расширенных коаллоквиумах кафедры биоэкологии и ихтиологии МГТА, 2001 г. и 2002 г.

Публикации. По теме диссертации автором опубликовано 5 научных работ.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из 120 страниц машинописного текста, включая 3 таблицы и 18 рисунков.

Работа включает следующие разделы: введение, пять глав, заключение, выводы и список литературы, включающий 114 работ, из которых 57 – иностранных авторов.

Содержание работы

Глава 1. Влияние условий культивирования камбарин на гистологические изменения в их репродуктивной и пищеварительной системе (литературный обзор)

По мнению одних авторов созревание гонад у раков напрямую зависит от их размера, другие авторы считают, что скорость гаметогенеза зависит от скорости линек, по мнению третьих исследователей, важную роль при развитии гонад играет гепатопанкреас, так как - он непосредственно ответственен за процесс переваривания той или иной пищи, но так же воздействует на репродуктивную систему через гормональный обмен (Haefner, 1993; Ikeda, 1992; Spaargaren, 1998).

Из литературных данных известно, что семенник у рода *Procambarus* представляет собой ацинарную железу. В каждом ацинусе видны три доли с различными стадиями сперматогенеза. На периферии сперматогонии, следующим слоем расположены хорошо различимые сперматоциты 1 и 2-го порядков и различные стадии их делений, наконец, а за ними отмечается наличие либо сперматид, либо зрелых сперматозоидов. Сперматозоиды атипичны, заключены в цитоплазматическую массу и у них нет отчетливых границ (Рузен-Ранге, 1980; Костомарова и др., 1982; Данилова, 1993).

В отличие от оогенеза сперматогенез начинается в более раннем возрасте и не так синхронизирован как овогенез. Процесс синхронизации отмечается только в отдельных ацинусах, в которых клоны половых клеток четко ограничены в дольках (Рузен-Ранге, 1980).

У красного болотного рака (*Procambarus clarkii*) развивающиеся ооциты классифицируются 7-ю стадиями по их морфологии:

1) оогонии, 2) незрелые ооциты, 3) авителлогенные ооциты, 4 – 6) ооциты в раннем, среднем, и позднем вителлогенезе, 7) и резорбирующиеся ооциты (после вителлогенеза).

Секреторная жидкость гепатопанкреаса рака подобно желчи может эмульгировать жиры, пептонизировать белки и переводить гликоген в сахар. Помимо этого клетки пищеварительной железы участвуют в пищеварении,

захватывая мелкие частицы пищи (фагацитоз). Гепатопанкреас можно рассматривать как тест-орган, по которому можно судить о полноте и полноценности питания. Название "печень" у раков условное, так как ее клетки вырабатывают секрет, характерный как для печени, так и для поджелудочной железы высших позвоночных животных. По этой причине печень раков можно считать гепатопанкреасом, по аналогии с гепатопанкреасом рыб. В последнее время у высших раков найдена взаимосвязь между развитием яичника и гепатопанкреаса.

Изучено изменение содержания воды в гепатопанкреасе и яичнике креветки *Crangon crangon* (L.) в зависимости от массы и развития гонад. Яичники и гепатопанкреас претерпевают циклические, прогрессивные и регрессивные изменение веса и объема со сдвигом по фазе в развитии этих органов (Haefner et al., 1993). Именно с этой целью в данной работе проведено гистологическое исследование гепатопанкреаса красного болотного рака при выращивании на различных кормах.

Глава 2. Материал и методика исследований

Для исследований был взят вид: *Procambarus clarkii*. Первоначально были взяты молодые особи в возрасте 2 месяца, при средней длине 2 см (от начала антенул до конца тельсона).

В работе исследовалось воздействие на созревание гонад и состояние гепатопанкреаса следующих кормов:

- осетровый комбикорм (MS 49/12) - как корм с оптимально сбалансированными компонентами (Полосьянец, 2002);
- хирономиды - как естественный кормовой объект для гидробионтов, в том числе и раков. В нашем случае представляющий интерес по содержанию гормона – эклизона;
- энхитреи – хотя и не являющиеся естественной пищей для раков, однако богатый жирами и необходимый для усвоения жирорастворимых компонентов прокомбурасами;
- спирулина – как источник компонентов растительного происхождения, в том числе белка и пигментов, необходимых для кальциевого обмена, но с повышенным содержанием нуклеиновых кислот;
- также различные комбинации между ними.

Культивирование раков осуществлялось в лабораторных условиях, в аквариумах емкостью 20 литров. Для культивирования использовалась водопроводная отстоянная вода и применялась дополнительная аэрация. В аквариумах поддерживалась концентрация кислорода 8 мг/л. Температура воды в

аквариумах составляла 24 ± 1 °C на протяжении всего эксперимента. Световой режим в аквариальной составлял 14 часов свет – 10 часов темнота.

Раки помещались по 6 штук в каждый аквариум. Для избежания каннибализма, и для равномерного распределения корма, каждый рак был посажен в двухлитровую пластиковую емкость, соответствующую высоте аквариума. Для нормального удаления метаболитов, в индивидуальных емкостях перфорировались отверстия диаметром 5 мм, которые занимали половину всей поверхности индивидуальной емкости. Общая продолжительность опытов для каждой группы составила 90 дней.

Для получения достоверных результатов опыты проводились в две серии: январь-март 2002 г. и май-июль 2002 г. Повторность опытов - трехкратная.

Прирост по длине тела измерялся еженедельно. Проводился визуальный контроль поедаемости корма и оценка общего состояния особей.

Кормление осуществлялось два раза в сутки, в 11 и 18 часов.

В общей сложности были поставлены следующие варианты кормления:

1. Кормление раков энхитреями. Энхитрей (*Enchytraeus albianus*) выращивали на манной каше с добавлением моркови и картофеля.
2. Раки получали в качестве корма личинок хирономид. В основном использовали *Chironomus plumosus*.
3. Кормление раков сухой спирулиной. Для кормления сухой спирулиной, использовались таблетки по 0,31 г, фармацевтического препарата «фитосплат». Содержание спирулины в одной таблетке составляла 0,298 г, вспомогательных веществ – 0,012 г.
4. Кормление раков спирулиной и энхитреями. В 11 часов утра ракам давалась спирулина, а в 18 часов проводили кормление энхитреями.
5. Следующий вариант опыта характеризовался также смешанным кормлением. В те же часы выдавалась спирулина, но вместо энхитрей использовались личинки хирономид.
6. Раки получали комбикорма для осетровых рыб (продукционный MS 49/12). Кормление раков комбикормом MS 49/12 можно считать исходным экспериментом в виду стабильности компонентов корма (Полосьянец, 2002).
7. В данном варианте опыта раков содержали на комбикорме для аквариумных рыб «Sera Premium», изготовленном в Германии. В состав данного комбикорма входило 20 % спирулины.
8. Кормление раков комбикормом (продукционный MS 49/12) при групповом содержании. В этом варианте условия содержания соответствовали условиям содержания раков в других вариантах. Но раки содержались не в перфорированных пластиковых емкостях, а совместно. В качестве имитации нор использовались обрезки пластмассовых труб.

Для количественной оценки последствий воздействия различных видов кормов на гаметогенез и состояние гепатопанкреаса проводилась микрометрия на гистологических срезах. В качестве основных показателей измерялись: изменение диаметра ооцитов и отклонения в развитии при различных формах кормления раков.

Статистическая обработка полученных данных на определение достоверности разности средних проводилась по критерию Стьюдента с использованием компьютерной программы Mathcad 2000.

Для фотографирования срезов гонад раков и гепатопанкреаса использовалась цифровая камера Nikon 800 с микрофотонасадкой.

Перечень экспериментов и распределение объектов исследования по каждому из них представлены на таблице 1.

Таблица 1.

Объекты исследований и распределение экспериментального материала

Объект исследования	Кол-во раков, шт.	Вид эксперимента	Количество препаратов
Procambarus clarkii	36	Исследование гистологических и гистохимических особенностей гепатопанкреаса и гонад раков при кормлении энхитреями	36 гистологических, гистохимических препаратов
	36	Гистологические и гистохимические изменения в гепатопанкреасе и в гонадах при кормлении личинками хирономид	34 гистологических, гистохимических препаратов
	36	Гистологическая структура гонад и гепатопанкреаса при кормлении раков спирулиной	35 гистологических, гистохимических препаратов
	36	Тканевые изменения в гонадах и гепатопанкреасе рака при смешанном кормлении энхитреями и спирулиной	36 гистологических, гистохимических препаратов
	36	Гистологическая структура гонад и гепатопанкреаса раков при кормлении личинками хирономидами и спирулиной	36 гистологических, гистохимических препаратов
	36	Гистология гепатопанкреаса и гонад раков при кормлении комбикормом (MS 49/12), предназначенным для осетровых	33 гистологических, гистохимических препаратов
	36	Гистология гепатопанкреаса и гонад раков при кормлении комбикормом "Sera Premium", содержащим 20 % спирулины, предназначенным для рыб	36 гистологических, гистохимических препаратов
	36	Гистология гепатопанкреаса и гонад при групповом содержании раков	32 гистологических препаратов
Итого:	288		278

3. Результаты исследований

3.1. Влияние различных вариантов кормления на рост рака *Procambarus clarkii*

Средняя длина раков после завершения опытов по двум сериям в различных вариантах представлена на рис 1.

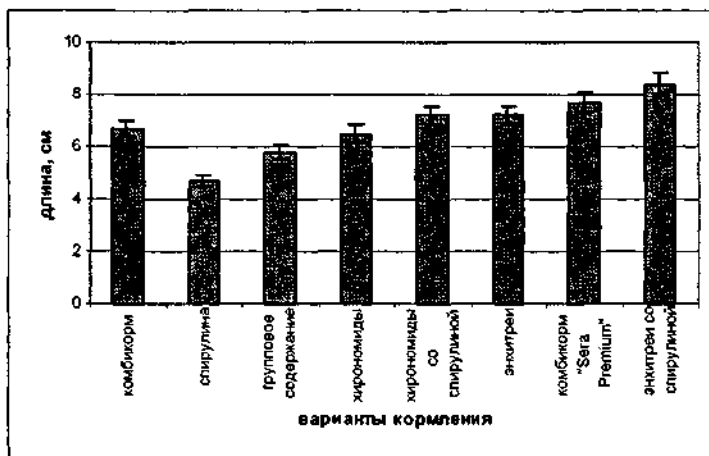


Рис. 1. Длина раков при различных вариантах кормления (при завершении эксперимента).

Содержание раков в индивидуальных ячейках общих емкостей ускоряет рост раков. Прирост раков при содержании в отдельных емкостях и кормлении осетровым комбикормом (MS 49/12) больше на 15 % чем, при групповом содержании на этом же комбикорме.

Чистая спирулина негативно влияет на рост раков. В этом варианте средняя длина раков была наименьшей и составила 4,7 см, что на 30 % меньше, чем, при кормлении раков комбикормом.

Кормление раков хирономидами не стимулирует рост раков и полученные данные близки к контролю.

Кормление энхитреями также незначительно ускоряет рост раков.

Использование спирулины в качестве добавки к кормам ускоряет процесс роста раков. Так, наибольшую длину раки достигли при кормлении энхитреями со спирулиной и комбикормом с содержанием 20% спирулины. Длина раков при кормлении энхитреями со спирулиной на 26% больше чем в контроле, а при кормлении комбикормом, содержащим 20 % спирулины, больше контрольных на 15 %.

Добавка спирулины к энхитреям увеличивает прирост раков на 17 % в

сравнении с кормлением одними энхитреями.

Достоверность различия длины раков при кормлении различными кормами и при групповом содержании по отношению к контрольной группе, оценивалась методом Стьюдента: двухвыборочным t-тестом с различными дисперсиями. Вероятность совпадений выборок $P (T \leq t)$ приведены в таблице 2.

Таблица 2.

Вероятность совпадений выборок при различных вариантах кормления

Вариант	Среднее	Дисперсия	$P (T \leq t)$
Контроль (комбикорм)	6,7	0,08	-
Комбикорм (массовое содержание)	5,8	0,006	0,0002
Энхитреи со спиролиной	8,5	0,09	0,000001
Хирономиды со спиролиной	7,2	0,07	0,03
Комбикорм «Sera Premium»	7,7	0,07	0,0001
Хирономиды	6,6	0,04	0,2
Энхитреи	7,2	0,1	0,03
Спиролина	4,7	0,2	0,00001

3.2. Гистологическое строение печени красного болотного рака при различных вариантах кормления

При кормлении раков комбикормом для осетровых рыб не отмечается отклонений в гистологическом строении гепатопанкреаса. В пищеварительной железе наблюдается умеренная секреция, о которой можно судить по количеству вакуолей в эпителии канальцев. На гистохимических препаратах видно равномерное распределение гликопротеидов и гликогена (рис. 3).



Рис. 3. Срез гепатопанкреаса при кормлении комбикормом (10x15).



Рис. 4. Срез гепатопанкреаса при кормлении хирономидами (10x15).

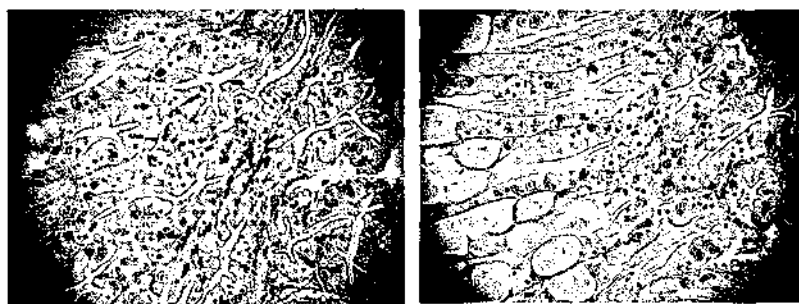
При групповом содержании и кормлении раков комбикормом (MS 49/12) высота эпителия трубочек гепатопанкреаса соответствует норме, однако секреция в клетках гепатопанкреаса несколько снижена, по сравнению с секрецией, наблюдаемой при кормлении раков комбикормом.

При кормлении энхитреями без каких либо добавок, раки обладают умеренной секрецией в клетках пищеварительной железы, что соответствует норме.

При кормлении раков личинками хирономид пищеварительная железа приобретает зеленоватую окраску. Секреция в клетках гепатопанкреаса несколько снижена по сравнению с секрецией, наблюдаемой при кормлении раков комбикормом (рис. 4), что сказывается и на морфологии трубочек гепатопанкреаса (на препаратах отмечаются спадшие стенки эпителия трубочек гепатопанкреаса).

Кормление раков только одной спирулиной оказывает отрицательное влияние на состояние пищеварительной железы. В некоторых зонах отмечается отсутствие секреции гранул фермента, а стенки трубочек гепатопанкреаса резко спадшие (рис. 5а). Высота выстилающего их эпителия значительно уменьшилась.

В этой же серии опытов можно найти зоны в гепатопанкреасе рака, где видна резкая граница перехода от деградирующих участков печеночных трубочек к гиперсекреции (рис. 5б).



а)

б)

Рис. 5. Срез гепатопанкреаса при кормлении спирулиной (8х15).

Следующий вариант опыта - кормление раков двумя видами кормов - спирулиной и энхитреями.

При исследовании гистологических препаратов в указанном варианте можно отметить благоприятное воздействие на гепатопанкреас красных болотных раков указанного сочетания кормов.

Эпителий трубочек гепатопанкреаса высокий и содержит множество вакуолей с секретом (рис. 6). Все это указывает на активную ферментативную деятельность печени.

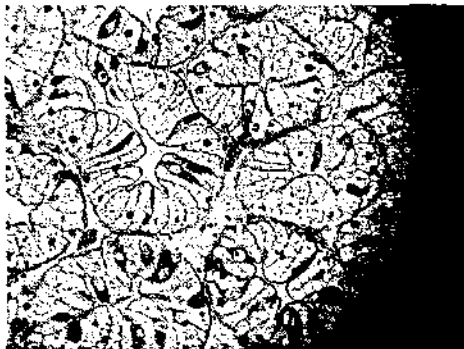


Рис. 6. Срез гепатопанкреаса при кормлении энхитреями и спирулиной (10х15).

При кормлении раков личинками хирономид и спирулиной наблюдаются морфологические сдвиги структуры эпителия канальцев гепатопанкреаса в сторону улучшения, в сравнении с использованием каждого из этих кормов в отдельности. Морфология печеночных трубочек близка к таковой в контрольной группе.

В последнем варианте опытов ракам давался комбикорм для рыб «Sega Premium». Исследование гистологических препаратов показало, что добавление спирулины к комбикуорму для рыб улучшает его свойства, так как на микропрепаратах отмечается усиление секреции вакуолей в эпителии гепатопанкреаса. Структура канальцев не нарушена, печеночный эпителий увеличивается в высоту по сравнению с эпителием у раков, контрольной группы.

Степень образования вакуолей с ферментами в гепатопанкреасе при различных вариантах кормления приведена на рис. 7.

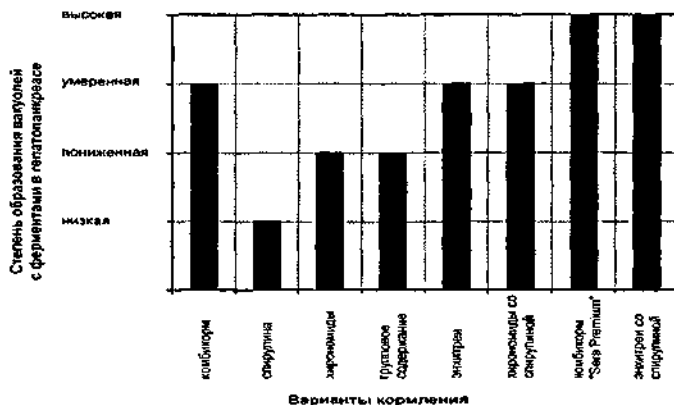


Рис. 7. Степень образования вакуолей с ферментами в гепатопанкреасе, при различных вариантах кормления.

3.3. Исследования сперматогенеза у красного болотного рака при использовании различных кормов

В группе раков, выращенных на комбикормах для осетровых рыб, отмечается 5 стадий сперматогенеза.

В ацинусах можно встретить сперматоциты на стадиях редукционного и эквационного деления, а также расхождение клеток и выстилание периферических стенок ацинусов (рис. 8).

Указанные изменения в ацинусах соответствуют стадиям развития и течению сперматогенеза без отклонений, выявленных в процессе сперматогенеза у десятиногих раков другими исследователями (Chow et al., 1991).



Рис. 8. Срез семенника при кормлении раков комбикормом (MS 49/12) (40x15).

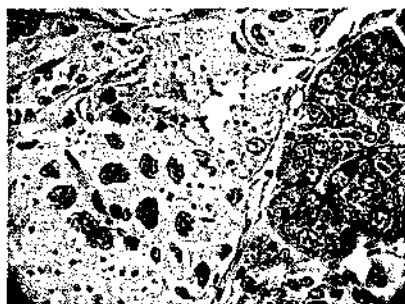


Рис. 9. Срез семенника при кормлении энхитреями со спирулиной (40x15).

При кормлении раков энхитреями и энхитреями со спирулиной (рис. 9) созревание клеток в ацинусах усиливается. Во многих цистах видны делящиеся сперматоциты первого и второго порядка. Много ацинусов наполнено сперматидами.

В некоторых цистах происходит эквационное деление. Гистохимическая окраска на гликопротеиды, указывает на высокое содержание гликогена в стволовых клетках и в растущих сперматоцитах 1-го порядка.

При кормлении исследуемых особей в течение 3-х месяцев энхитреями и смесью спирулины с энхитреями не отмечаются нарушения митотической активности при размножении сперматогоний и не обнаруживаются нарушения редукционного и эквационного делений.

Совершенно иная картина наблюдается при кормлении раков только одной спирулиной (рис. 10).

В семенниках можно отметить ацинусы со всеми стадиями сперматогенеза. Однако наполнение цист семенника созревающими клетками неполное, и видны ацинусы в большей части которых отмечаются начальные стадии размножения

сперматогоний.

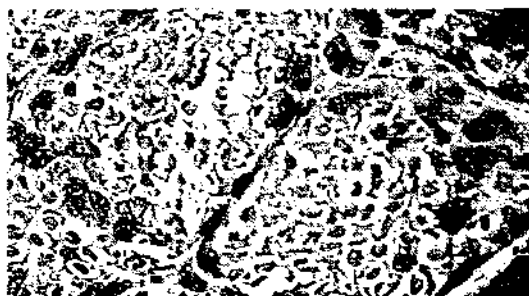


Рис. 10. Срез семенника при кормлении спирулиной (40х15).

Кормление раков хирономидами и комплексное кормление хирономидами со спирулиной не приводит к стимуляции процессов сперматогенеза и действует на процессы предзародышевого развития сходно с вариантом, где использовался комбикорм. Гистохимическая окраска показывает, что количество мукополисахаридов и гликогена в клетках ашинусов несколько снижено, что говорит о неблагоприятном воздействии на углеводный обмен при сперматогенезе.

В следующем варианте раки получали комбикорма для рыб, содержащие 20 % спирулины. В этом случае, корм, содержащий спирулину, благоприятно влияет на процессы сперматогенеза. В семенниках виден активный рост сперматоцитов 1-го и 2-го порядков, отмечена стимуляция делений созревания. Процессы спермиогенеза также активизированы.

У раков при групповом содержании в семенных долях отмечается большее количество сперматоцитов на стадиях редукционного деления, созревание семенников на одну стадию отстает по сравнению с контрольными особями при индивидуальном содержании. Максимальное количество клеток на стадии сперматогенеза при различных вариантах кормления раков приведены на рис. 11.

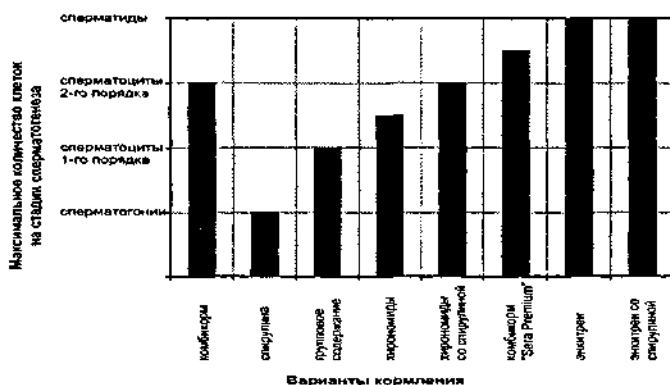


Рис. 11. Максимальное количество клеток сперматогенеза при различных вариантах кормления.

3.4. Цитологические изменения в ооцитах красного болотного рака при использовании различных кормов

В контрольной группе раков получавших осетровый комбикорм, отмечаются ооциты I-го порядка на стадии трофоплазматического роста. В ооцитах идет накопление мелкозернистых гранул желтка (рис. 12). Гистохимическая окраска препаратов ШИК- реакцией, показывает умеренное накопление гликопротеидов в ооцитах.

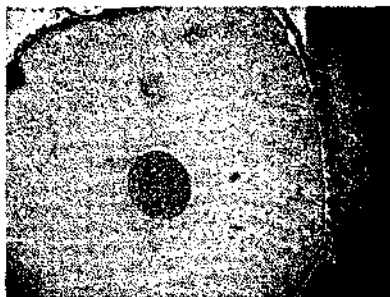


Рис. 12. Срез яичника при кормлении комбикормом MS 49/12 (10x15).

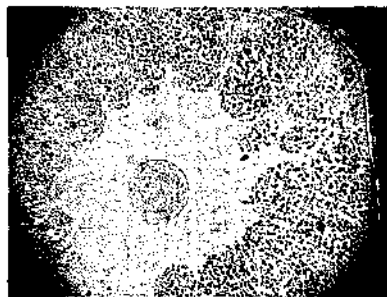


Рис. 13. Срез яичника при кормлении энхитреями (10x15).

При кормлении раков энхитреями основной особенностью цитоплазмы ооцитов I-го порядка можно считать наличие крупных гранул желтка. Ооциты в яичнике красных болотных раков выращенных при кормлении энхитреями представлены на рис. 13. Выявлено более интенсивное накопление гликопротеидов, чем в контроле.

При кормлении раков энхитреями и спироулиной, также отмечается наличие крупных гранул желтка. Ооциты в этом варианте, были самыми большими и ядро в них было сдвинуто к анимальному полюсу яйцеклетки, что указывает на созревание ооцита I-го порядка и подготовку их к редукционному делению (рис. 14).

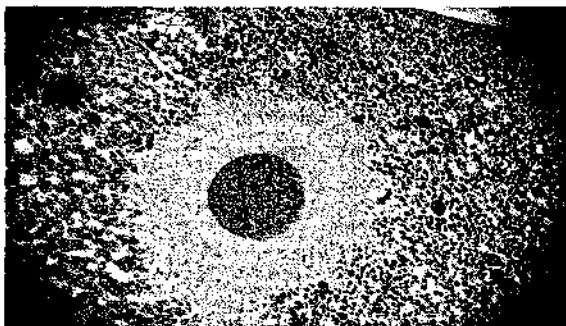


Рис. 14. Срез яичника при кормлении энхитреями и спироулиной (20x10).

Кормление раков хирономидами, не стимулирует процессы оогенеза. В ооцитах 1-го порядка идет синтез мелкозернистого желтка, как и в контрольной группе.

Совершенно другая картина наблюдается при кормлении раков спирулиной. Кормление раков спирулиной приводит к угнетению процессов оогенеза. Ооциты отстают в росте и в 1,5 раза меньше, чем при кормлении раков комбикормом.

Гистохимические методы выявления гликогена и мукополисахаридов показывают (по степени окраски), что процессы накопления углеводного желтка задерживаются по сравнению с особями, выращенными на комбикорме. Гистологическая картина состояния ооцитов у раков, выращенных на спирулине, представлена на рис. 15.



Рис. 15. Срез яичника при кормлении спирулиной (10x15).

Использование в качестве корма комбикорма «Sera Premium» положительно влияет на оогенез раков. В этом случае ооциты 1-го порядка накапливают мелкозернистые гранулы желтка, как и в контрольной группе, но они на 25 % больше.

Влияние совместного кормления спирулиной с личинками хирономид на оогенез, сходно с кормлением раков комбикормом.

При групповом содержании опытных раков ооциты за три месяца эксперимента отстают от созревания ооцитов при индивидуальном содержании. Гистохимическая окраска показывает понижение углеводного обмена в цитоплазме ооцитов, по отношению к контролю. Средний диаметр ооцитов в этом варианте на 20 % меньше контрольных.

Диаметр ооцитов при различных вариантах кормления раков представлены на рис. 16.



Рис 16. Диаметр ооцитов при различных вариантах кормления.

Глава 4. Обсуждение результатов

Результаты воздействия различных вариантов кормления на рост, гаметогенез и состояние гепатопанкреаса при завершении эксперимента (табл. 3).

Таблица 3.

Результаты воздействия различных вариантов кормления на рост, гаметогенез и гепатопанкреас раков

Форма кормления	Длина раков, см	Сперматогенез	Оогенез		Гепатопанкреас
		Основная стадия сперматогенеза	Желточные зерна	Диаметр ооцитов, мкм	Вакуолизация ферментов в гепатопанкреасе
Комбикорм MS 49/12 (контроль)	6,7	Сперматоциты 2-ого порядка	Мелкозернистые	370	Умеренная
Комбикорм MS 49/12 (групповое содержание)	5,8	Сперматоциты 1-ого порядка	Мелкозернистые	296	Умеренная
Спирулина	4,7	Сперматогонии	Мелкозернистые	254	Низкая
Хирономиды	6,5	Сперматоциты 1-ого и 2-ого порядка	Мелкозернистые	352	Пониженная
Энхитреи	7,2	Сперматиды	Крупнозернистые	664	Высокая
Хирономиды со спирулиной	7,2	Сперматоциты 2-ого порядка	Мелкозернистые	398	Умеренная
Комбикорм «Sera Premium»	7,7	Сперматоциты 2-ого порядка и сперматиды	Мелкозернистые	481	Высокая
Энхитреи со спирулиной	8,4	Сперматиды	Крупнозернистые	756	Высокая

Анализ результатов показал, что лучшим репродуктивным кормом для красных болотных раков оказываются олигохеты-энхитреи, как в чистом виде, так и в смеси со спирулиной. Использование в качестве живых кормов энхитрей при культивировании красных болотных раков лучше отражается на их тканевом строении и на репродуктивной функции, чем кормление хирономидами, или рыбой, которые часто используются при искусственном выращивании камбарид. Вероятно, что энхитреи содержат органические соединения, которые ускоряют оогенез раков, а нами в этом случае отмечено и ускорение роста ооцитов под влиянием этих биологически активных веществ. Индийским исследователям удалось выделить из олигохет *Pontodrilus bermudensis* два органических соединения, которые ускоряют овогенез и откладывание яиц раками. К сожалению, разделив эти два вещества, обладающие стимулирующим свойством, они не установили их химический состав (Maheswarudu et al., 1995).

Рост раков тесно связан с линькой. Размеры рака увеличиваются сразу после сброса карапакса до затвердевания нового. По видимому, при кормлении раков олигохетами снижается уровень гормона, ингибирующего линьку. Подобный гормон у красного болотного рака находится в синусной железе и его содержание колеблется в зависимости от концентрации эклистероида в гемолимфе (Nakatsuji et al., 1999). Возможно, при кормлении раков хирономидами, которые сами содержат эклистерон, концентрация этого гормона в гемолимфе повышается, что тормозит в свою очередь линьку. В отличие от хирономид энхитреи не содержат в своих тканях высоких концентраций эклистероидов и поэтому не сдерживают линьку раков.

Особый интерес вызывает использование в качестве корма синезеленой водоросли *Spirulina platensis*. В наших опытах биологически активные вещества из спирулины попадали к ракам как при кормлении чистой спирулиной, так и при использовании спирулины как добавочного корма. Благодаря этому решается важная научно-практическая задача, а именно снижение содержания нуклеиновых кислот на единицу кормовой продукции. Повышенное содержание нуклеиновых кислот в корме может привести к нарушению метаболизма и даже к возникновению злокачественных опухолей. Высшие растения содержат 1 – 2 % нуклеиновых кислот, одноклеточные водоросли и простейшие - 4 %, дрожжи - 10 %, а в спирулине до 6 %. В корме для позвоночных животных оптимальным следует считать содержание нуклеиновых кислот 1 – 2 %.

В нашем случае лучшие результаты получены тогда, когда кормление осуществлялось не чистой спирулиной, а совместно с использованием других кормов, например энхитрей или комбикорма для рыб. При подобных условиях красным болотным ракам поступает меньше нуклеиновых кислот, а при использовании готового комбикорма со спирулиной уже заранее определено, что раки получают только 1/5 часть нуклеиновых кислот по отношению питания только

одной спироулиной.

По данным DaSilva (1978) у многих животных, в основном это крупный рогатый скот, весь белок, вырабатываемый спироулиной, обеспечивает нормальную скорость роста. При этом у них не наблюдается аномалий в развитии и патологических процессов.

Перспективы использования спироулины в качестве корма для культивируемых видов раков очень высоки, так как урожайность спироулины в десять раз выше, чем у пшеницы и соевых бобов. Однако, как показали наши эксперименты, красные раки плохо переносят кормление чистой спироулиной, что видимо, связано с высоким содержанием нуклеиновых кислот в спироулине и этим они еще раз подтвердили наличие сходной ферментативной системы у лошади и высших раков, выявленной за последнее время (Camba et al., 1997).

Различные варианты кормления раков со спироулиной позволили нам сделать вывод, что другие корма, содержащие 1 – 2 % нуклеиновых кислот в сочетании со спироулиной доводят концентрацию нуклеиновых кислот в рационе красного болотного рака до 3 %, что значительно повышает кормовую ценность спироулины (Симаков, Пономарев, 2002).

В спироулине содержится 65 % белков, 19 % углеводов, 6 % пигментов, 4 % липидов, 3 % волокон и 3 % золы (Сассон, 1987). Для культивирования высших ракообразных требуется наличие в корме высокого содержания пигментов, в том числе и каротиноидов, особенно при построении панциря. Как раз этим требованиям удовлетворяет состав спироулины.

При добавлении спироулины к энхитреям, повышается их пищевая ценность. Это дает возможность использовать для раков живой корм большим содержанием жира, концентрация которого компенсируется большим содержанием белка и каротиноидов при добавлении спироулины. Так как энхитреи живут в почве, и практически не метаболизируют пигменты, добавка к энхитрен спироулины позволяет ракам получить необходимые для них пигменты из водорослей.

Основные выводы

1. Культивирование раков в индивидуальных ячейках общих проточных емкостей существенно ускоряет скорость роста раков и процессы их полового созревания.
2. Кормление раков одной спироулиной угнетает рост раков, а кормление раков с частичным использованием спироулины стимулирует рост раков. Так наибольшую интенсивность роста раков обеспечивает кормление энхитреями со спироулиной. Вторым по эффективности следует считать комбикорм для рыб "Sera Premium", содержащим 20 % спироулины.

3. Кормление чистой спирулиной вызывает явное нарушение секреции гепатопанкреаса. Добавление спирулины к кормам способствует секреции гепатопанкреаса. Наибольшая секреция ферментов в клетках эпителия трубочек гепатопанкреаса – при кормлении раков энхитреями со спирулиной и комбикормом для рыб "Sera Premium".
4. Анализ процессов оогенеза и сперматогенеза показал, что из исследуемых кормовых объектов наибольшую стимуляцию созревания гонад вызывают энхитреи, а энхитреи со спирулиной вызывают максимальную стимуляцию в эксперименте. Кормление раков чистой спирулиной резко замедляет процессы гаметогенеза.
5. Кормление раков одной спирулиной равно отрицательно как для полового созревания, так и для роста, при этом наблюдается нарушение секреции гепатопанкреаса. Спирулина в качестве единственного корма не пригодна для выращивания *Procambarus clarkii*.
6. На основе проведенных исследований оптимальным репродуктивным кормом для *Procambarus clarkii* является энхитреи со спирулиной.

Список работ опубликованных по теме диссертации

1. Пономарев А.К. Спирулина и ее воздействие на биологические структуры пищеварительной системы // Ж. Проблемы Биовалетехнологии №1(2), 2002, С. 62-71.
2. Пономарев А.К. Симаков Ю.Г. Сперматогенез у красного болотного рака при культивировании на различных кормах // Сборник научных трудов молодых ученых МГТА - М.: МГТА, 2002 - Вып. II, С. 70-76.
3. Пономарев А.К., Симаков Ю.Г. Оогенез у красного болотного рака при культивировании в индивидуальных емкостях на различных кормах // Сборник научных трудов молодых ученых МГТА – М.: МГТА, 2002 – Вып. II, С. 77-82.
4. Пономарев А.К., Симаков Ю.Г. Перспектива содержания культивируемых видов раков в индивидуальных ячейках общих проточных емкостей // Сборник научных трудов молодых ученых МГТА – М.: МГТА, 2002 – Вып. II, С. 83-85.
5. Пономарев А.К. Биомониторинг по флуктуирующей асимметрии // Сбор. Водные экосистемы и организмы. М.: МАКСпресс 2000, С. 66-67.

