

# ПРОБЛЕМЫ ИММУНОЛОГИИ, ПАТОЛОГИИ И ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ РЫБ



Москва 2011

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
Научный Совет по проблемам гидробиологии и ихтиологии РАН  
Институт биологии внутренних вод  
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК  
Отделение ветеринарной медицины  
МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ  
ФГУ Межведомственная ихтиологическая комиссия  
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ  
Московский государственный университет технологий и управления

# **ПРОБЛЕМЫ ИММУНОЛОГИИ, ПАТОЛОГИИ И ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ РЫБ**

*Расширенные материалы  
III Международной конференции*

БОРОК – МОСКВА  
2011

**Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб.** Расширенные материалы III Международной конференции, Борок, 18-22 июля 2011 года / Под редакцией д.б.н., проф. В.Р. Микрякова, д.б.н. проф. А.М. Наумовой, д.б.н., проф. А.Л. Никифоров-Никишина, к.б.н. Л.В. Балабановой, к.б.н. Д.В. Микрякова. М.: Изд-во РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева, 2011. 346 с.

Рассматриваются вопросы эволюционной, экологической, инфекционной, инвазионной патологии и иммунологии. Дается характеристика последствий антропогенного загрязнения водных экосистем, транспортного, токсического стрессов, условий содержания в аквакультурах на иммунологические, биохимические, генетические механизмы адаптации к паразитам, характер проявления патологических, эпизоотических процессов. Предлагаются новые подходы управления состоянием здоровья гидробионтов и иммунитетом рыб, основанные на использовании специфических и неспецифических иммуномодуляторов, гормональных препаратов и создании благоприятных для роста и развития экологических условий. Приводятся данные о возможности использования морфопатологических, биохимических, иммунологических, паразитологических показателей при оценке здоровья гидробионтов, обитающих в морских и пресноводных экосистемах и условиях аквакультуры.

Тематика представленных сообщений разнообразна и будет интересна биологам, ихтиопатоологам, иммунологам, паразитологам, экологам, токсикологам, рыбоведам, практическим работникам по разведению гидробионтов, специалистам, занимающимся вопросами охраны природы, борьбы с болезнями и преподавателям вузов.

Печатается по решению Оргкомитета  
Международной научно-практической конференции.

Ответственные за выпуск: академик РАН *Д.С. Павлов*;  
академик РАСХН *А.М. Смирнов*;  
д.б.н., проф. *В.Р. Микряков*;  
д.б.н. проф. *А.М. Наумова*;  
д.б.н., проф. *А.Л. Никифоров-Никишин*;  
к.б.н., *О.А. Фомичев*.

За достоверность представленных к публикации материалов ответственность несут авторы.

ISBN 978-5-9675-0545-4

**Problems of immunology, pathology and fish health protection.** Enlarged materials of III International conference, Borok, 18-22 July 2011. Under the editorship of Doctor of Biological Sciences, Prof. V. R. Mikryakov, Doctor of Biological Sciences, Prof. A.M. Naumova, Doctor of Biological Sciences, Prof. A. L. Nikiforov-Nikishin, Candidate of Biological Sciences L.V. Balabanova, Candidate of Biological Sciences D. V. Mikryakov.

Questions of evolutionary, ecological, infectious, invasion pathology and immunology are considered. Characteristic is given of the effects of anthropogenic pollution of aquatic ecosystems, of transport, toxic stresses, and aquaculture conditions on immunological, biochemical, genetic mechanisms of adaptation, growth rates, development, survival, pathological and epizootic processes. New approaches for the control of hydrobiont health and fish immunity based on specific and non-specific immunomodulators, hormonal preparations and ecological conditions favorable for growth and development are suggested. Data on the use of morphopathological, biochemical, immunological and parasitological indices for assesment of aquatic organisms inhabiting marine and freshwater ecosystems as well as in aquaculture are presented.

The themes of presented works are diverse and will be of interest to biologists, ichthyopathologists, immunologists, parasitologists, ecologists, toxicologists, pisciculturists, aquatic organism breeders, specialists in the field of environmental protection and health control and lecturers at institutes of higher education.

Editorial Board: Academician RAN *D.S. Pavlov*  
Academician RAAS *A.M. Smirnov*  
Doctor of Biological Sciences, Prof. *V.R. Mikryakov*;  
Doctor of Biological Sciences, Prof. *A.M. Naumova*;  
Doctor of Biological Sciences, Prof. *A.L. Nikiforov-Nikishin*;  
Candidate of Biological Sciences, *O.A. Fomichov*;

Authors of the corresponding materials are responsible for reliability of the data presented in these collected articles.

Книга печатается по решению Ученого совета ИБВВ РАН от 11 мая 2011 г.  
Издание осуществлено при финансовой поддержке  
Российского фонда фундаментальных исследований по проекту № 11-04-00662-г

© Институт биологии внутренних вод РАН, 2011  
© Межведомственная ихтиологическая комиссия, 2011  
© Московский государственный университет  
технологии и управления, 2011

## ПРЕДИСЛОВИЕ

III Международная конференция «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов» организована Решением бюро отделения общей биологии РАН совместно с отделениями ветеринарной медицины и зоотехнии РАСХН, Федеральным агентством по рыболовству МСХ РФ (ФГУ «Межведомственная икhtiологическая комиссия»), Министерством образования и науки (Московский государственный университет технологии и управления) на базе лаборатории иммунологии Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН.

На конференции представлен широкий круг актуальных проблем иммунологии и патологии гидробионтов, направленных на охрану их здоровья, управление биологической продуктивностью, обеспечение оптимального роста, развития и определение роли иммунологических механизмов в реализации процессов адаптации к повреждающим факторам (паразитам, ксенобиотикам) в антропогенно-трансформированных естественных экосистемах и при воспроизводстве их в условиях аквакультуры.

В сборник включены 86 научных сообщений. Авторами статей являются исследователи ведущих научных центров Российской академии наук, высших учебных заведений, отраслевых рыбохозяйственных и ветеринарных институтов не только Российской Федерации, но и Украины, Польши, Нидерландов, Германии, Японии. В представленных материалах рассматриваются эволюционные, экологические, генетические, физиолого-биохимические, инфекционные, инвазионные, токсикологические и алиментарные аспекты патологии и иммунологии; вопросы оценки качества среды обитания, основанные на данных анализа морфопатологических, иммунологических, биохимических, физиологических, микробиологических, паразитологических показателей гидробионтов, обитающих в антропогенно-трансформированных, техногенно-загрязненных пресноводных и морских естественных экосистемах и в условиях их искусственного воспроизводства; вопросы управления охраной здоровья водных животных путем воздействия на структурно-функциональное состояние иммунной системы специфическими и неспецифическими иммуностимуляторами, использования лекарственных препаратов, пробиотиков, кормления их доброкачественными кормами и создания экологически безопасных условий для обеспечения оптимального роста, развития и сохранения индивидуальной целостности объектов аквакультуры на всех этапах их онтогенеза.

В соответствии с основными направлениями научной программы, вынесенными для обсуждения на конференции, в сборнике представлены доклады, посвященные актуальным вопросам общей и частной иммунологии и патологии; иммунитету рыб и других гидробионтов к паразитам; иммунологическим механизмам адаптации к абиотическим факторам; проблемам охраны здоровья объектов аквакультуры; оценке состояния здоровья особи, популяций и экосистем.

В заключение следует отметить, что представленные в сборнике статьи будут интересны для широкого круга специалистов, занимающихся разработкой фундаментальных и научно-практических проблем патологии, иммунологии, охраны здоровья и борьбы с болезнями рыб и других гидробионтов, вопросами их воспроизводства в естественных и выращивании в искусственных условиях.

*академик РАН Д.С. Павлов;  
академик РАСХН А.М. Смирнов;  
д.б.н., проф. В.Р. Микряков;  
д.б.н. проф. А.М. Наумова;  
д.б.н., проф. А.Л. Никифоров-Никишин;  
к.б.н., О.А. Фомичев.*



## ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ЭПИЗООТОЛОГИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ

Л.И. Бычкова<sup>1</sup>, Л.Н. Юхименко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Московский государственный университет технологий и управления (МГУ ТУ)  
г. Москва, Россия, larabychkova@mail.ru*

<sup>2</sup> *ФГУП Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства, п. Рыбное, Московской области, Россия, VNIPRH@mail.ru*

При постановке диагноза бактериального заболевания у рыб специалисты всегда основываются на триаде Коха: наличие клинических признаков болезни, выделение бактериальной культуры из внутренних органов больной рыбы и положительная биопроба с выделенным возбудителем. Эпизоотология таких болезней часто ограничивается понятием о попадании возбудителя в "здоровый" водоем. Однако в последние годы решающая роль стала отводиться загрязнению водной среды, то есть стала допускаться возможность формирования вирулентного возбудителя путем повышения вирулентности присутствующих в воде "в норме" сапрофитных форм бактерий. В этих условиях диагностический принцип Коха явно устарел. Стало очевидным, что значительный ущерб интенсивному рыбоводству наносят заболевания, протекающие без ярких клинических признаков, в скрытой форме. Установлено, что "в норме" во внутренних органах рыб часто встречаются бактерии - возбудители заболеваний, а результат биопробы становится непоказательным в условиях различного иммунного статуса внешне однородных рыб и широкого антигенного разнообразия возбудителя.

Использование дорогих антибактериальных средств не всегда приводит к оздоровлению эпизоотической ситуации и не всегда оправдано. Поэтому назрела настоятельная необходимость, направленная не столько на ликвидацию заболевания, сколько на устранение предпосылок обострения эпизоотической обстановки в рыбоводных хозяйствах. Именно в экологическом аспекте эпизоотологии бактериальных болезней рыб и необходимо рассматривать результаты настоящих исследований.

Наши работы и работы других авторов (Езепчук, 1977; Борисенко, 1991) подтвердили необходимость проведения параллельных бактериологических исследований воды и рыбы на протяжении всего летнего выращивания рыбы, что позволяет лучше оценивать эпизоотическую ситуацию в данный момент.

Сравнительный анализ за многие годы исследований позволил выявить наличие следующих экологических процессов. В летний период в водной среде бурно активизируются микробиологические процессы. Определяющими экологическими факторами активизации бактерий являются уровень рыбоводной эвтрофикации и температура воды, влияющие на рост численности различных групп бактерий, в том числе азромонад, кишечных бактерий, неферментирующих щелочеобразующих бактерии (НФЩ) и др. (Аморос Хименес, 1993; Юхименко, Койдан, 1997).

Наши исследования и сведения, полученные из других источников, показывают, что в условиях растущей агрессивности водной среды возбудителем может стать любые условно - патогенные сапрофитные бактерии родов *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Acinetobacter* и др. - в зависимости от состава пищевого для бактерий субстрата. Само наличие условно - патогенных бактерий в паренхиматозных органах рыб ряд авторов считают формой заболевания (Рудиков, Грищенко, 1985; Юхименко и др., 1987; Бычкова и др., 1995; Грищенко, Смирнов, 1997). Кроме того, обсемененность органов создает условия пассивирования бактерий через организм ослабленных рыб, приводит к росту их вирулентности и при неизменности данного экологического процесса создает тенденцию к возникновению более острых форм болезни.

Наши многолетние исследования показали возможность пассивирования подвижных аэромонад через организм ослабленной, а затем и здоровой рыбы (Юхименко и др., 2001; Бычкова и др., 2007).

Варьирующими признаками патогенных бактерий являются, как правило, вирулентность и антигенность, а у выращиваемых рыб - иммунокомпетентность.

Экологический аспект бактериального паразитизма включает исследование особенности распространения бактерий как среди популяции хозяина – рыбы, так и внутри организма (места локализации), оценку динамики роста популяции бактерий и рыб, изучение регулирующего действия факторов внешней среды (Кеннеди, 1978).

Решение этих вопросов и было положено в основу наших исследований при изучении микробиоценоза воды и рыбы, их взаимоотношения в процессе выращивания рыбы, определение роли отдельных групп микроорганизмов как индикаторов санитарного состояния водоема.

Уровень восприимчивости или устойчивости к заболеванию у рыб прослеживается в существовании четко выраженной сезонности эпизоотий инфекционных заболеваний (Катичева и др., 2000).

По достижении температурного оптимума происходит вспышка численности возбудителей заболеваний, находящихся как в окружающей рыб водной среде, так и в самом организме рыб. В этих условиях возрастает интенсивность патогенного воздействия на рыб, что часто ведет к развитию инфекционного процесса (Тимаков и др., 1968; Лукьяненко, 1982; Беляков и др., 1987).

Пик численности бактерий в паренхиматозных органах рыбы совпадает с пиком численности их в воде в период высоких температур (22° – 25°С) и приходится на момент возникновения бактериальной инфекции рыб (июнь) (табл.).

Пик численности аэромонад в паренхиматозных органах рыбы также совпадает с пиком численности аэромонад в воде в тот же период и затем приходится на момент возникновения ассоциативных инфекций (август - начало сентября). Полученные данные о динамике численности условно - патогенных бактерий не противоречат и дополняют исследования многих авторов (Каховский, 1991; Борисенко, 1991; Бычкова, Юхименко, 2007).

В развитии второго пика заболевания большую роль также играют бактерии рода *Aeromonas*, представленные в основном *A. sobria*, реже другими видами. ДНК-азная активность аэромонад возрастает постепенно с июня по сентябрь, в этот период часто отмечают максимальные значения ДНК-азы аэромонад, изолированных из внутренних органов рыб. Минимальные значения ДНК-азы зарегистрированы у водных изолятов в начале летнего выращивания (май-июнь).

Проведенные исследования динамики контаминации паренхиматозных органов рыб условно - патогенными бактериями и ее зависимость от микрофлоры воды дают возможность обобщить данные об эпизоотологии бактериальных

болезней рыб. Было установлено, что динамика бактериальной контаминации органов рыб и бактериологических показателей воды взаимосвязаны, т.е. с ростом водной бактериальной обсемененности на определенном этапе в органах рыб появляются вирулентные бактерии. На следующем уровне развития микробиоценоза появляются доминирующие группы условно - патогенных бактерий.

В осенне-зимний период, когда интенсивность эксплуатации прудов снижена, в паренхиматозных органах рыб бактерий практически нет. Таким образом, очевидно, что экологическая ситуация в рыбоводных прудах доходит до критического уровня в момент появления в паренхиматозных органах рыб условно - патогенных бактерий. Резко возрастает вероятность возникновения бактериальных болезней рыб и неизбежно возрастают энергозатраты рыб на иммунную реакцию организма, что значительно снижает резистентность у них. Возможность пассирования условно - патогенных микроорганизмов через рыбу создает предпосылки для роста их вирулентности и изменению симбионтных отношений в системе "паразит - хозяин" в сторону паразитирования доминирующих групп бактерий в рыбе.

Таблица.

Сезонная динамика выделения бактерий различных групп из воды и от рыбы, %

Микроорганизмы	Месяцы						
	май	июнь	июль	август	сентябрь	октябрь	ноябрь
Вода							
аэромонады	25	35	35	41	45	25	20
псевдомонады	10	0	0	0	0	10	25
энтеробактерии	50	28	30	28	25	20	10
НФЦ (ацинетобактеры, моракселлы)	15	20	25	22	25	35	45
бациллы	0	7	10	9	5	0	0
Итого:	100	100	100	100	100	100	100
Контаминированная рыба							
аэромонады	45	50	40	45	45	45	0
псевдомонады	15	0	0	0	5	10	0
энтеробактерии	30	30	30	35	20	15	0
НФЦ (ацинетобактеры, моракселлы)	10	10	20	15	15	25	
бациллы	0	10	10	5	15	5	0
Итого:	100	100	100	100	100	100	0

Интенсивность происходящих процессов, сила взаимозависимости параметров между собой тем выше, чем выше плотности посадки рыб. Накопление энергоемких отходов (комбикормов, продуктов метаболизма) в рыбоводных прудах ведет к дестабилизации водной экосистемы, на поддержание равновесия в которой при создавшихся условиях, в соответствии с экологической "теорией сложности

экосистем" (Одум, 1975), необходимы дополнительные затраты энергии, тем более интенсивные и систематические, чем выше интенсивность и систематичность загрязнения. В противном случае неизбежна перестройка экосистемы по деструкционному типу (наполнение сапрофитными бактериями, соответствующими группами водорослей, зоопланктонными и паразитарными организмами), что неизбежно будет сопровождаться вытеснением продукционной части экосистемы (рыбы) в виде бактериальных болезней рыб или интоксикаций (Просьяная, Хуторной, 1979; Борисенко, 1991).

Одновременно с аэромонадами как в воде, так и в рыбе постоянно доминируют энтеробактерии и НФШ, являясь основным бактериальным фоном, способствующим развитию не только аэромонадоза, но и ассоциативных болезней в виде бактериального геморрагического заболевания (Бычкова и др., 2007).

Кардинальным методом профилактики бактериозов при выращивании рыб является поддержание стабильности водной экосистемы - равновесие и правильное соотношение между продукционной и деструкционной частью энергетических цепей. Для такой стабилизации необходима систематическая утилизация, изъятие или нейтрализация отходов рыбоводного производства (в частности, мертвой рыбы, остатков комбикорма, дезинфекция и др.).

Профилактику бактериозов возможно обеспечивать за счет кормов с пробиотиками субалином, зоонормом, ацидофильным молоком, которые значительно повышают резистентность организма рыб к таким заболеваниям и способствуют нормализации кишечной флоры за счет антагонистической активности бактерий.

Таким образом, поддержание равновесия в водной (рыбохозяйственной) экосистеме необходимо постоянно осуществлять под бактериологическим контролем водной среды и рыбы с целью своевременной коррекции и оптимизации технологического процесса (плотность посадок рыб, сортировка рыб, полноценное кормление), а для быстрого улучшения качества воды - изъятие иловых и биологических макромолекулярных структур (накоплений), возможности большего применения пробиотических и витаминизированных препаратов.

Аналитический и конструктивный подход к разработке профилактических, биотехнологических и санитарно-гигиенических мероприятий позволяет значительно снижать ущерб от развития бактериальных болезней рыб.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аморос Хименес Г.К. Сезонная динамика бактериальной микрофлоры сазана (*Surginus sagrio*) в дельте Волги. Вестник Астраханского технологического института рыбной промышленности и хозяйства. Москва. 1993. - с. 93-96.
2. Беляков В.Д., Голубев Д.Б., Каминский Г.Д., Тец В.В. Саморегуляция паразитарных систем, молекулярно - генетические механизмы. Л.: Медицина, 1987. С.240
3. Борисенко В.Ф. Свойства аэромонад и их значение в интенсивно эксплуатируемых рыбоводных прудах: автореф. дисс. канд. биол. наук. 03.00.19. - иктиология, 03.00.10. - паразитология. М.: 1991. - с. 29.
4. Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н. Роль иммунокоррекции в повышении устойчивости организма рыб к оппортунистическим инфекциям. // Сб. науч. трудов российско-китайского семинара «Молекулярно-клеточные механизмы патогенного и иммуногенного действия *Aeromonas spp.*» - Россия. - М.: Медицина для всех. - 2007. - С. 60-73.
5. Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н., Бабич Г.А. Факторы, способствующие развитию бактериальной геморрагической септицемии (БГС) карпа в прудовом рыбоводстве //Материалы Международной научно-практической конференции «Рациональное использование пресноводных экосистем – перспективное направление реализации национального проекта Развитие АПК». – Россия. – М.: - ВНИИР. – 2007. – С. 380-383.



6. Грищенко Л.И., Смирнов В.В. Микрофлора карпов при выращивании в тепловодных хозяйствах: Информ. бюл. "Итоги науч.-практ. работ в ихтиологии". – М.: Россельхоз академия, 1997. – С.- 48-50.

7. Езепчук Ю.В. Биомолекулярные основы патогенности бактерий. - М.: Наука, 1977, с. 216.

8. Калина Г.П. Теоретические обоснования изучения потенциально-патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды // Гигиена и санитария. 1983, № 10, с-4-7.

9. Катичева Л.Ю., Мухина Л.В., Гетман О.Ю. Эпизоотический мониторинг рыбоводных предприятий в системе Росрыбхоза: Тез. докл. научн.-практ. конф. "Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре". – М.: МИК, 2000. – С. 72-74.

10. Каховский А. Е. Профилактика болезней рыб бактериальной этиологии в интенсивно эксплуатируемых рыбоводных прудах // Автореф. дисс. канд. биол. наук 03.00.19, 03.00.10. М.: 1991, 20 с.

11. Одум Ю. Экология М.: Мир, 1986. т. 1. С. 328.

12. Просьяная В.В., Хуторной П.М. Бактериальная флора белого амура в условиях неудовлетворительного гидрохимического режима. Сб. научн. труд. ВНИИПРХ. 1979. вып. 23., 66-68

13. Рудиков Н.И., Грищенко Л.И. Микрофлора и бактериальные болезни рыб // Итоги науки и техники. Ихтиология, М.: 1985, Т. 1., С 93-148.

14. Тимаков В.Д., Кудлай Д.Г., Покровская В.Г., Ларионова Т.И. Ферментативная активность бактерий в связи с их вирулентностью // Ж. Микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, М.: Медицина, 1968, № 3, с. 3-16.

15. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С. Современное состояние проблемы аэромоноза рыб // Рыбн. хоз.-во. Сер. Аквакультура: Информ. пакет «Болезни рыб» / ВНИЭРХ. – 1997. – Вып. 2 – с. 1-9.

16. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Бычкова Л.И. Влияние антропогенного воздействия на микробиоценоз воды рыбохозяйственных водоемов и рыбы. // Матер. Междунар. научно-практ. конф. 24-27 сентября 2001г. Краснодар-Адлер. 2001. с.280-282.

#### THE ECOLOGICAL APPROACH TO EPIZOOTOLOGY BACTERIAL ILLNESSES OF FISHES

L.I. Bychkova, L.N. Juhimenko

In epizootology bacterial illnesses it is necessary to consider not only development of pathological processes in fishes, but also degree of influence of the environment influencing on the bacterial activator (its quantitative both qualitative characteristics and dynamics of development).

# ЛИЗОСОМАЛЬНЫЕ ГЛИКОЗИДАЗЫ В ЗАЩИТНЫХ И ПРИСПОСОБИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЯХ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ

**Р.У. Высоцкая, Н.Н. Немова, Е.А. Вдовиченко**

*Учреждение Российской академии наук Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия  
rimma@bio.krc.karelia.ru*

Углеводы, являющиеся одной из самых распространенных в природе группой органических соединений, выполняют в живых организмах множество функций. Они служат источником и аккумулятором энергии, выполняют структурную роль в растениях и у некоторых животных, таких как насекомые, крабы и креветки, составляют основу клеточной стенки бактерий, входят в состав нуклеиновых кислот и антибиотиков. Кроме того, как показали исследования последних лет, благодаря уникальному строению и специфичности многие углеводы и углеводсодержащие биополимеры могут выполнять и целый ряд неканонических функций, в том числе по кодированию биологической информации и регуляции обмена веществ. Углеводы выступают в качестве рецепторов клеточной поверхности, участвуют в процессах межклеточной адгезии, молекулярного и клеточного узнавания, защиты, ионного обмена и других важных реакциях. В живых организмах углеводы присутствуют в виде гликопротеинов, протеогликанов, гликолипидов и полисахаридов. Благодаря разной степени гликозилирования и своеобразному составу олигосахаридных цепей существует огромное количество гликоконъюгатов специфического строения.

К типичным гликопротеинам относятся белковые гормоны, иммуноглобулины, большинство белков плазмы крови, интерфероны, факторы комплемента, групповые вещества крови, рецепторные белки и многие другие. Гликозилированные липиды (сфинголипиды и гликозилфосфатидилинозиты) участвуют в процессах дифференцировки клеток, трансмембранной передаче сигналов, межклеточного взаимодействия, регуляции процессов, связанных с клеточными мембранами. Углеводная часть гликопротеинов и гликолипидов часто представлена маннозой, галактозой, глюкозамином, фукозой и сialовыми кислотами (Лукиянов, Журавлева, 2004). Углеводные компоненты усиливают стабильность конформации молекул, в состав которых они входят, и защищают их от влияния химических и физических факторов, предохраняют гликопротеины от действия протеолитических ферментов.

Модификация биополимеров за счет присоединения углеводной составляющей может осуществляться путем неэнзиматического и энзиматического гликозилирования. Последнее происходит под действием многочисленных внутриклеточных гликозидаз. Обширная группа гликозил-гидролаз включает до 165 белков, обладающих ферментативной активностью и осуществляющих гидролиз большого числа природных субстратов – ди-, олиго- и полисахаридов, а также их производных (Наумов, 2011). Многие гликозидазы обладают широкой субстратной специфичностью. Кроме того, довольно часто наряду с гликозил-гидролазной эти ферменты проявляют трансгликозидазную активность. Всё сказанное относится и к лизосомальным гликозидазам, локализованным в специализированных внутриклеточных органеллах – лизосомах, и проявляющих максимальную активность при кислых значениях pH (Высоцкая, Немова, 2008). Лизосомальные гликозидазы изучены лучше других, так как аномалии в их синтезе и функционировании являются причиной возникновения лизосомальных болезней

накопления (Видершайн, 1980; Розенфельд, 1982; Steinfeld et al., 2004). Отсутствие или снижение активности гликозидаз при развитии патологий приводит к накоплению в клетках в больших количествах гликогена, мукополисахаридов, гликопротеинов, гликолипидов, церамидлипофусцинов и других веществ. Из сказанного выше ясно, какую важную роль играют углеводсодержащие вещества и ферменты их обмена в жизнедеятельности живых организмов. Указанные проблемы мало изучены у рыб и других гидробионтов.

Как показали наши исследования, комплекс лизосомальных ферментов принимает участие в защитных и приспособительных реакциях водных организмов при воздействии различных абиотических и биотических, антропогенных и патогенных факторов. Целью данной работы являлось сравнительное изучение роли лизосомальных гликозидаз в адаптациях рыб и водных беспозвоночных к изменениям в среде обитания.

В качестве объектов исследования были использованы массовые виды рыб из Костомукшского хвостохранилища (щука, плотва, сиг), а также мидии *Mytilus edulis* и амфиподы *Gammaridae* из различных по степени загрязнения районов Белого моря.

В Карелии одним из водных объектов, испытывающих значительную антропогенную нагрузку, является озеро-речная система Кенти – Кенто. Основной источник воздействия на водную систему р. Кенти – техногенные воды Костомукшского горно-обогатительного комбината. Верхнее озеро системы (Костомукшское) используется для хранения отходов железорудного производства (хвостов) и оборотного водоснабжения. Вода в хвостохранилище отличается высокой минерализацией (с преобладанием ионов калия, сульфатов и гидрокарбонатов), аномальным соотношением щелочных и щелочноземельных катионов, щелочной средой и наличием мелкодисперсной взвеси. Преобразование изначально слабоминерализованных гидрокарбонатно-кальциевых вод в сульфатно-калиевые вызвало существенные изменения состояния биоты оз. Костомукшского и нижележащих водоемов системы р. Кенти. В течение ряда лет осуществляется мониторинг водных объектов данной озеро-речной системы различными специалистами. Биохимические исследования рыб из района Костомукши проводятся нами, начиная с 1993 года. Данная работа продолжает этот ряд наблюдений и выполняется для оценки современного состояния рыбной части сообщества Костомукшского хвостохранилища и сопоставления с результатами, полученными ранее. Следует указать, что за период наблюдений в системе р. Кенти произошли изменения химического состава воды под воздействием отходов комбината. Еще больше возросла общая минерализация, концентрация ионов  $K^+$ , сульфатов и снизилось содержание гидрокарбонатов, появились нитраты. Изменения химического состава воды вызвали перестройку в структуре фито- и зоопланктонных ценозов. Исследования ихтиофауны в 1995 г. и в 2001 г. показали её крайне бедный состав. Массовыми были только два вида: плотва и щука (Такшеев, 2005). В уловах 2009 г. в хвостохранилище были отмечены четыре вида рыб: плотва, щука, сиг, уклейка. Биохимические показатели рыб из хвостохранилища сравнивали с соответствующими показателями рыб из чистого озера Каменного.

Активность ферментов и содержание белка определяли в печени, почках, жабрах, мышцах и гонадах рыб. Подготовку проб и выявление активности гликозидаз проводили по методам, принятым в нашей лаборатории (Высоцкая, Немова, 2008). При определении активности  $\beta$ -глюкозидазы (КФ 3.2.1.21) субстратом служил раствор *m*-нитрофенил- $\beta$ ,D-глюкопиранозиды на цитратном буфере, pH 5,0. Активность  $\beta$ -галактозидазы (КФ 3.2.1.23) выявляли по

расщеплению *n*-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозиды, рН 4,0. Активность обеих гликозидаз выражали в микромолях *n*-нитрофенола, освободившегося в условиях реакции за единицу времени.

Результаты исследования показали различную реакцию на техногенные воды хвостохранилища как у представителей разных видов, так и у самцов и самок одного вида, разных возрастов и стадий зрелости гонад.

Во всех сравниваемых группах рыб активность  $\beta$ -глюкозидазы у щук из хвостохранилища была ниже, а  $\beta$ -галактозидазы намного выше по сравнению со щуками из оз. Каменного. Эта закономерность сохранялась при расчете активности на 1 г сырого веса ткани и на мг белка. Содержание белка было повышенным в органах самок щуки из хвостохранилища, причем на большую величину у самок второй стадии зрелости гонад. У сига содержание белка во всех органах самцов под влиянием техногенных вод повышалось, а у самок заметно возрастало только в гонадах. Уровень активности  $\beta$ -глюкозидазы у самцов сига в большинстве органов (печень, почки, мышцы) возрастал, а у самок (за исключением мышц) – снижался. Активность  $\beta$ -галактозидазы практически во всех органах сига из хвостохранилища также была на более низком уровне по сравнению с сигами из контрольного водоема. Лишь в жабрах самцов отмечен более высокий уровень этого фермента.

Анализ полученных результатов свидетельствует о существенных различиях в адаптивных реакциях рыб к наличию в среде обитания одного и того же загрязнения. У самцов щуки эта реакция проявлялась в угнетении ферментов, а у самок, напротив, происходила активация тех же ферментов в таких органах, как почки и жабры. Интересно, что в исследованиях прошлых лет биохимическая адаптация щук к данному типу загрязнения выражалась в активации большинства лизосомальных гидролаз (Такшеев, 2005). Различия между самками второй и шестой стадии зрелости гонад не столь велики. Они различаются размахом амплитуды исследованных биохимических показателей. Возможной причиной этого является отличающийся гормональный фон у самок двух изученных групп щук. Ранее при исследовании влияния отходов металлургических комбинатов был установлен высокий адаптивный потенциал щук (Высоцкая и др., 2007). В данной работе выявлено резкое возрастание активности  $\beta$ -галактозидазы во всех органах щук и особенно значительное в жабрах и гонадах. Это может указывать на вовлечение в адаптивные реакции рыб галактозосодержащих липидов и протеогликанов. Отличия от ранее установленной реакции со стороны гликозидаз и других ферментов щуки на минеральное загрязнение, вероятно, связано с изменениями в химическом составе воды за прошедший период. Кроме того, на формирование адаптивного потенциала щуки накладывает отпечаток многолетнее пребывание вида в сложившихся неблагоприятных условиях. Постепенно накапливающиеся небольшие изменения передаются в ряду поколений, происходит стабилизация адаптивного потенциала на более высоком уровне. Сказанное справедливо и в отношении плотвы.

У сига наибольший вклад в процессы адаптации самцов к техногенной среде вносили печень и почки. У самок наиболее значительным было повышение активности гликозидаз в мышцах и гонадах. Ещё одним отличительным моментом, характеризующим видовые особенности реагирования на минеральное загрязнение среды, является отсутствие повышенного активирования галактозидазы в органах сига, которое было выявлено у щук во всех сравниваемых группах.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить ряд отличий в адаптивных реакциях рыб к хроническому загрязнению водоема отходами горно-обогатительного комбината по сравнению с предыдущим периодом. Эти отличия определяются изменениями в химическом составе техногенной воды



хвостохранилища и последующими структурными преобразованиями в сообществах фито- и зоопланктона. У массовых видов рыб загрязняемого отходами водоема показана видовая и половая специфичность адаптивных реакций на уровне лизосомальных гликозидаз.

Ярким примером, иллюстрирующим разные стратегии адаптации к загрязнению в зависимости от образа жизни животных, получены нами при исследованиях на представителях беломорской биоты. Объектами исследования были двустворчатые моллюски *Mytilus edulis* и ракообразные амфиподы *Gammaridae*, выловленные в разных зонах Кандалакшского залива, отличающихся по степени и типу загрязнения. В качестве контроля служили мидии и бокоплавы, собранные на литорали Турьего мыса и Порьей губы, расположенных на территории природного заповедника на значительном удалении от населенных пунктов и промышленных объектов. Другие места сбора проб располагаются в кутовой части Кандалакшского залива, подверженной сильному воздействию нефтепродуктов, хозяйственно-бытовых и промышленных стоков.

В результате исследований установлены различия в реакции мидий и бокоплавов на воздействие одних и тех же факторов. У мидий с ростом уровня загрязнения наблюдалось снижение уровня активности лизосомальных гидролаз.  $\beta$ -глюкозидаза активизировалась только у моллюсков, собранных на литорали о. Ряшков, где имеет место нефтяное загрязнение. Особенно заметно (до 20-40 % от контроля) угнеталась активность изученных ферментов под воздействием сточных вод у пос. Лувеньга и в районе о. Еловый, где основные загрязняющие вещества представлены стоками морского порта с повышенным содержанием кальция и фосфора из состава перевозимого апатитового концентрата. В целом в данных исследованиях подтвержден сделанный нами ранее вывод о снижении интенсивности метаболизма мидиями под влиянием неблагоприятных факторов среды. В пользу этого предположения свидетельствует более низкий уровень белка в их тканях по сравнению с соответствующими показателями у мидий, обитающих на литорали мыса Турий. Следует заметить, что потенциальные возможности использования углеводных компонентов для адаптивных реакций у мидий очень большие. Уровень активности лизосомальных гликозидаз в гепатопанкреасе этих моллюсков необычайно высок (Vysotskaya, Skidchenko, 2010). Однако в рассматриваемой ситуации метаболизм переключается на пути минимизации и выживания.

Реакция ферментных систем амфипод на те же виды загрязнения была иной. Активность лизосомальных гидролаз в их тканях значительно повышалась под влиянием бытовых сточных вод, загрязнения тяжелыми металлами и радионуклидами. Для  $\beta$ -глюкозидазы бокоплавов отмечено адаптивное повышение в ответ на присутствие в среде обитания повышенного содержания кальция и фосфора (Лупчостров) и комплексного загрязнения промышленных предприятий («механический завод», г. Кандалакша). Содержание белка в тканях гаммарусов из загрязняемых акваторий также было выше, чем у рачков из чистых зон.

Проведенные исследования показали, что адаптивные реакции гаммарид в ответ на различные антропогенные воздействия отличаются более выраженной специфичностью по сравнению с двустворчатыми моллюсками. Исследованные группы литоральных беспозвоночных хорошо приспособлены к жизни в часто меняющихся условиях среды. Это позволяет им выживать при возрастающем загрязнении моря поллотантами. Отличающиеся по биологическим особенностям группы беспозвоночных используют при этом разную стратегию биохимической адаптации.

Лизосомальные ферменты углеводного обмена проявляют высокую чувствительность к изменениям в химическом составе среды обитания водных организмов. Вклад отдельных гидролаз в адаптивные реакции при воздействии промышленных поллютантов зависит от видовой и половой принадлежности рыб, образа жизни, стадии развития и физиологического состояния организма. У рыб, живущих в условиях хронического воздействия загрязнителей, формируется и закрепляется более высокий адаптивный потенциал. Примером такого рода механизмов является повышенный уровень активности галактозидазы в органах щуки из хвостохранилища.

Выбор стратегии биохимической адаптации зависит от биологических особенностей вида, времени и интенсивности воздействия поллютанта, а также его химической природы.

Работа выполнена при поддержке Программы Президента РФ «Ведущие научные школы РФ» НШ-3731.2010.4, программ ОБН РАН «Биоресурсы 2009-2011» и Президиума РАН «Биоразнообразие 2009-2011».

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Видершайн Г.Я. Биохимические основы гликозидозов. – М.: Медицина, 1980. – 287с.
2. Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. – М.: Наука, 2008. – 284 с.
3. Высоцкая Р.У., Такшеев С.А., Амелина В.С. Оценка состояния рыб по активности ферментов в водохранилищах с разным типом минерального загрязнения // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов – 2. Расширенные материалы междунар. науч.- практич. Конф. – М.: Россельхозакадемия, 2007. – С. 322-326.
4. Лукьянов П.А., Журавлева Н.В. Современная гликобиология и медицина // Вестник ДВО РАН. – 2004. - № 3. – С. 24-34.
5. Наумов Д.Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз // Биохимия. – 2011. – Т. 76, вып. 6. – С. 764-780.
6. Розенфельд Е.Л. Особенности энзиматических дефектов при некоторых наследственных заболеваниях // Успехи биол. химии. – 1982. – Т. 22. – С. 167- 185.
7. Такшеев С.А. Состояние рыбной части сообщества Костомукшского хвостохранилища и его оценка биохимическими методами: Автореф. Дис. ... канд. Биол. Наук. – Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2005. – 23 с.
8. Steinfeld R., Steinke H.-B., Isbrandt D., Kohlschutter A., Gartner J. Mutations in classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis disrupt transport of tripeptidyl-peptidase I to lysosomes // Hum. Mol. Genet. – 2004. Vol. 13, no. 20. – P. 2483-2491.
9. Vysotskaya R.U., Skidchenko V.S. Saltwater mussels (Family Mytilidae) – prospective source of high-active hydrolytic enzymes // Current problems of physiology and biochemistry of aquatic organisms. Vol. II. Arctic and sub-arctic biological resources – potential for biotechnology. – Petrozavodsk: Karelian Research Centre RAS, 2010. – P. 100-101.

### LYSOSOMAL GLYCOSIDASES IN PROTECTIVE AND ADAPTIVE REACTIONS OF AQUATIC ORGANISMS

Rimma U. Vysotskaya, Nina N. Nemova, Elizabeth A. Vdovichenko

The important role of lysosomal glycosidases ( $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase) in the adaptive responses of aquatic organisms to the impact of waste iron ore production, oil and other pollutants was shown in studies on fishes, bivalves *Mytilus edulis*, amphipod crustaceans *Gammaridae*.

## ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ НА ПИЩЕВАРЕНИЕ У РЫБ

И.Л. Голованова

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия,  
golovan@biw.yaroslavl.ru

Экологическое неблагополучие многих рыбохозяйственных водоемов часто связано с наличием в них токсичных веществ, которые могут оказывать прямое и опосредованное влияние на морфофункциональные характеристики пищеварительного тракта гидробионтов. В настоящее время установлено, что в кишечнике костистых рыб существует достаточно эффективная защита от токсической и аллергической агрессии, включающая структурный и энзиматический барьеры (Кузьмина, 1995). Изменение характеристик пищеварительных ферментов при действии антропогенных факторов может не только менять эффективность питания рыб, но и значительно снижать эффективность энзиматического барьера, обеспечивающего неспецифическую защиту рыб от токсического воздействия.

Многие загрязняющие вещества, поступающие в водоемы со стоками промышленных и сельскохозяйственных предприятий, обладают биологической активностью и способны аккумулироваться в тканях гидробионтов. В их число входят приоритетные загрязнители как органической, так и неорганической природы. Они оказывают губительное действие на икру и молодь рыб, вызывают заболевания и патологии различных органов, изменяют физиолого-биохимические показатели организма. Выявить токсичность того или иного вещества, а также механизмы его действия можно только в экспериментальных условиях. Кроме того, применение биохимических методов часто позволяет наблюдать изменения в обмене веществ, наступающие, как правило, до появления видимых отклонений от нормы, и дают возможность определять границы адаптационных возможностей организма. Определение активности ферментов, расщепляющих основные компоненты корма в пищеварительном тракте рыб, позволяет судить о скорости начальных этапов усвоения пищи и выявлять изменения функциональной активности пищеварительной системы при действии ряда антропогенных факторов. В настоящей работе предпринята попытка кратко охарактеризовать влияние органических загрязнителей на пищеварительные ферменты пресноводных костистых рыб.

Полихлорированные бифенилы (ПХБ), относящиеся к классу хлорорганических полициклических ароматических соединений, являются одной из наиболее распространенных групп стойких органических загрязнителей. Обладая высокой липофильностью они способны к биоаккумуляции и даже в крайне малых дозах оказывают токсическое, мутагенное и канцерогенное действие. В хронических экспериментах установлено, что ПХБ, поступающие с пищей и грунтом, снижают скорость начальных этапов ассимиляции углеводов в кишечнике сеголетков плотвы *Rutilus rutilus* (L.) (Голованова и др., 2008). Активность гликозидаз слизистой оболочки снижается на 11–33 % (96 сут), значения  $K_m$  гидролиза крахмала увеличиваются на 23 % (218 сут), отражая снижение сродства ферментов к субстрату. Снижение активности протеиназ на 10–26 % у сеголетков опытной группы на протяжении всего периода наблюдений (Ушакова и др., 2008) демонстрирует, что в условиях данного эксперимента ПХБ в большей степени снижают скорость начальных этапов ассимиляции белковых, чем углеводных компонентов корма. Изучение активности гликозидаз ( $\alpha$ -амилазы, сахаразы,

мальтазы и амилолитической активности) в кишечнике леща *Abramis brama* (L.) Рыбинского водохранилища показало, что рыб из наиболее загрязненного Шекснинского плеса с большим содержанием ПХБ в печени активность мальтазы и средство ферментов к субстрату ниже, чем у леща из более чистого Моложского плеса (Голованова, 2010). В то же время активность протеиназ, гидролизующих белковые компоненты корма, в кишечнике леща Шекснинского плеса в 1.5 раза выше, чем у рыб из Моложского плеса (Ушакова и др., 2009). Эти различия могут быть обусловлены большим содержанием белка в тканях кормовых объектов рыб, обитающих в более загрязненном районе, а также разным влиянием токсических веществ на ферменты цепи протеиназ и гликозидаз. В то же время значения константы Михаэлиса ( $K_m$ ) гидролиза крахмала на 25%, а гидролиза сахарозы на 65% ниже у рыб из Шекснинского плеса, что свидетельствует об увеличении фермент-субстратного сродства и адаптивных изменениях этого показателя с ростом накопления ПХБ в печени рыб (Голованова, 2011).

Нафталин – полициклический ароматический углеводород, при хроническом 60-сут действии в концентрации 1,5 мг/л (составляющей 1/15 часть от 24-ч  $LK_{50}$ ) не изменяет амилолитическую и протеолитическую активность в слизистой оболочке кишечника мозамбикской тилляпии *Oreochromis mossambicus* Peters (Golovanova et al., 1994; Kuzmina et al., 1999). В содержимом кишечника активность указанных ферментов может возрастать на 50–98 % от контроля. В то же время, в экспериментах *in vitro* установлено, что нафталин в концентрации 0,3–15 мг/л не вызывает значительных изменений амилолитической активности слизистой оболочки кишечника у 12 видов пресноводных костистых рыб (Голованова и др., 1995). Эти результаты свидетельствуют, что данный углеводород не оказывает достоверного влияния на функционирование мембранных ферментов, а также на процессы их синтеза.

Хлорофос – фосфорорганический пестицид с нервнопаралитическим действием, ранее применявшийся для борьбы с эктопаразитами рыб. При кратковременном действии хлорофоса в концентрациях  $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-2}$  мг/л на осемененную икру выявлены отдаленные эффекты, проявляющиеся в разнонаправленных изменениях активности и кинетических характеристик гликозидаз в кишечнике развивающейся молоди плотвы (Голованова, Таликина, 2006). Амилолитическая активность в слизистой оболочке кишечника рыб опытных групп достоверно снижалась по сравнению с контрольными особями. Максимальное торможение на 45–49 % отмечено при концентрации хлорофоса  $1 \cdot 10^{-5}$  и  $1 \cdot 10^{-4}$  мг/л. Активность сахаразы, наоборот, возросла в 1.5–2 раза по сравнению с контролем. При этом наибольший стимулирующий эффект на 90–103 % отмечен в крайних точках испытанного диапазона концентраций. Разнонаправленные эффекты действия хлорофоса в период эмбриогенеза на амилолитическую активность и активность сахаразы у сеголетков плотвы могут быть связаны с неодинаковым влиянием токсиканта на процессы синтеза панкреатических ( $\alpha$ -амилаза) и собственно кишечных (мальтаза, сахараза) ферментов. У рыб опытной группы  $K_m$  гидролиза крахмала снижалась в 1.3–3.8 раза, отражая адаптивное повышение сродства ферментов к субстрату.  $K_m$  гидролиза сахарозы, напротив, возрастали в 2–4 раза обратно пропорционально концентрации хлорофоса (Голованова, Таликина, 2006).

В настоящее время принято считать, что токсические свойства хлорофоса обусловлены в основном образующимся из него более токсичным ДДВФ – диметилдихлорвинил-фосфатом. Поскольку после внесения в воду хлорофос практически весь переходит в более токсичный ДДВФ, то вполне вероятно, что именно с этим веществом и связан основной токсический эффект. В то же время, на примере



мозамбикской тилипии показано, что хроническое 60-сут действие ДДВФ в сублетальной концентрации 0.46 мг/л (1/15 часть от 24-ч ЛК<sub>50</sub>) обратимо снижает амилолитическую активность в кишечнике не более, чем на 20% от контроля, и не изменяет протеолитическую активность (Golovanova et al., 1994; Kuzmina et al., 1999). В экспериментах *in vitro* установлено, что ДДВФ в концентрации 0.2–100 мг/л не влияет на активность гликозидаз в слизистой оболочке 11 видов рыб, обитающих в Рыбинском водохранилище. Достоверное снижение протеолитической активности на 21% от контроля отмечено лишь при действии ДДВФ в концентрации 0.2 мг/л у щуки (Golovanova et al., 1999). Сравнение эффектов *in vivo* и *in vitro* свидетельствует о том, что выявленные изменения ферментативной активности не являются специфическими.

Ряд соединений, попадающих в водоёмы, могут обладать мутагенной активностью. К числу таких веществ относится N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (MNNG) – генотоксикант с прямым влиянием на химическую структуру ДНК, широко применяемый в работах по индуцированию канцерогенеза у рыб. Установлено, что он вызывает многочисленные новообразования в различных, в том числе и пищеварительных, органах ряда видов рыб (Carlson et al., 2001). Кратковременное действие низких концентраций ( $3 \cdot 10^{-7}$ – $3 \cdot 10^{-2}$  мг/л) MNNG в период раннего эмбриогенеза плотвы вызывает снижение активности гликозидаз слизистой оболочки кишечника на 10–46 %. Значения  $K_m$  гидролиза крахмала снижаются в 1.6–2.5 раза,  $K_m$  гидролиза сахарозы изменяются разнонаправлено. Зависимость изученных показателей от концентрации токсиканта носит нелинейный характер, а концентрации MNNG, отличающиеся на 5-6 порядков, могут вызывать равные эффекты. Снижение значений  $K_m$  гидролиза углеводов, свидетельствующее об увеличении фермент-субстратного сродства, можно отнести к адаптивным реакциям в период раннего онтогенеза плотвы в ответ на эмбриотоксическое действие низких и сверхнизких концентраций хлорофоса и MNNG.

При кратковременном действии формалина (0.0018%) в зародышевый период развития уровень протеолитической активности и активности щелочной фосфатазы у развивающейся молоди плотвы в большинстве случаев достоверно не отличался от контроля (Кузьмина, Таликина, 1998). В то же время исследование температурных характеристик щелочной фосфатазы выявило резкое сужение зоны оптимальных значений и снижение величины температурного оптимума (от 50°C до 40°C) у сеголеток, развивавшихся из икры после воздействия формалином.

При исследовании действия *in vivo* двух представителей оловоорганического соединений – триамилловохлорида (ТАОХ) и триэтилловохлорида (ТЭОХ) в концентрациях 0,5 и 1 мг/л на активность пищеварительных ферментов в кишечнике карпа установлено, что ТАОХ в течение 1–3-х недель не влиял на активность  $\alpha$ -амилазы, в то время как ТЭОХ в этих же концентрациях уже на 1–2 суток опыта снижал активность  $\alpha$ -амилазы, трипсина и липазы в 2–15 раз по сравнению с контролем (Бузинова, 1983). ТАОХ в более низких концентрациях (0,01 и 0,001 мг/л) через 30 сут необратимо снижал амилолитическую активность вдвое, в то время как ТЭОХ в концентрациях 0,01 и 0,003 мг/л вызывал разнонаправленные изменения активности исследованных ферментов в продолжение двух месяцев опыта: активность то увеличивалась, то снижалась относительно контроля. Регуляторные механизмы, противодействующие нарушениям со стороны структурно неспецифических веществ, способствовали переживанию особей при неблагоприятных условиях (Бузинова, 1983).

Среди органических соединений ртути метилртуть, обладающая липофильными свойствами и легко преодолевающая биологические мембраны, является наиболее токсичной. Накопление метилртути в организме окуня из водоемов с нейтральным значением рН воды вызывает неспецифическое снижение активности пищеварительных гликозидаз и средства ферментов к субстрату, уменьшая скорость начальных этапов ассимиляции углеводных компонентов корма (Голованова, Комов, 2005). У окуня, длительное время живущего в условиях acidification, отмечено адаптивное повышение средства ферментов к субстрату, что, по всей вероятности, позволит частично компенсировать неблагоприятное влияние факторов среды на скорость переваривания углеводных компонентов пищи (Голованова, Комов, 2005). В экспериментах по изучению действия метилртути, содержащейся в корме природного происхождения, не выявлено изменений активности гликозидаз кишечника молоди окуня (30 сут) и карася (75 сут), получавших корм с низким (0.11 мг/кг) и высоким (0.5 мг/кг) содержанием ртути. В то же время у карпа более длительное (3 и 6 мес.) действие повышенных концентраций ртути в корме снижало активность гликозидаз и средства ферментов к субстрату. Активность панкреатической  $\alpha$ -амилазы снижалась в большей степени, чем амилолитическая активность или активность сахаразы, демонстрируя, что ферменты, осуществляющие начальные этапы гидролиза углеводов и функционирующие в полости кишечника, более чувствительны к токсическому действию метилртути по сравнению с собственно мембранными ферментами (Голованова, 2009).

Интересно отметить, что в экспериментах *in vivo* при действии метилртути, хлорофоса и нитрозогуанидина снижение активности гликозидаз, осуществляющих начальные этапы гидролиза углеводов, сопровождалось повышением линейно-массовых показателей рыб. Вполне вероятно, что ускорение роста молоди при действии сублетальных концентраций токсикантов обусловлено компенсаторным увеличением эффективности усвоения белковых компонентов пищи по сравнению с углеводными компонентами. Кроме того, низкая скорость начальных этапов ассимиляции углеводов может восполняться повышением эффективности заключительных этапов их усвоения либо снижением энергетических расходов организма на двигательную активность, что нередко наблюдается при обилии корма в условиях токсического воздействия.

Таким образом, активность ферментов пищеварительного тракта может быть использована в качестве физиологического показателя токсичности в хронических экспериментах и опытах *in vitro*, при этом в качестве нормы по физиологическому показателю следует использовать контроль данного опыта. Определение температурных и кинетических характеристик ферментов позволит выявить механизмы ответной реакции пищеварительной системы на действие чужеродных веществ. Приведенные данные важны для прогнозирования риска действия органических токсикантов на пищеварительную систему рыб, от функционального состояния которой в значительной мере зависит состояние иммунной системы и здоровья рыб.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бузинова Н.С. Паталогические изменения активности пищеварительных ферментов рыб // Теоретические проблемы водной токсикологии. Норма и патология. М.: Наука. 1983. С. 131–137.
2. Голованова И.И., Чуйко Г.М., Филиппов А.А. Влияние ПХБ на гидролиз углеводов у молоди плотвы // Матер. Объединен. III Всерос. конф. по водной токсикологии, посвящ. памяти Б.А. Флерова «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы» и конф. по гидроэкологии «Критерии оценки качества вод и методы нормирования антропогенных нагрузок». Борок. 2008 Ч. 2. С. 19–22.

3. Голованова И.Л. Гидролиз углеводов у рыб с различным накоплением ртути в организме // Биол. ресурсы Белого моря и внутр. водоемов Европейского Севера. Матер. XXVIII Межд. конф. Петрозаводск, 2009. С. 153–155.
4. Голованова И.Л. Полихлорбифенилы и гидролиз углеводов у леща Рыбинского водохранилища // Современные проблемы гидроэкологии. Тез. IV Межд. науч. конф., посвящ. памяти проф. Г.Г. Винберга. СПб. 2010. С. 48.
5. Голованова И.Л., Габжелян Т.Е., Кузьмина В.В., Павлов Д.Ф., Чуйко Г.М. Влияние кадмия и дихлофоса на активность карбогидраз и протеаз кишечника пресноводных костистых рыб // Биол. ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера. Тез. докл. 14-ой Межд. конф. Петрозаводск, 1995. С. 186–188.
6. Голованова И.Л., Комов В.Т. Влияние ртути на гидролиз углеводов в кишечнике речного окуня *Perca fluviatilis* // Вопр. ихтиологии. 2005. Т. 45. № 5. С. 695–701.
7. Голованова И.Л., Кузьмина В.В. Влияние дихлофоса, нафталина и кадмия на морфо-функциональные характеристики кишечника тиляпии *Oreochromis mossambicus* Peters. // Биология внутр. вод. 1998. № 1. С. 80–87.
8. Голованова И.Л., Таликина М.Г. Влияние низких концентраций хлорофоса в период раннего индивидуального развития на пищеварительные карбогидразы сеголетков плотвы *Rutilus rutilus* // Вопр. ихтиологии. 2006. Т. 46. № 3. С. 412–416.
9. Кузьмина В.В. Защитная функция пищеварительного тракта рыб // Вопр. ихтиологии. 1995. Т. 35. вып.1. С. 86–93.
10. Кузьмина В.В., Таликина М.Г. Влияние экстремальных воздействий в период раннего индивидуального развития на пищеварительные гидролазы сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* // Вопр. ихтиол. 1998. Т. 38. № 4. С. 524–529.
11. Ушакова Н.В., Кузьмина В.В., Чуйко Г.М. Влияние полихлорированных бифенилов, поступающих с пищей на активность протеиназ слизистой оболочки кишечника плотвы *Rutilus rutilus* (L.) // Матер. объедин. III Всерос. конф. по водной токсикологии, посвящ. памяти Б.А. Флерова «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы» и конф. по гидроэкологии «Критерии оценки качества вод и методы нормирования антропогенных нагрузок». Борок. 2008. Ч. 2. С. 164–167.
12. Carlson D.B., Williams D.E., Spitsbergen J.M. et al. Fumonisin B1 promotes aflatoxin B1 and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-initiated liver tumors in rainbow trout // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2001. V. 172. № 1. P. 29–36.
13. Golovanova I.L., Chuiko G.M., Pavlov D.F. Effects of cadmium, Naphthalene and DDVP on gut carbohydrases activity in bream (*Abramis brama* L.) and mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) // Bull. Envir. Contam. Toxicol. 1994. V. 52. № 3. P. 338–345.
14. Kuz'mina V.V., Chuiko G.M., Pavlov D.F. Effects of DDVP, Naphthalene and Cadmium, on Intestinal Proteolytic activity in mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) // Bull. Envir. Contam. Toxicol. 1999. V. 62. № 2. P. 193–198.

## EFFECT OF ORGANIC POLLUTANTS ON FISH DIGESTION

I. L. Golovanova

The data about influence of the organic pollutants of different chemical nature (PCB, trichlorfon, dichlorvos, naphthalene, formalin, MNNG, organic compound of stannum, methylmercury) on the digestive activities in freshwater fish are cited. The results of the in vivo and in vitro experiments testify about the significant changes of temperature and kinetic characteristics of digestive enzymes under organic pollutants.

## **«ДЕЗАВИД» - НОВОЕ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЕ СРЕДСТВО ДЛЯ АКВАКУЛЬТУРЫ**

**П.П. Головин, Н.Н. Романова, Л.Н. Юхименко**

*ФГУП "Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства" Московская обл., Дмитровский район, пос. Рыбное*

Проблема борьбы с микроорганизмами, вызывающими инфекционные заболевания у животных, в том числе и рыб, весьма актуальна, несмотря на достаточно большой выбор бицидных препаратов. В настоящее время на российском рынке преобладают традиционные хлорсодержащие дезинфицирующие средства (хлорная известь, гипохлорид кальция и натрия, хлорамин и др.), а также формальдегид, которые имеют ряд недостатков: высокую токсичность, выраженный запах, нестабильность рабочих растворов, избирательность в отношении патогенных микроорганизмов, коррозионную активность и др. (Павлова и др., 2003). Импортные средства из-за их высокой стоимости практически недоступны отечественному потребителю. Поэтому растет интерес к дезинфицирующим препаратам, обладающим высокой эффективностью, низкой токсичностью и относительно невысокой стоимостью.

Механизм действия таких препаратов разнообразен и может быть связан с денатурацией белка, нарушением проницаемости плазматических мембран, ингибированием ферментов микроорганизмов и с другими факторами. В целом все дезинфицирующие средства, применяемые для нужд аквакультуры должны обеспечивать высокую активность, химическую стойкость растворов, отсутствие повреждающего действия на оборудование, отсутствие неприятного запаха, обладать хорошей растворимостью в воде.

Перспективным для аквакультуры, в том числе и аквариумистики, может быть дезинфицирующее средство «Дезавид», активно действующим веществом которого являются четвертичные аммонийные соединения. На теплокровных животных доказано, что он не обладает сенсibiliзирующими и кумулятивными свойствами, а также отдаленными проявлениями (мутагенным, эмбриотоксическим, тератогенным, гонадотропным).

Дезавид представляет собой прозрачную жидкость без запаха. Выпускается в виде концентрата и 6,4%-го раствора. Основным компонентом является бактерицидный полиэлектролит на основе гуанидиновых соединений. Препарат производится в России на ООО «Адекватные технологии». Имеет сертификаты Роспотребнадзора, Росстандарта и Сертификат безопасности. В настоящее время это дезинфицирующее средство применяют для обеззараживания сточных вод, воды в индивидуальных и общественных плавательных бассейнах.

Целью настоящей работы было оценить возможность использования дезинфицирующего средства «Дезавид» в аквакультуре.

Работа проведена в лаборатории ихтиопатологии ФГУП «ВНИИПРХ» на основных объектах отечественной аквакультуре (радужной форели, сибирском осетре, карпе).

Предварительно в экспериментальных условиях проведена серия опытов по оценке токсичности этого препарата для рыб. В зависимости от вида рыб выявлены концентрации дезавида, при которых не отмечено токсического воздействия на организм в течение длительного времени (30 дней).

Средство «Дезавид» для обеззараживания водной среды применяли в виде растворов. Концентрация зависела от вида рыб. Следует учитывать, присутствие



органических веществ в воде в значительной степени снижает антибактериальную активность этого дезинфектанта. В результате экспериментальных работ были выявлены эффективные концентрации дезавида по 6,4%-му рабочему реализуемому раствору в зависимости от содержания в ней органического вещества (по перманганатной окисляемости воды), которые в дальнейшем были рекомендованы для применения в аквакультуре (табл. 1).

Таблица 1.

Концентрации дезавида для обеззараживания воды при выращивании рыб, мг/л\*

Семейства рыб	Перманганатная окисляемость воды, мг О <sub>2</sub> /л	
	< 4	>4
	концентрации дезавида, мг/л	
Лососевые	4	30
Осетровые	15	30
Карповые	30	30

Примечание: \* экспозиция обработки составляет 60 минут

Результаты экспериментов по оценке антимикробного действия показали, что дезавид для аквакультуры может являться эффективным дезинфектантом. При обработке этим препаратом значительно снижается бактериальная обсемененность воды. Наибольшая чувствительность к этому дезинфектанту отмечена у аэромонад (табл. 2).

Таблица 2.

Оценка влияния раствора дезавида на разные группы бактерий

Вид бактерий	Контроль	Дезавид (32 мг/л)
<i>Aeromonas sobria</i>	сливной рост	60
<i>E.coli</i>	сливной рост	1868
<i>Bac.sp.</i>	сливной рост	280
<i>Moraxella sp.</i>	480	420

Эта группа бактерий является наиболее патогенной при выращивании рыб в промышленных условиях с высокими плотностями посадки, а также и в декоративном рыбоводстве (аквариумистике). Присутствие аэромонад в воде в высоких количествах провоцирует возникновение инфекционных заболеваний, способствует снижению общей резистентности организма.

Действие активных веществ, входящих в состав дезавида основано на воздействии поликатионных соединений, которые проходят через клеточную мембрану внутрь бактериальной клетки, блокируя воспроизводящую способность нуклеиновой кислоты и белков, а также ферментную дыхательную систему и угнетают развитие микроорганизмов.

Дальнейшее испытание дезавида проведено в условиях рыбоводного хозяйства. Для сравнения был взят препарат - дезинфектант хлорамин, который широко используется в рыбоводстве. Обработку воды провели в пластиковых бассейнах, где находилась молодь стерляди массой около 5 г. Концентрация дезавида составляла 30 мг/л, хлорамина - 20 мг/л, экспозиция - 1 ч. После одного часа обработки были созданы условия проточности. Результаты бактериологического анализа воды в бассейнах показали, что количество

микроорганизмов (общее микробное число - ОМЧ) при использовании дезавида снизилось в 9 раз (рис. 1).

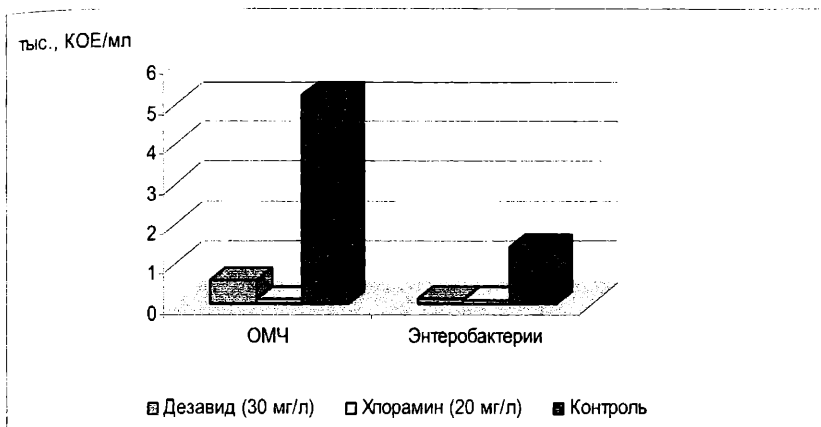


Рисунок 1. Эффективность применения дезавида при обеззараживании воды в бассейнах с молодью рыб

В экспериментальных условиях были смоделированы условия для перевозки рыб в рыбоводных емкостях. Имитация транспортировки продолжалась в течение 24 ч. при первоначальной концентрации дезавида в воде для стерляди - 10 мг/л, для карпа - 30 мг/л.

При использовании дезавида во время транспортировки можно в 1,5-4 раза снизить содержание потенциально опасных для рыб бактерий (рис. 2).

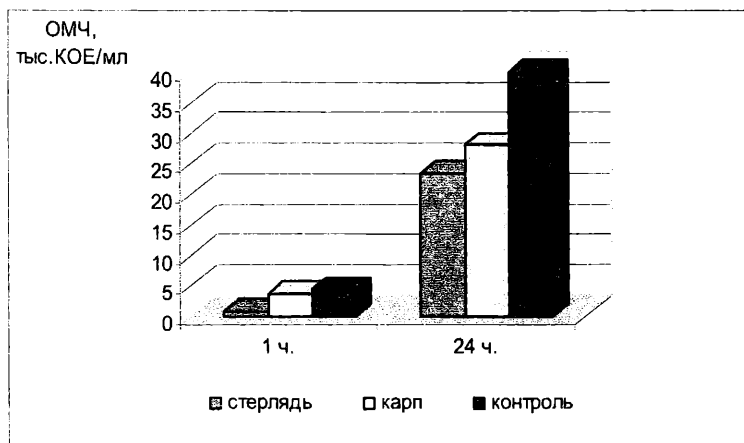


Рисунок 2. Эффективность применения дезавида при транспортировке рыбы в живорыбном транспорте

При транспортировке рыбы испытывают стресс, во время которого повышается проникновение через стенки кишечника микроорганизмов, что может привести к контаминации внутренних органов и крови микробами. Такая эффективность обработки дезавидом позволяет значительно снизить микробное обсеменение воды, что положительно отразится на здоровье перевозимых объектов ихтиофауны.

Результаты обработки воды дезавидом позволили его рекомендовать, как эффективное средство при транспортировке рыб (табл. 3).

Таблица 3.

*Дозировки дезавида при длительной транспортировке (до 24 ч. и более)\**

Вид рыб	Концентрация, мг/м
Осстровые	10-20
Карп	30-60

*Примечание: \* - препарат добавляют в воду живорыбной емкости перед посадкой рыбы*

Эффективность выращивания рыбы и её здоровье зависят от соблюдения ветеринарно-санитарных правил, важнейшей составляющей которых является своевременное проведение профилактических мероприятий, включающих дезинфекцию:

- рыбоводного инвентаря;
- инкубационных цехов, рыбоводных помещений;
- лотков, бассейнов, садков, неводов, живорыбного транспорта;
- дезковриков в рыбоводных цехах.

Дезавид является эффективным антисептическим средством для дезинфекции. Кроме того, это средство имеет преимущества по сравнению с другими препаратами, применяемыми для этих целей.

Средство «ДЕЗАВИД»:

- не имеет запаха,
- безвредно для обрабатываемых материалов,
- легко смывается водой,
- не образует токсичных канцерогенов,
- в рекомендуемых концентрациях безопасно для людей и теплокровных животных.

Рекомендуемые концентрации при контакте с обрабатываемым материалом (по рабочему раствору) в течение 1-3 часов.

- при обеззараживании лотков и бассейнов 100-300 мг/л;
- для рыбоводного инвентаря (щетки, мочалки, сачки) и резиновых ковриков длительно при концентрации 100 мг/л.

Положительные качества дезавида и его эффективность при дезинфекции позволяют рекомендовать это средство, как универсальное для аквариумистики. Применять его можно для:

- дезинфекции инвентаря, грунта, искусственных растений (100 мг/л с последующей промывкой),
- дезинфекции аквариума в качестве подготовки для содержания рыб (100-300 мг/л с последующей промывкой),
- обработки рыб против бактериальных инфекций с последующей заменой воды (16-30 мг/л).

Таким образом, в экспериментальных и производственных условиях показана эффективность и безопасность нового дезинфицирующего средства «Дезавид» для аквакультуры.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Павлова И.Б., Григанова Н.В., Банникова Д.А., Попов Н.И., Архипова Н.Д. Дезинфицирующая активность йодеза и его композиций против микобактерий. Ветеринария - 2003. - №7. – С. 9-11.

### **DEZAVID IS A NEW DISINFECTANT FOR AGUACULTURE**

**P.P. Golovin, N.N. Romanova, L.N. Yukhimenko**

Under experimental conditions, the effectivity of a new disinfectant "Dezavid" has been estimated at fish rearing. The disinfectant proved to be a low-toxic preparation for hydrobionts. Its effectivity has been shown when used for fish water disinfection as well as for antiseptic water treatment at fish transport, for disinfection of fish culture equipment, instruments and rooms.

# РАЗДЕЛЕНИЕ НОРМЫ И ПАТОЛОГИИ - ОСНОВА ТЕХНОЛОГИЙ ОН-ЛАЙН БИОМОНИТОРИНГА И КОНТРОЛЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОД В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

**А.В. Гудимов**

*ММБИ КНЦ РАН, Мурманск, 183010, Владимирская, 17*

*alexgud@mail.ru*

Любое антропогенное вмешательство, равно как и изменение основных экологических факторов, неизбежно вызывает реакции биосистем, от организменного до экосистемного уровня. Очевидно, не существует таких антропогенных воздействий, которые не приводили бы к изменению здоровья биосистемы, поскольку антропогенная нагрузка (даже «безобидное» хроническое загрязнение низкой концентрации) всегда увеличивает диапазон экологических изменений сверх существующей природной нормы. Вопрос обнаружения отклонений состоит лишь в силе воздействия и методе (технологии) исследования (биомониторинга). Чем сильнее, т.е. интенсивнее и/или продолжительнее воздействие или изменение среды, тем быстрее и яснее заметен его результат в адаптивных реакциях биосистем.

Многолетние экспериментальные и полевые исследования физиологии и поведения морских двусторчатых моллюсков-фильтраторов (в основном в ММБИ, с 1985 по 1990 гг. и с 2003 по 2008 гг.) показали, в частности, что животные реагируют практически на все, даже малейшие изменения экологических факторов, включая загрязнение. Как физиологическое, так и экологическое значение этих реакций не всегда определяется силой воздействия, причем реакции на поступление разных (тестовых) токсикантов (соли тяжелых металлов, аммиак, детергенты, дизтопливо и др.) нередко подобны нормальным реакциям моллюсков на изменения природных факторов.

В системах непрерывного биомониторинга природной среды по поведенческим или физиологическим реакциям водных животных привычный контроль, традиционный для экспериментальных/стационарных условий, отсутствует. Поэтому вопрос разделения нормы и патологии является центральным в разработке технологий он-лайн (непрерывного, автоматического) биомониторинга и оперативной биоиндикации в реальном времени.

Вторым важнейшим вопросом оперативного биомониторинга и индикации является установление экологической значимости регистрируемой реакции для жизнедеятельности и выживания организма, ее связи с физиологическими, биохимическими и иммунными изменениями.

Существующие в РФ системы (точнее, установки) мониторинга на основе организмов-биосенсоров поспешно внедрены на станциях Водоканала в С.Петербурге и Екатеринбурге (на очереди Москва). Между тем они запущены неспециалистами, без соответствующих исследований (и публикаций результатов) по главным ключевым вопросам, т.е. экологически необоснованны и, видимо, пока способны лишь к весьма огульному биотестированию в строго контролируемых условиях.

В итоге до настоящего времени система оперативного контроля экологической безопасности водной среды не разработана, что не позволяет своевременно обнаружить ситуации токсичности вод и принять необходимые меры на ранних этапах возникновения загрязнения. Оперативный биомониторинг является единственной перспективой развития стратегии экологического мониторинга. В

морских условиях пример катастрофы в Мексиканском заливе сделал это очевидным даже для неспециалистов.

**DISTINGUISHING BETWEEN NORMAL AND PATHOLOGY IS THE MAIN BASIS OF ON-LINE BIOMONITORING AND WATER TOXICITY CONTROL IN THE REAL TIME**

**A.V. Gudimov**

Any anthropogenic or environmental factor affects the biological systems disregard to the impact intensity. How to distinguish between normal and adverse effects on the real time basis is a key point of any on-line biomonitoring technology. In the Russian Federation there are not any on-line biomonitoring or bioindication systems/technologies (e.g., meaning AS "Vodocanal" in St.Petersburg and Ekaterinburg) which meet the main requirements and are able to control the water toxicity in the natural conditions. Despite of that the on-line biomonitoring is a solely strategy to develop the ecological biomonitoring of the pollution effects.

## ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННЫХ ЗАГРЯЗИТЕЛЕЙ НА ГИДРОБИОНТОВ

Т.П. Денисова

ГОУ ВПО «Восточно-сибирская государственная академия образования», Иркутск,  
Россия, *denis\_tp@inbox.ru*

Важнейшая биологическая и хозяйственная проблема современности – проблема «чистой воды», возникшая в индустриальном обществе в связи с нарастающими темпами водопотребления и стремительным ростом загрязнения внутренних водоемов. В настоящее время выявлены основные источники загрязнения водоемов, а также получено достаточно данных, позволяющих оценить степень опасности перечисленных загрязнителей по тем или иным биологическим показателям. К числу техногенных загрязнителей природных водоемов относятся сточные воды различного происхождения.

Сточные воды имеют сложный, многокомпонентный состав. Доказана токсичность сточных вод, проявляющаяся не только в гибели, но и в других морфологических показателях водных организмов. Некоторые сточные воды обладают канцерогенным и мутагенным действием. Индуцируемые ими эффекты обнаружены у организмов, относящихся к различным систематическим группам (Биттуева и др., 2005; Вершинин и др., 2001; Куделин и др., 2004; Селивановская и др., 2004).

Как правило, на формирование качества воды в водоеме влияет не один загрязняющий фактор, а их комплекс. Это не только усугубляет воздействие на биоту водоема, но и усложняет работу по выявлению основных загрязнителей водоема и оценке их воздействия на гидробионтов. Все соединения рано или поздно попадают в водные организмы и включаются в метаболические процессы, в т.ч. в биотрансформацию. Это проявляется не только в жизнеспособности данной особи, но может иметь и отдаленные последствия. Следовательно, контроль за техногенными загрязнителями необходим не только со стороны токсикологов, требуется научное прогнозирование и отдаленных последствий их действия.

Необходимость исследования загрязнителей водных сред с позиций изучения не только их токсичности, но и мутагенной активности, высказывалась многими учеными (Арчаков и др., 2003; Коновалова и др., 2001; Гилева и др., 2005; Симонова, 2002). Огромное значение приобретает не только скрининг загрязнителей природной среды на мутагенность, но и определение степени их биологической опасности. Вместе с тем оценивать уровень биологической опасности загрязнителей для живых организмов, включая и человека, можно на основе экспериментальных исследований с применением точных и надежных методов. Однако в настоящее время не существует универсальной тест-системы и общепринятых критериев для оценки генотоксической активности промышленных загрязнителей, циркулирующих в водной среде. Вследствие этого дальнейшего развития требует совершенствование токсикогенетических методов исследования, обладающих высокой информативностью и хорошей воспроизводимостью результатов.

Все изложенное выше подтолкнуло нас к разработке простого в использовании и недорогого способа, позволяющего достаточно быстро получать информацию не только о токсичности, но и мутагенности изучаемых техногенных компонентов. Большой объем экспериментальных работ со сточными водами и их компонентами, а также с эталонными токсикантами и мутагенами позволил разработать способ, позволяющий получать ответы на поставленные вопросы.

В настоящей публикации я предлагаю Вашему вниманию результаты изучения токсической и мутагенной активности фенола – вещества ГСО и фенольной смеси – компонента сточных вод ЦБП. Эксперименты проводились по специально разработанной схеме, а оценка результатов осуществлялась по рассчитываемым нами коэффициентам, которые затем сравнивались со специально разработанными шкалами. Это позволило оценивать степень опасности анализируемых соединений. Тест-объектом служили хорошо известные токсикологам организмы – *D. magna Str.*

Данные, характеризующие токсическую активность фенола, полученные на основе разработанного нами способа, представлены в таблице 1.

В соответствии с критериями, принятыми в способе, фенол оценивался как чрезвычайно токсичное соединение в диапазоне концентраций от 1,0 до 100,0 мг/л. Токсичность он обнаруживал при концентрации 0,1 мг/л, а при концентрации 0,01 мг/л проявлял себя как умеренный токсикант.

Таблица 1.  
Уровень токсической активности фенола

Концентрация, мг/л	Показатели токсичности:		Выраженность эффекта действия
	$L_0$	$K_0$	
100,0	20,8	-	Чрезвычайно токсичное
10,0	20,8	-	
1,0	20,8	-	
0,1	5,8	0,4	Токсичное
0,01	1,2	1,9	Умеренно токсичное

Обнаружено, что фенол в концентрациях 0,1 мг/л и 0,01 мг/л индуцирует у *D. magna Str.* мутации. Так, установлено, что в опытных вариантах, в которых культура *D. magna Str.* подвергалась воздействию фенола в концентрации 0,1 мг/л, были обнаружены сублетальные мутанты ( $P < 0,05$ ). Под воздействием этого же раствора фенола возникали и летальные мутанты. Однако по последнему показателю достоверных различий с контрольным вариантом не получено ( $P > 0,05$ ). Фенол в концентрации 0,01 мг/л незначительно индуцировал появление сублетальных и летальных мутантов ( $P < 0,05$ ).

Морфологически измененных особей фенол не индуцировал ни в одном из вариантов.

Оценку уровня мутагенной активности фенола производили по коэффициенту & (таблица 2).

Таблица 2.  
Уровень мутагенной активности фенола

Концентрация, мг/л	Показатель мутагенности, &	Выраженность эффекта действия
0,1	8,4	Слабо мутагенное
0,001	0,5	Не мутагенное



Генетическая активность фенола изучена только на двух концентрациях. Поэтому установить зависимость частоты появления мутантов от концентрации фенола нельзя, но можно отметить тенденцию к повышению генетической активности фенола при увеличении концентраций его растворов.

О специфичности мутагенного действия фенола свидетельствуют коэффициенты  $L_2$ ,  $K_2$  и  $\mu$  (таблица 3). Они указывают на то, что фенол активен как индуктор сублетальных мутаций.

Таблица 3.

Специфичность мутагенного действия фенола

Концентрация, мг/л	Показатели специфичности		
	$L_2$	$K_2$	$\mu$
0,1	8,0	0,5	0,0
0,01	1,8	0,8	0,0

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что в диапазоне исследованных концентраций фенол является токсикантом и слабым мутагеном. При этом он обладает выраженной специфичностью, проявляющейся в его способности индуцировать сублетальные мутации, снижающие продолжительность жизни особей в популяции *D. magna Str.*

Сточные воды предприятий ЦБП содержат в своем составе фенольные соединения. В связи с этим на предмет токсикогенетической активности исследовали смесь фенольных соединений в широком диапазоне концентраций: от 100,0 до 0,1 мг/л. Присутствие фенольных компонентов (моно- и дифенолы) в смеси соответствовало их соотношению в сточных водах сульфатного производства целлюлозы – 1:100.

Уровень токсической активности исследуемой смеси представлен в табл. 4.

Растворы в концентрациях 100, 10 и 1 мг/л обладают чрезвычайным токсичным действием:  $L_0 = 17,0$ . Раствор - 0,1 мг/л характеризуется токсичным действием.

Таблица 4.

Уровень токсичности модельной смеси фенолов

Концентрация, мг/л	Показатели токсичности		Выраженность эффекта действия
	$L_0$	$K_0$	
100,0	17,0	-	Чрезвычайное токсичное
10,0	17,0	-	
1,0	17,0	-	
0,1	7,0	0,98	Токсичное

Очевидно, что исследовать мутагенное действие можно было только фенольной смеси в концентрации 0,1 мг/л (табл.5). Установлено, что эта смесь индуцирует в популяции *D. magna Str.* мутационные события: сублетальные и летальные мутации. Морфологически измененных особей среди всех

проанализированных *D. magna* Str.  $F_2$  не обнаружено. Таким образом, исследуемый раствор смеси фенолов обладает слабым мутагенным действием.

Таблица 5.

Уровень мутагенной активности смеси фенолов в концентрации 0,1 мг/л

Показатель мутагенности, &	Выраженность эффекта действия
4,3	Слабый мутаген

О специфичности мутагенной активности исследуемой смеси информируют данные таблицы 6.

Таблица 6.

Специфичность мутагенного действия смеси фенолов

Концентрация, мг/л	Показатели специфичности		
	$L_2$	$K_2$	$\mu$
0,1	4,63	0,39	0,0

Таким образом, изложенное выше позволяет заключить, что изученная смесь фенольных соединений обладает острым токсичным действием, выражающимся в полной гибели опытных дафний. Концентрация смеси 0,1 мг/л очень близка к  $CL_{50}$ , и характеризуется тем, что индуцирует только летальные и сублетальные мутации. Морфологические мутанты под её действием у тест-культуры не возникали.

По уровню мутагенной активности этот агент характеризуется как слабый мутаген. Установлено, что характерной особенностью действия этого вещества является высокий выход сублетальных и летальных мутантов. Вряд ли можно предположить, что смесь фенолов обладает избирательным действием на генетический материал гидробионтов. Вероятнее всего - это результат селективирующего действия агента в отношении морфологических мутантов. Кроме того, известно, что возникновение мутационных событий может быть обусловлено не только прямым воздействием химического агента на ДНК, но также быть связано с нарушением биохимических процессов в клетке, которые опосредованно влияют на нарушение целостности генетических структур и их функции в организме.

Следует обратить внимание, на изозффективные концентрации фенола – вещества ГСО и изученной смеси фенолов.

Итак, на основании сказанного выше можно прийти к заключению:

- в диапазоне исследуемых концентраций проанализированная смесь фенольных соединений, обладает выраженной токсичностью;
- уровень токсической активности зависит от концентрации исследуемых агентов: чем выше концентрация, тем больше величина их действия на популяцию *D. magna* Str;
- сопоставление уровня токсикогенетической активности смеси фенольных веществ позволяет говорить о том, что токсичность сточных вод предприятий ЦБП может быть обусловлена содержанием в них фенольных соединений.

Вместе с тем, проанализировав полученный экспериментальный материал, также следует отметить то, что изучение токсических и мутагенных свойств химических веществ, а также оценка их суммарного действия представляет

определенные трудности. Результат токсикогенетической активности комплексных смесей различных химических веществ может быть неожиданным и отличаться от такового у отдельно входящих в них компонентов. В некоторых случаях, могут происходить химические взаимодействия между двумя или несколькими веществами, входящими в смесь до того, как она попадет в живую клетку. В зависимости от сочетания этих веществ в смесях меняются их возможности проникновения в клетку, взаимодействия между ними и клеточными компонентами в самой клетке, действия с ДНК, и возможны другие варианты. Исходя из этого, следует, что для оценки токсико-генетической активности загрязнителей природной среды необходимо начинать анализ с их суммарного действия на живой организм. А вот уже следующим этапом должны быть исследования, в которых изучаются биологические свойства отдельно составляющих их компонентов, а затем можно приступать к определению токсико-генетической эффективности различных сочетаний этих загрязнителей с целью установления «основных» мутагенов или токсикантов либо их модифицирующих факторов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арчаков А.И., Говорун В.М. Генный полиморфизм и проблемы токсикологии // II Съезд токсикологов России, Москва, 10-13 ноябр., 2003: Тезисы докладов. – М., 2003. – С. 4-5.
2. Биттуева М.М., Абилов С.К. Мутагенная активность жидких стоков Тырныаузского горно-обогатительного комбината в Кабардино-Балкарии // Естествензнание и гуманизм: Сб. научн. работ. – Томск, 2005. - Т.2. - № 1 - С. 120.
3. Вершинин В.Л., Камкина И.Н. Проллиферативная активность эпителия роговицы и особенности морфогенеза сеголеток *Rana arvalis* в условиях урбанизации // Экология. - 2001. - № 4 - С. 297-302.
4. Гилева Э.А., Щупак Е.Л. Хромосомная нестабильность и содержание тяжелых металлов у амфибий из Юганского заповедника // Экология. - 2005. - № 1 - С. 73-76.
5. Коновалова М.В., Спицын И.П. К вопросу о формировании знаний по генетической безопасности // Вестн. Тамб. Ун-та. Сер. Естест. и техн. н. – 2001. - № 1 – С. 43-44.
6. Куделин М, Тимошенко Г.А., Толстихина В.С. Токсикологическая оценка сточных и дренажных вод Байкальского целлюлозно-бумажного комбината // Экология. - 2004. - № 1 - С. 74-76.
7. Селивановская С.Ю., Латыпова В.З. Создание тест-системы для оценки токсичности многокомпонентных образований, размещаемых в природной среде // Экология. - 2004. - № 1 - С. 21-25.
8. Симонова Е.В. Исследование техногенных загрязнителей как генотоксикантов природной среды / ЦНТИ. - М., 2002. - 107 с. - Деп. в ЦНИИНГИ 13.11.2002; № 1971-В.

### EFFECT OF POLLUTANTS IN HYDROBIONTS

T.P. Denisova

The results of testing phenol and the model of mixtures of phenol - component of the pulp and paper industry wastewater. Testing was carried out using a specially developed method, which allows to evaluate the toxic and genetic effects on hydrobionts.

**И.А. Ерохина, Н.Н. Кавцевич**

*Учреждение Российской академии наук Мурманский морской биологический институт Кольского научного центра РАН, Мурманск, Россия  
erohina@mmbi.info*

В последние годы все острее становится проблема взаимоотношений морских млекопитающих и человека в связи с усилением антропогенного воздействия на природную среду. Загрязнители вызывают угнетение многих важнейших функций, включая иммунологические. Последнее - один из важнейших факторов, способствующих возникновению эпизоотий у тюленей и дельфинов. Кроме того, давление инфекций в ходе эволюции морских млекопитающих было слабым. Поэтому они обладают повышенной восприимчивостью ко многим заболеваниям вирусной, бактериальной и грибковой природы, свойственным наземным, в том числе и сельскохозяйственным, животным. В свою очередь ластоногие и китообразные могут служить обширным природным "резервуаром" возбудителей инфекций, представляющих опасность для человека и наземных млекопитающих. Таким образом, кроме необходимости принятия мер, направленных на сохранение природной среды при эксплуатации ресурсов суши и моря, актуальна задача эпизоотологического мониторинга, включающего общую и специальную оценку состояния здоровья морских млекопитающих. В то же время методы диагностики и профилактики заболеваний у этих животных, оценки токсического воздействия на них веществ антропогенного происхождения находятся в начальных стадиях разработки и внедрения.

В настоящее время установлен широкий спектр инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных, которые поражают и морских млекопитающих. Обзор имеющейся информации по вирусным инфекциям морских зверей (Степанова, 1998; Handbook..., 2001) выявил, что эти животные имеют контакт с арбо-, адено-, энтеро-, калици-, покс-, ретро-, рабдо-, парамиксо-, гепато- и другими вирусами, которые играют определенную роль в патологии и смертности морских теплокровных животных. Многие вирусные инфекции вызывают истощение лимфоидной ткани, что способствует развитию вторичных инфекций, во многих случаях приводящих к летальному исходу (Jauniaux, Coignoul, 2001). Отмечена высокая частота встречаемости вируса гриппа А в популяциях китообразных и ластоногих, выделены аденовирусы и энтеровирусы от некоторых видов китов, обнаружены случаи лимфомы, вызываемой ретровирусами. Серьезное значение приобрели сейчас поксвирусы, вызывающие оспу у тюленей и дельфинов (Sweeney, 1978). В последнее время внимание ученых обращено на парамиксовирусы, которые, как полагают (Kremer, 1989), послужили причиной массовой смертности тюленей в Северном море и на Байкале. Появились сообщения об участии ластоногих в циркуляции вируса бешенства. Отмечены даже случаи гибели людей в результате укуса тюленями, пораженными рабической инфекцией (Соколов и др., 1988; Березин, 1990). Вместе с тем опыта и информации по вопросам изучения, выявления, лечения и профилактики вирусных инфекций у этих животных крайне недостаточно.

Вызывает серьезную озабоченность и заражение морских млекопитающих многими бактериальными инфекциями - лептоспирозом (Sweeney, 1974; Smith et al., 1978), эризипелоидом, сальмонеллезом, пастереллезом, листериозом и др. (Ridgway et al., 1975; Smith et al., 1978; Sweeney, 1978), причем многие из них способны

передаваться от морских зверей к представителям некоторых наземных млекопитающих (свиней, лошадей и приматов, в том числе человека) (Smith et al., 1978; Geraci, Ridgway, 1991).

Существенным фактором смертности морских млекопитающих являются паразиты. По сравнению с китообразными ластоногие в большей степени подвержены инвазии, поскольку их образ жизни предполагает контакт и с морскими, и с наземными паразитами. Паразитофауна ластоногих многочисленна, разнообразна и включает представителей всех классов паразитов, причем большое число последних имеют наземное происхождение и лишь немногие из них - морское (Menier, 2000). До настоящего времени достаточно полной сводкой по гельминтам ластоногих остается работа (Dailey, 1975). Заслуживает внимания исследование В.В.Трещева (1970), посвященное гельминтам морских млекопитающих европейского сектора Арктики.

Специалисты подчеркивают важность разработки и внедрения методов эпизоотологического и химического мониторинга, которые должны включать прижизненную экспресс-диагностику вирусных и бактериальных инфекций морских млекопитающих; говорят о необходимости проведения карантинных мероприятий для поступающих в неволю животных; считают первостепенно важной задачей создание научных центров, где сотрудники, работающие с животными, проходили бы специализацию и усовершенствование своих знаний (Березин, 1990; Мищенко и др., 1995). Изучение заболеваний, которым подвержены морские млекопитающие, путем проведения полевых наблюдений осложняется водным образом жизни этих животных. Поэтому объектами полевых исследований обычно являются ушастые тюлени, которые образуют многочисленные колонии на суше. Некоторые данные о причинах гибели морских зверей в природе исследователи получают на зверобойных промыслах и при обследовании найденных на суше трупов животных (например, в случае выброса на берег). Однако наиболее информативными для медико-биологических исследований морских млекопитающих являются наблюдения за животными, содержащимися в неволе. Марикультура морских млекопитающих преследует различные цели. При этом практически полностью исключается интерес человека к морским зверям в марикультуре как к источнику пищевых ресурсов и сырья для промышленности в связи с явной нерентабельностью гипотетических звероферм этих животных. Наиболее рациональный путь domestikации ластоногих - создание специализированных питомников для удовлетворения потребностей зоопарков, цирков, океанариумов и научных учреждений в адаптированных к условиям жизни в неволе и прирученных животных. Другой функцией таких питомников могла бы стать реабилитация заболевших или травмированных диких морских зверей, выкармливание ослабленных или недокармливаемых самками щенков и выпуск их в море с целью пополнения малочисленных популяций. В настоящее время подобные работы ведутся в Калифорнийском центре морских млекопитающих (вблизи г. Сан-Франциско), в Центре реабилитации тюленей г. Питербюрен (Нидерланды), на биостанции по изучению ластоногих в г. Норддайх (Германия).

Основной проблемой любых учреждений, которые занимаются содержанием морских млекопитающих в неволе, было и остается полноценное жизнеобеспечение животных, их ветеринарное обслуживание. Методы медико-биологических исследований морских зверей могут быть весьма разнообразными, но все они направлены на решение вопросов ранней диагностики и профилактики заболеваний животных. На первых этапах ветеринарных исследований таких малоизученных объектов, какими являются морские млекопитающие, весьма информативен анализ

причин гибели животных посредством патологоанатомической экспертизы. В этом плане заслуживают внимания обзорные работы по некроскопии морских зверей (Ridgway et al., 1975; Murtmann et al., 1984).

У морских млекопитающих, содержащихся в неволе, часто встречаются заболевания, связанные с нарушениями правил кормления животных. Это вполне объясняется тем, что питание в неволе отличается от такового в природных условиях, несмотря на усилия человека создать для животных условия, максимально приближенные к естественным. Чаще всего встречаются патологии, вызванные недостатком витаминов и микроэлементов. Последствия этого могут быть весьма серьезными, вплоть до дегенерации мышц (Wilson, 1972) и поражений центральной нервной системы (Wohlsein et al., 2003). Этиология многих заболеваний, по свидетельству специалистов, часто остается невыясненной даже при современных методах диагностики. Поэтому для профилактики и лечения заболеваний тюленей, содержащихся на экспериментальном полигоне Мурманского морского биологического института, мы предпочитаем применять средства широкого диапазона действия. Безусловно, необходимы углубленные исследования заболеваний полярных видов тюленей и использование самых эффективных препаратов для их лечения. Однако наш опыт подтверждает давно сложившееся мнение, что основу обеспечения нормальной жизнедеятельности морских млекопитающих в неволе составляют тщательные и регулярные санитарно-гигиенические и профилактические мероприятия. Это тот фундамент, на котором построена работа лучших океанариумов. В условиях Крайнего Севера при организации мест содержания крупных морских животных особенно очевидна необходимость разработки и применения методов максимально простого и нетрудоемкого их медико-биологического обеспечения.

Наиболее пригодный материал для прижизненных исследований, кровь, содержит, в силу своих структурно-функциональных свойств, информацию о тканях и органах всего организма. Однако данные о "нормальных" значениях многих гематологических величин китообразных и ластоногих не полны из-за ряда обстоятельств. К ним относятся: очень высокая изменчивость некоторых параметров, малочисленность и неоднородность контрольных групп животных, отсутствие строгой стандартизации методик. При исследовании морских млекопитающих различных видов в 1987-2009гг. нами были получены представительные данные о биохимических и цитологических особенностях гренландских и серых тюленей разного возраста, пола, физиологического состояния. При этом выделены параметры крови, адекватно характеризующие неблагополучие в состоянии организмов. Изучение тюленей в естественных условиях и в океанариуме показали, что содержание реактантов острой фазы (гаптоглобин и модифицированный альбумин), распределение белка плазмы крови по фракциям (протейнограмма), сорбционная способность эритроцитов статистически достоверно изменяются при различных формах патологии у тюленей. Перечисленные показатели относятся к неспецифическим тестам состояния здоровья животных, с помощью которых можно обнаружить факт заболевания на той стадии, когда еще не выражены внешние клинические симптомы. В гематологических исследованиях наряду с лейкоцитарной формулой, широко применяющейся в диагностических целях, нами изучались цитохимические характеристики лимфоцитов в связи с тем, что метаболические реакции, необходимые для пролиферации и дифференцировки клеток, составляют основу иммунологических процессов. Было установлено, что чувствительными индикаторами физиологического состояния животных являются активность неспецифической эстеразы и ядрышка лимфоцитов.

Таким образом, перечисленные параметры крови могут использоваться для оценки состояния здоровья на уровне норма-патология у морских млекопитающих в мониторинге природных популяций, а также при содержании животных в неволе.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березин В.В. Проблемы охраны здоровья морских млекопитающих // Тез. докл. 10 Всес. совещ. по изучению, охране и рациональному использованию морских млекопитающих (г. Светлогорск, 2-5 окт. 1990 г.). - М., 1990. - С.19-21.
2. Мищенко В.А., Захаров В.М., Яременко Р.А. Проблемы иммуномониторинга за инфекционными болезнями диких животных // Вирусные болезни сельскохозяйственных животных: Тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф. (г. Владимир, 17-21 апр. 1995г.). - Владимир, 1995. - С.110.
3. Соколов В.В., Шишков В.П., Березин В.В. Проблемы эпизоотологии и патологии диких теплокровных животных и охрана животного мира // Успехи соврем. биол. - 1988. - Т. 105, вып. 2. - С.269-283.
4. Степанова О.А. Вирусные болезни морских млекопитающих // Экология моря. - 1998. - Вып. 47. - С.56-59.
5. Трещев В.В. Гельминты промысловых морских млекопитающих европейского сектора Арктики: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - М., 1970. - 20с.
6. Dailey M.D. The distribution and intraspecific variation of helminth parasites in pinnipeds // Rapp. P.-v. Rein. Cons. Int. Explor. Mer. - 1975. - Vol. 169. - P.338-352.
7. Geraci J.R., Ridgway S.H. On disease transmission between cetaceans and humans // Mar.Mamm.Sci. - 1991. - Vol. 7, N 2. - P.191-194.
8. Jauniaux T., Coignoul F. Pathologie des infections par les morbillivirus chez les mammiferes marins // Ann. med. vet. - 2001. - Vol. 145, N 2. - P.76-96.
9. Handbook of marine mammal medicine / Ed. by L.A.Dierauf and F.M.D.Gulland. - CRC Press, Boca Raton, Florida, 2001. - 1063p.
10. Kremer B.P. Robbenepidemie in der Nordsee // Naturwiss. Rdsch. - 1989. - Vol. 42, N 9. - P.359-361.
11. Menier K. Origine et evolution du parasitisme chez les mammiferes marins: L'exemple des "Pinnipedes" // Rev. med. vet. (France). - 2000. - Vol. 151, N 4. - P.275-280.
12. Murmann W., Schoon H., Schulz L. Pathologie der marinen Sauger // Tierarztl. Prax. - 1984. - Vol. 12, N 1. - P.105-115.
13. Ridgway S.H., Geraci J.R., Medway W. Diseases of pinnipeds // Rapp. P.-v. Rein. Cons. Int. Explor. Mer. - 1975. - Vol. 169. - P.327-337.
14. Hazards of disease transfer from marine mammals to land mammals: review and recent findings / Smith A.W., Vedros N.A., Akers T.G., Gilmartin W.G. // J.Amer.Vet.Med.Assoc. - 1978. - Vol. 173, N 9. - P.1131-1133.
15. Sweeney J.C. Common diseases of pinnipeds // J. Am. Vet. Med. Assoc. - 1974. - Vol. 165. - P.805-810.
16. Sweeney J.C. Infectious diseases of body systems // Zoo and Wild Animal Medicine / Ed. E. Murray. Philadelphia, London, Toronto, - 1978. - P.589-592.
17. Wilson T.M. Diffuse muscular degeneration in captive harbour seals // J. Amer. Vet. Med. Assoc. - 1972. - Vol. 161, N 6. - P.608-610.
18. Polioencephalomalacia in captive harbour seals (*Phoca vitulina*) / Wohlsein P., Peters M., Geburek F. et al. // J. Vet. Med. A. - 2003. - Vol. 50, N 3. - P.145-150.

### PROBLEM OF MARINE MAMMALS HEALTH PROTECTION

I.A. Yerokhina, N.N. Kavtsevich

The factors influencing death rate of marine mammals in the nature and in captivity are discussed. Blood parameters which can be used for an estimation of marine mammals health state at a level norm-pathology in monitoring natural populations as well as at the keeping of animals in captivity are given.

# ОЦЕНКА АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ НА ПОПУЛЯЦИИ РЫБ ПО ЗАКОНОМЕРНОСТЯМ ГЕОГРАФИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ

Ю.Г. Изюмов, А.Н. Касьянов

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия  
izum@biw.yaroslavl.ru*

Знания закономерностей географической изменчивости фенотипических признаков рыб может быть использовано для оценки степени антропогенной трансформации популяций. Суть предлагаемого подхода для выявления антропогенно преобразованных популяций в пределах некоторого речного бассейна сводится к следующему. В реке, даже при наличии каскада водохранилищ руслового типа, популяции рыб образуют ленточную систему. При этом генетические и морфологические расстояния между популяциями должны монотонно возрастать по мере роста географического расстояния между ними, и эту зависимость можно описать некоторой эмпирической функцией. Плавность зависимости может нарушаться при переходе от одной географической расы к другой, если различия между этими расами (группами популяций) достаточно резко выражены, либо за счет потока чужеродных генов, например, в зоне впадения крупного речного притока. Другой причиной отклонения наблюдаемых межпопуляционных дистанций от теоретических может быть преобразование популяции внешними воздействиями, не связанными с потоком генов. В этом случае завышенные по сравнению с ожидаемым значением фенотипические дистанции между выборками из условно чистых участков и тестируемыми выборками могут отражать результаты антропогенного воздействия на последние. Предлагаемый подход реализован нами на примере популяций плотвы камских водохранилищ. В городах, расположенных по берегам водохранилищ камского каскада, сосредоточены многочисленные предприятия деревообрабатывающей, целлюлозно-бумажной, нефтехимической и оборонной промышленности, стоки которых могли бы воздействовать на морфологический облик популяций обитающих здесь рыб.

Материалом для данной работы послужили сборы плотвы из камских водохранилищ, начиная от Камского устья до р. Вишера. Рыб отлавливали неводом. У всех особей подсчитывали число позвонков в туловищном, переходном и хвостовом отделах позвоночника, суммарное число туловищных и переходных, а также общее число позвонков, включая веберовы и теуральные. По совокупности этих признаков между выборкой плотвы р. Вишера, взятой за исходную, и выборками из ниже расположенных точек вычислялись расстояния Евклида. Полученные расстояния Евклида сопоставлены с географическим расстоянием точек от исходной по системе стока (рис.). Теоретические расстояния Евклида вычислены с учётом ранее определённых нами широтных зависимостей (Кожара и др., 1996; 1999). На рисунке приведены географические расстояния точек сбора материала от самой верхней из них в устье р. Вишеры, где нет существенных источников загрязнения, а также наблюдаемые и ожидаемые расстояния Евклида между соответствующими выборками. Выборка 1 взята выше г. Соликамск, выборка 15 соответствует Камскому устью.

Как видно из рисунка, в ряде случаев наблюдаемая морфологическая дистанция превосходит ожидаемую – точки 4,5,7,9,11, причем эти случаи приходится на выборки, взятые из загрязненных участков. Выборки 4 и 5 взяты ниже г. Пермь вплоть до пос. Нытва.



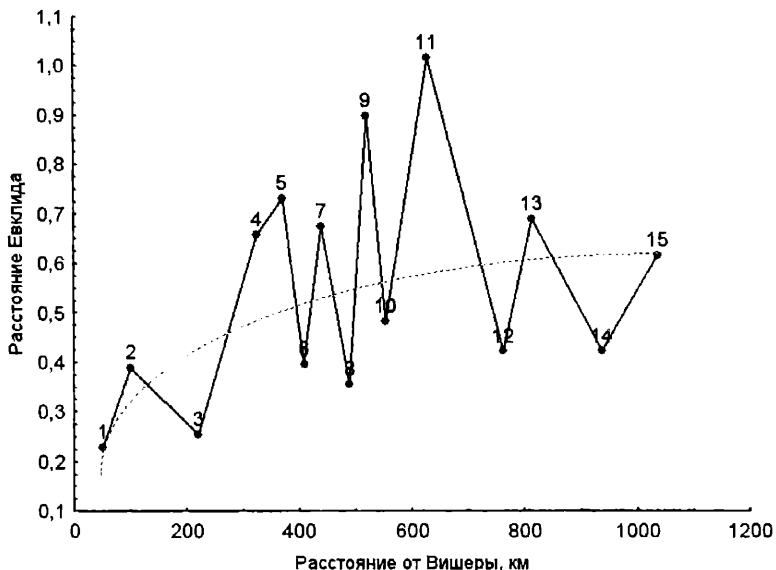


Рисунок. Эмпирическая (сплошная линия) и теоретическая (пунктирная линия) зависимости расстояния Евклида от географического расстояния для популяций плотвы Камы.

Выборки 7 и 9 взяты в средней части Воткинского водохранилища, у пос. Оса и Елово соответственно, где сосредоточены предприятия деревообрабатывающей, целлюлозно-бумажной и нефтехимической промышленности. Выборка 11 приходится на устье р. Сива, вбирающей стоки г. Воткинска. Выборки плотвы, соответствующие остальным точкам, взяты выше источников загрязнения или на значительном расстоянии от них. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что межпопуляционные морфологические дистанции, ранее применявшиеся только для классификационных и микроэволюционных построений, при определенных условиях (принадлежность к одной географической расе или подвиду в единой ленточной системе стока) могут оказаться пригодными для выделения зон антропогенной трансформации среды обитания рыб.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кожара А.В., Изюмов Ю.Г., Касьянов А.Н. Общая и географическая изменчивость числа позвонков у некоторых пресноводных рыб. // Вопр. ихтиологии, 1996, Т.36, № 2, с. 179-194.
2. Кожара А.В., Изюмов Ю.Г., Касьянов А.Н., Зеленецкий Н.М. Зависимость числа позвонков у пресноводных рыб от типа водоема. // Вопр. ихтиологии, 1999, том 39, №2, с.173-181.

### ESTIMATION OF ANTHROPOGENIC LOADING ON FISH POPULATIONS USING GEOGRAPHIC RULES OF MORPHOLOGIC CHARACTERS

Yu.G. Izyumov, A.N. Kasyanov

Roach (*Rutilus rutilus*) populations inhabiting the Kama river, were compared by morphologic euclidean distances and geographic distances between them. Populations living near pollution sources display euclidean distances noticeably greater than theoretically predicted ones.

М.Л. Калайда, Т.П. Синютина, Т.С. Гавшина

*Казанский Государственный Энергетический Университет, Казань, РТ  
kalayda@mi.ru*

В последнее время в связи с необходимостью на промышленных предприятиях проводятся различные биоцидные обработки технических систем водоснабжения и гидротехнических сооружений. Среди задач, требующих решения – обработка трубок конденсаторов турбин, трубок маслоохладителей, других теплообменных аппаратов, градирен и других технических сооружений против отложений и биологических обрастаний. При этом в наших исследованиях (Калайда, Синютина, 2007, 2010; Калайда и др., 2008) показано, что трубные отложения, как правило, во многих случаях связаны с биологическими обрастаниями. Биологические обрастания представляют собой совокупность организмов, поселившихся на различных поверхностях, в том числе поверхностях нагрева, охлаждаемых водой. Эти организмы заносятся в теплообменные системы с водой из источников водоснабжения и интенсивно размножаются в благоприятных для них условиях (теплая вода, обилие питательных веществ и растворенного кислорода). Обрастания, как правило, не состоят из одного организма, обычно они представляют собой некоторый комплекс – биоценоз. Обрастания как биоценоз возникают, развиваются и стабилизируются в некоторых постоянных условиях и переформируются в периоды изменения этих условий. В состав перифитона входят диатомовые и другие водоросли, грибы, простейшие, губки, мшанки, черви, моллюски, усоногие раки и другие беспозвоночные. Вначале субстраты покрываются слизистой пленкой из микроорганизмов. Затем на них оседают личинки и взрослые формы беспозвоночных. Покров из прикрепляющихся организмов облегчает нахождение в перифитоне подвижных форм. Проводимая биоцидная обработка нанокавитантами позволяет бороться как с технофильными микроорганизмами, катализирующими образование неорганических отложений и корродирующими металлы и бетон, так и с неорганическими отложениями, являющимися строительным материалом для биоклеток и образующими при длительной эксплуатации труднорастворимые и реакционно-инертные «котловые камни». Нанобиоцидные кавитанты позволяют проводить очистку теплообменников от нереакционноспособных отложений без демонтажа и разборки оборудования. Использование метода «направленной кавитации» заключается в расклинивании и дроблении нерастворимых отложений кавитационными микровзрывами, создаваемыми на границе раздела фаз в результате гетерофазной каталитической реакции и цепного распада наночастиц с заданными свойствами. В аппарат подается буферный водный раствор наночастиц. Наночастицы, инертные при обычных условиях, проникают в микропоры отложений или адсорбируются на их поверхности в течение 1-3 часов. Реакция инициируется подачей пара в трубное пространство, что приводит к запуску автокаталитической цепной реакции на границе раздела фаз по принципам гетерофазного катализа. Наночастицы реагируют с бурным выделением кислорода и тепла, формируя, таким образом, микровзрывы (кавитацию), интенсивно разрушая (расклинивая) отложения и выбрасывая их из аппарата. После окончания реакции межтрубное пространство промывают водой.

Проведение биоцидной обработки заканчивается решением вопроса о сбросе отработанной жидкости или возможности ее попадания в сбросные очистные сооружения или биофильтры, аэротенки, систему канализования, а также открытые

системы водоснабжения. В этой связи возникает задача оценки влияния растворов нанобиоцидов на гидробионтов. В проведенных нами экспериментах рассматривалось воздействие на гидробионтов следующих нанобиоцидных препаратов: линейное высокомолекулярное соединение органической полифосфатной природы (№1); хелатное линейное высокомолекулярное соединение на базе сетчатых хелатных соединений (№2); хелатное линейное высокомолекулярное соединение с включением третичных аминов (№3); линейное высокомолекулярное соединение с включением третичных аминов (№4); линейное высокомолекулярное соединение с включением нитрило-триметилуксусной кислоты (№5).

Биоцидное действие отслеживалось на трех тест-объектах – моллюске дрейссена (*Dreissena polymorpha* Pall.), гуппи (*Poecilia reticulata* Peters) и дафниях (*Daphnia magna* Straus).

В естественных благоприятных условиях у живой дрейссены створки приоткрыты и выставлены водной и выводной сифоны. Дрейссена хорошо реагирует на раздражение (колебания воды), пряча сифоны и смыкая створки. При биоцидной обработке дрейссена реагирует, пряча сифоны и смыкая створки. Пережить неблагоприятные условия она может, оставаясь живой до нескольких суток. При оценке смертности дрейссены при экспериментальном воздействии нанобиоцидными препаратами возникла задача визуального определения состояния дрейссены. Можно отметить, что у умершей дрейссены створки открыты больше, чем у живой, а сифоны - втянутые (мышечная система не функционирует). Кроме того, тело дрейссены не доходит до краев створок, оставаясь как бы впалым. Меняется и окраска тела дрейссены: с интенсивно оранжевой до бледно оранжевой.

При воздействии раствора нанокавитанта №4 наблюдалась иная картина: у мертвых дрейссен сифоны оставались аномально выпяченными и «вывернутыми».

При воздействии биоцидными препаратами на гуппи у последних меняется характер движения со спокойного на скачкообразное, тело гуппи покрывается пузырьками выделяемого при реакции кислорода, происходит выпячивание глаз, окончательным признаком того, что гуппи не выживут после воздействия на них раствора нанобиоцида является побеление живота. Дальнейшее воздействие рабочими растворами вышеперечисленных нанокавитантов №1, 2, 4 при рабочей концентрации 24,7 мл/л приводит к разрыву брюшной полости и выворачиванию кишечника у 100 % рыб. Нанокавитант № 4 при этой же рабочей концентрации, в отличие от остальных нанокавитантов, приводит к разрыву тела на две половинки вдоль позвоночника у 100% гуппи (Рис.1). Это, вероятно, связано с природой воздействия нанокавитантов. Механизм действия нанокавитантов описывается следующим образом: при каталитическом распаде наночастицы-кавитанты образуют локальные зоны повышенного и пониженного давления - «зоны микровзрывов и кавитации» с разрушающим действием расклинивающего типа на биопленки и конгломераты. Клетки, высвобождаемые из конгломератов, уничтожаются биоцидным хелатно-перекисным комплексом.

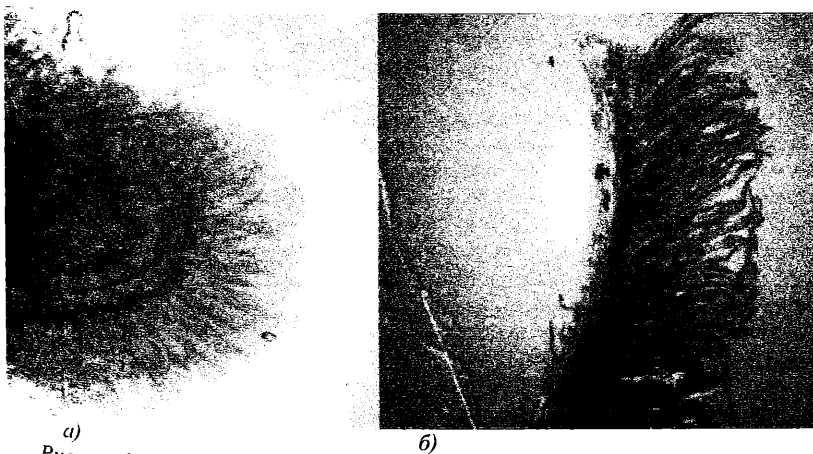
Также был проведен сравнительный анализ морфофизиологических параметров жаберного аппарата, детоксикации (печень) и клеточной стенки кишечника у гуппи под воздействием нанокавитанта. Проводился общий биологический анализ, визуально оценивалось состояние экспериментальных особей, гиперемия жаберного эпителия и отечность брюшка, а с применением гистологического анализа – морфофункциональное состояние жаберного аппарата и эпителия кишечника. В состоянии печени не было выявлено патологических

изменений. Незначительные отклонения от нормы проявлялись в увеличении массовой доли печени, что отмечалось у 47 % особей.



*Рисунок 1. Гутти в растворе с нанобиоцидом (линейным высокомолекулярным соединением с включением третичных аминов).*

У всех особей отмечалась интенсивная гиперемия жаберных филламентов и респираторных ламелл по сравнению с контрольными экземплярами (рис.2а), что может быть связано как с напряженным кислородным режимом, так и с действием биоцидов (Рис.2б). Такие серьезные нарушения, как срастание терминальных участков ламелл и дегенерация межламеллярного эпителия, встречались у 95 % особей. У 97 % экспериментальных особей наблюдалось частичное или полное разрушение эпителия кишечника, что, вероятно, привело к увеличению проницаемости стенок кишечника, как следствие к сильному набуханию брюшной полости и смерти.



*Рисунок 2. Жабры гутти: а) в контроле; б) после воздействия нанобиоцида.*

Необходимо отметить аномалии в рождении дафний при воздействии испарений паров нанобиоцидных препаратов. Известно (Методика..., период созревания рачков при оптимальной температуре и хорошо составляет 5-8 суток, длительность эмбрионального развития – 3-4 с повышением температуры до 25°C – 46 часов. Затем происходит вымет (партеногенетических самок) каждые 3-4 суток. Выдерживание культур емкостей с дафниями в климатостате для культивирования дафний одними экспериментальными стаканами с растворами нанобиоцидов приводило к вымету молодой дафнии, что в результате приводило к гибели взрослых дафний, в выводковой камере которой находилась живая молодь дафнии зафиксировано с помощью цифрового микроскопического комплекса (Ри

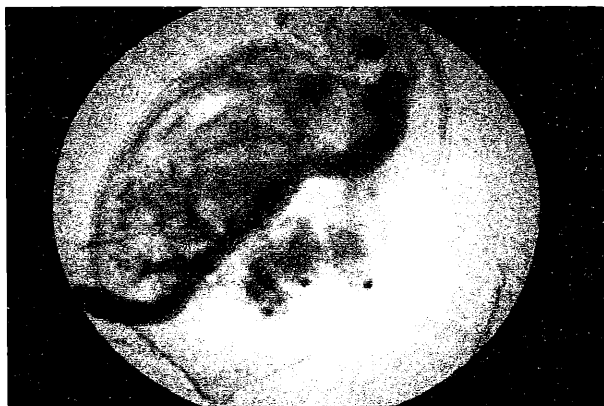


Рисунок 3. Живая молодь дафний в выводковой камере умершей взрослой

Для возможности сброса отработанных биоцидных растворов канализования, биофильтры или в водоемы были проведены исследования в разработке технологии снижения токсичности растворов нанобиоцидов. Были проведены исследования по оценке снижения остаточной концентрации раствора нанобиоцидов для гидробионтов в различных условиях применения препарата.

В проведенных экспериментах была показана возможность снижения токсичности препаратов методом его «расщепления на биомассу». «Биомасса» в экспериментах использовалась дрейссена и элодея. Снижение токсичности оценивалось по выживаемости тест-объекта (*Poecilia reticulata* Peters) и дафний (*Daphnia magna* Straus) в растворе пошагового помещения в него биомассы дрейссены или элодеи (Рис.4).

Дрейссена (или элодея) после 10 минут выдерживания нанокавитанта заменялась новой порцией (40 и 80 г). При использовании дрейссены от 0 до 0,8 кг/л раствор нанокавитанта сохраняет токсичность в растворе нанокавитанта от 0,8 до 1,2 кг/л биомассы происходит снижение токсичности препарата до 100% выживаемости в растворе. Аналогичный эксперимент был проведен при начальной концентрации нанокавитанта 76 мг/л. Эксперимент показал, что 100% выживаемость наступает в растворе нанокавитанта после выдерживания в нем 1 кг/л др

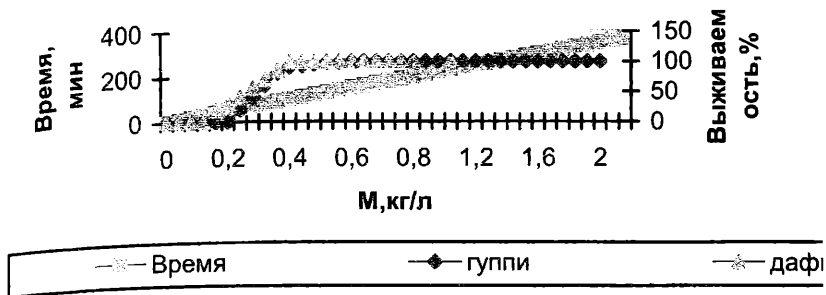


Рисунок 4. Изменение выживаемости гуппи и дафний при выдерживании их в растворе нанокавитанта с начальной концентрацией 40 мг/л после пошагового увеличения биомассы элодеи в растворе.

Аналогичный эксперимент был проведен при пошаговом добавлении в раствор нанокавитанта с его начальной концентрацией 40 мг/л биомассы (40 г/л) элодеи (рис.4).

Снижение токсичности раствора нанокавитанта для дафний и гуппи наступает при выдерживании в растворе массы водорослей от 0,1 до 0,2 кг/л. 100% выживаемость тест-объектов наступает в растворе нанокавитанта после выдерживания в нем 0,4 кг/л элодеи. Эффективность использования водных растений для снижения токсического действия нанокавитантов значительно сильнее.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калайда М.Л., Синютина Т.П. Сравнительный анализ состава организмов макрозообентоса и зооперифитона в естественных условиях и в условиях влияния ТЭЦ. – Актуальные экологические проблемы Республики Татарстан: Тезисы докладов VII республиканской научной конференции. – Казань: Отечество, 2007. – 245 с. С.81-83.
2. Калайда М.Л., Синютина Т.П. Возможности снижения остаточного токсического действия нанобактерий при борьбе с дрейссеной в составе биообрастаний // Бултеровские сообщения. - 2010. – Т. 22. - № 11. – С. 76-81.
3. Калайда М.Л., Синютина Т.П. Бионанотехнологии в системах водоподготовки объектов энергетики. Природоохранные биотехнологии в XXI веке. Сборник научных статей. Под редакцией доктора биологических наук, профессора Н.В. Морозова. – Казань: ТГГПУ, 2010. – 292 с. С.124-127.
4. Калайда М.Л., Новикова Г.В., Синютина Т.П., Шмакова А.А. Борьба с биообрастаниями – важная задача энерго- и ресурсосбережения. – «Журнал для руководителей и специалистов Энергетика Татарстана», №2 (10) 2008. С. 51-55.
5. Калайда М.Л., Новикова Г.В., Синютина Т.П., Шмакова А.А. Борьба с биообрастаниями – важная задача энерго- и ресурсосбережения. – «Журнал для руководителей и специалистов «Энергетика Татарстана», №3 (11) 2008. С. 85-92.
6. Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной и природной воды по смертности тест-объекта *Daphnia-magna* Straus: ПНД Ф Т 14.1:2.4.12-06.-М., 2007. – 44 с.

#### NANOBIOCIDES AS THE FACTOR OF INFLUENCE ON HYDROBIONTS

M.L. Kalaida, T.P. Sinyutina, T.S. Gafshina

The efficiency of application the nanobioicide processing in struggle with biological encrustation of hydraulic engineering constructions and water supply system are considered. For the open systems of water supply the influence of nanobioicide preparations on hydrobionts of various trophic level – zebra mussel, guppy and water flea are analyzed.

## ВЛИЯНИЕ СЕРТОНИНА И ХОЛЕЦИСТОКИНИНА НА ПРОЦЕССЫ ЭКЗОТРОФИИ У КАРПА *CYPRINUS CARPIO*

В.В. Кузьмина, Д.В. Гарина, Е.М. Семенова, А.В. Докучаева,  
П.В. Русанова, Е.В. Куливацкая

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия  
vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru

Хорошо известно, что состояние иммунной системы рыб в значительной мере зависит от эффективности их питания (Микряков, 1991). При этом все этапы экзотрофии, начиная от поиска и поглощения пищи и кончая переходом продуктов ее гидролиза во внутреннюю среду организма, находятся под нейрогуморальным контролем. Регуляция экзотрофии - сложный процесс, включающий как центральные, так и периферические механизмы. Наиболее подробно исследована регуляция начального звена экзотрофии - пищевого поведения рыб, в меньшей степени - центрального звена (процессов пищеварения). Сведения о влиянии серотонина (5-НТ) и холецистокинина (ССК) на пищевое поведение рыб фрагментарны, на активность пищеварительных ферментов, реализующих гидролиз различных компонентов пищи, в доступной литературе отсутствуют. При исследовании влияния 5-НТ на потребление пищи карасем *Carassius auratus* выявлен аноректический эффект как в случае его центрального (интравентрикулярного) введения (De Pedro et al., 1998), так и в случае его периферического (внутрибрюшинного) введения (Кузьмина и др., 2010). Важно отметить, что в работах по поведению рыб традиционно учитывается лишь количество потребляемой пищи. Вместе с тем гормоны могут влиять и на поисковые реакции, в частности двигательную активность рыб.

Цель работы - изучение периферических эффектов 5-НТ и ССК на начальное (пищевое поведение) и центральное (пищеварение - амилолитическая активность (АА) и протеолитическая активность (ПА)) звенья экзотрофии у карпа.

Работа проведена в 2009–2011 гг. Объект исследования: карп обыкновенный *Cyprinus carpio* L. в возрасте 0+ - 2+. Проведено 6 циклов экспериментов по изучению влияния 5-НТ и ССК на пищевое поведение рыб и 5 циклов экспериментов по изучению их влияния на активность пищеварительных ферментов. Рыб кормили два раза в неделю (5% от массы тела) пищей разного состава. Как правило, использовали «белковый» корм (желированный корм с преобладанием белковых компонентов: 17.3% белка, 1.7% жира и 0.1% углеводов в расчете на сырую массу). В одной серии опытов рыб содержали на «углеводной» диете (корм с преобладанием углеводных компонентов: 2.6%, 0.3% и 17.2% соответственно). В серии опытов по влиянию тяжелых металлов на пищевое поведение рыбам опытных групп предварительно на протяжении 6 мес. в корм вносили ртуть в метилированной форме (MeHg). Для этого использовали фарш из мышц серой цапли *Ardea cinerea*, содержавший Hg в концентрации 0.66 мг/кг (в корм рыб из контрольной группы добавляли фарш из мышц минтая *Theragra chalcogramma*, содержавший Hg в концентрации 0.014 мг/кг). Опыты проводили два раза в сутки – в 9 и 14 ч. За два дня до опытов рыб переставали кормить. Режим освещенности – 6 ч «свет» (450 лк), 18 ч «темнота» (0.08 лк). Для моделирования бентосного типа питания рыб помещали в камеру из прозрачного оргстекла с перфорациями (стартовый отсек), размером 10 x 5 x 6 см, которую устанавливали у задней стенки аквариума. Передняя стенка камеры поднимается. У противоположной стенки аквариума помещали корм (30 экз. замороженных личинок хирономид *Chironomus sp.*).

индивидуальная масса около 7.5 мг). Когда передняя стенка камеры поднималась, рыбы могли выходить из камеры для поиска и потребления корма. Регистрировали три параметра – время нахождения рыб в стартовой отсеке после подъема передней стенки камеры ( $t_1$ ), время, необходимое для достижения рыбами корма – латентное время питания, величина которого обратно пропорциональна скорости пищевой реакции ( $t_2$ ), и рацион (R). В последнем случае учитывали количество съеденных личинок хирономид за 3 мин наблюдения. Продолжительность опытов - 3-9 сут. В экспериментах по поведению за 1 ч до начала наблюдения рыбам контрольной группы внутривнутрибрюшинно (в/б) или внутримышечно (в/м) вводили 0.1 мл раствора Рингера для холоднокровных животных (109 mM NaCl, 1.9 mM KCl, 1.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM NaHCO<sub>3</sub>), рыбам опытной группы – равное количество гидрохлорида 5-НТ или ССК-33, производства Sigma, приготовленных на том же растворе Рингера, в дозе 10 мкг/г и 100 нг/г массы тела соответственно. В ряде опытов за 1 ч до введения рыбам 5-НТ вводили папаверин в дозе 0.02 мг/г массы тела. В энзимологических экспериментах на фоне соблюдения остальных условий время введения 5-НТ и ССК варьировало от 1 до 3 ч. АА (активность  $\alpha$ -амилазы, КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы, КФ 3.2.1.3 и ферментов группы мальтаз, КФ 3.2.1.20) определяли по приросту гексоз при помощи метода Нельсона в модификации А.М. Уголева и Н.Н. Иезуитовой (1969). ПА (преимущественно активность трипсина, КФ 3.4.21.4) оценивали по увеличению концентрации тирозина по методу Ансона (Anson, 1938) в некоторой модификации. В качестве субстратов использовали 1% растворы растворимого крахмала и казеина (рН 7.4). Инкубацию гомогенатов и субстратов осуществляли при температуре 20°C в течение 30 мин при непрерывном перемешивании. Об уровне ферментативной активности судили по приросту продуктов реакции за 1 мин инкубации субстрата и ферментативно активного препарата с учетом фона (количество соответствующих компонентов в исходном гомогенате) в расчете на 1 г сырой массы ткани (мкмоль/г·мин). Данные обработаны статистически с использованием приложения EXCEL программы MS Office'XP. Достоверность результатов оценивали при помощи непараметрического критерия Вилкоксона или t-теста Стьюдента при уровне значимости -  $p \leq 0.05$ .

**Влияние 5-НТ и ССК на пищевое поведение рыб.** Важно отметить, что и в/б, и в/м введение 5-НТ приводит к значительному изменению поведения рыб. Через 2 мин после инъекции рыбы всплывают к поверхности воды, активно поглощают воздух и держатся в поверхностном слое 30 мин. Затем они опускаются в придонные слои воды, что характерно для рыб-бентофагов. Указанный феномен обусловлен тем, что 5-НТ является стимулятором 5-НТ<sub>2</sub>-рецепторов, локализованных в гладкой мускулатуре стенок сосудов. Сужая сосуды, 5-НТ негативно влияет на дыхательную функцию. Предварительное введение папаверина, обладающего спазмолитическим действием, снимает этот эффект. К моменту начала регистрации пищевого поведения рыбы опытной группы не отличаются по поведению от рыб контрольной группы. В первой серии опытов у рыб, содержащихся на белковой диете, после в/б введения 5-НТ время пребывания в стартовой отсеке ( $t_1$ ) достоверно увеличивается через 1, 5, и 53 ч (в последнем случае на 70%), что свидетельствует о снижении у рыб уровня адаптивного любопытства. Изменение времени достижения кормового пятна ( $t_2$ ) носит колебательный характер. Достоверное увеличение значений  $t_2$  наблюдается через 5, 29 и 53 ч после введения 5-НТ, максимум на 110%. Рацион у рыб опытной группы достоверно снижается через 1, 5 и 24 ч, максимум на 35% (Рис. 1а). В случае в/м введения 5-НТ эффекты значительнее – достоверное уменьшение двигательной активности и рациона рыб наблюдается почти во все сроки наблюдения.



Во второй серии опытов у рыб, получавших пищу разного состава, отмечено увеличение  $t_1$  и  $t_2$  через 1 ч после инъекции 5-НТ. При этом почти во все сроки наблюдения у рыб, содержащихся на углеводной диете, параметры двигательных реакций были ниже, чем у рыб, получавших пищу, богатую белками. Рацион у рыб, содержащихся на углеводной диете, напротив, снижается в меньшей степени, чем у рыб, получавших «белковый» корм (рис. 16). Введение в «белковую» пищу MeHg существенно изменяет характер влияния 5-НТ на пищевое поведение рыб. Наличие в пище MeHg снижает эффект 5-НТ, а различия между опытом и контролем минимизируются.

Данные, касающиеся влияния 5-НТ и ССК на АА и ПА слизистой оболочки кишечника карпа, свидетельствуют о значительном их влиянии на уровень ферментативной активности (Рис. 2).

В опытах по влиянию 5-НТ на активность пищеварительных гидролаз у интактных рыб уровень АА соответствовал  $5.01 \pm 0.16$ , ПА –  $1.20 \pm 0.23$  мкмоль/г·мин. Важно отметить, что характер динамики АА у рыб контрольной и опытной групп различен. У контрольных рыб сначала наблюдается резкое снижение АА, через 24 ч – подъем, а через 72 ч – новое снижение. У рыб опытной группы через 3 ч после введения 5-НТ уровень АА достоверно снижается до  $3.81 \pm 0.19$  мкмоль/г·мин по сравнению с таковым у интактных рыб и сохраняется на близком уровне в течение 3-х сут (исключение – подъем через 48 ч). ПА у контрольных рыб достоверно увеличивается через 3 ч и сохраняется на близком уровне в течение всего опыта. У рыб опытной группы в это время ПА увеличивается до  $3.07 \pm 0.10$  мкмоль/г·мин и поддерживается на достоверно более высоком уровне в течение 2-х сут.

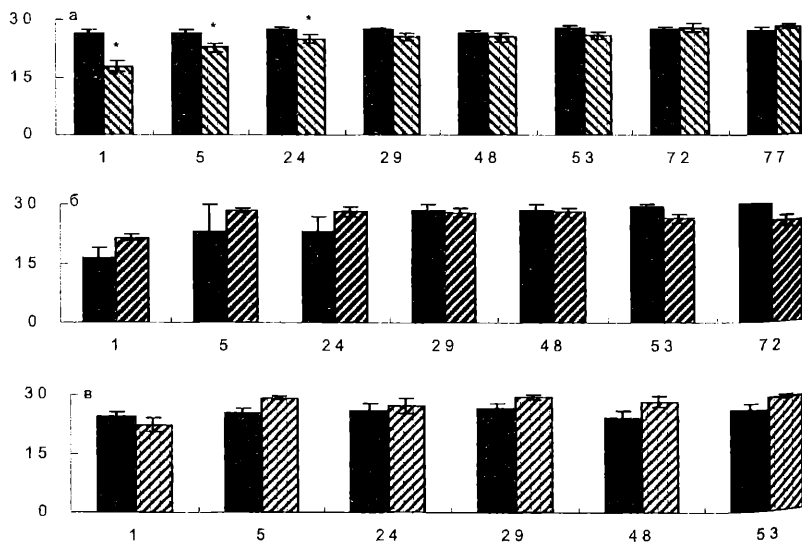


Рисунок 1. Влияние серотонина на рацион карпа.

Обозначения: на «а» темные столбики – раствор Рингера, заштрихованные – 5-НТ, на «б» темные столбики – белковая диета+5-НТ, заштрихованные – углеводная диета+5-НТ, на «в» темные столбики – MeHg, заштрихованные – MeHg + 5-НТ.

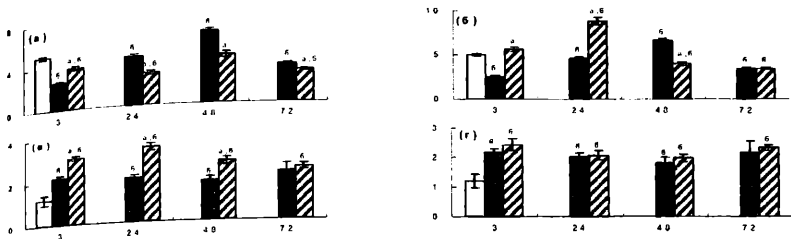


Рисунок 2. Влияние серотонина - (а) и (в) и холецистокинина - (б) и (г) на уровень амиллитической - (а) и (б) и протеолитической - (в) и (г) активности слизистой оболочки кишечника карпа.

Обозначения: по горизонтали – время после введения гормонов, ч, по вертикали – уровень ферментативной активности,  $\mu\text{моль}/\text{г}\cdot\text{мин}$ . а над столбиками - достоверные различия по сравнению с контролем, б - достоверные различия по сравнению с интактными рыбами.

В опытах по влиянию на активность пищеварительных гидролаз ССК использовалась та же группа интактных рыб. После введения ССК через 3 ч отмечается некоторое увеличение активности гликозидаз ( $5.60 \pm 0.23$   $\mu\text{моль}/\text{г}\cdot\text{мин}$ ) по отношению к таковой рыб интактной группы и достоверное увеличение относительно активности ферментов у контрольных рыб. В течение суток АА опытной группы увеличилась более чем в полтора раза (до  $8.79 \pm 0.41$   $\mu\text{моль}/\text{г}\cdot\text{мин}$ ). В этот период значения ферментативной активности у рыб, находящихся под действием ССК, достигают максимума. Через 48 ч после введения гормона наблюдается резкое снижение АА (до  $3.89 \pm 0.15$   $\mu\text{моль}/\text{г}\cdot\text{мин}$ ), причем величина показателя оказывается достоверно меньшей по сравнению с таковой у интактных и контрольных рыб. Через 72 ч после инъекции ССК активность ферментов достигает минимальных значений ( $3.47 \pm 0.11$   $\mu\text{моль}/\text{г}\cdot\text{мин}$ ). При этом различия в величине АА у рыб опытной и контрольной группы минимальны. При этом значения АА у рыб опытных и контрольных групп сближаются. ПА у рыб контрольной и опытной групп достоверно увеличивается через 3 ч (до  $2.18 \pm 0.13$  и  $2.44 \pm 0.20$   $\mu\text{моль}/\text{г}\cdot\text{мин}$  соответственно) и сохраняется на несколько более низком уровне в течение всего опыта. Как и в случае гликозидаз, различия между ПА у рыб опытной и контрольной групп минимизируются.

Прежде всего необходимо отметить, что нами впервые доказано участие 5-НТ в периферической регуляции экзотрофии. Это, по всей вероятности, возможно благодаря исключительно высокому содержанию моноамина в кишечнике рыб. Так, в кишечнике форели *Oncorhynchus mykiss* концентрация 5-НТ превышает 1500 нг/г, а в остальных тканях не достигает 160 нг/г. При этом 98% 5-НТ связано с серотонинергическими нервными волокнами, плотно расположенными в кишечной стенке, и лишь около 2% – с энтерохромафинными клетками слизистой оболочки (Саамайо-Тубио et al., 2007). По-видимому, как и у млекопитающих (Simansky, 1996), в реализацию ингибиторного действия 5-НТ включены рецепторы двух типов 5-НТ<sub>1В</sub> и 5-НТ<sub>2С</sub>. Эти факты делают понятным не только достоверное снижение потребления пищи, но и секреции ферментов поджелудочной железы, в частности уровня амиллитической активности слизистой оболочки кишечника под влиянием 5-НТ в течение первых суток после введения препарата. Кроме того, возможно вовлечение в эффекты 5-НТ адреналина и кортизола, ингибирующее влияние

которых на пищевое поведение рыб хорошо документировано (Кузьмина и др., 2003). Участие адреналина подтверждается наблюдающейся в первые 30 мин после введения 5-НТ дефекацией, обусловленной усилением моторики желудочно-кишечного тракта рыб. При этом взаимодействие гормонов, контролирующих потребление пищи, может осуществляться при участии гипоталамо-гипофизарно-интерренальной оси (Bernier, Peter, 2001). На вовлечение гормонов указывает и тот факт, что в наших опытах наблюдалось колебательное пролонгированное влияние 5-НТ как на рацион рыб, так и на их двигательную активность. Важно отметить, что исследованный фрагмент ССК слабо влияет на пищевое поведение карпов, однако в течение первых суток достоверно увеличивает АА и в течение всего опыта – ПА слизистой оболочки кишечника у рыб опытной группы по сравнению с показателями у интактных рыб. Возможно, слабое влияние ССК на пищевое поведение связано с тем, что в работе исследовалось действие ССК-33, а не ССК-8, обладающего более выраженным аноректическим действием на млекопитающих.

Таким образом, на примере карпа впервые показано, что 5-НТ, введенный периферически (внутрибрюшинно или внутримышечно), пролонгированно влияет на различные аспекты пищевого поведения рыб – уменьшает двигательную активность и рацион рыб. На активность пищеварительных гидролаз 5-НТ действует разнонаправленно – уменьшает АА и увеличивает ПА по сравнению с таковой интактных рыб. ССК на исследованные ферменты влияет однонаправленно (увеличивает и АА, и ПА). 5-НТ в большей степени влияет на ПА, ССК – на АА. Полученные данные расширяют сведения о действии 5-НТ и ССК на различные характеристики пищевого поведения и пищеварения, существенно дополняя представления об их роли в регуляции экзотрофии у рыб.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 09-04-00075).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузьмина В.В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. - М.: Наука, 2005. 300с.
2. Кузьмина В.В., Гарина Д.В., Яблочкина Е.В. Влияние адреналина на амилолитическую активность слизистой оболочки кишечника, уровень гликемии и концентрацию гликогена в тканях рыб // Журн. эволюц. биохим. физиол. 2003. Т.39. №2. С. 140-143.
3. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. 153 с.
4. Уголев А.М, Иезунтова Н.Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз// Исследование пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов. Л.: Наука. 1969. С. 169-173.
5. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеиздат. 1993. 238 с.
6. Anson M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J.Gen. Phys. 1938. V. 22. P. 79-83.
7. Bernier N.J., Peter R.E. The hypothalamic – pituitary – interrenal axis and the control of food intake in teleost fish // Compar. Biochem. Physiol. 2001. 129 B. P.639-644.
8. Caamaño-Tubío R.I., Pérez J., Ferreiro S., Aldegunde M. Peripheral serotonin dynamics in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Compar. Biochem. Physiol. 2007. V. 129 C. P. 245-255.
9. Simansky K.J. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety // Behav. Brain Res. 1996. V. 73. P. 37-42.

## EFFECT OF SEROTONIN AND CHOLECYSTOKININ ON EXOTROPHY PROCESSES IN CARP *CYPRINUS CARPIO*

V.V. Kuz'mina, D.V. Garina, E.M. Semenova, A.V. Dokuchaeva, P.V. Rusanova., E.A. Kulivatskaya

The effects of 5-HT and CCK on exotrophy processes in carp *Cyprinus carpio* have been investigated. At the first time it was shown that peripherally injected 5-HT caused prolonged effect on fish feeding behavior: decreased moving activity and the ration. 5-HT decreased AA and increased PA, CCK influences on these characteristics in same ways (increased both AA and PA). 5-HT effects on PA to a greater extent than on AA, and CCK acts on enzyme activities oppositely.

# ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ РЫБ (НОРМЫ, ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА) ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ ВОДНО-СОЛЕВОГО ОБМЕНА

**В.И. Мартемьянов**

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия  
martem@ibiw.yaroslavl.ru*

Способность животных противостоять факторам среды связана с защитными системами, функционирование которых существенно зависит от содержания электролитов во внутренней среде и клеточной жидкости организма. Ионы натрия, калия, кальция, магния контролируют различные процессы жизнедеятельности, участвуя в обеспечении воспроизводства, устойчивости, роста, регуляции различных физиологических функций и активности ферментативных реакций.

В медицинской практике и ветеринарии, как правило, используется клинический анализ, позволяющий оценивать состояние индивидуального организма на основе знаний по диапазонам регуляции того или иного показателя, характеризующего норму реакции, полученную на здоровых особях. Многочисленные данные свидетельствуют, что у здоровых людей содержание различных ионов во внутренней среде регулируется в определенных узких диапазонах, а отклонение за эти пределы наблюдается при различных неблагоприятных ситуациях и заболеваниях (Кей, 1992; Нацимента, 1992; Рейнольдз, 1992; Уиллз, Барнет, 1992). Несмотря на то, что по человеку накоплен обширный объем сведений, тем не менее относительно нормы и патологии во многом остается еще много не ясного (Григорьев, Баевский, 2001).

В научных исследованиях, как правило, применяется статистический анализ. Содержание какого-либо вещества в плазме крови или тканях сравнивается между контрольными группами и выборками объекта, находящегося в различном физиологическом состоянии или подвергнутого какому-либо воздействию. Этот подход позволяет оценить направление и величину наблюдаемых сдвигов исследуемого показателя, но не дает ответа на вопрос: выходят ли зарегистрированные изменения за пределы физиологической нормы реакции? В связи с этим центральной проблемой является определение диапазонов регуляции, характеризующих собой норму реакции и пределы, связанные с отклонениями от нормы.

Для выполнения этой задачи нами было предложено осуществлять определение уровней ионов во внутренней среде и тканях животных, акклиматизированных к какому-либо фактору во всем диапазоне, который вид может перенести (Мартемьянов, 1996), изучать динамику показателей в ходе годовых циклов (Мартемьянов, 2001) и при действии экстремальных воздействий.

Проведенные исследования показали, что у карпов в зоне толерантных температур, а у плотвы в ходе годового цикла, уровни натрия в плазме крови и тканях регулировались в определенных диапазонах концентраций, характеризуя собой норму реакции (рис. 1). Отклонения от нормы у карпа наблюдались в зоне критических температур, а у плотвы в период, связанный с воспроизводством.

Сравнение показывает, что соответствующие диапазоны регуляции содержания натрия в тканях карпа и плотвы полностью или существенно перекрываются между собой, отражая родство по данным признакам. Межвидовые различия соответствующих диапазонов регуляции проявляются в величине их амплитуды и смещении границ в ту или иную сторону.

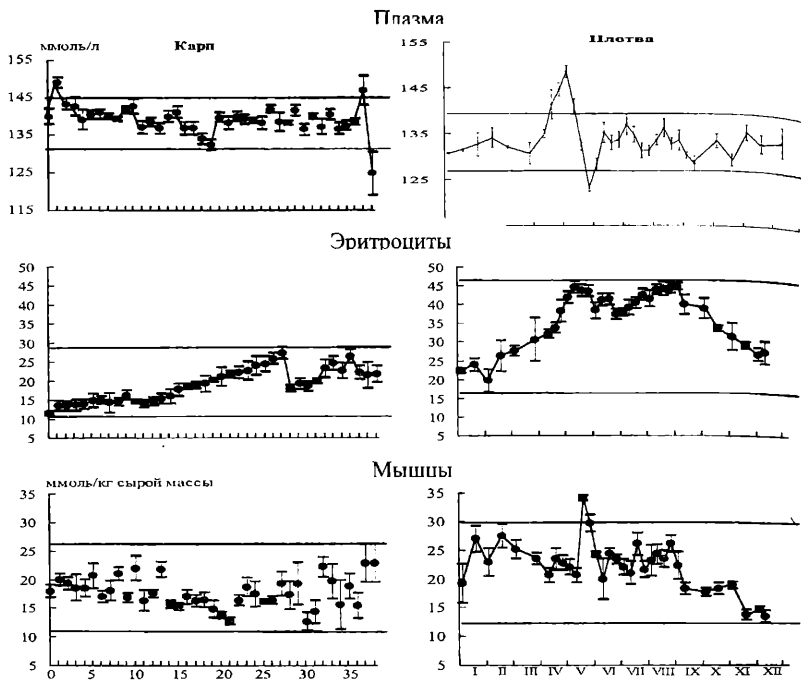


Рисунок 1. Содержание натрия в плазме, эритроцитах и мышечной ткани карпа в зависимости от температуры акклимации, а у плотвы в ходе годового цикла.

По оси абсцисс – температура акклимации для карпа, месяцы года для плотвы; по оси ординат – концентрация натрия в тканях рыб. Диапазоны регуляции, отражающие норму реакции, ограничены горизонтальными линиями относительно оси абсцисс.

Неблагоприятные ситуации уменьшают уровень натрия в крови человека и животных ниже нормы. Гипонатремия сопровождается негативными процессами, вплоть до гибели отдельных индивидуумов. На основе продолжительности гипонатремии выделяют две ее формы. Острая гипонатремия протекает от нескольких часов до 1 суток. Хроническая гипонатремия продолжается более длительное время. В экспериментальных исследованиях проследить длительность гипонатремии не представляет особых затруднений. В обычных (полевых) условиях продолжительность гипонатремии невозможно определить, поскольку неизвестна ее предыстория. Необходимы критерии, которые позволяли бы отличать формы гипонатремии у особей с неизвестной предысторией. Это возможно осуществить на основе выявления физиологических различий между двумя формами гипонатремии.

В норме содержание ионов натрия в плазме крови леща поддерживается в диапазоне 127-141 ммоль/л (рис. 2, левая часть). В ответ на резкие воздействия (острый стресс), такие как отлов и транспортировка рыб, исходные концентрации натрия в плазме крови леща ( $133.8 \pm 1.1$  ммоль/л) снизились в пределах 1 суток до минимальных значений ( $97.9 \pm 4.2$  ммоль/л), а затем в ходе акклимации к лабораторным условиям, восстановились и стабилизировались на исходных уровнях.

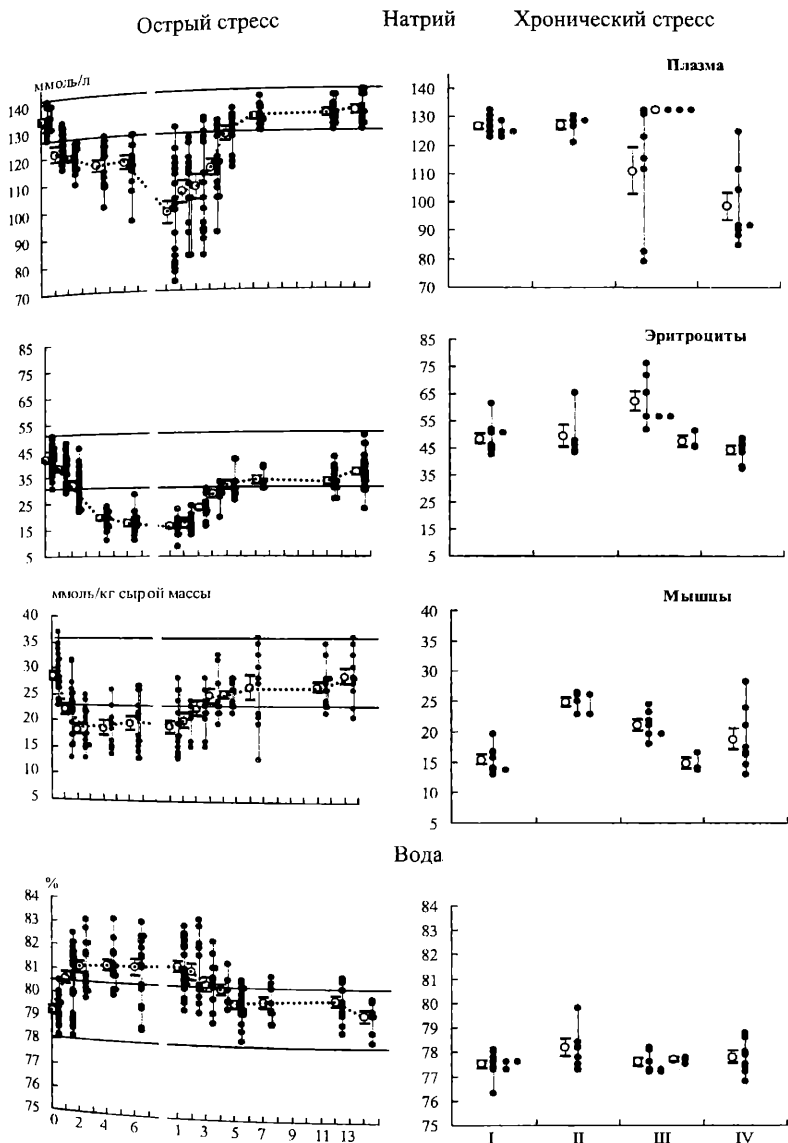


Рисунок 2. Закономерности изменений показателей водно-солевого обмена у леща при остром и хроническом стрессе.

По оси абсцисс при остром стрессе – время (0-6 часы, 1-15 сутки); при хроническом стрессе – станции отлова рыб в Рыбинском водохранилище: I –

Коприно, Волжский плес, II – Брейтово, Моложский плес, III – Мяска, IV – Торowo, Шекнинский плес. По оси ординат – показатели водно-солевого обмена.

Использование статистической обработки материала (светлые маркеры) показывает, что после воздействия гипонатемии проявляется у всей выборки рыб. При этом нижняя граница гипонатемии составляет 93.7 ммоль/л. Индивидуальный анализ (черные маркеры) свидетельствует, что после воздействия в каждой выборке встречаются устойчивые к воздействию особи, у которых содержание натрия в плазме крови не опускается ниже нормы. И, наоборот, в выборках обнаруживаются очень чувствительные к воздействию рыбы, у которых уровень натрия в плазме отклоняется от нормы до чрезвычайно низких значений. Индивидуальный анализ показывает, что содержание натрия в плазме крови леща при остром стрессе может снижаться до 78 ммоль/л.

Таким образом, статистическая обработка приводит к обезличиванию данных, которые нельзя применить на практике для оценки состояния конкретной особи. Сравнение индивидуальных значений позволяет оценить физиологическое состояние и степень чувствительности к воздействию отдельной особи на основе отклонения от нормы. Это имеет большое значение в рыболовной практике для оценки физиологического состояния производителей рыб.

Уменьшение уровня натрия в плазме крови при остром стрессе сопровождается падением осмоляльности внутренней среды организма. В результате между внеклеточной и внутриклеточной жидкостью организма создается осмотический перепад, способствующий перемещению воды в клетки, вызывая их разбухание. При этом происходит возрастание суммарного содержания тканевой воды. Полученные нами данные (рис. 2, левая часть) показывают, что в течение первых 2 суток от начала стрессорного воздействия содержание воды в мышечной ткани леща повышено, а затем в ходе акклимации к новым условиям снижается и стабилизируется на исходном уровне.

На основе индивидуального анализа установлена связь между степенью проявления гипонатемии и величиной гидратации мышечной ткани. У особей с более низкой концентрацией натрия в плазме наблюдалась более высокая обводненность ткани.

Увеличение содержания воды в тканях при остром стрессе представляет большую опасность для организма. Наиболее губительным процессом является обводнение мозга. Череп препятствует расширению этой ткани. Поэтому отек мозга при гипонатемии сопровождается ростом внутричерепного давления с целым рядом сопутствующих негативных последствий, включая высокую смертность.

Для противодействия вредным процессам при остром стрессе включаются защитные функции, связанные с усилением активности Na-насоса, расположенного на клеточных мембранах различных органов и тканей организма. В результате происходит изгнание ионов натрия из различных клеток в окружающую их жидкость (рис. 2, левая часть), препятствуя увеличению гипонатемии, гипосммии и осмотическому перепаду между клеточной и внеклеточной жидкостью организма.

На рисунке 2 (правая часть), приведены данные по содержанию натрия в плазме крови, эритроцитах, мышцах леща, отловленного в период экспедиции с 21 по 26 июня 1990 г в разных участках Рыбинского водохранилища, отличающихся по характеру и интенсивности антропогенного загрязнения.

Полученные результаты показали, что содержание натрия в плазме крови лещей, отловленных в Волжском и Моложском плесах, которые являются относительно чистыми, поддерживалось у нижней границы нормы в узкой зоне концентраций.

Станция Торowo, расположенная вблизи г. Череповец, испытывает наибольшую антропогенную нагрузку. Особи леща, пойманные на этой станции,

имели разную степень проявления гипонатремии. Среднее значение содержания натрия в плазме крови леща этой выборки было минимальным.

Станция Мякса расположена на выходе Шекснинского плеса. Содержание натрия в плазме крови лещей, отловленных на этой станции 22.06.1990 г, было наиболее вариабельным. Клинический анализ показывает, что две особи этой выборки имели нормальные значения концентрации натрия в плазме крови, тогда как остальные рыбы испытывали разную степень гипонатремии. Если два значения, отражающих норму, исключить из выборки со станции Мякса, то диапазон распределения натрия в плазме крови остальных 5 особей с признаками гипонатремии приблизительно сходен с таковым, полученным для лещей со станции Торово. Через 3 дня (25.06.1990 г) на станции Мякса был осуществлен повторный отлов, в улове которого оказалось 3 леща. Содержание натрия в плазме крови этих рыб было нормальным.

Рядом с Череповецким промышленным комплексом расположена ст. Торово, а Мякса значительно ниже на выходе Шекснинского плеса. Логично ожидать, что токсичность воды должна убывать по мере удаления от источника загрязнения, и лещ Шекснинского плеса на ст. Мякса должен испытывать меньшее негативное влияние, чем на ст. Торово. Однако часть особей леща со ст. Мякса имели наиболее суровую степень проявления гипонатремии. Это можно объяснить тем, что лещи на ст. Торово, получив определенную дозу воздействия, выше которой защитным системам уже трудно противостоять, перемещались в менее загрязненную среду, чтобы восстановить физиологическое состояние. Наличие на ст. Мякса особей леща, имеющих нормальный уровень содержания натрия в плазме крови, свидетельствует о миграции рыб в эту зону из относительно чистых участков Рыбинского водохранилища.

Проявление гипонатремии при остром стрессе сопровождается снижением концентрации натрия и увеличением уровня воды в тканях. У особей леща, отловленных в Шекснинском плесе с признаками гипонатремии, содержание натрия и воды в тканях было таким же, как и у нормальных рыб (рис. 2). Таким образом, острая гипонатремия сопровождается отклонением содержания натрия и воды в тканях от исходных значений, тогда как при хронической гипонатремии эти параметры восстановлены до нормы.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Григорьев А.И., Баевский Р.М. Здоровье и космос. Концепция здоровья и проблема нормы в космической медицине. М.: Слово, 2001. 150 с.
2. Кей Д.М. Гипонатремия и гипернатремия // Трудный диагноз. М: Медицина, 1992. Т. 1. С. 383-399.
3. Мартемьянов В.И. Диапазоны регуляции содержания ионов натрия, калия, кальция, магния в плазме, эритроцитах и мышечной ткани карпа *Cyprinus carpio* // Ж. эволюц. биохимии и физиологии. 1996. Т. 32. № 1. С. 37-43.
4. Мартемьянов В.И. Диапазоны регуляции концентрации натрия, калия, кальция, магния в плазме, эритроцитах и мышечной ткани плотвы *Rutilus rutilus* в природных условиях // Ж. эволюц. биохимии и физиологии. 2001. Т. 37. № 2. С. 109-113.

### ASSESSMENT OF PHYSIOLOGICAL CONDITION OF FISHES (NORM, SHARP AND CHRONIC STRESS) ON PARAMETERS OF WATER-SALT METABOLISM

V.I. Martemyanov

Criteria for assessment of norm, sharp and chronic stress on parameters of water-salt metabolism of freshwater fishes are shown.



# ОСНОВНЫЕ ИТОГИ И НАПРАВЛЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ГИДРОБИОНТАХ

В.Р. Микряков

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанова РАН, Борок, Россия  
mvr@ibiw.yaroslavl.ru*

Иммунологические исследования гидробионтов в настоящее время как в России, так и за рубежом, ведутся в широком плане. Они связаны с изучением структуры и функции иммунной системы, определением её роли в реализации процессов эволюции, адаптации к биотическим и абиотическим факторам, специфических и неспецифических основ иммунопрофилактики, диагностики инфекционных и инвазионных болезней, токсикантов, состояния здоровья водных животных; биохимических, генетических, морфологических, экологических аспектов иммунологии, патологии и оценкой последствий влияния техногенного загрязнения на иммунологические механизмы гомеостаза и использования иммуногестов в экотоксикологических исследованиях. Проведёнными исследованиями установлены особенности становления структурной организации и функционирования механизмов иммунного гомеостаза на разных этапах филогенеза гидробионтов (Заварзин, 1953, 1976; Хрущов, 1966; Лукьяненко, 1971; Галактионов, 1977, 1982, 1986, 1995, 2005; Hildemann, 1974; Litman, Jood, 1978; Gooper, 1978; Clemm, War, 1994; Roit et al., 1998; van Muiswinkel, van Der Waal, 2006; Zapata et al., 2006).

Определены основные этапы формирования и функционирования иммунной системы рыб в онтогенезе. Показана связь становления структурно-функциональной организации иммунной системы с периодами и этапом развития рыб (Лукьяненко, 1971, 1989; Микряков, 1978, 1979, 1984, 1991; Лапинова, Микряков, 1990, 2011; Флоренсов, Пестова, 1990; Горышина, Чага, 1990; O'Nill, 1989; Nakaiishi, 1991; Patner, 1996; Magnadotter et al., 2005; Zapata et al., 2006; Mulero et al., 2007 и др.). Установлена зависимость функционирования иммунной системы рыб в течение года от видовых, экологических особенностей и возраста (Лукьяненко, 1991; Микряков, 1978, 1991, 2004), а также от условий среды обитания, температуры, присутствия в воде поллютантов, pH среды (Гончаров, 1966, 1972; Шлейфер, 1978; Балабанова, Микряков, 1973; Микряков и др., 1974, 1991, 2001; Заботкина, 1999; Субботкина, 2002, 2004, 2011; Грищенко, Рудиков, 1985; Голованов, Микряков, 1985, 2000, 2003, 2007, 2010, 2011; Силкина и др., 2001, 2005, 2007, 2011; Балабанова и др., 2003; Заботкина, Лапинова, 2003, 2004, 2010, 2011; Макарская, Тарских, 2007, 2011; Степанова и др., 1998; 2003; Кондратьева и др., 2001, 2007; Сяпина и др., 2007, 2011; Anderson, 1980, 1996, 2001; Mikryakov et al., 2002), а также зараженности паразитами (Гончаров, 1946, 1953; Головина, 1974, 1975, 1976, 1977, 1983, 1996, 2003, 2007; Головина, Тромбицкий, 1989; Микряков и др., 1975, 1985, 2009, 2001-, 2011; Рудиков, Грищенко, 1985; Лысанов, 1990; Jeni, Anderson, 1993; Yin et al., 1997; Pearce et al., 1999; Sacij, 2002; Schapira et al., 2005; Imazarov, 1995, 2011 и др.). Установлены общие закономерности реагирования иммунной системы на ксенобиотики в условиях эксперимента и антропогенного загрязнения водных экосистем (Микряков и др., 1990, 2001, 2005, 2006; Заботкина, Лапинова, 2003, 2004, 2010; Мазур и др., 2006 и др.). Материалы исследований свидетельствуют, что иммунная система на загрязняющие вещества реагирует дестабилизацией структурно-функционального состояния, темпов лимфо- и миелопоэза, нарушением процессов дифференцировки стволовых кроветворных клеток, активацией

образования активных форм кислорода, нарушением структурной организации и инволюцией иммунокомпетентных клеток, тканей, органов, снижением функций естественного и супрессией формирования приобретённого иммунитета.

В популяциях рыб, обитающих в антропогенно-трансформированных экосистемах, вызванных загрязнением вод отходами крупных промышленных предприятий, повышается доля особей с повреждённой структурой иммунокомпетентных клеток, тканей, органов, содержанием токсикантреагирующих антител, гемолитических аутоантител, с высокими уровнями содержания пигментов старения липофусцина и продуктов перекисного окисления липидов и низкими величинами антиоксидантов. Показана связь происходящих в иммунной системе изменений с видовыми, экологическими особенностями рыб и уровнем загрязнения водоёмов поллютантами (Микряков и др., 1990, 2001, 2010, 2011; Силкина и др., 2006, 2010, 2011).

Сделан вывод, что иммунная система тонко реагирует на загрязняющие вещества изменением структуры и функции задолго до появления клинических признаков токсикоза. Рыбы на возмущающие факторы реагируют адаптивными и неадаптивными модификациями. Иммунная система как орган адаптиогенеза, является одной из чувствительных систем накопления организмом рыб информации о последствиях токсикозов и эпизоотий. Происходящие в иммунной системе отклонения могут служить надёжными биологическими маркерами при оценке качества воды, состояния здоровья и осуществлении мониторинговых наблюдений в антропогенно-трансформированных экосистемах и при скрининге поражённых и непоражённых токсикантами рыб в экотоксикологических исследованиях (Микряков и др., 2001, 2004, 2006, 2007).

На основе исследований иммунного статуса осетровых с расслоением мышечной ткани и без него в период массовой гибели их на нижнем участке Волги выдвинута аутоиммунная гипотеза разрушения мышц иммунной системой. Впервые показано, что осетровые с миопатией отличались от таковых без патологии уровнем содержания аутоантител и аутоантигенреагирующих иммунцитов к тканям собственного организма (Микряков, 1997).

Установлены ранее неизвестные данные о механизме влияния катехоламинов и кортикостероидных гормонов на структурно-функциональное состояние иммунной системы рыб и закономерности формирования специфического и неспецифического иммунитета (Микряков В.Р., Аскинази, 1982; Микряков Д.В., 2004, 2006; Ellis, 1986; Barton, Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, Sjored, 1997; Weits, 1998; van Muiswinkel, 2006 и др.). Показано, что иммунная система рыб на экзогенное введение катехоламинов и кортикоидов реагирует дестабилизацией структурно-функционального состояния и изменением закономерностей формирования иммунитета. Вызываемые в иммунной системе рыб дестабилизационные процессы связаны с изменением интенсивности апоптоза лимфоцитов, содержанием антигенраспознающих, антигенразрушающих и антителосинтезирующих клеток и клеток памяти, соматического индекса иммунокомпетентных тканей, органов и скорости отторжения аллотрансплантатов и окислительного стресса, снижением протективной функции к эктопаразитам (Микряков Д.В. и др., 2006, 2010; Степанова и др., 2007, 2009, 2011). По характеру влияния кортикоиды подразделяются на иммуносупрессивные и иммуностимулирующие. Выявлено сходство развития динамики дестабилизационных процессов, происходящих в иммунной системе под влиянием гормонов, с таковой при воздействии на рыб стресс-факторов. Установлен сходный характер взаимодействия иммунной системы рыб на воздействие кортикоидов с

таким теплокровных животных и человека. Показана возможность использования их при разработке проблем управления иммунитетом к стресс индуцируемым болезням (Микряков В.Р., 1976, 1979, 1989, 1991; Микряков Д.В., 2004; Микряков, Микряков, 2004, 2005, 2007; Степанова и др., 2004, 2007, 2010 и др.).

Предложена и разработана методика оценки последствий влияния стресс-факторов на клеточные основы иммунитета на основании анализа индекса разнообразия и относительной организации лейкоцитов по Шеннону. На основе определения характера реагирования лейкоцитов на воздействие солей тяжелых металлов (кадмия, меди и ртути), фенола, дихлофоса, карбофоса, нафталина, транспортормовки и гормона стресса (кортизона) установлена зависимость изменения индексов Шеннона от природы действующего на рыб стрессора. Предложенные индексы позволяют прогнозировать последствия влияния стрессоров на состояние клеточного звена иммунитета, процессы лейкопоза рыб и проводить мониторинг состояния здоровья рыб, обитающих в техногенно-трансформированных экосистемах и в условиях искусственного выращивания (Микряков и др., 2002, 2005; Терещенко и др., 2004, 2007, 2011).

Исследованиями последствий направленного изменения структурно-функционального состояния иммунной системы, метаболических процессов и динамики развития спонтанной паразитарной инвазии и инфекции (сапролегниоза, триходиноза, ихтиофтириоза, дактилогироза) выдвинута гипотеза, объясняющая иммунитет к факультативным паразитам с позиций питательно-тормозящей теории (или теории неполной среды) (Микряков, 1977, 1978, 1979, 1998; Воронин, 1992; Микряков Д.В. и др., 2007, 2008, 2011). Согласно выдвинутой гипотезы, иммунитет к факультативным паразитам объясняется отсутствием для роста и размножения паразитов питательных веществ и структурно-функциональным состоянием иммунной системы, препятствующим или ограничивающим развитие паразита и переход их из стадии «покоя» в сапрофитную и паразитную.

В связи с разработкой специфических основ регуляции адаптивного иммунитета интенсивно разрабатываются механизмы и факторы, обеспечивающие процесс формирования приобретенного иммунитета после иммунизации вакцинными препаратами, вопросы создания новых эффективных вакцин, средств специфической диагностики (Гончаров, 1950, 1962, 1966; Гончаров и др., 1967; Гончаров, Микряков, 1968; Gontcharov, Mikryakov, 1968; Микряков, 1964, 1967, 1970, 1984, 1991; Гончаров, 1946, 1955; Рудиков, 1972, 1975, 1988; Рудиков и др., 1975, 1986; Пичугина, 1983, 1985, 1991; Щелкунов, Щелкунова, Осадчая, 1977; Щелкунов и др., 1984, 2004, 2005, 2007, 2011; Пичугина и др., 2004; Валедская, 1998, 2000, 2001, 2003, 2004; Балабанова, 1978; Лобунцов, 1975; Лобунцов, Микряков, 1993; Гусева, 1998; Юхименко и др., 1996, 2004; Юхименко, Койден, 1997; Юхименко, Смирнов, 1997; Безгачина и др., 1996, 2000, 2003, 2005; Гаврилин и др., 2001, 2004; Смирнов и др., 2001, 2004; Schaperclaus, 1954; Krautz et al., 1964; Krautz, Anderson, 1970; Anderson, 1974; Antipa, Amend, 1977; Paterson, 1981; Dorson, 1977; Judding et al., van Muiswinkel, 2011 и мн. другие).

Наиболее полно механизмы взаимодействия между возбудителями инфекционных болезней и иммунной системой рыб разработаны в лаборатории иммунологии ИБВВ РАН на примере бактерий, вызывающих аэромоноз карпов (Гончаров и др., 1966, 1967; В. Микряков, 1969, 1991, 1998; В. Микряков и др., 1974, 1979; Балабанова, 1979; Микряков, Микряков, 2006).

Проведенные на основе единого методического подхода исследования показали, что иммунная система рыб на *A. hydrophila* реагирует изменением структурно-функционального состояния клеточных и гуморальных факторов

активацией функций эфферентных и афферентных звеньев, увеличением структур, осуществляющих эффективную защиту от патогенных бактерий, продуктов их распада. В их основе лежат процессы распознавания, разрушения, элиминации чужеродных тел, презентации иммуногена предшественникам антителообразующих клеток (АОК), дифференцировки их в сторону АОК, клеток памяти, синтеза антител и повышения напряженности адаптивного иммунитета (В. Микряков и др., 1974; В. Микряков, 1984, 1991, 1998). Определены основные структуры, осуществляющие распознавание, разрушение бактерий, синтез антител и сохранение иммунологической памяти. Установлено, что функцию распознавания, подобно теплокровным животным, в организме рыб выполняют преддетерминированные лимфоциты, разрушения – микро- и макрофаги, а синтез антител – В-лимфоциты. На основании анализа особенностей распределения меченых по  $^{14}\text{C}$  бактерий в тканях и органах рыб и элиминации продуктов их распада из организма установлено, что иммунная система сначала подвергает микроорганизмы гидролитическому расщеплению до углекислоты и неидентифицированных органических веществ. Углекислота выводится из организма через жабры, а неидентифицированные органические вещества образуются при распаде бактерий. Около 60% продуктов распада бактерий задерживается в иммунокомпетентных тканях неопределенно долгое время, более 2-х лет, и участвуют в метаболических процессах и синтезе антител (Микряков, Балабанова, 1984; Микряков, 1991). Показано, что бактерии в процессе взаимодействия с иммунной системой индуцируют синтез специфических антител и образование клеток памяти. Синтез антител связан с процессами дифференцировки предшественников В-лимфоцитов в сторону АОК. Исследованиями функциональных характеристик антигенраспознающих, антиинвазивных и антителосинтезирующих структур показано, что у рыб, подвергнутых воздействию бактерий, происходит повышение активности функций и увеличение количества иммунологических структур, обеспечивающих повышение напряженности иммунитета (V. Mikrakov, 1998). Показано, что активность структурно-функциональных перестроек в иммунной системе определяется температурой воды, присутствием токсических факторов (фенол, карбофос, соли тяжелых металлов), ионизирующей радиацией и воздействием на рыб кортикостероидов (кортизола, кортизона и дезоксикортикостерон-ацетата) (Шлейфер, 1978; В. Микряков, 1990, 1991; В. Микряков и др., 2000, 2001; Д. Микряков, 2004). На базе полученных материалов выдвинуто положение, что рыбы на воздействие бактериального антигена, подобно таковым высших позвоночных, реагируют адаптивными модификациями иммунной системы, которые направлены на повышение иммунитета и адаптивного потенциала рыб к патогенным организмам.

Проводимые в настоящее время исследования по изучению адаптивного иммунитета к заразным болезням направлены не только на изучение механизмов специфического иммунитета путем вакцинации, но и на разработку массовых способов иммунизации, поиск путей повышения иммуногенности вакцин, использования неспецифических иммуномодулирующих и иммуностимулирующих препаратов (пробиотиков, витаминов, интерферона, интерлейкина, гормонов), регуляции условий среды обитания и качества кормов, методов генетики и селекции, а также на создание и выведение устойчивых к патогенным паразитам пород рыб (Кирпичников, Фангорович, 1972; Кирпичников, 1977, 1980, 1998; Трифонова и др., 2003; Юхименко и др., 2003; Головин, 2004; Щелкунов, Арзаняева, 2007; Воронин и др., 2007; Касасва, 2005, 2007; Бабич и др., 2007; Лапирова и др., 2007; Зуевский и др., 2007; Лапирова, Микряков, 2011; Слынько и др., 2011; Imazarov, 2011),

определение роли полиморфных систем тканевых белков индивидуального иммунитета к тканевым эндопаразитам (Микряков, 1974, 1978, 1999; Микряков и др., 1982).

Таким образом, в настоящем сообщении изложены основные итоги и направления исследований в области иммунологии гидробионтов, отражающие современные тенденции развития научных разработок. Они связаны с изучением общих и частных проблем иммунологии, имеющих большой общетеоретический и практический интерес при решении вопросов эволюции, адаптации и управления состоянием здоровья и устойчивости гидробионтов к паразитам (в широком смысле слова) в колеблющихся условиях среды при воспроизводстве их в условиях аква- и марикультуры.

THE BASIC RESULTS AND DIRECTIONS OF IMMUNOLOGICHESKY RESEARCHES ON HYDROBIONTS  
V.R. Mikryakov

The basic results and directions in the field of immunology hydrobionts are stated.

# ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ГИДРОБИОНТОВ ПРИ ТОКСИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

И.И. Руднева, В.Г. Шайда

*Институт биологии южных морей НАН Украины, Севастополь, Украина  
svg-41@mail.ru*

Метаболизм организма зависит от множества экзогенных (температура, соленость, содержание кислорода в среде, давление, обеспеченность кормом) и эндогенных факторов (размер, скорость роста, возраст, стадия развития, физиологическое состояние и биохимический состав). Помимо этого, обменные процессы гидробионтов могут существенно изменяться под влиянием неблагоприятных факторов, в том числе антропогенного происхождения. Для исследования обмена веществ животных применяются различные физиологические и биохимические методы, в частности респирометрия, анализ состава и соотношения различных компонентов, активность ферментов, прямая калориметрия и множество других (Сапера et al., 1997; Рага & Yufere, 2001). Микрокалориметрия является наиболее эффективной для измерения общего метаболизма организма в приближенном состоянии, в чем заключается ее существенное преимущество перед остальными методами исследования обменных процессов.

Загрязнение среды обитания существенно изменяет физиологический и биохимический статус организма, приводит к нарушению метаболических процессов и повреждению важнейших биологических молекул и клеточных структур. При этом для оценки токсических эффектов применяются различные тесты - исследование функций дыхания, движения, осморегуляции, частота пульса, а также анализ биомаркеров. При определении острых токсических эффектов с использованием высоких доз ядовитых компонентов основным показателем служит уровень смертности (или выживаемости) тест-организмов, что практически не дает никакой существенной информации о механизмах развития токсикоза и тем самым не может служить информативным и чувствительным биоиндикатором. Физиологические и биохимические параметры важны как биомаркеры ранних откликов на действие неблагоприятных факторов, они реагируют на низкие концентрации токсикантов и служат предвестниками развития стрессовой реакции организма.

В настоящее время существует множество биомаркеров, как специфических, чувствительных к наличию в среде определенных токсикантов, так и неспецифических, отклики которых свидетельствуют о развитии патологических состояний, вызванных действием различных неблагоприятных факторов. Одним из таких параметров является теплопродукция, позволяющая проанализировать энергетические траты организма в нормальном состоянии и при токсических воздействиях (Handy & Depledge, 1999). Совершенно очевидно, что в стрессовой ситуации происходит нарушение метаболических процессов, однако исследователи, занимающиеся анализом откликов организма на действие неблагоприятных факторов, подчас получают противоречивые данные об изменении обмена веществ. В связи с этим анализ уровня метаболизма гидробионтов, подвергнутых действию различных токсических агентов, представляет интерес как в теоретическом плане, способствуя выявлению механизмов адаптации к неблагоприятным условиям существования, так и в практическом, позволяя установить новые биомаркеры и биоиндикаторы для адекватной оценки состояния организма и среды его обитания.

Анализ теплопродукции ранних онтогенетических стадий рыб и беспозвоночных, подвергнутых действию различных химических загрязнителей, свидетельствует о разных откликах, наблюдаемых у тест-объектов в ходе токсикологических исследований (Табл. 1,2).

Таблица 1.

Ответные реакции рыб на действие различных токсикантов

Виды	Токсиканты	Уровень метаболизма	Источник
Икра лосося <i>Salmo salar</i>	Пентахлорфенол (ПХФ)	Увеличение теплопродукции при низких концентрациях токсиканта (0.992 $\mu\text{моль}\cdot\text{л}^{-1}$ ) и снижение при более высоких дозах	Maenpaa et al., 2004
Молодь лосося <i>Salmo salar</i>	Бисфенол А	Увеличение теплопродукции	Penttinen et al., 2005
Молодь лосося <i>Salmo salar</i>	Пентахлорфенол (ПХФ)	Увеличение теплопродукции, высокая корреляция между накоплением ПХФ и показателями теплового потока	Penttinen & Kukkonen, 2006
Икра и личинки черноморского бычка-кругляка <i>Neogobius melanostomus</i>	Полихлорированные бифенилы (ПХБ)	Снижение теплопродукции	Собственные данные
Личинки атерины <i>Atherina hepsetus</i>	ПХБ	Снижение теплопродукции	Собственные данные
Личинки атерины <i>Atherina tochon pontica</i>	Пестициды купроксат и цифоз	Снижение теплопродукции	Собственные данные
Личинки <i>Atherina hepsetus</i>	Комплексное загрязнение среды обитания	Снижение теплопродукции	Собственные данные

Из приведенных в таблице данных можно видеть неодинаковые, различающиеся по знаку, реакции ранних онтогенетических стадий рыб на действие разных по химической природе загрязнителей. Такая же ситуация характерна и для беспозвоночных (Табл.2).

Приведенные данные свидетельствуют о трех типах реакции гидробионтов на действие токсикантов: 1. повышение обмена веществ, 2. снижение обмена веществ, 3. отсутствие изменений. Каждый тип откликов может иметь свое объяснение.

Таблица 2.

Ответные реакции водных беспозвоночных на действие различных токсикантов

Виды	Токсиканты	Уровень метаболизма	Источник
Личинки хирономид <i>Chironomus riparius</i> ,	2,4,5-трихлорфенол (2,4,5-ТХФ)	Увеличение теплопродукции в 2 раза	Penttinen et al., 1996
Олигохета <i>Lumbriculus variengatus</i> ,	То же	Нет изменений	Penttinen et al., 1996
Двустворчатые моллюски <i>Sphaerium comeum</i>	То же	Снижение теплопродукции	Penttinen et al., 1996
Олигохета <i>L. variengatus</i>	2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ), 2,4,5-ТХФ	Увеличение теплопродукции, высокая корреляция с концентрацией токсиканта в среде	Penttinen & Kukkonen, 1998
Науплии артемии <i>Artemia sp.</i>	ПХБ, пестициды купроксат и цифоз	Снижение теплопродукции	Собственные данные

Отклик 1 – повышение уровня метаболизма. Разные токсиканты действуют на организм различным образом, по специфическим механизмам. В частности, хлорорганические соединения способны разобщать реакции окислительного фосфорилирования в митохондриях, нарушать регуляцию процессов образования и утилизации энергии. Помимо этого, гормоны щитовидной железы являются чувствительными мишенями для эстрогенов, распространенных в среде, и их попадание в организм способно существенным образом нарушить эндокринный статус и модифицировать энергетический обмен (Penttinen et al., 2005). В то же время нельзя исключать возможность адаптивной реакции, обусловленной повышением уровня метаболизма и дополнительного производства энергии, необходимой для обеспечения процессов детоксикации и связанным с ними



синтезом соответствующих компонентов (цитохрома P-450, антиоксидантных ферментов, металлопротеинов и т.д.).

*Отклик 2* – снижение метаболизма. Известно, что неблагоприятные воздействия приводят к уменьшению двигательной и ферментативной активности, сокращению пульса и дыхания у животных (Маенраа et al., 2009). Способность снижать уровень метаболизма является важнейшим механизмом адаптации организма для обеспечения выживаемости в стрессовых ситуациях. Это проявляется в изменениях поведенческих реакций, физиологических и биохимических процессах, происходящих в клетке, что в конечном итоге направлено на экономию энергетических ресурсов и особенно отчетливо проявляется у простейших организмов и на культурах клеток (Richards, 2010).

*Отклик 3* – отсутствие изменений метаболизма при действии неблагоприятных факторов может свидетельствовать об устойчивости вида к стрессовым воздействиям или их недостаточной концентрации для проявления того или иного эффекта. Возможен и «суммарный эффект», когда в результате компенсации двух первых проявлений стрессовой реакции видимые изменения метаболизма не могут быть определены.

Таким образом, изменения метаболизма и характеризующей их теплопродукции организма при неблагоприятных воздействиях зависят от:

- стадии развития гидробионтов;
- видовых особенностей гидробионтов и их адаптационных возможностей;
- концентрации токсиканта и динамики его накопления и выведения из организма гидробионтов;
- химической природы токсиканта и специфических механизмов его действия на гидробионтов;
- фазы измерения теплопродукции.

Многие факторы среды обитания, включая биотические, абиотические и антропогенные, могут модифицировать обменные процессы гидробионтов, и метод микрокалориметрии позволяет понять эти изменения и объяснить механизмы их проявлений, что важно для понимания адаптаций организмов к стрессовым ситуациям, для выявления физиологических и биохимических биомаркеров для оценки состояния водных животных и среды их обитания.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Canepa E., Frascetti S, Geraci S., Licciano M., Manganelli M., Albertyelli G., Riadi G. Microcalorimetry of some invertebrates: preliminary characterization of their metabolic activity during different developmental stages. *Biol. Mar. Mediterr.* 1997. V.4. P. 626-628.
2. Handy R.D. & Depledge M.H. Physiological responses: their measurements and use as environmental biomarkers in ecotoxicology. *Ecotoxicology.* 1999. V. 8. P. 329-349.
3. Maenraa K.A., Penttinen O-P., Kukkonen J.V.K. Pentachlorophenol (PCP) bioaccumulation and effect on heat production on salmon eggs at different stages of development. *Aquatic Toxicology.* 2004. V. 68 (1). P. 75-85.
4. Maenraa K.A., Leppanen M.T., Kukkonen J.V.K. Sublethal toxicity and biotransformation of pyren in *Lumbriculus variegates (Oligochaeta)*. *Science of the Total Environment.* 2009. V. 407. P. 2666-2672.
5. Parra G., Yufera M. Comparative energetics during early development of two marine fish species. *Solea senegalensis (Kaup) and Sparus aurata (L.)*. *J. Exp. Biol.* 2001. V. 204. P. 2175-2183.
6. Penttinen O.P., Kukkonen J., Pellinen J. Preliminary study to compare residues and sublethal energetic responses in benthic invertebrates exposed to sediment-bound 2,4,5-trichlorophenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 1996. V. 15. P.160-166.

7. Penttinen O.P., Kukkonen J.V.K. Chemical stress and metabolic rate in aquatic invertebrates: threshold, dose-response and mode of toxic action. *Environ. Toxicol. Chem.* 1998. V. 17. P. 883-890.
8. Penttinen O.P., Honkanen J.O., Sorsa K., Kukkonen J.V.K. Can aquatic pollutants cause specific endocrinological and metabolic responses in salmon (*Salmo salar m. Sebago*) embryos? A direct calorimetry study. *Verhandlungen International Vereinigung Limnology.* 2005. V. 29. P. 945-948.
9. Penttinen O.P. & Kukkonen J.V.K.. Body residues as dose for sublethal responses in alevins of landlocked salmon (*Salmo salar m. Sebago*): a direct calorimetry study. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 2006. V. 25. (4). P. 1088-1093.
10. Richards J.G. Metabolic rate suppression as a mechanism for surviving environmental challenge in fish. In: *Progress in Molecular and Subcellular Biology.* 2010. V. 49. P. 113-135.

## **PECULIARITIES OF THE METABOLIC RATE OF AQUATIC ORGANISMS UNDER TOXIC IMPACT**

**I.I. Rudneva, V.G. Shaida**

Heat production of different species varies as a consequences of both exogenous and endogenous factors. The goal of the present work was to study the changes in heat production in embryos and hatching larvae of some marine fish and invertebrates species. The heat production of the animals was measured with a multichannel heat conduction type microcalorimeter (The Thermometric 2277 Thermal Activity Monitor, TAM, LKB, Sweden). The results demonstrated the changes of heat production levels of fish embryos associated with the damage of the processes of energy generation and utilization. Heat output of aquatic organisms is very sensitive parameter for determination of water toxicity and thus it could be applied as biomarker to the evaluation of water quality and has taken an effective role in solving many environmental problems such as the interactions between environmental factors and fish development, toxic effects and fish protection. Sensitive endpoints should be used in risk assessment because already low environmental concentrations of toxicants may cause damage of the organisms especially early developmental stages of fish. The responses of early developmental stages depending on their ecological status on complex of abiotic and anthropogenic factors are discussed.

## ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОЙ ЗАРАЖЕННОСТИ НА МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЧЕРНОМОРСКОГО МЕРЛАНГА

Е.Н. Скуратовская\*, В.М. Юрахно, А.В. Завьялов, Е.А. Шеметова

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАНУ, Севастополь,  
Украина, \*skuratovskaya2007@rambler.ru

В современных исследованиях особое внимание уделяется изучению взаимоотношений паразит-хозяин с целью выяснения механизмов существования одного организма за счет ресурсов другого в течение длительного времени. Описано множество способов приспособления паразитов и хозяев к совместному сосуществованию. Изменения, происходящие в организме обоих партнеров, могут проявляться на разных уровнях биологической организации, включая молекулярный (Руднева и др., 2004; Микряков, Силкина, 2006; Скуратовская, Завьялов, 2008). Многие работы посвящены изучению влияния зараженности на состояние иммунной и антиоксидантной систем млекопитающих и человека, так как паразиты играют важную роль в развитии различных патологических процессов. Однако сведения, касающиеся рыб, в литературе ограничены. Поэтому изучение влияния паразитов на организм рыб представляется необходимым для понимания механизмов ответных реакций хозяев, направленных на поддержание функционирования зараженных органов и организма в целом. Это особенно важно для рыболовства и аквакультуры, так как инвазия вызывает опасные заболевания, является причиной массовой гибели рыб, снижает производство рыбной продукции (Dautremepuits et al., 2003; Martinez-Alvarez et al., 2005; Руднева и др., 2010).

В большинстве случаев паразиты в организме хозяев представлены несколькими видами, относящимися зачастую к разным систематическим группам, что необходимо учитывать при проведении исследований. Среди паразитов, вызывающих массовые инвазии промысловых видов рыб, особое место занимают миксоспоридии и нематоды, нередко совместно паразитирующие в организме хозяина.

Одним из многочисленных хозяев этих паразитов является черноморский мерланг (пикша) *Merlangius merlangus euxinus* (Nordmann). Мерланг – представитель тресковых, играющий важную роль в питании хищных рыб, дельфинов, а также в передаче паразитов по цепи питания (Световидов, 1964).

На основании вышеизложенного цель настоящей работы заключалась в изучении комплексного влияния зараженности миксоспоридиями *Myxidium gadi*, *Ceratomyxa merlangi* и нематодами *Hysterothylacium aduncum* на морфофизиологические и биохимические показатели печени черноморского мерланга.

Объектами исследований служили самки мерланга. Рыб вылавливали в Стрелецкой бухте г. Севастополя в зимний период 2009 г. и подвергали полному биологическому анализу.

Паразитологический анализ осуществляли по общепринятой методике путем неполного паразитологического вскрытия рыб на предмет обнаружения в их желчных пузырях миксоспоридий, а в кишечниках и полости тела – нематод (Быховская-Павловская, 1985).

Рыб разделили на три группы в зависимости от степени зараженности. В первую (I), контрольную, группу включили свободных от миксоспоридий и свободно зараженных (с низкими значениями интенсивности инвазии) рыб, в мазках из

жёлчных пузырей которых были единицы либо десятки спор и плазмодиев миксоспоридий, а в полости тела и кишечниках I – 2 нематоды. Вторую (II) группу составили особи со средними значениями инвазии, в мазках из жёлчных пузырей которых были сотни спор и плазмодиев миксоспоридий, а в полости тела и кишечниках от 3 до 9 нематод. В третью (III) группу вошли сильно зараженные рыбы, в мазках из жёлчи которых насчитывали тысячи спор и (или) большое количество плазмодиев, а также от 10 до 12 нематод в полости тела и кишечниках.

Рассчитывали следующие морфофизиологические показатели: индекс печени (ИП), индекс селезенки (ИС) и упитанность (Упит). В печени рыб определяли активность пяти антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), пероксидазы (ПЕР), глутатионредуктазы (ГР) и глутатион-S-трансферазы (ГТ) методами, описанными ранее (Руднева и др., 2008). Затем проводили сравнительный анализ исследованных параметров у рыб из трех групп. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента (Лакин, 1990).

Результаты исследований позволили установить определенные отличия морфофизиологических и биохимических параметров мерланга с разной степенью зараженности.

Обнаружено достоверное снижение ИС и увеличение ИП у рыб со средними и максимальными значениями интенсивности инвазии по сравнению с контрольными, что свидетельствует о негативном воздействии паразитов на функциональное состояние организма. В то же время зараженность не оказала влияния на упитанность рыб (табл. 1).

Таблица 1.

Морфофизиологические показатели мерланга с разной степенью зараженности

зараженности

№ группы	Кол-во рыб	ИП	ИС	Упит
I группа	16	41,07±2,50	0,11±0,005	0,77±0,01
II группа	15	50,86±3,45*	0,09±0,005*	0,75±0,01
III группа	25	50,45±3,23*	0,09±0,005*	0,76±0,01

Примечание: \* - различия достоверны по сравнению со значениями рыб из I группы ( $p \leq 0,05$ )

Селезенка рыб является иммунокомпетентным и кроветворным органом, участвует в обеспечении механизмов срочной адаптации, выбрасывая в кровоток «депонированные» эритроциты (Кондратьева и др., 2001; Солдатов, 2005). Снижение ИС у рыб из II и III групп, вероятно, вызвано повышенным поступлением крови из селезенки в кровеносное русло и функциональным истощением органа в результате воспалительного процесса, вызванного присутствием паразитов, и удаления их метаболитов (рис. 1).

Разнообразные функции печени обуславливают лабильность массы и варьирование индекса этого органа. Увеличение ИП у рыб со средним и высоким уровнем инвазии может свидетельствовать о гипертрофии органа за счет перерождения ткани и усиления функции детоксикации метаболитов паразитов, а также продуктов перекисного и свободнорадикального окисления.

Выявлены отличия параметров антиоксидантной ферментной системы печени рыб из разных групп. Общая тенденция установлена для КАТ, СОД и ГТ: активность каталазы и СОД снижена у рыб из II группы, ГТ у особей из II и III групп по сравнению с контролем ( $p \leq 0,05$ ). Обратная зависимость обнаружена для

пероксидазы. Активность фермента у рыб со средней степенью зараженности (II группа) в 3 раза превысила соответствующие показатели особей из других групп ( $p \leq 0,05$ ). Активность ГР не имела достоверных отличий (табл. 2).

Таблица 2.

Активность антиоксидантных ферментов в печени мерланга с разной степенью зараженности

№ группы	Кол-во рыб	КАТ, мг $H_2O_2$ /мг белка/мин	СОД, усл. ед./мг белка/мин	ПЕР, опт. ед./мг белка/мин	ГР, нмоль НАДФН мг белка/мин	ГТ, нмоль конъюг./мг белка/мин
I группа	16	0,17±0,06	118,09±20,48	0,07±0,04**	6,91±1,90	34,21±6,64
II группа	15	0,03±0,01*	73,61±10,52*	0,22±0,07	9,96±4,72	6,26±3,46*
III группа	25	0,09±0,04	106,44±29,98	0,05±0,02**	7,36±2,82	13,08±4,48*

Примечание:

\* - различия достоверны по сравнению со значениями рыб из I группы,

\*\* - то же по сравнению со значениями рыб из II группы ( $p \leq 0,05$ )

Снижение активности ключевых антиоксидантных ферментов СОД, КАТ и ГТ в печени рыб со средней и высокой степенью зараженности, вероятно, обусловлено ингибирующим действием активных форм кислорода, образующихся в макрофагах хозяина, а также высоким содержанием метаболитов паразитов, вызывающих окислительный стресс и представляющих большую опасность для здоровья рыб. В то же время незначительное повышение активности данных ферментов в печени рыб из III группы по сравнению с показателями особей II группы может являться адаптивным ответом хозяина, направленным на поддержание функционирования организма в условиях высокой степени инвазии.

Повышение активности ПЕР в печени рыб из II группы на фоне низкой активности СОД, КАТ и ГТ может свидетельствовать о компенсаторном эффекте работы антиоксидантной системы при действии неблагоприятных факторов, что было установлено нами ранее (Скуратовская, Руднева, 2008). Однако снижение активности пероксидазы в печени рыб из III группы свидетельствует об ингибировании фермента в присутствии большого количества паразитов.

Таким образом, результаты исследований показали, что паразитарная инвазия оказывает влияние на функциональный статус мерланга, проявляющийся в изменении морфофизиологических и биохимических показателей. Характер этих изменений зависит от степени зараженности хозяина. Изученные показатели могут служить биомаркерами для оценки действия на рыб неблагоприятных факторов, включающих паразитарную инвазию.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Быховская-Павловская И. Е. Паразиты рыб. Руководство по изучению. – Л.: Наука, 1985.-123 с.
2. Гаевская А.В. Анникардные нематоды и заболевания, вызываемые ими у животных и человека. – Севастополь: ЭКОСИ. – Гидрофизика, 2005. – 223 с.
3. Лакин Р.Ф. Биометрия. М: Высшая школа, 1990. - 352 с.
4. Кондратьева И. А. и др. Современные представления об иммунной системе рыб // Вестник Московского университета. Биология. – 2001. – № 4. – С. 11 – 20.
5. Микряков В. Р., Силкина Н. И. Характеристика показателей перекисного окисления липидов в системе паразит – хозяин на примере *Ligula intestinalis* L. (Cestoda, Hsuedophyllidea) – *Abramis brama* L. // Биология внутренних вод. – 2006. - № 4. – С. 63 – 66.
6. Руднева И.И., Завьялов А.В., Скуратовская Е.Н. Роль молекулярных систем защитных реакций рыб, зараженных паразитами // Риб. госп-во України. – 2010. № 1. С. 2-6.

7. Руднева И.И., Скуратовская Е.Н., Омельченко С.О., Залевская И.Н. Применение биомаркеров крови рыб для экотоксикологической оценки прибрежных морских акваторий // Экологическая химия. – 2008. – Т. 17, вып. 2. – С. 77 – 84.
8. Руднева И.И., Солонюченко А. И., Мельникова Е. Б. Влияние паразитарной инвазии на активность некоторых антиоксидантных ферментов печени и мышц хозяина черноморского калкана *Psetta maxima taenotica* // Паразитология. – 2004. – 38, вып. 6. – С. 557 – 561.
9. Световидов А.Н. Рыбы Черного моря. – Л.: Наука, 1964. – 552 с.
10. Скуратовская Е.Н., Завьялов А.В. Влияние паразитарной инвазии на состояние антиоксидантной ферментной системы крови мерланга (*Merlangius merlangus euximus*) // Ветеринарная медицина. – 2008. – № 90. – С. 394 – 398.
11. Скуратовская Е.Н., Руднева И.И. Видовые особенности антиоксидантной ферментной системы крови некоторых видов черноморских рыб // Риб. госп-во України. – 2008. – № 1. – С. 15 – 18.
12. Солдатов А.А. Особенности организации и функционирования системы красной крови рыб // Журн. эвол. биохим. и физиол. – 2005. – Т. 41, № 3. – С. 217 – 223.
13. Dautremepuits C., Betoulle S., Vernet G. Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio*) infected by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda) // Fish. Shellfish Immunol. - 2003. – V. 15. – P. 467 - 471.
14. Martinez-Alvarez R.M., Morales A.E., Sanz A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors // Reviews in Fish Biology and fisheries. – 2005. – V. 15. – P. 75 - 88.

#### INFLUENCE OF THE COMPLEX INFESTATION ON MORPHOPHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF BLACK SEA WHITING

E.N. Skuratovskaya, V.M. Yurachno, A.V. Zav'yalov, E.A. Shemetova

The complex influence of the myxosporicans *Myxidium gadi*, *Ceratomyxa merlangi* and nematode *Hysterothylacium aduncum* infestation on the morphophysiological and biochemical parameters of Black Sea whiting was studied. The increase of liver index, the decrease of spleen index and the change of liver antioxidant enzyme activities in infected fishes was detected. The possibility of studied parameters application as biomarkers of the parasitic invasion effect in fish is discussed.

# УСТОЙЧИВОСТЬ К АЭРОМОНОЗУ ГЕНОТИПИЧЕСКИ РАЗЛИЧНЫХ ПО ЛОКУСУ ПЕРОКСИДАЗЫ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ ГРУПП СЕГОЛЕТОК ЛЕЩА

Ю.В. Слынько, В.Р. Микряков\*, Т.Б. Лапирова  
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
mvr@ibiv.yaroslavl.ru

Пероксидаза (По) – один из широко распространенных внутриклеточных ферментных белков в животном и растительном мире. Биологическое значение По определяется ее функциональной ролью в реализации окислительно-восстановительных процессов, а также участием в формировании защитных механизмов от инфекций (Рубин и др. 1975; Маянский, Маянский, 1983). По входит в состав комплекса каталитически активных белков клетки, которые вызывают разрушение и детоксикацию паразитических организмов и их метаболитов, оказывающих деструктивное влияние на организм хозяина (Рубин и др. 1975). По – мономер, у леща на электрофорграммах представлен несколькими изоформами, кодирующимися одним генетическим полиморфным локусом (Диксон, Уэбб, 1985; Слынько, 1985, 1992; Кирпичников, 1987; Андреева, 1988).

Несмотря на давнюю (с середины прошлого века) и глубокую изученность особенностей структуры и функции фермента, вопрос о его селективной роли в иммунитете рыб к патогенным организмам, в частности к аэромонадной инфекции, следует считать не разработанным.

Цель данного исследования состоит в анализе связей генотипов и аллелей локусов пероксидазы сердечной мышцы с устойчивостью к аэромоназу при искусственном заражении сеголеток леща.

Путем направленных индивидуальных скрещиваний (Табл. 1) было создано шесть групп потомств, различающихся по генотипам пероксидазы сердечной мышцы: две полностью гомозиготных по одному из генотипов и три гетерогенных группы, в которых были представлены как гомо-, так и гетерозиготы по соответствующим аллелям.

Таблица 1.

Схема получения генотипов.

Генотипы родителей		Генотипы потомства					
♀	♂	По <sup>79/79</sup>	По <sup>100/100</sup>	По <sup>116/116</sup>	По <sup>100/116</sup>	По <sup>79/100</sup>	По <sup>79/116</sup>
По <sup>79/79</sup>	По <sup>79/79</sup>	+	-	-	-	-	-
По <sup>100/100</sup>	По <sup>100/100</sup>	-	+	-	-	-	-
По <sup>79/116</sup>	По <sup>116/116</sup>	-	-	+	-	-	+
По <sup>79/100</sup>	По <sup>79/79</sup>	+	-	-	-	+	-
По <sup>79/79</sup>	По <sup>79/116</sup>	+	-	-	-	-	+
По <sup>100/100</sup>	По <sup>100/116</sup>	-	+	-	+	-	-

Гомогенная группа по гомозиготе По<sup>116/116</sup> не была создана вследствие крайней редкости встречаемости в природе гомозигот По<sup>116/116</sup>: из 104 половозрелых особей, использовавшихся в скрещиваниях, среди которых проводили отбор производителей для создания групп, обнаружена только одна особь с данным генотипом, самец. Она была использована для создания группы с 75%

концентрацией в потомстве данного аллеля – гетерогенная группа  $По^{116/116} + По^{79/116}$ .  
 Полученную икру после скрещивания инкубировали в единых условиях водообеспечения и температурного режима. Личинки были пересажены в пруды с единой системой водообмена, где подращивали их до стадии сеголеток. Впоследствии сеголетки были подвергнуты электрофоретическому контролю на чистоту генетического состава группы и вводились в эксперименты по искусственному заражению.

Условия проведения экспериментов по заражению изложены в таблице 2. Для заражения использовали суточную культуру *Aeromonas hydrophila* штамм Е-3, выращенную на рыбопептонном агаре. Заражение проводили внутрибрюшинным инъецированием в 2-х дозах: 100 млн бак./особь и 200 млн бакт./особь. Длительность эксперимента по каждой группе устанавливалась в 14 суток, поскольку к этому времени заканчивалось прохождение всех фаз заболевания. Ранее проведенные предварительные эксперименты позволили установить, что для стандартных сеголеток леща дозой LC100 является 250 млн бак./особь, следовательно, мы вправе рассматривать дозу 200 млн бак./особь как сублетальную, а дозу 100 млн бак./особь – близкую к LC50.

Сопоставляя гибель инфицированных сеголеток в различных генотипических группах при двух дозах заражения (Табл. 3), мы видим, что при дозе 200 млн/особь гибель высока и практически по всем группам превышает 50%. Совершенно иную картину мы наблюдали при дозе 100 млн/особь. Уровень смертности существенно колеблется в различных группах сеголеток. Максимальная гибель отмечена в группе с наибольшей концентрацией аллели  $По^{116}$  (группа № 4). Эта группа, согласно данным по высокой смертности в контроле, может быть охарактеризована как изначально наименее жизнеспособная.

Соответственно сеголетки с генотипом  $По^{116/116}$  и, вероятно,  $По^{79/116}$ , видимо, наименее устойчивы к аэромоназу. Наиболее устойчивыми к малой дозе заражения оказались особи из группы № 2. Наблюдаются различия и между гомозиготными группами № 5 и № 6. Смертность в группе № 6 ( $По^{100/100}$ ) ниже, чем в группе № 5 ( $По^{79/79}$ ). Учитывая, что данные две гомогенные по аллелям  $По^{79}$  и  $По^{100}$  группы фактически являются повторностями гетерогенных групп № 1 и № 2 (по каждой из которых в дополнение к основным аллелям имеются примеси аллели  $По^{116}$  в виде гетерозигот  $По^{79/116}$  и  $По^{100/116}$  соответственно), необходимо подчеркнуть сходимость результатов в уровне смертности по этим группам. Однако эта тенденция четко выражена только при дозе 100 млн/особь.

Таблица 2.

Условия проведения экспериментов по искусственному заражению сеголеток леща.

№ генотипической группы	Генотипический состав	Количество особей в эксперименте	Количество особей в контроле
1	$По^{79/79}, По^{79/116}$	50	50
2	$По^{100/100}, По^{100/116}$	50	50
3	$По^{79/100}$	50	50
4	$По^{116/116}, По^{79/116}$	50	50
5	$По^{79/79}$	50	50
6	$По^{100/100}$	50	50



По-видимому, при данной дозе происходит некоторая нивелировка межallelных различий при сохранении основных межгенотипических различий. В целом можно, в особенности для дозы 100 млн/особь, констатировать селективный характер основных аллелей локуса пероксидазы сердечной мышцы леца в отношении устойчивости к аэромонозу.

Таким образом, аллель  $По^{100}$  локуса пероксидазы сердечной мышцы можно квалифицировать как маркер устойчивости к аэромонозу леца. Оценивая в целом генотипическую устойчивость сеголеток леца к краснухе, следует прежде всего отметить отсутствие явления, подобного моногенному гетерозису, описанного для ряда видов рыб, в том числе в отношении к заболеваниям (Кирпичников, 1987). Основная гетерозигота  $По^{79/100}$  характеризуется практически 50% смертностью при обеих дозах заражения. Хотя в отличие от других генотипов пероксидазы карпии элиминация гетерозигот обладает определенной стабильностью, обуславливаемой независимостью от дозы. К наименее устойчивым генотипам, кроме  $По^{116/116}$ , по-видимому, с уверенностью можно отнести и генотип  $По^{79/79}$ .

Таблица 3.  
Смертность (%) в генотипически различных сеголеток леца при искусственном заражении

№ п/п	Группа	Исходное количество рыб в каждой дозе и в контроле	Смертность (%)		
			Доза, млн/особь		
			100	200	Контроль
1	$По^{79/79}$ , $По^{79/116}$	50	68	100	6
2	$По^{100/100}$ , $По^{100/116}$	50	4	100	0
3	$По^{79/100}$	50	58	50	0
4	$По^{116/116}$ , $По^{79/116}$	50	74	62	29
5	$По^{79/79}$	50	36	100	0
6	$По^{100/100}$	50	28	60	0

Наблюдаемая для генотипов № 1, 2 и 5 по сравнению с таковыми № 3, 4 и 6 дозовая зависимость уровня смертности и тотальный характер элиминации особей при дозе 200 млн/особь объясняется, с одной стороны, сублетальностью данной дозы, а с другой – скоростью развития и протекания заболевания, а также разной чувствительностью исследуемых генотипов к *A. hydrophila*. Если в случае дозы 100 млн/особь мы, вероятно, имеем более близкий к естественной клинической картине ход заболевания, то, вводя дозу 200 млн/особь, мы формируем нестандартную ситуацию пиковой нагрузки с начала заражения, исключая тем самым возможность мобилизации иммунных способностей организма.

По нашему мнению, интересен не столько факт селективного преимущества аллеля  $По^{100}$ ; сколько селективного преимущества гомозиготы  $По^{100/100}$ . Это имеет важное значение не только в теоретическом смысле при обсуждении проблемы моногенного гетерозиса, но и чисто практически, поскольку, согласуясь концепцией большей адаптивной значимости генотипов по сравнению с аллелями (de Benedictis, 1978; Богданов, 1983), позволяет использовать в качестве маркера устойчивости и не аллель, а сам генотип, и, соответственно, более направленно вести селекционные работы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988, 128 с.
2. Богданов Л.В. Генетические основы селекции рыб на устойчивость к заболеваниям. – В кн.: Биологические основы рыболовства: генетика и селекция. Л.; Наука, 1983, сс. 70-83.
3. Герасимов Ю.В., Слынько Ю.В. Воздействие хищника на структуру элементарной популяции жертвы в присутствии субстратов различной сложности. – Тез. докл. Всесоюз. совещ. «Экология популяций», ч. 2. М., 1988, сс. 136-138.
4. Илясов Ю.И. Генетические основы селекции рыб на устойчивость к заболеваниям. – В кн.: Биологические основы рыболовства: генетика и селекция. Л.: Наука, 1983, сс. 120-129.
5. Илясов Ю.И., Шарт Л.А. Полиморфные генетические системы сыворотки крови и их связь с селекционными признаками у карпа. – В кн.: Биохимическая генетика рыб. Л.: Ин-т цитологии АН СССР, 1979, сс. 152-156.
6. Илясов Ю.И., Кирпичников В.С., Шарт Л.А. Методы и эффективность селекции карпа на повышенную устойчивость к краснухе. – В кн.: Биологические основы рыболовства: генетика и селекция. Л.: Наука, 1983, сс. 130-146.
7. Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. Л.: Наука, 1987, 520 с.
8. Маятский А.Н., Маятский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука, 1983, 254 с.
9. Никольский Г.В. Частная ихтиология. М.: Высшая школа, 1971, 470 с.
10. Рубин Б.А., Арциховская Е.В., Аксенова В.А. Биохимия и физиология иммунгетта растений. М.: Высшая школа. 1975, 320 с.
11. Слынько Ю.В. Полиморфизм пероксидазы леща (*Abramis brama* L.). – Тез. докл. III Всесоюз. совещ. по генетике, селекции и гибридизации рыб. М., 1986, сс. 212-213.
12. Слынько Ю.В., Герасимов Ю.В., Гречанов И.Г. Морфо-этологическое описание и частота встречаемости фенотипов среди различных по генотипам лососей пероксидазы сердечной мышцы групп семголец леща. – Экология, 1989, в печ.
13. Справочник по болезням рыб. М.: Колос, 1978, 351 с.
14. Suzumoto B.K., Schreck C.B., McJntyre J.D. Relative resistances of three transferrin genotypes of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and their hematological responses to bacterial kidney disease. – J. Fish Res. Board. Can., 1977, v. 34, № 1, pp. 1-8.
15. Winter G.W., Schreck C.B., McJntyre J.D. Resistance of different stocks and transferring genotypes of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* and steelhead trout *Salmo gairdneri* to bacterial kidney disease. – Fish. Bull., 1980, v. 77, № 4, pp. 795-802.

### THE RESISTANCE TO AEROMONOSIS INFECTION OF GENOTYPICALLY DIFFERENT ON THE PEROXIDASE LOCUS OF THE CARDIAC MUSCLE OF BREEM FINGERLINGS GROUPS

Y.V. Slynko, V.R. Mikryakov, T.B. Lapirova

An experimental investigation of the selective significance of 6 different genotypes and alleles of the locus of peroxidase bream fingerlings in relation to the sustainability of fish to the causative agent of bacterial infection aeromonosis was conducted. Based on the analysis of percentage of surviving and dead individuals after exposure to virulent culture of *Aeromonas hydrophila* strain E-3, significant differences of various genotypes in the degree of resistance to *Aeromonas* infection were identified.

# ИЗМЕНЧИВОСТЬ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНОВ И СОДЕРЖАНИЯ ЛИЗОЦИМА ПРИ СОЗРЕВАНИИ ГОНАД У ЩУКИ *ESOX LUCIUS* L. РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

М.Ф. Субботкин, Т.А. Субботкина

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия  
smif@ibiw.yaroslavl.ru

Система неспецифического иммунитета является первой и важнейшей линией защиты организма животных от неблагоприятного воздействия окружающей среды. Ее механизмы сформировались в процессе эволюции, закодированы в геноме и обуславливают адаптивную норму реакции отдельной особи или вида в целом (Йегер, 1990). Одним из элементов естественной резистентности рыб является лизоцим – фермент из группы гликозидаз, обладающий бактериолитическим эффектом. Эксперименты на объектах аквакультуры показали, что на активность лизоцима влияют иммуностимуляторы различной природы (Tassakka, Sakai, 2002; Jian, Wu, 2003; Khoshbavar-Rostami, et al., 2007; Wu, et al., 2007), состав кормов, в том числе количество липидов (Lin, Shiau, 2003), олигосахаридов (Staykov, et al., 2007), витаминов (Waagbo, et al., 1993; Yang, et al., 2008), стрессовые раздражители (Fevolden, et al., 2002).

Содержание лизоцима у рыб неодинаково в разных органах и подвержено внутригодовым колебаниям (Лукьяненко, 1994; Субботкина, Субботкин, 2002, 2003, 2004, 2007). Вызывает особый интерес изучение показателей естественного иммунитета у рыб в зависимости от их физиологического состояния и сезонных изменений. Предварительные материалы, полученные нами ранее на осетровых рыбах, указывают на различный уровень активности лизоцима в тканях иммунокомпетентных органов у особей одного вида на разных стадиях зрелости гонад (Субботкина, Субботкин, 2002; неопубликованные данные). Продолжая работу в этом направлении, мы поставили задачу более детального исследования лизоцима в тканях некоторых внутренних органов в процессе созревания гонад и сопоставления их с изменениями этих органов.

Известно, что подготовка к размножению сопровождается глубокими преобразованиями организма. Это в первую очередь относится к гонадам, которые многократно увеличиваются в массе и размерах, оказывая влияние на остальные внутренние органы. Другие органы также не остаются стабильными. При накоплении жиров в организме в период, предшествующий интенсивному развитию генеративной ткани, может увеличиваться размер печени, которая является очень лабильным органом, зависимым от состава пищи и действия токсикантов (Wille et al., 2002; Nga et al., 2003; Dwyer et al., 2003). Иммунокомпетентные органы, такие как почки и селезенка, непосредственно менее связаны с развитием половых продуктов, но могут изменяться под воздействием иммуностимуляторов (Feng et al., 2009).

Щуку *Esox lucius* L. отлавливали в прибрежье Рыбинского водохранилища, в районе пос. Борок, и в р. Сутка. На открытой воде отлов осуществлялся закидным неводом, в подледный период – ставными сетями. У рыб определяли общую массу тела без внутренних органов, массу органов: печени, почек и селезенки, а также пол и стадии зрелости половых продуктов. За период 2005–2008 г.г. в разные сезоны года собрано и обработано более 130 рыб с гонадами разных стадий зрелости. Индексы органов рассчитывали по формуле:

Индекс органа (ГепСИ; ИП; ИС), % = 100 x Масса органа (г)/Масса тела без внутренних органов (г); где:  
 ГепСИ – гепатосоматический индекс;  
 ИП – индекс почек;  
 ИС – индекс селезенки.  
 Содержания лизоцима в органах определяли методом «диффузии в агар», в соответствии с вариантом, описанным нами ранее (Субботкина, Субботкин, 2003).  
 Изменчивость индексов внутренних органов щуки в зависимости от зрелости гонад представлена на рис. 1.

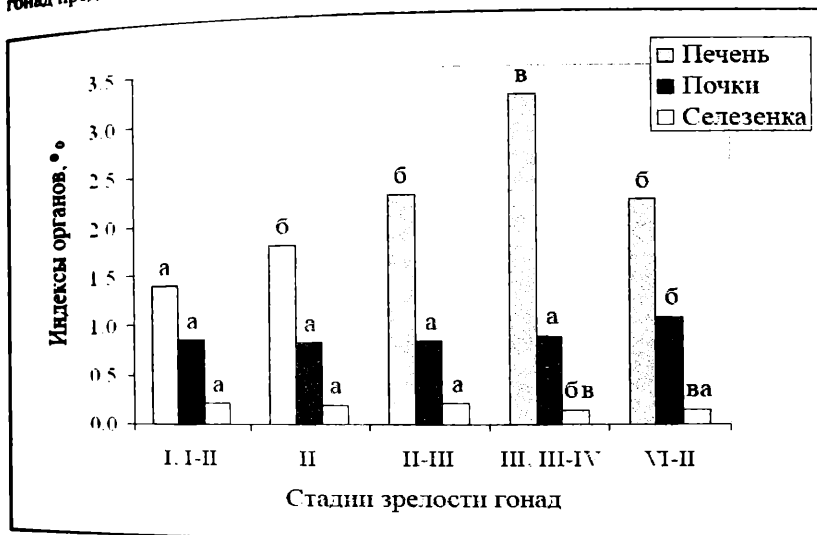


Рисунок 1. Изменчивость индексов внутренних органов щуки в зависимости от зрелости гонад.

Значения индексов органов, обозначенные разными буквами, достоверно различаются ( $P < 0,05$ ).

Впервые созревающие рыбы, с гонадами на ранних стадиях развития, характеризуются минимальными значениями ГепСИ. Следующие группы, с более развитой генеративной тканью, объединяют как впервые, так и повторно созревающих рыб. Они демонстрируют увеличение ГепСИ, максимальные значения которого отмечены у рыб с гонадами III, III-IV стадий зрелости. В этот период ГепСИ более чем вдвое превышает показатель молодых незрелых особей. У отнерестившихся рыб на стадии VI-II наблюдается значительное снижение индекса печени. Такая направленность изменения печени, вероятно, может продолжаться и далее, о чем свидетельствуют значения ГепСИ у рыб с гонадами II стадии зрелости. Почки щуки не изменяются в процессе развития гонад со стадии I, I-II до III, III-IV стадий. Однако после нереста происходит увеличение ИП. Селезенка оказалась также подвержена вариабельности на разных стадиях созревания половых продуктов. При этом наблюдается обратная зависимость ИС и зрелости гонад, при которой наименьшие значения показателя отмечены на III, III-IV стадиях. В период

после нереста у щуки с гонадами на стадии VI-II по-прежнему сохраняется пониженный ИС.

Анализ содержания лизоцима на разных стадиях половой зрелости рыб отражает вариабельность этого показателя (рис. 2). Для печени щуки, в сравнении с другими органами, характерна низкая активность лизоцима. Самые высокие значения показателя в этом органе - в среднем на уровне 5 мкг/г ткани - отмечены у молодых и незрелых рыб. С развитием гонад наблюдается понижение уровня лизоцима, который возвращается на промежуточные значения после нереста.

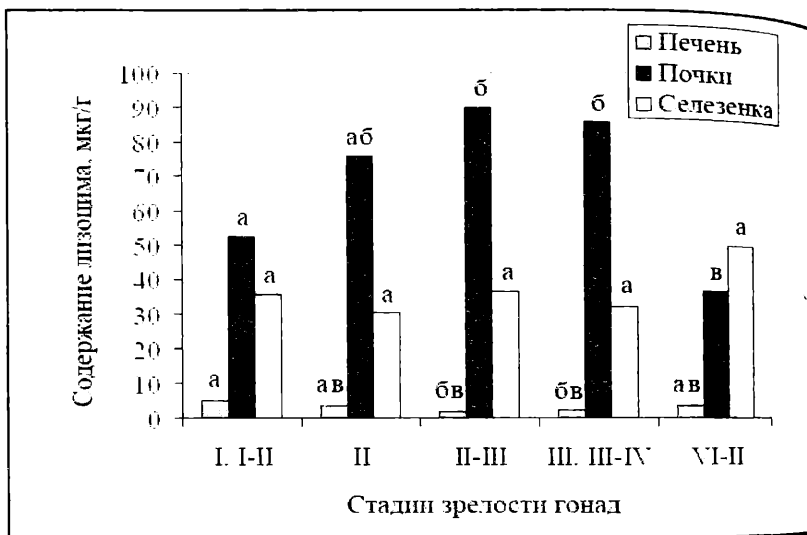


Рисунок 2. Изменчивость количества лизоцима в органах щуки в зависимости от зрелости гонад.

Значения показателя, обозначенные разными буквами, достоверно различаются ( $P < 0,05$ ).

В почках щуки, как правило, отмечаются наиболее высокие концентрации фермента, достигающие 170 мкг/г у отдельных особей. Развитие гонад сопровождается существенным увеличением количества лизоцима в этом органе, достигая максимума уже на стадии II-III. На более поздних стадиях уровень лизоцима в почках сохраняется также высоким. Однако в почках отнерестившихся рыб концентрация фермента снизилась до минимальных значений зарегистрированных в этом органе щуки.

Содержание лизоцима в селезенке варьировало в относительно узком диапазоне - в среднем 30-37 мкг/г, и только у отнерестившихся рыб оно увеличилось до 50 мкг/г ткани, оставаясь в границах нормы реакции.

Полученные результаты отражают различную роль исследованных иммунокомпетентных органов щуки в формировании неспецифического иммунитета в зависимости от физиологического состояния организма. Активность процессов направленных на обеспечение защитных реакций, которые происходят в этих органах, оказываются под влиянием функционирования воспроизводительной системы.

Печень как орган, синтезирующий и аккумулирующий основную массу биохимических компонентов, необходимых для развития гонад, в процессе полового созревания рыб увеличивается в массе вдвое. В то же время количество лизоцима, обнаруженное в печени, на всех стадиях зрелости гонад оказывается наименьшим в сравнении с другими органами и проявляет закономерность снижения при увеличении ГепСИ.

Иная картина наблюдается в почках. При неизменном состоянии этого органа в ходе полового созревания количество лизоцима существенно, более чем в 1,5 раза, возрастает у рыб с развивающимися гонадами. После нереста, когда активизируются процессы регенерации тканей генеративной системы, и, вероятно, усиливается выделение метаболитов, функциональная нагрузка на почки увеличивается. В этот период ИП возрастает, а содержание лизоцима падает до физиологического минимума в органе, что может свидетельствовать о сокращении синтеза этого гуморального компонента иммунной защиты.

Селезенка демонстрирует обратную связь с развитием гонад, а именно, минимальные значения ИС соответствуют наиболее зрелым и отнерестившимся рыбам. Независимо от этого, содержание лизоцима в селезенке сохраняется на одном, близком уровне, но может незначительно увеличиваться после нереста.

Проведенными исследованиями установлено, что при созревании гонад у щуки изменяется состояние иммунокомпетентных органов: их масса и содержание лизоцима. Щука относится к ежегодно нерестящимся рыбам. Обнаруженная вариабельность внутренних органов и показателя неспецифической защиты наблюдается в рамках одного годового цикла. Физиологическое состояние рыб, обусловленное созреванием гонад, может быть разным не только в различные сезоны, но и существенно отличаться в течение одного сезона. Активность лизоцима в иммунокомпетентных органах также оказывается под влиянием этого процесса. Полученные результаты указывают на необходимость учета степени зрелости гонад при изучении сезонной динамики иммунологических показателей.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Йегер Л. Клиническая иммунология и аллергология. - Перевод с нем. М.: Медицина, Т. 1.-1990.-527 с.
2. Лукьяненко В.И. Иммунобиология рыб. Врожденный иммунитет.- М.: Агропромиздат.-1989.-271 с.
3. Субботкина Т.А., Субботкин М.Ф. Лизоцим четырех видов осетровых рыб сем. Acipenseridae р. Волги // Биология внутр. вод.-2002.-№ 2-С.88-93.
4. Субботкина Т.А., Субботкин М.Ф. Особенности активности лизоцима некоторых видов костистых рыб р. Волги // Биология внутр. вод.-2003.-№ 1-С.102-107.
5. Субботкина Т.А., Субботкин М.Ф. Уровень лизоцима у некоторых видов хищных рыб // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расширен. материалы Всесоюз. научно-практической конф.-М.,-2004.-С.163-171.
6. Субботкина Т.А., Субботкин М.Ф. Уровень лизоцима у рыб различного систематического положения // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Материалы 2 науч. конф.-Петрозаводск,-2007.-С.149-150.
7. Dwyer K. S., Parish C. C., Brown J. A. Lipid composition of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*) in relation to dietary lipid intake // Marine Biology.-2003.-№ 143-P.659-667.-DOI 10.1007/s00227-003-1101-0
8. Feng L., He W., Jiang J. et al. Effects of dietary pyridoxine on disease resistance, immune responses and intestinal microflora in juvenile Jian carp // Aquaculture Nutrition.-2009.-doi: 10.1111/j.1365-2095.2009.00660.x
9. Fevolden S-E., Roed K., Fjalestad K. Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth // Aquaculture.-2002.-№ 205-P.61-75.

10. Jian J., Wu Z. Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson) // *Aquaculture*.-2003.-№ 218-P.1-9.
11. Khoshbavar-Rostami H.A., Soltani M., Hassan H. M. Immune responses of great sturgeon *Huso huso* to *Aeromonas hydrophila* bacterin // *Journal of Fish Biology*.-2007.-№70-P.1931. 1938.-doi:10.1111/j.1095-8649.2007.01468.x
12. Lin Y, Shiao S. Dietary lipid requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, and effects on immune responses // *Aquaculture*.-2003.-№ 225-P.243–250
13. Nga W., Lim Ph., Boey P. Dietary lipid and palm oil source affects growth, fatty acid composition and muscle  $\alpha$ -tocopherol concentration of African catfish, *Clarias gariepinus* // *Aquaculture*.-2003.-№ 215-P.229–243
14. Staykov Y., Spring P., Denev S., Sweetman J. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Aquacult. Int.*.-2007.-№ 15-P.153–161.-DOI 10.1007/s10499-007-9096-z
15. Tassakka A., Sakai M. CpG oligodeoxynucleotides enhance the non-specific immune responses on carp, *Cyprinus carpio* // *Aquaculture*.-2002.-№ 209-P.1 –10.
16. Waagbo R., Glette J., Raa-Nilsen E., Sandnes K. Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *Fish Physiol. Biochem.*-1993.-Vol.12; № 1. P.61-73.
17. Wille K., McLean E., Goddard J.S., Byatt J.C. Dietary lipid level and growth hormone alter growth and body conformation of blue tilapia, *Oreochromis aureus* // *Aquaculture*.-2002.-№ 209.-P.219–232
18. Wu G., Yuan C., Shen M., Tang J., et al. Immunological and biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio*) after Qompsell feed ingredients for long-term administration // *Aquaculture Research*.-2007.-№ 38.-P.246-255
19. Q., Zhou X., Jiang J., Liu Yang Y. Effect of dietary vitamin A deficiency on growth performance, feed utilization and immune responses of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) // *Aquaculture Research*.-2008.-№ 39.-P.902-906.

**VARIABILITY OF IMMUNOCOMPETENT ORGANS  
AND THE CONTENT OF LYSOZYME DURING GONADS DEVELOPMENT  
IN PIKE *ESOX LUCIUS* L. FROM RYBINSK RESERVOIR**

**M. F. Subbotkin, T. A. Subbotkina**

Studies have shown variability in the liver, kidney and spleen, as well as the content of lysozyme in pike during sex maturation. The minimal hepatosomatic indices are observed in fish, which mature for the first time. The hepatosomatic indices double in fish with gonads at stage III, III-IV. After spawning, the liver index decreases to an intermediate level. The greatest amount of lysozyme in the liver is recorded for immature fish, and after spawning. The level of lysozyme in this organ decreases when the gonads are developing.

Kidney indices do not change during maturation of the gonads, but increase after spawning. In contrast, the content of lysozyme in the kidney increases almost twice for fish with developing gonads, as compared to the juvenile. After spawning, the lysozyme level in the kidneys drops to the lowest values.

Spleen indexes are the greatest in juvenile, and are reduced to a minimal value when the gonads begin to develop. After spawning, the spleen index increases to the level of that in immature fish. The content of lysozyme in the spleen varies slightly in fish with gonads at different stages of maturity. The highest values of the enzyme are observed in spent fish, but these differences are statistically insignificant.

Physiological state of fish, especially their sexual maturity, should be considered when the seasonal variability of the immunological parameters is studied.

# ОСОБЕННОСТИ ИХТИПАТОЛОГИЧЕСКИХ РАБОТ В УСЛОВИЯХ ДЕКОРАТИВНОГО РЫБОВОДСТВА

О.Н. Юнчис

Санкт - Петербургский Океанариум

За последнее десятилетие в России получила широкое распространение новая отрасль рыбоводства "Декоративное рыбоводство", включающая в себя декоративное озерное, прудовое, бассейновое, аквариумное рыбоводство и морское аквариумное рыбоводство. Появились публичные аквариумы, Океанариумы и постоянно растёт интерес к созданию новых аквариумов, прудов, бассейнов и Океанариумов. Для потребностей декоративного рыбоводства существует целая индустрия, поставляющая технику, корма, водные растения, рыб и гидробионтов. Основным поставщиком живых пресноводных и морских объектов является Сингапур и страны Юго-Восточного региона.

Разведение и выращивание рыб для декоративного рыбоводства в странах поставщика производится на воде из естественных водоёмов и, естественно, происходит занос паразитов местных рыб. Полноценный ихтиопатологический контроль, как правило, отсутствует. Перед отправкой рыб чаще всего не подвергаются карантинизации и профилактическим обработкам. Для профилактики чаще всего используется медный купорос и тетрациклин, такого рода обработка приводит к ухудшению состояния печени и снижению иммунного статуса за счет авитаминозов, вызванных длительным воздействием антибиотика. В процессе перевозки рыб при больших плотностях посадки происходит перезаражение рыб.

С завозимыми декоративными рыбами в наши рыбохозяйственные водоёмы попадают "новые" для нашего региона возбудители заболеваний, способные нанести экономический ущерб. Наиболее известными возбудителями являются иридовирус карпа кои, вызвавший панзоотию карпов и нанёсший огромный экономический ущерб мировому карповодству, ихтиофтириус шлотфельда, вызывающий значительную гибель и в настоящее время, тетрахимена корлиси, псевдофилометридоз, ряд новых амёбных заболеваний и т.д.

Основная особенность эпизоотологии поступающих рыб состоит в том, что рыбы всегда заражены, поскольку контактируют с местными рыбами и с водой, поступающей из естественных водоёмов. При работе с завозимыми декоративными рыбами следует учитывать и тот факт, что во время длительной транспортировки рыбы испытывают стресс, после которого часто возникают вторичные заболевания.

Морские завозимые рыбы в 90% случаях отлавливаются в морях и всегда являются носителями криптокариона, широко специфичных моногеней и ряда других паразитов.

Новая отрасль рыбоводства требует применения новых методов профилактики, диагностики и лечения.

Опыт показал, что пассивная профилактика болезней рыб неэффективна потому, что не выявляет наличия хронических болезней, таких как туберкулез, ихтиофтириус, ихтиофтириус шлотфельда, амёбных заболеваний и т.д.

В виду высокой стоимости рыб не всегда можно проводить исследование методом диагностического вскрытия.

Для декоративного рыбоводства мы рекомендуем применять "активную карантинизацию", основа которой состоит в применении профилактического лечения, применения иммуномодуляторов и антистрессовых препаратов.

При работе с декоративными рыбами и другими гидробионтами следует помнить, что гидробиоценоз (планктон, бентос, и т.д.) декоративного пруда, садка, бассейна, аквариума будет в сотни раз беднее гидробиоценоза естественного



водоёма, основного фактора, недопускающего возникновения заболевания рыб в естественных водоёмах.

Из этой закономерности можно сделать вывод о том, что в условиях обеднения гидробиоценоза или отсутствия такового в условиях декоративного рыбоводства может произойти накопление непатогенных или условно патогенных паразитов, что вызовет снижение резистентности и возникновение заболевания или возникновения бактериального заболевания за счет вторичной условно патогенной микрофлоры.

Основной вывод из перечисленных фактов: в условиях декоративного рыбоводства на рыбах не должно быть паразитов, и они должны быть ликвидированы в условиях карантина.

Основные мероприятия при приёме рыб должны быть направлены на ликвидацию последствий стресса, повышения физиологического статуса против паразитов широко специфичных с прямым циклом развития и вторичной условно патогенной микрофлоры.

Для определения скрытого бактерионосительства мы применяем витальные красители, например, нильский голубой, не вызывающий при применении токсического воздействия, окрашивающего покровы рыб при наличии бактерионосительства, вызывающего их нарушение. Как правило, в транспортных ёмкостях рН, содержание нитритов и аммония сильно повышаются. Воздействие этих веществ вызывает снижение содержания гемоглобина, перевода его в метгемоглобин.

В этих случаях применяются бактерицидные препараты, одновременно способствующие образованию гемоглобина (такие как метиленовый синий).

Одновременно вводятся с пищей препараты повышающие иммунитет, такие как милдронат, ридостин, витамин С, левомизол. В том случае, если рыбы не питаются, иммуномодуляторы применяются в виде ванн или инъекций, кроме витамина С.

На второй день после поступления пресноводных рыб обрабатывают препаратами против наружных простейших и моногней препаратом ФМС (формалин, малахит, синька) – и пересаживают в новую ёмкость.

Через день, повысив температуру воды до 26-27°C, проводят профилактическую обработку против неоихтиофтириуса малахитовым зеленым, 5 раз через день.

У морских рыб проводят опресненную ванну (1-2 части морской воды на 8-9 частей пресной с добавкой ФМС 1 мл на 5 литров воды 10-15 минут). При этом происходит уничтожение наружных простейших, моногней, паразитически ракообразных, кроме криптокариона и оодиниума.

У морских рыб проводится обработка против оодиниума и криптокариона препаратом пойнттокс 5 раз через день. В дальнейшем проводится обработка против эндопаразитических жгутиконосцев (гексамит) и представителей других паразитов трихополом или фуросолидоном.

В заключение рыб обрабатывают против плоских и круглых червей пирантеллом и празиквантеллом.

В случае возникновения бактериального заболевания применяют антибиотики циклоспоринового ряда совместно с антибактериальными препаратами действующими на анаэробную микрофлору, нитрофурановые препараты и иммуномодуляторы.

Ихтиопатолог, практикующий на декоративных рыбах, должен знать паразитофауну конкретного вида рыб, т.к. применение последующих обработок зависит от паразитофауны конкретного вида рыб.

# IMMUNE RESPONSE OF COMMON CARP AGAINST CYPRINID HERPESVIRUS 3 (CyHV-3)

I. Irmazarow<sup>1</sup>, M. Adamek<sup>2</sup>, K. Rakus<sup>1</sup>, D. Steinhagen<sup>2</sup>, T. Aoki<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Polish Academy of Sciences, Institute of Ichthyobiology & Aquaculture in Gofysz, Chybie, Poland;*

<sup>2</sup>*Fish Diseases Research Unit, Centre for Infection Medicine, University of Veterinary Medicine in Hannover, Hannover, Germany;*

<sup>3</sup>*Laboratory of Genome Science, Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan.  
ilgiz.irmazarow@fish.edu.pl*

Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3), also known as koi herpesvirus (KHV) has been recognised as the agent which is associated with diseases and mass mortalities in populations of common carp (Hedrick et al. 2000, Neukirch et al. 1999). In affected fish, hyperplasia and necrosis of the respiratory epithelium of the gill, focal necrosis of hepatocytes in the liver and of glomerular cells in the kidney were observed (Hedrick et al. 2000, Perelberg et al. 2003). The virus has spread over many countries in Europe (Haenen et al., 2004), Israel (Perelberg 2003), USA (Hedrick et al. 2000) China, Taiwan (Tu et al. 2004) and Japan (Sano et al. 2004). Cyprinid herpesvirus-3 has a major impact on production and trade of ornamental (koi) and on farmed populations of common carp in many areas in Europe, Israel, and the Far East.

Currently there is not much information available about carp immune response to CyHV-3. Experimental infections gave indications of different resistance to CyHV-3 among different common carp strains and crosses (Shapira et al. 2005, Adamek et al. unpublished results). The results of these studies suggest that resistance to this virus might be affected by genetic factors. This conclusion was also supported by Rakus et al. (2007) who linked higher susceptibility of carp to the CyHV-3 with the one particular haplotype of Major Histocompatibility (MH) class II B genes (Cyca-DAB1/Cyca-DAB2).

Strain variation in mortality under CyHV-3 infection suggest that there is a relation between resistance of certain individuals to herpesviral infection and genetically conditioned structural and/or functional differences in immune system.

We analysed genetic differences in immune response of common carp against CyHV-3 by mean of microarray and real-time PCR techniques. Four genetic groups of carp: 2 different purebred lines (Polish K and Polish R3) and 2 diallelic crosses between them (KxR3 and R3xK) were experimentally infected with CyHV-3 virus by immersion. The Polish carp lines R3 (more resistant) and K (more susceptible) presented a 20% difference in survival rate and significant difference in virus loads measured at day 3 post infection (p.i.). That clearly indicate the existence of a family effect on the resistance of carp against CyHV-3.

Microarray analysis was performed on head kidney samples of fish from lines K and R3 (n=4 fish/line/sampling point) sampled at day 0 and day 3 after CyHV-3 infection. Microarray hybridization was performed using Agilent common carp gasket slides containing 10,823 DNA sequences.

Changes in gene expression between day 0 and day 3 after CyHV-3 infection was analyzed in each line separately. At day 3 p.i., 581 genes in line K (330 up-regulated, 251 down-regulated) and 107 genes in line R3 (77 up-regulated, 30 down-regulated), were at least 2-fold differentially expressed compared to day 0. Genes which were at least 4-fold

differentially expressed in both lines were selected as potential markers of an infection of common carp by CyHV-3.

Microarray analysis revealed no significant differences in gene expression between line K and R3 at day 0. At day 3 p.i. there were 76 genes that were differentially expressed between the two lines (at least 4-fold). This group of genes include several immune related genes encode for proteins from the chemokines superfamily, the type I interferon (IFN)-stimulated genes, ubiquitin-like proteins, and a suppressor of the cytokine signaling (SOCS) family.

The kinetics of gene expression of T cell markers TCR $\alpha$ 1, TCR $\alpha$ 2, CD8 $\alpha$ 1, CD8 $\alpha$ 2, CD8 $\beta$ 1 and CD8 $\beta$ 2 were determined in spleen samples derived from fish from the lines K and R3 (n=4 fish/line/sampling point). Samples were collected over a period of 5 (line R3) to 14 (line K) days after CyHV-3 infection and analyzed by RT-qPCR. The kinetics of expression of T cell markers was higher in TCR genes and the CD8 $\beta$ 1 gene in the first phase of infection for line R3 but not for line K. This might indicate for higher activation of CD8+ T cells in R3 line which could resulted in a better immune response against CyHV-3 virus and finally could contribute to a higher survival rate.

Gene expression of the cytokines IL-1 $\beta$ 1, IL-10, IL-12p35, IL-6M17 and IFN $\alpha\beta$  analysed by mean of RT-PCR revealed higher activation of immune response in more resistant R3 line. The CyHV-3 did not induce IFN $\alpha\beta$  gene expression in both lines. An up regulation of this gene was not seen in the microarray analysis and it was not observed by RT-qPCR analysis of cytokine genes. Nevertheless our microarray analysis revealed up-regulation of genes activated by the type I IFN (STAT1, GIG1-like protein, both up-regulated >4 times) which indicate the role of IFNs during CyHV-3 infection. No significant differences in expression of the IFN $\alpha\beta$  gene was detected in lines K and R3 during infection with CyHV-3

Challenge with CyHV-3 significantly up-regulated the IL-1 $\beta$ 1 gene expression in line R3 being about 5 time higher than in carp from line K. Challenge with CyHV-3 also induced significant up-regulation of IL-10, IL-12p35 and IL-6M17 in line R3 at day 5 p.i. Expression of IL-12p35 was down-regulated during the CyHV-3 infection in line K at day 3 and 5 p.i.

Our study revealed also that differences in resistance to CyHV-3 between the analyzed two carp lines can be correlated with differentially expressed immune-related genes. The kinetics of the expression of immune-related genes indicates for higher activation of cytotoxic T cells in the more resistant R3 line. Altogether, our results add to the understanding of common carp immune response against CyHV-3 virus and provide knowledge for developing future vaccines.

## REFERENCES

1. Haenen OLM, Way K, Bergmann SM, Ariel E (2004) The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. Bull Eur Assoc Fish Pathol 24: 293-307.
2. Hedrick PR, Gilad O, Yun S, Marty GD, Nordhausen RW, Kebus MJ, Bercovier H, Eldor A (2000) A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. J Aquat Anim Health 12: 44-57.
3. Neukirch M, Kunz, U (2001) Isolation and preliminary characterisation of several viruses from koi (*Cyprinus carpio*) suffering gill necrosis and mortality. Bull Eur Assoc Fish Pathol 21: 125-135.
4. Perelberg A, Smimov M, Hutoran M, Diamant A, Bejerano Y, Kotler M (2003) Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. Israel J Aquacult – Bamidgah 55: 5-12.

5. Rakus KL, Wiegertjes GF, Adamek M, Siwicki AK, Lepa A, Imazarow I (2009). **Resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to Cyprinid herpesvirus-3 is influenced by major histocompatibility (MH) class II B gene polymorphism.** *Fish Shellfish Immunol* 26: 737-743.
6. Sano M, Ito T, Kurita J, Yanai T, Watanabe N, Miwa S, Iida T (2004) First detection of **koi herpesvirus** in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol* 39: 165-167.
7. Shapira Y, Magen Y, Zak T, Kotler M, Hulata G, Levavi-Sivan B (2005) **Differential resistance to koi herpes virus (KHV)/ carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) among common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains and crossbreeds.** *Aquaculture* 245: 1-11.
8. Tu C, Wenig M-C, Shiau J-R, Lin S-Y (2004) **Detection of koi herpesvirus in koi *Cyprinus carpio* in Taiwan.** *Fish Pathol* 39: 109-110.

# A SHORT HISTORY OF FISH IMMUNOLOGY AND VACCINATION

Willem B. van Muiswinkel

*Wageningen University, Cell Biology & Immunology Group,  
Department of Animal Sciences, P.O. Box 338, 6700 AH Wageningen,  
The Netherlands, w.muiswinkel1@kpnplanet.nl*

This review describes the people that were involved in studying fish immunology and vaccination between 1850 and 2000. In the early period (till 1950) most scientists were looking at fish from the angle of comparative anatomy, embryology, physiology, taxonomy or fish diseases. The publications from this period are usually describing the morphology of blood cells and hemopoietic or lymphoid organs (Maurer, Nusbaum, Jordan). The first publications on functional aspects, such as specific immune responses of fish, were found in the period 1935-1938 (Nybelin). Even during World War-II important studies were published in relation to fish vaccination (e.g. Duff, Schäperclaus). However, the immune mechanisms behind protective immunization were largely unknown in those days. It took till after 1950 before these mechanisms could be elucidated at the cellular and molecular level (Goncharov, Mikryakov, Evelyn, Paterson, Amend).

In the period after 1950 the first researchers can be found devoting their whole career to fish immunology (e.a. Sigel, Clem, Ellis, Fletcher, Secombes). In first instance the focus of most studies was on humoral (Ig, B-cell) responses. Thorough studies on specific cellular (T-cell) responses became available in the 1950's and 1960's (e.g. Hildemann). In the 1970's and later an overwhelming amount of data on regulation (e.g. cell cooperation, interleukins) and cell surface receptors (e.g. T-cell receptor; MHC) was published in regular papers and specialized books (Luk'yanenko 1971, Anderson 1974, Stolen et al. 1990-1994, Iwama and Nakanishi 1996) or presented during international meetings (ISDCI-Wageningen 1981, Developments in Biological Standardization 1981-present, European Society of Fish Immunology 1991 - present). Fish turned out to be vertebrates like all others with a sophisticated immune system showing specificity and memory. Moreover, the basic data on immunization could be applied in vaccination of fish in aquaculture. There is no doubt, that Fish Immunology has become a flourishing science by the end of the 20<sup>th</sup> century.

## REFERENCES

1. Anderson DP. Fish Immunology. Diseases of Fishes, Vol. 4 (Snieszko SF, Axelrod HR, Eds.) T.F.H. Publications Neptune City 1974; p. 1-240 (This book contains a nice chapter about the history of fish immunology).
2. Evelyn TPT. A Historical Review of Fish Vaccinology. In: Fish Vaccinology (Lillehaug GR, Midtlyng PJ, Brown F, Eds.), Dev. Biol. Stand. Basel, Karger, Vol. 90, 1997, p. 3-12.
3. Van Muiswinkel WB, A History of Fish Immunology and Vaccination I. The early days. Fish & Shellfish Immunology, Vol. 25, 2008, p. 397-408.

# СЕКЦИЯ I. АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ОБЩЕЙ И ЧАСТНОЙ ИММУНОЛОГИИ И ПАТОЛОГИИ

## ОРГАНИЗАЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ СКОРПЕНЫ *SCORPAENA PORCUS L.*

А.М. Андреева, А.Э. Дмитриева

Институт биологии внутренних вод им.И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия  
aam@ibiw.yaroslavl.ru

Иммуноглобулины относятся к суперсемейству белков с Y-образной пространственной организацией, способных связывать антигены, стимулирующие их образование. Они продуцируются В-лимфоцитами и находятся либо в свободном виде в крови и других жидкостях организма, либо в виде рецепторов на поверхностных мембранах клеток. Все Ig состоят из двух тяжелых H и двух легких L цепей, связанных S-S-связями. Структурную формулу этих белков можно представить как  $(H_2L_2)_n$ . При  $n=1$  белок является мономером, при  $n=2, 4, 5$  олигомером. Разный состав H цепей формирует пять классов иммуноглобулинов – G, A, M, D и E.

Молекулярная масса мономерных Ig у млекопитающих варьирует от 150 (IgG) до 190 (IgE) кДа, у олигомеров – от 360 (IgG) до 950 (IgM) кДа, у костистых рыб от 180-200 до 950 кДа (Mochida et al., 1994; Андреева, 2001; Hansen et al., 2005; Glove et al., 2006; Nakamura et al., 2006). MM цепей Ig у леща составили около 20 (L), 50, 65, 75, 80 (H) кДа (Андреева, 2001), у других видов встречаются H-цепи с MM около 38, 52 (Litman et al., 1971) и 76 (Glove et al., 2006) кДа. MM L-цепей варьируют у разных видов от 20 до 28,5 кДа (Glove et al., 2006).

Цель данного исследования – выявить разнообразие тяжелых цепей иммуноглобулинов из перитонеальной жидкости скорпены *Scorpaena porcus L.* по параметру MM, а также выяснить, сколько классов Ig участвует в создании этого разнообразия.

В работе использовали сыворотку крови и тканевые жидкости скорпены – мозга, белых мышц и перитонеальную. Жидкости получали при отборе пипеткой-дозатором или напигиванием полосок хроматографической бумаги 0,2x0,5 мм (Андреева и др., 2007). Для определения величин MM цепей Ig использовали 2D-SDS-электрофорез в ПААГ (Laemmli, 1970), маркеры MM – сывороточный альбумин человека, овалбумин и гемоглобин лошади (67, 45 и 16 kDa). После 2D-SDS-ПААГ проводили сравнительный анализ масс-спектров фрагментов трипсинолиза H-цепей Ig скорпены с помощью MALDI-TOF. Полученные данные использовали для определения гомологий белков и идентификации тяжелых цепей Ig. MALDI-TOF-анализ белков скорпены выполнен на базе НИИ ФХМ ФМБА, в лаборатории протеомного анализа. Масс-спектры (МС) и спектры фрагментации (МС/МС) получены на тандемном MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex П BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd). МС получены в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона и в тандемном режиме; точность измеренных моноизотопных масс в рефлекто-моду после

докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.005 %, точность измеренных масс фрагментов составляла 1 Да.

Сывороточные иммуноглобулины скорпены были выявлены в плазме крови и тканевых жидкостях организма – мозга, белых мышц и перитонеальной жидкости. В SDS-ПААГ на дорожке иммуноглобулина из перитонеальной жидкости выявлено до 10 субъединиц (Рис.1).

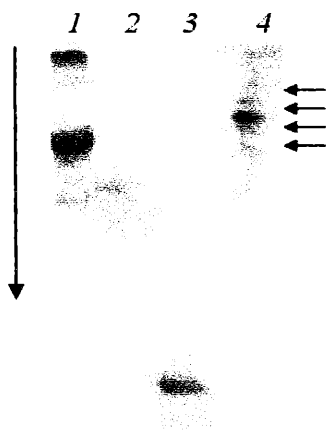


Рис.1. SDS-электрофорез H-цепей Ig из перитонеальной жидкости скорпены (4). Маркеры ММ ЧСА (1), ОА (2) и Нб (3). Вертикальная стрелка указывает направление электрофореза, маленькие горизонтальные стрелки – H-цепи с ММ около 65, 70, 80 и 90 кДа соответственно.

MALDI-TOF-анализ четырех субъединиц с ММ около 65, 70, 80 и 90 кДа выявил практически полную идентичность их масс-спектров (Рис.2).

Поиск гомологов для тяжелых цепей скорпены в базе данных NCBI среди белков всех организмов при помощи программы Mascot (опция «пептидный фингерпринт», www.matrixscience.com) выявил гомолога для субъединицы с ММ около 70 кДа. Гомологом оказалась H-цепь иммуноглобулина китайского окуня *Siniperca chuatsi* с ММ 53294 (NCBI GenBank: ACCESSION AAQ14846). В ее составе обнаружен

фрагмент NGAALTDSIQYPPVQK с ММ 1702.9 Да, присутствующий и в тяжелой цепи Ig скорпены (Рис.3).

```

1  EDTAVYYCAR AVLGVYGFYD WGKGTMTVTS SATSTGPTVF PLMQCGSGT
51  DMVTLGCLAT GFTPSSLTYA WSKNGAALTD SIQYPPVQKG DVYTGVSQIR
101 VRRQWDARE SFRCAVTHPA GNGKADFMKP KVTYVPPTTEL KVLASSGEBEQ
151 EASFSCFARD FSPKDYEIKW LKNEAEIPNK IYEIKMPLGE RQDKNGTTLY
201 SAASFLTVPA SEWTVDTKFT CEFEGKGENG ATFMNSSVTY KHTTPGNCEV
251 DVDIKITGPT LADMFLNREG TIVCQVKVNE PYVGRILWED EKGNEMAGAS
301 KTFNDEGTFS LPLEITYDEW SKGIKRYCVV EHENLIEPLK ELYERSFGGQ
351 TQRPVFMPLP PVEHTRKETV TLTCYVKDFF PQEVLVTWLV DDEEADSKYK
401 FYTTNPVESN GSYFAYGQLS LSLEQWKND VVYSCVVHHQ SLVNTTNAIV
451 RSIGHRTFEN TNLVNLNMNI PESCKAQ
    
```

gi|33340500|gb|AAQ14846.1|AF320776\_1 immunoglobulin heavy chain [*Siniperca chuatsi*]

Рис.3. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина китайского окуня *Siniperca chuatsi*.

Курсивом выделен участок, гомологичный тяжелой цепи иммуноглобулина скорпены.

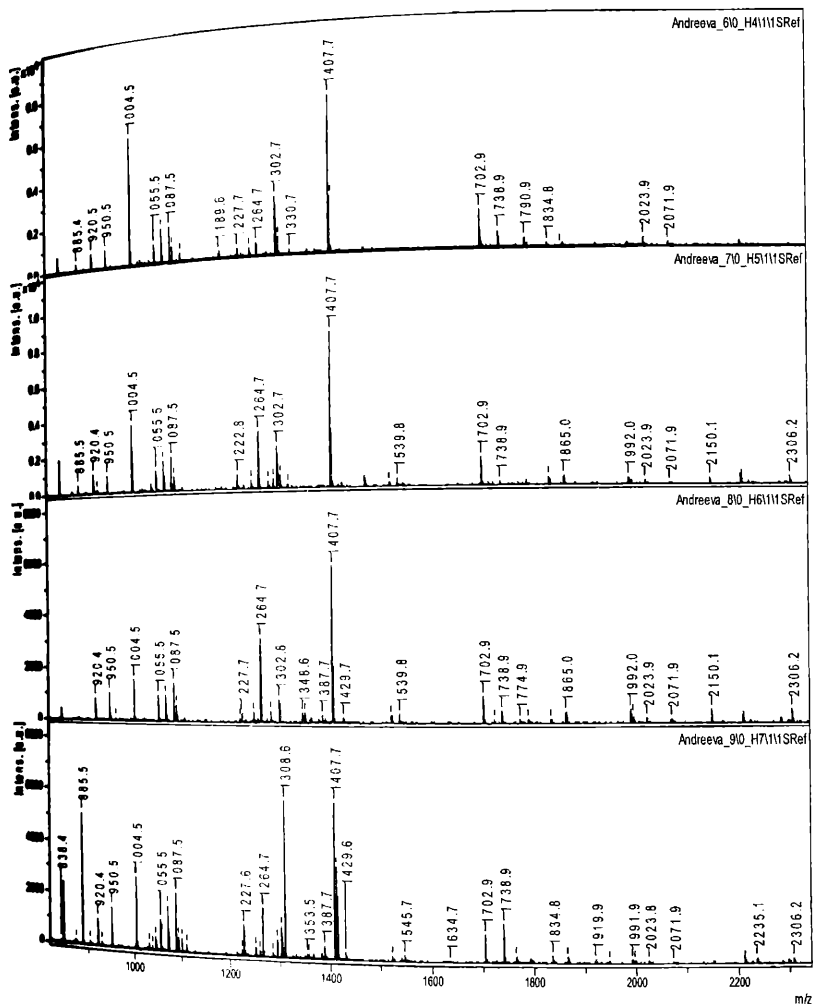


Рис. 2. Масс-спектры MS тяжелых цепей иммуноглобулина скорпены. По оси абсцисс - величины ММ фрагментов трипсинолиза Ig, по оси ординат - интенсивность сигнала.

Определенно надежными гомологами ( $p < 0.05$ ) считаются кандидатные белки, имеющие параметр достоверности  $score > 83$ . Выявленный в результате поиска кандидат - тяжелая цепь Ig китайского окуня - имел параметр достоверности  $score > 83$ , поэтому его рассматривали в качестве возможного гомолога искомого белка морского ерша.

Пример скорпены показывает, что множественность N-цепей иммуноглобулинов может формироваться за счет гомологичных вариантов одной цепи в рамках одного класса Ig.



Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам Института биологии южных морей НАН Украины Рудневой Ирине Ивановне и Шеню Валентину Григорьевичу за предоставленные образцы сыворотки крови и тканей жидкости скорпены.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 10-04-00954-а).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева А.М. Сывороточные гамма-глобулины рыб // *Вопр. ихтол.* - 2001.-Т.1 №4 - С. 550-556.
2. Андреева А.М., Чалов Ю.П., Рябцева И.П. Особенности распределения белков плазмы между специализированными компартментами внутренней среды на примере карпа *Cyprinus carpio* (L.) // *Журн. эвол. биол. и физиол.* - 2007. - Т. 43 - №6 - С. 501-504.
3. Grove S, Tryland M, Press C.M, Reital L.J. Serum immunoglobulin M in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): characterization of the molecule and its immunoreactivity // *Shellfish Immunol.* - 2006. - V.20 - №1 - P. 97-112.
4. Hansen J.D, Landis E.D, Phillips R.B. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype  $\delta$  in rainbow trout: Implication for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish // *PNAS* 2005. - V. 102 - №19 - P. 6919-6924.
5. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage // *Nature.* - 1970. - V. 4(227) - №5259 - P. 680-685.
6. Mochida K, Lou YH, Hara A, Yamauchi K. Physical biochemical properties of IgM from teleost fish // *Immunology.*-1994.-V.83-P.675-680.
7. Nakamura O, Kudo R, Aoki H, Watanabe T. IgM secretion and absorption in the maternal fetal interface of a viviparous teleost, *Neoditrema ransonneti* (Perciformes; Embiotocidae) // *Dev. Comp. Immunol.* - 2006. - V. 30 - №5 - P. 493-502.
8. Significance of heavy chain mass and antigenic relationship in immunoglobulin evolution Litman G.W, Frommel D, Chartrand S.L, Finstad L, Good R.A.// *Immunichem.* - 1971. - V. 8 - 345-348.

### HEAVY CHAIN IMMUNOGLOBULIN ORGANIZATION FROM *SCORPAENA PORCUS* L.

A.M. Andreeva, A.E. Dmitrieva

The variety of immunoglobulin heavy chains MM in diapason from 65 to 90 kDa and higher was revealed in scorpaena peritoneal fluid. MALDI-TOF-analysis of four subunits with MM approximately 65, 70, 80 and 90 kDa revealed the practically complete identity of their mass-spectrum. The search of homologues for scorpaena heavy chains in NCBI database among the proteins of all organisms with the help of the program Mascot revealed a homologue only for the subunit with MM approximately 70 kDa. The homologue was H-chain of chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* Siniperca chuatsi immunoglobulin with MM 53294 Da (NCBI GenBank: ACCESSION AAQ14846). The analysis of the amino acid composition of scorpaena Ig. An analysis of scorpaena shows that the plurality of Ig chains of the one type can be formed due to the homologous variation of one chain.

# КОМПЛЕКСНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ДВУХ ПРОМЫСЛОВЫХ ВИДОВ КАМБАЛ БЕРИНГОВА МОРЯ

Е.В. Бочкова, Т.В. Гаврюсева, Л.В. Овчаренко, Л.А. Жукова

ФГУП Камчатский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (КамчатНИРО), г. Петропавловск-Камчатский, Россия  
e\_v\_botch@mail.ru

Камбалы дальневосточных морей, отличающиеся большим видовым разнообразием, относятся к массовым и широко распространенным рыбам, что обуславливает их важное промысловое значение в экономике Дальнего Востока. Опубликовано много работ, посвященных биологии и промыслу камбал, однако до сих пор недостаточно изучен вопрос о состоянии здоровья основных популяций этих рыб.

В 2010г. провели комплексное (вирусологическое, бактериологическое, паразитологическое и гистологическое) обследование двух промысловых видов камбал Берингова моря — северной двухлинейной (*Lepidopsetta polyxustra*) и желтоперой (*Limanda aspera*). Всего обследовали 120 экз. рыб, по 60 экз. каждого вида, использовали метод случайной выборки. Пробы отбирали на рыбоперерабатывающем предприятии в п. Оссора, куда доставляли уловы камбалы из Карагинской подзоны. Затем материал транспортировали в лабораторию, где проводили его дальнейшую обработку.

Комплексным исследованиям предшествовал визуальный учет внешних и внутренних признаков патологии. На плавниках и коже 8,3% двухлинейной и 10,0% желтоперой камбал отмечали перламутрово-белые округлые образования Ø 1 – 1,5 мм (рисунок 1А). При микроскопических исследованиях в них обнаружили личинок трематод р. *Stephanostomum*, предположительно *S. baccatum*, отмечали формирование грануляционной ткани хозяина вокруг паразита в соединительной ткани дермы (рисунок 1Б).



Рисунок 1. Метациркаррии трематоды р. *Stephanostomum*:

А — на плавниках и коже рыб; Б — гистологический срез скелетной мускулатуры. Увеличение  $\times 400$ . Окраска гематоксилин-эозином.

На жабрах и кожном покрове камбал регистрировали паразитических copepod *Nectobranchia indivisa*: экстенсивность заражения этими паразитарными агентами составила 20–40%, средняя интенсивность была невысокой — 1,2–5 экз. При гистологических исследованиях в жабрах в местах прикрепления рачков

отмечали очаговый некроз и гиперплазию респираторного эпителия. Кроме того, в жабрах рыб обнаружили хламидиеподобный микроорганизм р. *Epitheliocystis* (6,7% рыб), патоген встречался в единичных экземплярах.

У 13,3% двухлинейной и 41,7% желтоперой камбал на теле обнаружены кровонезлияния разной степени интенсивности. Геморрагии локализовались в основном вдоль боковой линии и у плавников. При сильной степени выраженности они покрывали всё тело и плавники, часть проникала в мускулатуру.

В результате вирусологических исследований на пяти перевываемых клеточных линиях рыб (ЕРС, СН5Е-214, СНН-1, RTG-1 и ВF-2) вирусных патогенов, способных вызывать заболевания со сходными клиническими признаками, не обнаружили. При посеве почки на универсальные и селективные питательные среды у двухлинейной камбалы выделили 2 рода бактериальных патогенов: *Vibrio* (40% рыб, из них: 17% — *V. (Listonella) anguillarum* и 23% — *Vibrio sp.*) и *Enterobacter* (6%). Бактериальная микрофлора, выделенная от желтоперой камбалы, была представлена 3 родами: *Vibrio* (56% рыб, из них: 16% — *V. anguillarum*, 40% — *Vibrio sp.*), *Enterobacter* (9%) и *Pseudomonas* (6%). Перечисленные патогены при определенных условиях способны комплексно или специфично стать причиной бактериальной геморрагической септицемии, одним из характерных клинических признаков которой является повреждение кровеносных сосудов. Среди них в первом месте стоит *V. anguillarum*, классический возбудитель вибриоза гидробионтов. Этого патогена некоторые исследователи относят к облигатным, т.е. способным вызвать заболевание независимо от состояния организма рыбы в условиях среды (Бычкова и др., 2000, Кох et al., 1993). Однако бактерии рр. *Vibrio*, *Enterobacter* и *Pseudomonas* постоянно циркулируют в морской воде, и высокий процент их носительства у рыб не всегда подразумевает наличие заболевания. В ходе гистологических исследований у двухлинейной камбалы выявлены грамотрицательные бактерии только в просвете почечных канальцев и кровеносных сосудах печени. Отсутствие инфекционного процесса и связанных с ним патоморфологических изменений внутренних органов и тканей, очевидно, указывает именно на носительство этих факультативных патогенов у *L. polyactis*.

У желтоперой камбалы в почке регистрировали меланизацию макрофагов, локальную гиалиново-капельную дегенерацию нефроцитов, некроз почечных канальцев и протоков (в просвете — скопление эпителиальных клеток, детрит и грамотрицательные бактерии, рисунок 2 А).

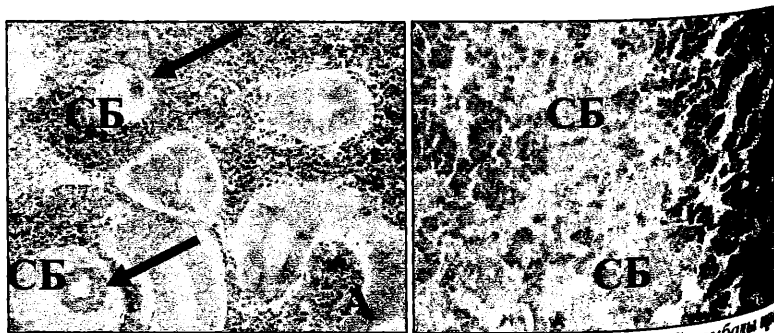


Рисунок 2. Патологические изменения в почках и печени желтоперой камбалы при бактериальной инфекции:

А — скопления бактерий (СБ) вокруг почечного клубочка (Г) и его разрушение. Б — некроз гепатоцитов и скопления бактерий (СБ) в паренхиме печени. Увеличение  $\times 400$ . Окраска гематоксилин-эозин.

Кроме того, грамотрицательные бактерии отмечали в гемопоэтической ткани печени; в паренхиме печени регистрировали некроз гепатоцитов (рисунок 2 Б); в скелетной мускулатуре рыб, где наблюдали геморрагии – гидратацию и локальную деструкцию миоцитов.

При паразитологическом обследовании двухлинейной камбалы выявили 13 видов паразитов, относящихся к пяти классам: микоспоридии — 4, трематоды — 5, нематоды — 1, скребни — 2, ракообразные — 1; у желтоперой камбалы обнаружили 10 видов паразитов: три вида — микоспоридии, четыре — трематоды, два — скребни и один — ракообразные. Видовая принадлежность паразитарных агентов во всех случаях обнаружения паразитов была невысокой и не превышала 6,7 экз., индекс обилия паразитов в популяции рыб почти во всех случаях был в пределах 1.

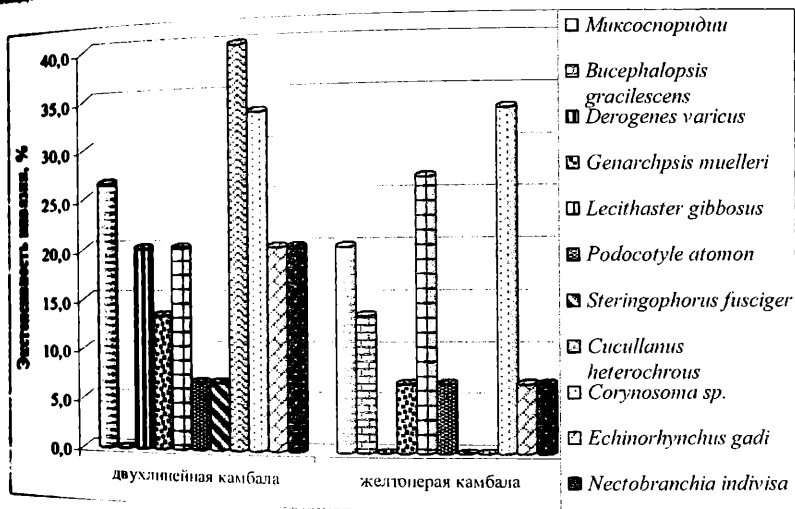


Рисунок 3. Паразитофауна двухлинейной и желтоперой камбал в 2010 г.

Обнаруженные в желчном пузыре, желчных протоках и просвете почечных канальцев камбал микоспоридии являлись представителями двух родов: *Seratomyxa* и *Myxidium*. Несмотря на то, что эти паразиты были самыми многочисленными, структурных нарушений в органах и тканях рыб они не вызывали. Еще одним массовым представителем паразитофауны камбал были личинки скребня *Corynosoma sp.* Среди скребней у морских рыб паразитируют как взрослые особи, так и их личиночные стадии, соответственно рыбы могут выступать как в роли промежуточных, так и окончательных хозяев. Личинки р. *Corynosoma* во взрослом состоянии паразитируют у морских млекопитающих и потенциально опасны для человека, поэтому перед употреблением в пищу зараженную рыбу следует подвергать термической обработке.

Патоген, который заслуживает особого внимания, был обнаружен при гистологических исследованиях внутренних органов двухлинейной камбалы у 6,7% рыб. Это представитель протозойных жгутиковых р. *Ichthyophonus*,

предположительно *I. hoferi* (Protozoa, класс Ichthyosporaea, по новым данным – Mesomycetozoea; порядок Ichthyophonida), которого длительное время относили к грибам (Mendoza, 2002). В скелетной мускулатуре, почке (рисунок 4 А) и печени (рисунок 4 Б) рыб обнаружили “покоящиеся споры” паразита размерами 50–230 мкм, вокруг которых наблюдали разрастание грануляционной ткани.

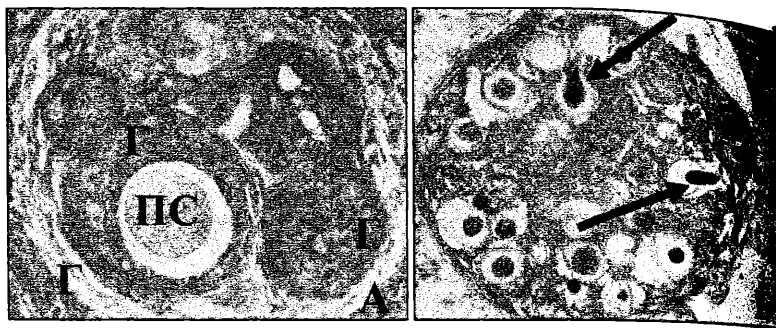


Рисунок 4. Паразит р. *Ichthyophonus*, предположительно *I. Hoferi*, во внутренних органах и тканях двухлинейной камбалы:

А — гранулема (Г) вокруг покоящихся спор (ПС) в почке (увеличение  $\times 400$ ); Б — прорастание покоящихся спор (↑) в печени. Увеличение  $\times 100$ . Окраска гематоксилин-эозин.

По мнению Ного (Noga, 1996), этот патоген относится к облигатным. По литературным данным (Bruno et al., 1999), при эпизоотии у камбал ихтиофоза зачастую приводит к летальному исходу в течение трех месяцев. По данным других исследователей (Post, 1987; Sindertmann, 1990), во время эпизоотических вспышек *I. hoferi* может оказывать влияние на численность популяций морских рыб — сельди, камбал, макрели и др., в то же время он представляет собой серьезную угрозу и наносит значительный урон культивируемым лососям в Европе и Северной Америке.

Известны случаи заражения рыб в аквакультуре при скармливании им фарш из сырого мяса инфицированных морских рыб. Так, в 2004 г. впервые на Камчатке был зафиксирован случай ихтиофоза у молоди кижуча, выращиваемой на Вилюйском лососевом рыбоводном заводе (Гаврюсева, 2007). Мальков кормили фаршем из свежей тихоокеанской сельди, зараженной патогеном. Методов лечения ихтиофоза не существует, меры борьбы в заводских условиях сводятся к профилактике.

Следует отметить, что, несмотря на сравнительно невысокие показатели зараженности, видовой состав паразитофауны камбал был довольно богатым, соответственно нельзя не принимать во внимание влияние, оказываемое паразитами на рыб-хозяев. Выше мы уже описали гистопатологические изменения органов и тканей рыб, вызванные присутствием паразитарных агентов и токсическим воздействием продуктов их метаболизма. Нарушение нормального функционирования организма могло повлечь за собой некоторое ослабление иммунной системы рыб, что в свою очередь, возможно, послужило решающим фактором для развития у желтоперой камбалы инфекционного бактериального заболевания.

В целом комплексными методами в 2010 г. у двухлинейной камбалы выявили 15 паразитарных, 3 вторичных бактериальных патогенных агента и хламидиоподобный микроорганизм, у желтоперой — 11 видов паразитов и 4 — бактерий. Обнаруженные гистопатологическими и гистохимическими методами деструктивные изменения в органах и тканях обследованных рыб в основном были вызваны паразитарными агентами и бактериальной инфекцией.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н., Можарова А.И. Микробиоценоз как индикатор экологического состояния водной среды и рыбы // Тез. докл. науч. - практ. конф. «Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре». М., 2000. С. 42-43.
2. Гаврюсева Т.В. Первый случай иктиофоза у молоди кижуча *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) в условиях аквакультуры на Камчатке // Владивосток: Биология моря. 2007. Т. 33. № 1. С. 49-53.
3. Bruno D.W., D.J. Alderman, and H.J. Schlotfeldt. What should I do? A practical guide for the marine fish farmer // The Eur. Ass. Fish Pathol. 1999. 64 p.
4. Mendoza L., J.W Taylor, and L. Ajello. The class mesomycetozoa: a heterogeneous group of microorganisms at the animal-fungal boundary // Annu. Rev. Microbiol. 2002. Vol. 56. P. 315-344.
5. Noga E.J. Fish disease: diagnosis and treatment // St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc. 1996. P. 188-191.
6. Pathobiology of marine and estuarine organisms. Ed. J. Couch, J. Fourmie // CRC Press. 1993. P. 116-119.
7. Post G. Textbook of fish health // Neptune City: T.F.H. Publ. 1987. 288 p.
8. Sindermann C. J. Principal diseases of marine fish and shellfish // USA: Academic Press. Second Edition. 1990. V. 1. 521 p.

### COMPLEX RESEARCHES OF A STATE OF HEALTH OF TWO TRADE KINDS OF FLOUNDERS OF THE BERING SEA

E.V. Botchkova, T.V. Gavruseva, L.V. Ovcharenko, L.A. Zhukova

The article presents the results of complex (virology, bacteriology, parasitology and histology) studies of the health status of two trade species of flounder the Bering Sea. Found obligate pathogen *Ichthyophonus*.

# НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА ТРИПЛОИДНОЙ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ *ONCORHYNCHUS MYKISS* ПРИ ЕЁ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В УСЛОВИЯХ ЮЖНОГО ВЬЕТНАМА

Е.В. Ганжа

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, г. Москва, Россия, [Kate\\_ganga@mail.ru](mailto:Kate_ganga@mail.ru)

В настоящее время часть мировой аквакультуры сосредоточена в воспроизводстве и выращивании различных видов рыб в условиях, существенно отличающихся от их естественного ареала. Повышение товарной продукции на единицу площади достигается разными методами, в частности использованием триплоидных рыб. Известно, что триплоиды по сравнению с диплоидами имеют ряд физиологических отличий – стерильность и повышенную эффективность усвоения пищи, приводящей к ускоренному росту (Павлов, 2011; Dillon, 1988; Solomon, 2002). По данным Соломона (Solomon, 2002), триплоиды меньше подвержены заболеваниям и более устойчивы к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды. Вероятно, за счёт низких затрат энергетических ресурсов организма на функционирование репродуктивной системы у триплоидов формируется более устойчивый иммунитет и расширяются зоны толерантности организма. Однако Бенфи (Benfey, 2001) отмечает, что у триплоидной атлантического лосося *Salmo salar* по сравнению с диплоидными снижен темп роста, выше смертность, а организм чаще испытывает стресс. В связи с этим актуальным становится изучение формирования и функционирования иммунитета у триплоидной радужной форели *Oncorhynchus mykiss* в специфических условиях её интродукции.

В последние годы аквакультура в Республике Вьетнам интенсивно развивается, например, культивируют радужную форель, ранее не обитавшую в этом регионе. Климат южного Вьетнама отличается от естественных условий обитания данного вида по ряду параметров: специфический фотопериод (12 ч день : 12 ч ночь), высокая температура воды, от которой также зависит содержание кислорода в водоёмах (Павлов, 2011; Павлов и др., 2010; Benfey, McCabe, 1997; Pornsoping et al. 2007).

Материал собран в мае–июне 2010 г. на рыбноводном форелевом хозяйстве Клонг-Кланг, расположенном на высокогорном плато высотой 1.5 км над уровнем моря в 50 км на северо-восток от г. Далат. Хозяйство оснащено прудами каскадного типа с водоснабжением из двух горных рек. На хозяйстве измерены параметры основных абиотических факторов, влияющих на жизнедеятельность гидробионтов (температура воды, содержание в воде кислорода и pH) (Ганжа и др., 2010). Были изучены две возрастные группы триплоидной радужной форели различного происхождения – сеголетки, выращенные из икры, импортированной из Венгрии, и двухлетки, полученные из икры, импортированной из США. У рыб измеряли длину тела по Смитту и массу. Для оценки иммунного статуса в крови радужной форели измеряли содержание С-реактивного белка (СРБ), иммуноглобулина Е (IgE) и глюкозы. Для биохимического и иммуноферментного анализа использовали тест-наборы фирм «BioSystems» (выявление СРБ) и «Cortez Diag.» (выявление IgE). Содержание глюкозы в цельной крови определяли глюкометром и тест-полосками Ascensia Entrust. Все анализы выполнены в трёх повторностях в соответствии с описанной ранее методикой (Ганжа, 2008). Статистическая обработка материала проведена в MS Excel 2003.

Средняя температура воды в бассейнах хозяйства Клонг-Кланх с апреля по июль 2010 г. составляла 20.8°C и варьировала в широких диапазонах – от 17.5°C до 26.7°C. Такая температура превышает значения, характерные для естественного ареала радужной форели (Зеленинков, 1999; Peterson, Meador 1994; Punkhurst et al., 1996; Pomzoring et al., 2007), и не подходит для размножения, а её верхние пределы считаются критическими даже для выживания данного вида (Bidgood, 1980). Среднее содержание кислорода в прудах составляло 6.6 мг/л утром и 7.0 мг/л днём, что является нижней границей нормы. Средний pH в бассейнах составлял 7.38 (6.6–8.08) и находился в допустимом диапазоне для выращивания радужной форели.

Средняя длина сеголеток триплоидной радужной форели составляла 19.6 ± 0.32 (17.9–21.5) см, а масса – 79.3 ± 4.17 (57.4–109.5) г. Их гонады представлены длинными непрозрачными тяжами. Средняя длина двухлеток составляла 33.5 ± 0.34 (31.9–36.0) см, масса 384.9 ± 16.59 (304.0–533.0) г. Большая часть гонад (85%) была малого размера (< 0.5 г), что обусловлено триплоидией этих рыб.

СРБ и IgE являются факторами гуморального иммунитета, формируют ответ иммунной системы при повреждении целостности организма или проникновении чужеродных микроорганизмов. СРБ относится к группе белков острой фазы, он стимулирует защитные реакции и активирует иммунитет, является высокочувствительным показателем и одним из первых реагирует на повреждения тканей, поэтому в клинических исследованиях используется в качестве индикатора воспаления (Назаренко, Кишкун, 2000; Ganzha, Mikodina, 2009). Содержание СРБ в плазме крови сеголеток радужной форели выше, чем у двухлеток и варьирует в больших пределах – 2.3 ± 0.13 (0.3–3.8) мг/л у сеголеток, 1.1 ± 0.09 (0.0–2.47) мг/л у двухлеток. СРБ в концентрации, превышающей 2.0 мг/л, отмечен более чем у половины сеголеток и только у трёх двухлеток, что свидетельствует о наличии воспалительного процесса в организме этих рыб. Известно, что у тихоокеанских лососей в преднерестовом состоянии содержание СРБ составляет 2.2 мг/л у самцов горбуши и 4.7 мг/л у самок кижуча, что связывали с запущеном апоптоза (Ganzha, Mikodina, 2009). Вероятно, содержание СРБ в крови радужной форели в концентрации более 2.0 мг/л можно расценивать как наличие патологии. При отсутствии видимых симптомов заболевания можно предположить, что воспалительный процесс в организме триплоидной радужной форели протекает в пищеварительном тракте и обусловлен использованием недоброкачественного корма и применяемой схемой кормления. Так, всех рыб на хозяйстве кормили продукционными кормами фирмы Skretting, часть из них была просрочена (Ганжа и др., 2010), а в схеме кормления форели на рыбоводном хозяйстве Клонг-Кланх не было учтено снижение рациона при высоких температурах и низком содержании кислорода в воде.

Основная физиологическая функция иммуноглобулина Е связана с защитой слизистых оболочек организма путём локальной активации факторов плазмы и эффекторных клеток. Это происходит за счёт связывания IgE с высокоаффинными рецепторами, находящимися на поверхности базофилов и тучных клеток, что приводит к высвобождению медиаторов воспаления (сероборан, гистамин и др.), т.е. индуцируется острый воспалительный процесс (Галактионов, 1998; Назаренко, Кишкун, 2000). Таким образом, IgE в сыворотке возрастает при аллергических реакциях немедленного типа и стимулирует приток циркулирующих в крови иммуноглобулинов классов G и A (Ганжа и др., 2010), комплемента, нейтрофилов и эозинофилов. В норме содержание IgE в крови низкое. У изученных сеголеток и двухлеток триплоидной радужной форели IgE находился примерно на одном уровне. У сеголеток концентрация IgE составляла 0.1 ± 0.08 (0.0–2.8) МЕ/мл,



у двухлеток –  $0.2 \pm 0.06$  (0.0–1.3) МЕ/мл. Данный показатель был выявлен только у трети изученных сеголеток и у менее половины двухлеток, при этом его максимальное значение у сеголеток выше, чем у двухлеток. Наличие IgE у триплоидной радужной форели также отражает воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды.

Глюкоза является одним из наиболее важных показателей физиологического состояния организма. Уровень глюкозы в крови регулируется центральной нервной системой (гипофиз), гормональными факторами (тиреотропный гормон, адренокортикотропный гормон) и функцией печени (Назаренко, Кишкун, 2000). Ее содержание в крови может изменяться при некоторых патологических состояниях организма (Микулин и др., 2005; Микулин, Кочергина, 2005). Количество глюкозы в крови отражает состояние углеводного обмена, а, следовательно, и качество потребляемого рыбой корма (Coweу et al., 1977a, b). Часто уровень глюкозы используют в качестве показателя адаптационных возможностей лососевых рыб при смене среды обитания (Любаев и др., 2004; Григорьева и др., 2006).

Среднее содержание глюкозы в крови триплоидной радужной форели различалось незначительно, у сеголеток составляло  $7.4 \pm 0.37$  (5.1–9.5) ммоль/л, у двухлеток –  $7.3 \pm 0.37$  (5.2–9.4) ммоль/л. В соответствии с данными Илдыва (Yildiz, 2006) уровень глюкозы у радужной форели в условиях субтропиков составляет 5.11–5.21 ммоль/л, а при стрессе – возрастает на 1.0 ммоль/л и более и сохраняется в течение длительного времени. Таким образом, содержание глюкозы в крови радужной форели высокое.

Ранее (Ганжа и др., 2010) мы указывали на повышенный уровень глюкозы в крови диплоидных трёхлеток радужной форели, выращенных в условиях Южного Вьетнама –  $9.0 \pm 0.44$  (6.2–14.1) ммоль/л, т.е. концентрация глюкозы в крови диплоидных особей радужной форели достоверно выше, чем у триплоидных. Это может быть обусловлено не только различием пород, возраста, типом корма, но и отражать различия в плоидности этих рыб. Однако Байрон и Бенфи (Byron, Benfi, 1994) указывают на отсутствие значительных отличий содержания глюкозы в крови диплоидных и триплоидных гольцов (*Salvelinus fontinalis*, Mitchell). Известно, что концентрация глюкозы служит индикатором стресса организма (Ганжа и др., 2010; Clements, Hicks, 2002). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии хронического стрессового состояния у радужной форели хозяйства Клима Кланх и, возможно, более высокой физиологической устойчивости триплоидных рыб к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Известно, что уровень глюкозы отражает состояние углеводного обмена. Кови с соавторами (Coweу et al., 1977a, b) установил, что содержание глюкозы в крови радужной форели может изменяться в зависимости от состава и качества корма – от 3.0 ммоль/л при стандартном кормлении до 4.0 ммоль/л и 5.3 ммоль/л при высокобелковом и высокоуглеводном кормлении соответственно. Таким образом, обнаруженный высокий уровень глюкозы в крови исследованных рыб также может являться результатом перекармливания радужной форели при использовании корма не достаточно высокого качества и не сбалансированного по составу. Считаем, что для дальнейшего кормления рыб в высокогорных условиях южного Вьетнама следует использовать корма с другим содержанием жира и белков целесообразна разработка специальных рецептур.

Таким образом, исследованные показатели иммунитета характеризуют неблагоприятные условия содержания триплоидной радужной форели в южном Вьетнаме.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганжа Е.В., Микодина Е.В., Во Тхи Ха. Некоторые показатели иммунитета радужной форели *Oncorhynchus mykiss*, выращенной при воздействии постоянно высоких температур // Тезисы докладов Всероссийской молодежной конференции "Вклад молодых ученых в рыбохозяйственную науку России". Санкт-Петербург. 2010. С. 35-38.
2. Ганжа Е.В. Биохимические показатели крови тихоокеанских лососей р. Большая Вереская (Западная Камчатка) // Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов. Мат-лы 2-ой междунар. научно-практ. конф. Москва, ВВЦ, 26-27 ноября 2008 г. М.: Изд-во ВНИРО. 2008. С. 197-200.
3. Галактионов В.Г. Иммунология. М.: Изд-во МГУ. 1998. 480 с.
4. Зелеников О.В. Гаметогенез радужной форели *Parasalmo mykiss*, выращенной в системе с оборотным водоснабжением от вылупления до полного созревания при оптимальной температуре // Вопр. ихтиологии. 1999. Т. 39. № 1. С. 89-97.
5. Любаев В.Я., Микулин А.Е., Старостина Ю.В., Самсонова М.В., Лаптева Т.И. Биохимический состав сеголеток кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) и кижуча *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) при смене среды обитания // Мат. Всерос. научно-практ. конф. "Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб" М.: ИБВВ РАН, МИК, МГУТиУ. 2004. С. 304-315.
6. Григорьева Ю. В., Микулин А.Е., Любаев В.Я., Самсонова М.В. Изменение содержания углеводов в печени и теле кеты *Oncorhynchus keta* и кижуча *Oncorhynchus kisutch* при смене осмотичности среды обитания // Научные труды МГПУ. Серия: Естественные науки. М.: Прометей. 2006. С. 400-404.
7. Микулин А.Е., Коуржал Я., Микулина Ю.А., Микодина Е.В.. Роль анестетиков как диабетогенного фактора у рыб // Мат. Междунар. научной конф. «Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных». Саранск: Изд-во Мордов. ун-та. 2005. С. 152-154.
8. Микулин А.Е., Кочергина Е.С. Влияние адреналина, гепарина и инсулина на содержание глюкозы в крови молоди кижуча // Мат. Междунар. научной конф. «Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных». Саранск: Изд-во Мордов. ун-та. 2005. С. 154-156.
9. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М.: Медицина. 2000. 544 с.
10. Павлов Е.Д., Нгуен Вьет Туи, Нгуен Ти Хуан Ту. Состояние половых желёз молоди трёхполной форели *Oncorhynchus mykiss* в условиях южного Вьетнама после искусственной инверсии пола // Вопр. ихтиологии. 2010. Т. 50. № 5. С. 675-684.
11. Павлов Е.Д. Состояние половых желёз лососевых рыб в условиях интродукции // Автореф. дисс.... канд. биол. наук. М.: Изд-во ВНИРО. 2011. 24 с.
12. Benfey T.J. Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for aquaculture in New Brunswick // ICES J. Mar. Sci. 2001. V. 58. P. 525-529.
13. Benfey T.J., McCabe L.E. Critical thermal maxima of diploid and triploid brook charr, *Salvelinus fontinalis* // Environmental biology of Fishes. 1997. V. 49. № 2. P. 259-264.
14. Biron M., Benfey T.J. Cortisol, glucose and hematocrit changes during acute stress, cohort sampling, and the diel cycle in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis* Mitchell) // Fish Physiology and Biochemistry. 1994. V. 13. № 2. P. 153-160.
15. Bidgood B.F. Tolerance of rainbow trout to direct changes in water temperature // Fish. Res. Rep. Fish Wildl. Div. 1980. № 15. 11 p.
16. Clements S.P., Hicks B.J. The effect of a trapping procedure on the stress response of wild rainbow trout // North American Journal of Fisheries Management. 2002. V. 22. P. 907-916.
17. Cowey C.B., Higuera M., Adron J. W. The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // Br. J. Nutr. 1977a. V. 38. P. 385-395.
18. Cowey C.B., Knox D., Walton M.J., Adron J.W. The regulation of gluconeogenesis by diet and insulin in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // Br. J. Nutr. 1977b. V. 38. P. 463-470.
19. Dillon J.C. Production of triploid rainbow trout for evaluation in South Dakota waters. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree Master of Science, Major in Wildlife and Fisheries Sciences (Fisheries Option) South Dakota State University. 1988.

20. Ganzha E., Mikodina E. Blood Serum Proteins of Pink, Chum, Coho and Sockeye Salmon from Two South Kamchatka Water Bodies // Arctic marine ecosystems in an era of rapid climate change. Abstracts. Arctic Ocean Governance 18-23 January 2009. Tromsø. 2009. P. 124.
21. Pankhurst N.W., Purser G.J., Kraak G., Thomas P.M., Forreath G.N.R. Effect of holding temperature on ovulations, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro oviduct steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* // *Aquaculture*. 1996. V. 146. P. 277-290.
22. Peterson M.S., Meador M.R. Effects of salinity on freshwater fishes in coastal plain drainages in the southeastern // *U.S. Rev. Fish. Sci.* 1994. V. 2. P. 95-121.
23. Pornsoping P., Unsrisonong G., Veerasilp T., Wessels S., Hörstgen-Schwark G. Reproductive performance of female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) kept under water temperatures and photoperiods of 13° and 51°N latitude // *Aquaculture Research*. 2007. V. 38. P. 1265-1273.
24. Solomon D.J. The potential for restocking using all-female triploid brown trout to avoid genetic impact upon // *Trout news*. 2002. №35. P. 28-31.
25. Yildiz H.Y. Plasma lysozyme levels and secondary stress response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after Exposure to Leteux-Meyer Mixture // *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2006. №30. P. 265-269.

#### IMMUNITY PARAMETERS OF TRIPLOID RAINBOW TROUT *ONCORHYNCHUS MYKISS* CULTIVATED IN THE CONDITIONS OF SOUTH VIETNAM

E.V. Ganzha

The contents of C-reactive protein, immunoglobulin E, and glucose were determined in the blood of triploid rainbow trout cultivated in South Vietnam. A negative effect on fish organism and chronic stress caused by the specific conditions of cultivation (12 h light : 12 h dark photoperiod, a high water temperature, and a low oxygen level reaching 7.0 mg/l) were registered. The immune responses in the young of the current year and in the fish of the age 1+ were connected with increased CRP level and high glucose content. A high glucose level (7.3-7.4 mmol/l) could be associated with utilization of unbalanced feed and with overfeeding of the fish at the hatchery. The IgE content in the blood of the fish was within the normal range.

# МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ИММУНИТЕТ РЫБ К ИНФЕКЦИОННЫМ БОЛЕЗНЯМ

В.К. Голованов, В.Р. Микряков

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия  
golovan@biv.yaroslavl.ru*

Среди абиотических факторов среды температура выделяется в первую очередь тем, что практически полностью контролирует процессы питания, роста и развития водных организмов. Распределение и поведение рыб в естественных условиях также в большой степени зависит от температуры окружающей среды. За последние 70 лет собран огромный массив данных, характеризующих различные стороны влияния температуры на жизнедеятельность гидробионтов (Хочачка, Сомеро, 1977; Avtalion, 1981; Бретт, 1983; Алабастер, Ллойд, 1984; Уголев, Кузьмина, 1993; Голованов, 1996; Голованов и др., 1997; Beitinger et al., 2000). Выявлены зоны эколого-физиологического оптимума, в которых рост и питание наиболее эффективны, а также области сублетальных температур, где жизненные процессы рыб затруднены. Определены сезонные особенности влияния температуры и онтогенетические тренды температурных требований рыб. Показано, каким образом происходит воздействие температуры в отдельности и в комплексе с другими факторами среды. Проанализировано, в какой степени физиолого-биохимический и иммунологический статус особей изменяет реакции и чувствительность рыб к температуре.

Также подробно изучены закономерности формирования иммунитета у различных видов рыб (Avtalion, 1981; Лукьяненко, 1989; Микряков, 1991). Исследована межвидовая, внутривидовая и возрастная изменчивость иммунитета рыб, его механизмы. Проанализировано влияние различных абиотических и биотических факторов водной среды, а также антропогенных воздействий на иммунитет рыб к инфекционным болезням. Вместе с тем некоторые аспекты влияния непосредственно температуры как важного экологического фактора среды на способность рыб противостоять инфекциям изучены недостаточно. В настоящей работе предпринята попытка кратко охарактеризовать модифицирующее влияние температуры на иммунитет рыб к инфекционным болезням. Выделено несколько аспектов проблемы, приведен ряд примеров, характеризующих взаимоотношения «температура водной среды - инфекции рыб».

**Температурный диапазон жизнедеятельности рыб.** Как известно, температурный диапазон жизнедеятельности морских и пресноводных рыб располагается в диапазоне от  $-1.5$  до  $+44.6^{\circ}\text{C}$ . Верхняя граница существования ограничена температурой  $40-41^{\circ}\text{C}$  у карповых видов рыб. При этом для некоторых видов – сазана (карпа), серебряного и золотого карасей она равна этой величине или несколько ниже. В то же время для ряда других видов семейства карповых – леща и плотвы, например, а также окуневых, щуковых и осетровых видов рыб она располагается на уровне  $33-37^{\circ}\text{C}$ . В отличие от теплолюбивых рыб, у холодолюбивых лососевых и сиговых верхняя температурная граница жизнедеятельности несколько ниже – от  $23-25$  до  $28-30^{\circ}\text{C}$ .

Вся область температур, в которой обычно обитают рыбы, разделяется на ряд поддиапазонов. Нижний участок – от нижних летальных и сублетальных температур на  $5-10^{\circ}\text{C}$  вверх по направлению к оптимуму. Зона эколого-физиологического и физиолого-биохимического оптимума – в центре диапазона жизнедеятельности у лососевых и сиговых. Она несколько сдвинута вверх по диапазону у карповых,

окуневых и ряда других видов рыб. Наконец, поддиапазон выше зоны оптимума и верхних сублетальных и летальных температур.

В процессе прохождения сезонных жизненных циклов рыбы периодически обитают в разных температурных поддиапазонах, а в условиях аквакультуры выращивают в определенных режимах. В связи с этим они сталкиваются с колебаниями температур среды, неодинаково влияющих на эффективность их роста, развития и питания. Кроме того, они по-разному реагируют и на инфицирование. Важно отметить, что температурный предел активности комменсала колеблется от 0–4 до 40–56°C (Грищенко и др., 1999). В свою очередь рыбы вызываемые различными видами возбудителей, проявляются у рыб и в узком, и в широком интервале температур среды обитания (Бауер, 1959; Schäperclaus, 1979).

**Влияние сезона года.** Приуроченность наиболее эффективного действия различных видов возбудителей к температурам от 10–15 до 30°C приводит к ярко выраженному сезонному характеру заболевания, когда инфекция максимальна весной и летом и затухает, как правило, в осенне-зимний сезон (Щербина, 1971; Кеннеди, 1978). Отметим, что в данном случае, очевидно, подразумеваются требования рыб. Массовость вспышек инфекционных заболеваний рыб (карпа, фурункулез лососевых и др.) в определенные сезоны года, очевидно, определяется как особенностями эколого-физиологического состояния рыб, так и напряженностью их врожденного иммунитета, которые в свою очередь зависят от температуры окружающей среды (Микряков, 1978, 1991; Лукьяненко, 1989). Сезонное изменение температуры в естественных водоемах и в условиях прудовых хозяйств существенно влияет на численность паразитов, сдвигает сроки прохождения ими жизненных циклов, в результате чего соответственно увеличивается или уменьшается количество инфицированных рыб.

Известно, что эпизоотии краснухи карпов в прудовых хозяйствах возникают весной, после повышения температуры воды выше 10°C. Такие заболевания краснухой реже, еще реже они осенью. Возможны также обострения таких эпизоотий зимой. Вспышки фурункулеза лососевых в рыбоводстве, как правило, приводят к гибели рыб, происходят чаще осенью и весной, а летом – лишь единично. Существуют и многочисленные другие примеры сезонного проявления заболеваний рыб, что указывает на их связь с температурой окружающей среды. По-видимому, только лабораторный эксперимент в полной мере способен оценить роль температуры в возникновении той или иной инфекции и выходе из нее.

**Воздействие температурных стрессов.** Известно, что резкие перепады температур величиной более 6°C негативно влияют на физиолого-биохимический и иммунологический статус рыб, вызывая не только температурный стресс, но, в конечном итоге и температурный шок. Именно такие перепады характерны для переходных периодов года: конец зимы – начало весны, конец весны – начало лета и конец лета – начало зимы. Особенно опасен для карповых как объектов рыбоводства переход от зимы в весну, когда сказывается длительная зимовка, в результате которой рыбы обычно ослаблены. Резкие нагрев или охлаждение болезненны сами по себе, но они, кроме того, еще и способствуют усилению инфекционного начала. Показано также, что при воздействии стресс-факторов, таких как перепады температуры и кислорода, а также загрязнения воды и корма в условиях аквакультуры бактериальные заболевания возникают более часто (Исаева, Козиненко, 1999).

**Соотношение «оптимума» и «пессимума» у рыб и возбудителей заболеваний.** Изучение таких соотношений, возможно, позволит использовать температуру в целях предотвращения и лечения многих заболеваний.

температуры большинства лососевых, осетровых, окуневых и карповых видов рыб лежат в диапазонах: 13–18°C, 20–24°C, 22–28°C и 24–30°C соответственно, а оптимальные границы жизнедеятельности для тех же видов равны примерно 23–28°C, 31–32–37°C и 34–41°C (Голованов, 1996; Голованов и др., 1997). В свою очередь оптимальные условия для развития вирусов, которые чаще вызывают заболевания у лососевых рыб, отмечены при 10–12°C, а у теплолюбивых карповых – при 18–20°C (Ведемейер и др. 1981). Дополнительный анализ показывает, что оптимальная зона для развития возбудителя у лососевых, осетровых, окуневых и карповых рыб варьирует достаточно широко – от 5–10°C при хиллдонеллезе, до 5–40°C при аэромонозе и 18–25°C при вибриозе. Следует отметить и тот факт, что вспышки заболевания не всегда связаны с оптимальными температурными условиями размножения возбудителя (Ведемейер и др. 1991).

В то же время для многих возбудителей инфекций (весенняя виремия карпа, фузариоз, хиллдонеллез, триходиноз, дактилогироз) температуры воды на уровне 32–34°C в течение нескольких суток приводят к подавлению заболевания у рыб. Использование для аналогичных целей температур ниже 4°C (в случае острой геморрагической септицемии и дактилогироза) иногда тоже успешно, но просто замедляет проявление заболевания. Видимо, оптимумы у рыб и для лечения, оздоровления и профилактики заболевания рыб. Наиболее эффективным для лечения и профилактики заболевания рыб представляется использование участка диапазона температур между зоной оптимума и верхними пределами температурами.

«Поведенческая лихорадка» рыб. Многие виды (каarp, лещ, плотва, серебряный карась, большеротый окунь, обыкновенный и длинноперый карп), проявляют реакцию поведенческой лихорадки, избирая в градиентных условиях после инъекции возбудителя инфекции зоны температур, на 2–6°C большие по сравнению с контролем (Reynolds et al., 1976; Кларк, 1979; Голованов, Микряков, 1985, 2000). Экспериментально показано, что оптимальные представители карповых и ушастых окуней, искусственно задержанные в оптимальных температурах, после инъекции аналогичных доз возбудителей инфекции погибают (Голованов, Микряков, 2000; Kluger, 1979). Данная реакция наблюдается в широком диапазоне температур и не зависит от метода изучения (термопреферендума, а также вида возбудителя инфекции (*Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saprolegnia*) (Голованов, Микряков, 2000). Выявлены дозозависимые эффекты реакции поведенческой лихорадки, ослабление ее со временем после инокуляции возбудителя, а также более быстрое проявление при повторной инъекции (Голованов, Микряков, 1985, 2000). Поведенческая лихорадка имеет защитный характер, усиливает сопротивляемость рыб и способствует их большей выживаемости в процессе протекания болезни. Показано, что в более высоких избираемых температурах (по сравнению с оптимальными избираемыми температурами) механизмы иммунной защиты рыб действуют более эффективно (Kluger, 1979; Голованов, Микряков, 1985, 2000).

Разница реакций у теплолюбивых и холодолюбивых видов рыб. Для теплолюбивых и серебряного карася установлено, что повышение температуры содержания (оптимальный выбор температур в гетеротермальных условиях) на 2–4°C приводит к более высокой выживаемости рыб от оптимальных, в диапазоне температур от 28 до 33°C, прекращает проявление болезни. Такая же реакция показана и у канального сомика при заражении

бактерией *Edwardsiella ictaluri* (Francis-Floyd, 1987). Рыб инфицировали в диапазоне температур от 17 до 32°C. Сомики чувствительны к заражению при температуре, но наибольшая опасность заражения популяций рыб при септицемией находится в пределах температур 22–28°C, выше она минимальна. Таким образом, для теплолюбивых видов для «борьбы» с инфекцией оптимальной температуры среды, несколько выше оптимальных. Существенный вопрос представляет, соблюдается ли аналогичное правило в случае лососевых видов в другом диапазоне температур. Оказалось, что развитие инфекционного гемопоэтического некроза гемепоэтической ткани у молоди нерки можно предупредить путем повышения температуры воды до 18°C (от исходных 12°C) сразу же после заражения. Содержание рыбы в такой воде в течение 4–6 суток (Amend, 1970). После заболевания не рецидивирует, но рыба остается восприимчивой к виру повторном инфицировании. Предполагают, что положительное действие повышения температуры воды обусловлено образованием интерферона клетками печени рыб. Однако с этим же возбудителем, но для другого вида рыб, молоди рад форели в диапазоне температур от 3 до 21°C этого явления не показано (Hilborn et al., 1979). Напротив, было продемонстрировано, что заражение радужной форели возможно как при температуре 3–12°C, так и при более высоких температурах до 21°C. И предлагаемое повышение температуры воды до 18°C, как метод борьбы с вспышками инфекционного некроза гемопоэтической ткани не имеет практического значения. Исходя из этих и ряда других данных, можно сделать вывод о том, что в случае холодолюбивых видов рыб данная реакция, по крайней мере, неоднозначна и нуждается в дополнительной экспериментальной проверке.

Выполнена предварительная оценка инфицированности рыб из условий аквакультуры, видоспецифичности возбудителей, значения температурного порога начала инфекций, возможных механизмов температурного влияния на иммунитет. Кроме того, обсуждены вопросы присутствия возбудителей в организме рыб и проявления заболевания, комплексного влияния различных факторов, включая температуру, на устойчивость рыб к разным инфекциям, соотношение эврибионтности рыб и возбудителей их инфекций.

Таким образом, температура как экологический фактор существенно изменяет проявление иммунитета рыб в диапазоне их жизнедеятельности. В ряде случаев на противоречивость некоторых результатов и недостаток экспериментальных данных, приведенные примеры свидетельствуют о том, что с учетом особенностей влияния температуры на иммунитет рыб можно эффективно противостоять их инфекционным заболеваниям.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алабастер Дж., Ллойд Р. Критерии качества воды для пресноводных рыб и птиц. Промышленность, 1984. 344 с.
2. Бауэр О. Н. Экология паразитов пресноводных рыб (взаимоотношения в среде обитания) // Изв. ГосНИОРХ. 1959. Т. 49. С. 5–206.
3. Бретт Дж. Р. Факторы среды и рост // Биоэнергетика и рост рыб. М.: Пищевая промышленность, 1983. С. 275–345.
4. Ведемсйер Г.А., Мейер Ф.П., Смит Л. Стресс и болезни рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. 128 с.
5. Голованов В.К. Эколого-физиологические аспекты терморегуляционного поведения пресноводных рыб // Поведение и распределение рыб. Докл. 2-го Всероссийского симпозиума «Поведение рыб». Борок. 1996. С.16–40.

6. Голованов В.К., Микряков В.Р. Реакция карпа в градиенте температур после приёма возбудителей бактериальной инфекции // Экол. физиология и биохимия рыб. 1985. С. 50-51.
7. Голованов В.К., Микряков В.Р. Эволюционные и эколого-физиологические аспекты тепловой акклиматизации рыб // Сб. тез. докл. научно-практ. конф. «Проблемы охраны рыб в аквакультуре», М., 2000. С. 47-48.
8. Голованов В.К., Свирицкий А.М., Извеков Е.И. Температурные требования рыбного водохранилища и их реализация в естественных условиях // Современное рыбное хозяйство Рыбинского водохранилища. Ярославль: Изд. ЯрГУ, 1997. С. 92-93.
9. Грищенко Л.И., Акбаев М.Ш., Васильков Г.В. Болезни рыб и основы рыбоводства // Рыб. журн. 1999. 456 с.
10. Исаева Н.М., Козипенко И.И. Иммуномодулирующее действие бактерий (ихтиобактерий) на рыб // Вопр. ихтиологии. Т. 39. № 4. С. 527-534.
11. Кеттелли К. Экологическая паразитология. М.: Мир, 1978. 230 с.
12. Лукьяненко В.И. Иммунология рыб: врожденный иммунитет. Москва; ВО «Знание», 1989. 271 с.
13. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. // Рыб. журн. 1991. 154 с.
14. Микряков В.Р. Актуальные вопросы иммунологии рыб // Теоретические аспекты научных исследований водохранилищ. Л.: Наука, 1978. С. 116-133.
15. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Наука, 1993. 238 с.
16. Хочатка П., Сомеро Д. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977. 398 с.
17. Щербина А.К. Болезни рыб. Киев: Урожай, 1973. 404 с.
18. Amend D. F. Control of infectious hematopoietic necrosis virus disease by elevating the temperature // J. Fish. Res. Board Can. 1970. V. 27. № 2. P. 265-270.
19. Avtalion R.R. Environmental control of the immune response in fish // CRC Crit. Rev. in Contr. 1981. V. 11, № 2. P. 163-188.
20. Beitinger T.L., Bennet W.A., McCauley R.W. Temperature tolerances of North American fishes exposed to dynamic changes in temperature // Env. Biol. Fishes. 2000. V. 58. № 3. P. 75.
21. Francis-Floyd Ruth, Belcau Marshall H., Waterstrat Paul R., Bowser Paul R. Effect of temperature on the clinical outcome of infection with Edwardsiella ictaluri in channel catfish // Vet. Med. Assoc. 1987. V. 191. № 11. P. 1413-1416.
22. Hetrick F. M., Fryer J. L., Knittel M. D. Effect of water temperature on the infection of trout *Salmo gairdneri* Richardson with infections haematopoietic necrosis virus // J. Fish. Dis. 2. № 3. P. 253-257.
23. Kluger M.J. Fever in ectotherms: evolutionary implications // Thermoregulation in Fish. Symp. Richmond. 1978. / Amer. Zool. 1979. V.19. N 1. 295-304.
24. Reynolds W.W., Casterlin M.E., Covert J.B. Behavioral fever in teleost fishes // Nature, 1959. № 5538. P. 41-42.
25. Schilperclaus W. Fisch-krankheiten. Teil 1 and 2. Berlin: Academic-Verlag, 1979. 1089s.

#### MODIFYING INFLUENCE OF TEMPERATURE ON FISH'S IMMUNITY TO INFECTIOUS ILLNESSES

V. K. Golovanov, V.R. Mikryakov

The questions of temperature influence on fish's immunity to infectious illnesses are discussed. The describing influence of a year season and temperature stress on ability of fishes to infections resistance are discussed. «optimism» and «pessimism» in fishes and activators of diseases, «behavior fever» of fishes, of infectious illness at warmwater and coldwater fish species and other aspects are analyzed.



М.П. Грушко

Астраханский государственный технический университет, Астрахань, Россия,  
mgrushko@mail.ru

Сравнительный анализ с подробным изучением морфологии и строения различных органов животных является весьма плодотворным для выявления сложных биологических явлений, часто не поддающихся экспериментальному изучению (Кулер, 1980; Селезнев, 1999; Житенева и др., 2004).

Морфофункциональная характеристика органов иммунной системы земноводных, где подробно рассмотрена топография, строение, качественный и количественный состав формирующихся клеток, практически отсутствует в научной литературе.

Объектом исследования являлись половозрелые самки земноводных озерной лягушки (*Rana ridibunda* Pall., 1771) и головастики озерной лягушки. Лягушки отлавливались из водоемов Наримановского и Красноярского районов Астраханской области. Материал обрабатывался методами классической гистологии (Пирс, 1962; Ромейс, 1954; Волкова, Елецкий, 1989). Идентификация форменных клеток крови осуществлялась по атласам Н.Т. Ивановой (1984) и В.Н. Пискунова (1949). Подсчет форменных элементов белой крови проводился методом четырех полей, т.е. более 200 лейкоцитов в мазке (Иванова, 1982; Житенева, 1989).

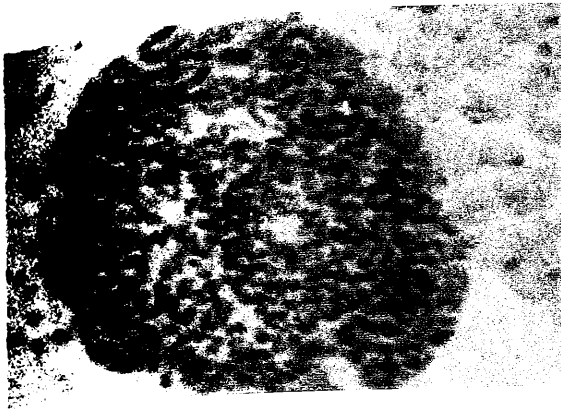
Тимус возникает у амфибий через три дня после оплодотворения в результате инвагинации дорсального эпителия второго глоточного кармана, и в шестой день развития в нем выделяют корковую и мозговую зоны (Селезнев, 1999).

В личиночный период развития тимус земноводных - это округлое образование, которое снаружи было покрыто тонкой соединительнотканной капсулой (рис.1). Деление стромы органа на дольки не отмечено. На нем выявлялось мозговое и корковое вещество. Гистоструктура органа была представлена ретикулоэпителиальными клетками, среди которых располагались клетки лимфоцитопозитического ряда. Тельца Гассалья встречались очень редко.

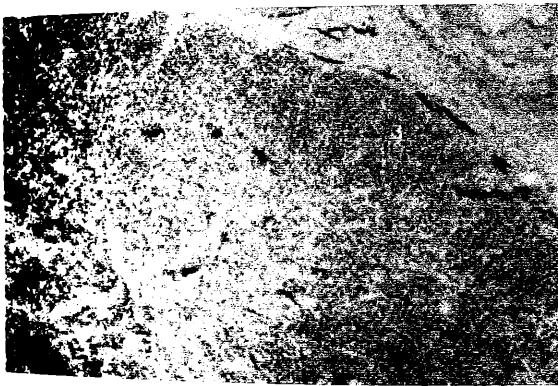
Среди развивающихся клеток были выявлены гемоцитобласты - 1,4%. Формирующиеся клетки лимфоцитопозитического ряда были представлены бластными, созревающими и зрелыми. Среди бластов были отмечены лимфобласты - 25,0% и плазмобласты - 2,8%.

Созревающие клетки были представлены пролимфоцитами - 12,5%, проплазмочитами - 2,7%. Из зрелых клеток были отмечены только лимфоциты - 55,6%.

У исследованных особей земноводных в возрасте трех лет тимус представлял собой округлое образование, снаружи покрытое тонкой соединительнотканной капсулой. От капсулы шли перегородки - трабекулы, разделяющие тимус на дольки (рис. 2). Число долек на срезе было равно пяти. В каждой дольке различалось темноокрашенное корковое вещество и более светлое мозговое вещество в соотношении 1:1. В мозговом слое долек тимуса были отмечены эпителиальные слонстые тельца Гассалья, которые представляли собой округловатые ороговевших ретикулоэпителиальных клеток (число телец Гассалья в поле зрения составляло 2 шт.).



*Рисунок 1. Тимус головастика*  
**ОК10 ОБ 40** Гематоксилин-эозин. 1. Кортиковое вещество. 2. Мозговое вещество.  
 3. Соединительнотканная оболочка.



*Рисунок 2. Тимус лягушки.*  
**ОК10 ОБ 10.** Гематоксилин-эозин 1. Соединительнотканная капсула. 2. Трабекулы.  
 3. Кортиковое вещество. 4. Мозговое вещество.

В мозговом веществе количество лимфобластов составляло 5,0%, лимфоцитов 11,0%, зрелых лимфоцитов 78,0 %. Здесь же находились плазматические клетки, которые располагались хаотично; их удельный вес был 6,0%.

В корковом веществе лимфобластов было отмечено несколько больше, чем в мозговом веществе - 10,0% ( $P < 0,001$ ), пролимфоцитов здесь было выявлено на 11%, чем в мозговом веществе ( $P < 0,001$ ); зрелые лимфоциты составляли 53,0%, а плазматических клеток в корковом веществе были отмечены в количестве на 25% меньше, чем в мозговом слое ( $P < 0,001$ ).

Из плазматических клеток в корковом веществе были отмечены плазматические клетки, которые составляли по 2,0%, зрелые плазматические клетки, количество которых здесь оказалось выше, чем в мозговом веществе.

( $P < 0,001$ ), причем они, в основном локализовались по краю коркового вещества (рис. 3).

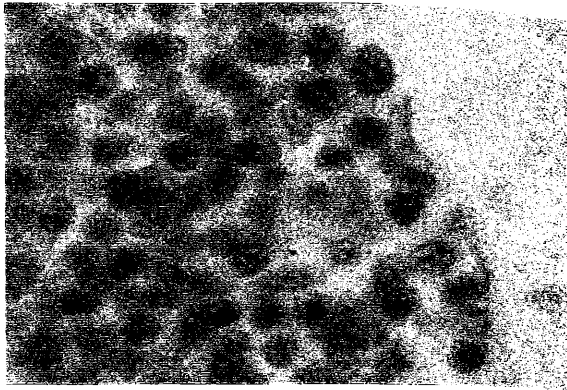


Рисунок 3. Корковое вещество тимуса лягушки.  
ОК10 ОБ 90. Окраска по Бриге. 1. Плазмобласт. 2. Плазмоцит.

Также на протяжении всей дольки тимуса встречались макрофаги, отмечены и единичные сегментоядерные нейтрофилы.

Таким образом, при сравнении клеточного состава тимуса личинок и коркового вещества этого органа у половозрелых особей лягушек отмечено, что число лимфобластов и лимфоцитов у головастиков выше ( $P < 0,001$ ). Количество созревающих лимфоцитов выше было у половозрелых лягушек ( $P < 0,001$ ).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой / 2-е изд. – М.: Медицина, 1982. – 304с.
2. Жигенева Л.Д., Полтавцева Т.Г., Рудницкая О.А. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб – Ростов н/Д: к.и. изд-во, 1989. – 112с.
3. Жигенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Основы ихтиопатологии (в сравнительном аспекте) - Ростов-на-Дону: «Эверест», 2004. - 311с.
4. Жигенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Эволюция крови - Ростов-на-Дону, 2001. – 112с.
5. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб (сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб) – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1982. – 184 с.
6. Купер Э. Сравнительная иммунология (пер. с англ.) - М., 1980. – С.500.
7. Никитин В.Н. Атлас клеток крови сельскохозяйственных и лабораторных животных – М.: Гос. изд. с-х. лит-ры., 1949. – 187с.
8. Пирс Э., Гистохимия – Москва: Изд-во иностр. лит-ры, 1962. – 929с.
9. Ромейс Б., Микроскопическая техника – М.: Изд-во иностр. лит., 1954. - 246с.
10. Селезнев С.Б. Филлогенез иммунной системы - М.: РУДН, 1999. - 24 с.

### MORPHOLOGY THYMUS OF AMPHIBIOUS

M.P. Grushko

The topography, structure, qualitative and quantitative structure of formed cells in the thymus of sexually mature amphibious. During the research peculiarities in the structure and the organization in the amphibious.

# СРАВНИТЕЛЬНАЯ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЫБ-ВСЕЛЕНЦЕВ, ЗАРАЖЕННЫХ ЭКТОПАРАЗИТАМИ

О.Н. Давыдов, Л.Я. Куровская, Ю.Д. Темниханов

Институт зоологии им. И.И. Шмальгаузена АН Украины, Киев, Украина  
temnihanov@mail.ru

Распространение сорных рыб-вселенцев способно вызвать непредвиденные последствия с точки зрения безвозвратной потери автохтонного биоразнообразия и привести значительные экономические убытки в результате снижения численности промысловых ценных видов рыб Украины (Вовк, 1976; Мовчан, 1989; Сабодаш, Тилченко, 2002; Шевченко, Мальцев, 2005).

Становится очевидным, что понимание закономерностей распространения видов рыб-вселенцев, формирование их паразитофауны в новых условиях важно в теоретическом и практическом аспектах для оценки современной эпизоотологической ситуации рыбопромысловых водоемов Украины. Биологическое и эпизоотологическое обоснование роли новых возбудителей паразитарных болезней в динамике численности и патологии интродуцированных видов рыб является своевременным, поскольку сведения о них в Украине практически отсутствуют (Давыдов и др., 2007, 2009 а, б, в.; Темниханов, Куровская, 2010).

Целью настоящего исследования явилось изучение в экспериментальных условиях влияния одиночных и смешанных инвазий эктопаразитами при совместном содержании рыб-вселенцев на некоторые морфофизиологические и биохимические показатели.

На протяжении 2006–2010 гг. нами проведены исследования на рыбах-вселенцах (карась серебряный, чебачок амурский, ротан-головешка, белый амур), привезенных из рыбных хозяйств «Нивка» и «Немешаево» Киевской области (Украина).

Видовой состав паразитов определяли по «Определителям паразитов пресноводных рыб фауны СССР» (1984, 1985, 1987). Вычисляли индекс обилия (ИО) и интенсивность заражения (ИЗ) рыб эктопаразитами (экз.).

У рыб, которые получали корм и голодали, определяли морфофизиологические и биохимические показатели: абсолютную (мг) и относительную (индекс, %) массу иммунокомпетентных органов, исследовали кровь, слизь кожи, эпителиальные клетки хвостового плавника.

Определяли относительное количество эритроцитов с патологией (хроматинные включения, двойные и фрагментарные ядра, эритроциты с большим или очень малым диаметрами с полихроматофильной окраской), просматривая по 3000 эритроцитов в разных участках препарата. Измеряли большой и малый диаметры эритроцитов, а также их ядер, применяя иммерсионный объектив и окуляр-микrometer со шкалой. Определяли объем эритроцитов и их ядер по формуле:  $V = (\pi : 6) \times LB^2$ , где L - большой, а B - малый диаметр эритроцита.

У рыб отрезали краевые пластинки с хвостового плавника шириной 5 мм и длиной 1–1,5 см. Препараты фиксировали реактивом Кларка в течение 1 час. Проводили мацерацию 45%-ным раствором уксусной кислоты. Из пластинок плавников изготавливали мазки растиранием между предметными стеклами. Их высушивали на воздухе и окрашивали азотнокислым серебром. Считали количество эпителиальных клеток с двойными ядрышками из 200 клеток в одном препарате.

При биохимических исследованиях у исследуемых рыб из сердца отбирали кровь для получения сыворотки, в которой определяли количество общего белка по

методу Лоури, содержание лизоцима (мурамидазы) диффузионным методом на агаре. Из органов и тканей рыб (печень, почки, селезенка, слизь) были изготовлены водные экстракты тканей (1:50), в которых определяли содержание водорастворимого белка, содержание лизоцима. Для сравнения содержания лизоцима в органах и тканях рыб в качестве контроля использовали белок куриного яйца, так как он имеет высокое содержание лизоцима.

Установлено, что чем выше интенсивность заражения рыб простейшими (*Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina* sp.) и моногенеями (*Dactylogyrus vastator*, *Gyrodactylus cyprini*), тем отмечено большее количество эритроцитов с патологией и эпителиальных клеток с двойными ядрышками. Сравнение морфофизиологических характеристик клеток крови (объем эритроцитов, объем ядра, соотношение объема эритроцитов к объему их ядер, эпителиальные клетки с двойными ядрышками) рыб показало, что они зависят от вида рыб (табл. 1).

Таблица 1. Влияние заражения эктопаразитами на морфофизиологические характеристики эритроцитов и эпителиальных клеток плавников разных видов рыб при совместном их содержании

Показатели	Ротан-головешка	Белый амур	Карась серебряный	Амурский чебачок
ИЗ, экз.				
<i>I. multifiliis</i>	5,0	0	53,5	0
<i>Trichodina</i> sp.	2,2	10,0	0	0
<i>D. vastator</i>	0	0	50,0	0
<i>G. cyprini</i>	12,5	0	0	0,2
Морфологические характеристики эритроцитов и эпителиальных клеток				
Объем эритроцитов без патологии (мкм <sup>3</sup> )	432,3±31,6	492,1±51,9	460,6±72,8	304,3±81,4
Объем ядра эритроцитов без патологии (мкм <sup>3</sup> )	33,8±2,0	39,6±3,6	36,9±1,9	26,3±7,5
Соотношение объема эритроцитов к объему их ядер	12,7	12,4	12,4	11,5
Количество эритроцитов с патологией	14,7±0,1	39,6±3,2	22,6±3,6	35,6±4,4
Количество эпителиальных клеток хвостового плавника с двойными ядрышками	83,1±0,9	81,2±2,4	62,8±4,6	60,5±4,3

Голодание рыб приводит к достоверному увеличению количества эктопаразитов и эритроцитов с патологией в крови, а также эпителиальных клеток плавников с двойными ядрышками. Чем дольше длится голодание, тем выше обилие паразитов. При этом количество эритроцитов с патологией и эпителиальных клеток плавников с двойными ядрышками у рыб повышалось, что, по-видимому, связано с нарушениями метаболических процессов в клетках. По выживаемости показателям карась серебряный, амурский чебачок и ротан-головешка более жизнеспособны при длительном голодании, чем белый амур.

Анализ проведенных исследований по влиянию множественных заражений на некоторые биохимические показатели рыб-вселенцев при совместном выдерживании позволяет сделать вывод, что содержание лизоцима оказалось

умозрительным, чем показатель концентрации белка в тканях и органах рыб, хотя судить об этом характеризует уровень адаптации исследованных рыб к заражению паразитами. Так, содержание лизоцима в сыворотке крови и печени выше, а в их же селезенке ниже у зараженного простейшими паразитами карпа, чем жолтого карася серебряного при совместном их длительном содержании (80 сут температуре 15–16°C).

При совместном содержании амурского чебачка и ротана-головешки была значительная резистентность первого вида к заражению эктопаразитами, в то время как у ротана-головешки регистрировалась более высокая их численность. Показатели иммунофизиологических показателей у ротана-головешки, зараженного паразитами, наблюдался высокий индекс печени и высокое содержание белка в сыворотке крови по сравнению с амурским чебачком (табл. 2).

Таблица 2. Заражение эктопаразитами и некоторые морфофизиологические показатели рыб-аселенцев при совместном их содержании

Показатели	Амурский чебачок	Ротан-головешка
Заражение паразитами (ИО, экз.)		
<i>multifiliis</i>	0	5,0
<i>chodina sp.</i>	0	20,4
<i>vastator</i>	0	4,4
<i>cyprini</i>	0,2	2,4
Абсолютная масса, мг		
чебь	32,0±6,5	1264,0±143,4
чеши	9,0±6,5	57,0±12,5
всезица	5,6±4,4	28,6±4,9
Относительная масса (индекс), ‰		
чебь	6,5±1,4*	52,1±5,0*

снизилась концентрация лизоцима в сыворотке крови, но у ротана-головешки самый высокий.

Сравнительный анализ исследованных биохимических показателей и тканей рыб-вселенцев показал, какие из них можно использовать как физиологического состояния рыб при влиянии одиночного и смешанного паразитами. В первую очередь необходимо учитывать показатели содержания лизоцима в сыворотке крови, иммунокомпетентных органах и исследованных рыб.

Установлена возможность использования объема эритроцитов крови и двойных ядрышек эпителиальных клеток хвостового плавника для характеристики морфофункционального состояния рыб в норме и при заражении.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вовк П.С. Биология дальневосточных растительноядных рыб и их использование в водоемах Украины. / Киев: Наук. думка, 1976. 248 с.
2. Давыдов О.Н., Куровская Л.Я., Темниханов Ю.Д. К паразитофауне чебачка – вселенца водоемов Украины // Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке. Материалы III Межрегиональной научн. конф., посвящ. 80-летию проф. К.Д. Федорова. Новосибирск, 2009 а. С. 75–78.
3. Давыдов О.Н., Куровская Л.Я., Темниханов Ю.Д. Статус паразитов рыб-вселенцев в водных экосистемах Украины // Материалы конф. «Проблемы ихтиопатологии в начале XXI века». Санкт-Петербург, 2009 б. С. 58–63.
4. Давыдов О.Н., Куровская Л.Я., Темниханов Ю.Д., Бутков Р.В., Волович Г.Д. Паразитические сообщества рыб-вселенцев водоемов Украины: прогноз возможных изменений // Гидробиол. журн. 2009 в. Т. 45, № 3. С. 74–83.
5. Давыдов О.Н., Куровская Л.Я., Темниханов Ю.Д., Будков Р.В. и др. Общая характеристика разнообразия паразитов рыб-вселенцев в водоемах Украины // Материалы Международн. науч. конф. «Биоразнообразие и роль животных в экосистемах». Днепродзержинск. 2007. С. 331–333.
6. Мовчан Ю.В. Первая находка головешки (ротана) – *Perccottus glenii*, Dybowski (Pisces, Elotridae) в водоемах Украины // Вестн. зоологии. 1989. № 5. С. 87.
7. Сабодаш В.М., Ткаченко В.А., Цыба А.А. Обнаружена популяция ротана в Киевской области // Вестн. зоологии. 2002. № 2. С. 90.
8. Темниханов Ю.Д., Куровская Л.Я. Влияние эктопаразитов на морфофизиологические и иммунобиохимические показатели рыб-вселенцев водоемов Украины // I Международн. Беккеровские чтения. Науч.-практ. конф. Волгоград, 2010. С. 530–531.
9. Шевченко П.Г., Мальцев В.Н. Рыбное хозяйство Украины и виды-вселенцы: проблемы и перспективы // Проблемы воспроизводства аборигенных видов рыб. Киев, 2008. С. 204–213.

## COMPARATIVE MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EVALUATION OF FISHES INVADING INFECTED ECTOPARASITES

O.N. Davydov, L.Ja. Kurovskaia, Ju.D. Temnihanov

Original data on the effect of mixed infestations ectoparasites on a number of morphological and biochemical characteristics of invasive fish (*Carassius auratus gibelio*, *Pseudorasbora parva*, *Perccottus glenii*, *Ctenopharyngodon idella*) from water bodies of Ukraine given and their use for evaluating the functional state of fish.

# ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ ДВУХ ВИДОВ КАРПОВЫХ ИХ ПАРАЗИТА – *OPISTHORCHIS FELINEUS* В ОБЬ-ИРТЫШСКОМ ОЧАГЕ ОПИСТОРХОЗА

О.Н. Жигилева<sup>1\*</sup>, В.В. Ожирельев<sup>2</sup>, Т.Ф. Степанова<sup>2</sup>, Т.Э. Козак<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия  
\*zhigileva@mail.ru

<sup>2</sup>Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной  
патологии, Тюмень, Россия

Карповые рыбы, обитающие в Обь-Иртышском бассейне, участвуют в цикле гиперэндемичного очага описторхоза, сформировавшегося на этой территории Западной Сибири. Основную роль в циркуляции паразита играют три вида - плотва, елец и, особенно, язь. В центре очага язь инвазирован карповыми описторхисами на 100%, интенсивность инвазии может превышать порог на одну рыбу. Пораженность местного населения этой инвазией в ряде регионов достигает 80% и в разных местностях может значительно варьировать. Не менее важно, что варьирование показателей инвазированности хозяев может быть связано с их генетическими особенностями, обуславливающими устойчивость к паразиту. Благодаря разработке новых генетических методов в последние годы достигнуты большие успехи в изучении геномов паразитических червей, в том числе трематод. Для ряда видов семейства Opisthorchidae получено полное секвенирование митохондриального генома (Shekhovtsov et al., 2010; более 85 % транскриптома (Young et al., 2010). Генетическую изменчивость *Opisthorchis felineus* изучали с использованием методов секвенирования участков митохондриального генома (Катохин, 2008; Shekhovtsov, 2009), полимеразной цепной реакции (Pauly et al., 2003) и кариотипирования (Polyakov et al., 2004). Авторы обнаружили низкий уровень полиморфизма западно-сибирских популяций *O. felineus*, хотя у других представителей этого семейства выявлена высокая генетическая изменчивость (Sithithaworn et al., 2007; Saijuntha et al., 2007; включающая влияние на эпидемиологическую ситуацию (Andrews et al., 2008). Для изучения популяционной структуры *O. viverrini* использовали микросателлиты (Sithithaworn et al., 2010), RAPD-маркеры (Sithithaworn et al., 2007) и изоферменты (Sithithaworn et al., 2006).

Исследование популяционной структуры паразита невозможно без учета особенностей генетической подразделенности хозяев. Для паразитизма трематод важную роль играют моллюски, однако в ряде работ подчеркивается влияние на структуру популяций паразита популяционной структуры и миграций вторых промежуточных хозяев (Keeney et al., 2007). Данная работа посвящена комплексному изучению популяционно-генетической структуры *O. felineus* и его промежуточных хозяев - карповых рыб - в Обь-Иртышском очаге описторхоза.

Рыбы и метацеркарии *O. felineus* были собраны в ноябре-январе 2008-2010 гг. в Обь-Иртышского бассейна: Северная Сосьва, Обь, Конда, Большой Салым, Тобол, Тура, Ик и Уй. Исследовано 12 выборок сибирской плотвы *Rutilus rutilus* Pallas, 1811, 16 выборок язя *Leuciscus idus* Linnaeus, 1758 (субвиды: *Leuciscus idus* и *Leuciscus idus* *ibiformes*: Surprinidae), а также 8 выборок *O. felineus*. Всего изучено 316 особей (331 - язь и 192 образца мариит. Марииты *O. felineus* были выращены в лаборатории (сирийских) хомяках *Mesocricetus auratus* в стандартных условиях. Всего в экспериментах по заражению участвовало 30 хомяков. При проведении экспериментов соблюдались все правила работы с лабораторными



животными (Приказ МЗ РФ №755 от 12.08.77). В качестве инвазионного материала использовали мышцы язей, зараженных метацеркариями опистрхов, отловленных в реках Тура, Тобол, Обь, Конда. Выловленная рыба доставлялась в лабораторию в холодильниках с температурой  $0 \pm 4$  °С. Образцы мышц просматривали под микроскопом для оценки степени зараженности, для идентификации личинок трематод и определения их жизнеспособности. Из содержимых жизнеспособных личинок *O. felineus*, скармливали их экспериментальным группам в количестве 5-10 г ткани в расчете на 1 животное ежедневно утром натошак в течение 5 дней. Через 3 месяца после заражения животных усыпляли, червей извлекали из печени, отмывали несколькими физиологическом растворе, выдерживали до гибели, затем замораживали в микропробирках по 1-5 особей для последующего электрофоретического исследования. Принадлежность червей к виду *O. felineus* подтверждена морфологическом исследовании.

Для изоферментного анализа использовали образцы мышечной ткани марины опистрхов, а также образцы ткани печени и крови хомяков, использовали в качестве контроля. Образцы тканей хранились в замороженном состоянии при  $-40$  °С. Белки экстрагировали стандартным способом с использованием трис-НСI буфера (рН 8,0). Для разделения белков использовали метод вертикального электрофореза в 7,5 % полиакриламидном геле (Mauro в непрерывной трис-ЭДТА-боратной системе буферов (Peacock, Dingman). Электрофорез проводили при 80 mA, 10-12 В/см в течение 2,5 часов. Гистохимическое выявление белков проводили по методике (Корочкин и др. Richardson, 1986). У паразитов и хозяев изучено 6 ферментных систем: малатдегидрогеназа (ME, 1.1.1.40), лактатдегидрогеназа (LDH, 1.1.1.27), аспартатаминотрансфераза (GOT, 2.6.1.1), супероксиддисмутаза (SOD, 1.15.1.1), неспецифические : эстеразы (EST, 3.1.1.1, 3.1.1.2) и миогены.

По результатам электрофоретического анализа с использованием программы PopGen32 (Yeh et al., 1999) рассчитаны частоты аллелей, доля полиморфных локусов (*P*), показатели средней наблюдаемой (*Hobs*) и ожидаемой гетерозиготности (*Hexp*), индексы генетического сходства Нея (*INei*) и генетическая дистанция Нея (*Nei*, 1972), F-статистики. Дендрограмму строили на основании индексов Нея методом UPGMA.

Всего у *O. felineus* было идентифицировано 19 локусов, из них 14 (*EST-3, EST-4, EST-6, EST-7, EST-8, GOT, LDH, ME*, 6 миогенов) были моноаллельными у всех изученных образцов. Наиболее полиморфной была выборка из р. Обь, где изменчивость обнаружена по 3 локусам (*EST-2, EST-5, SOD-1*). В остальных выборках изменчивость обнаружена по 2 локусам: *EST-5* и *SOD-2* или *SOD-1*. Генетическое своеобразие обской популяции *O. felineus* выразилось в наличии по локусам *EST-2* и *SOD-1* электрофоретических вариантов ферментов, которые имеют ограниченное распространение и, кроме этой выборки, встречаются еще в иртышских выборках, где тоже редки. Также своеобразны кондинские выборки, где обнаружен полиморфизм по локусу *SOD-2*, а локус *EST-5* полиморфен по трем аллелям с характерным своеобразным распределением их частот. В наиболее разнообразных выборках по этому локусу преобладает быстрый аллель, в тобольской выборке медленный, а в кондинских быстрый и медленный аллели встречаются практически равной частотой.

Только два локуса соответствовали 95%-ому критерию полиморфизма и 4 - 99%-ому критерию. Доля полиморфных локусов составила 21.1% для всей и варьировала от 5.3 до 15.8% в разных местностях, средняя наблюдаемая гетерозиготность ( $H_{obs}$ ) - 0.008, ожидаемая гетерозиготность ( $H_{exp}$ ) - 0.052. По отношению локусов у *O. felineus* наблюдается низкая частота гетерозигот и дефицит гетерозигот ( $F_{IS} = 0.7424$ ). Низкая частота гетерозигот и у других видов трематод (Vilas et al., 2003; Laoprom et al., 2010). Это обусловлено эффектом Валунда, связанным со смешением генетически разных группировок паразита при заражении рыбы, а также следствием миграции.

Расчет генетических дистанций Нея выявил низкий уровень генетической дифференциации выборки *O. felineus* из разных мест Обь-Иртышского бассейна. Индекс генетического сходства ( $I_{Nei}$ ) варьирует в пределах от 0.931 до 0.999. Удаленные выборки, как Казым Мыс и Ханты-Мансийск генетически почти идентичны, индекс генетического сходства составляет 0.9995. Большая дистанция между крайними исследованными точками (Казым Мыс и Ханты-Мансийск) составляет 7%.

Низкий уровень генетического полиморфизма и дифференциации по другим генетическим маркерам у *O. felineus* отмечают и другие авторы (Катохин и др., 2008; Givov et al., 2009). Это может быть обусловлено либо филогеографическими причинами (относительно недавним и быстрым распространением описторхиса на обширной территории из одного источника), либо экологическими причинами – высоким перемешиванием генофонда в результате миграций хозяев. Высокая частота миграции хозяина может свести на нет локальную адаптацию паразита (Michalakis, 2002). Низкий уровень генетического полиморфизма трематод может быть обусловлен также другими причинами, связанными с особенностями их жизненного цикла: наличием партеногенетической стадии, способствующей генетической однородности, связью с малоподвижными первыми промежуточными хозяевами, затрудняющей широкий обмен генами (Безр, 1999; Zhigileva, 2007). В то время как у близкого вида *O. viverrini* в Юго-Восточной Азии выявлен очень высокий уровень генетической дифференциации между провинциями, вплоть до фиксации аллельных вариантов изоферментных локусов, позволяющих подозревать наличие критических видов (Saijuntha et al., 2006 a,b; Saijuntha et al., 2007). Вероятно, что у близких видов (*O. felineus* и *O. viverrini*), формирующих паразитарные системы, факторы, определяющие популяционную дифференциацию, были различны.

Кластерный анализ позволил описать популяционную структуру *O. felineus* в исследованной части ареала. На дендрограмме выделяется два кластера. Первый кластер включает три северные выборки (Северная Сосьва, Обь, Иртыш в месте впадения в Обь). Между этими выборками генетическая дифференциация очень низкая, несмотря на значительные географические расстояния. Второй кластер включает центральную часть Обь-Иртышского очага описторхоза (Конда) и Конду. Этот кластер включает два кластера, дифференцированных друг от друга на уровне межпопуляционных различий. Один из кластеров включает две выборки из верховьев р. Конды, второй – низовья Конды и устье Иртыша. Таким образом, можно говорить о наличии трех популяционных группировок *O. felineus* на исследованной части ареала: северной, верхне-кондинской и кондо-иртышской. Генетическая структура западно-сибирских популяций карповых рыб была описана ранее с использованием тех же изоферментных маркеров (Zhigileva et al., 2009). Дендрограмма генетических дистанций плотвы показывает, что у этого

вида можно выделить три группы популяций – южную (тобольская), центральную (Среднее течение Оби, Конда, Большой Салым) и северную (Северная группа плотвы (р. Тобол, Ик) отличается от остальных наличием высокой доли генетического сходства (*I<sub>Nei</sub>*) между северо-центральной и южной группами). Такой высокий уровень дивергенции может указывать на происхождение этих популяционных группировок плотвы.

У язя, также как у плотвы, выделяется три группы популяций, включающая язей из рек Тобол, Тура и Иртыш, центральная, включающая язей из рек Обь (среднее течение), Большой Салым и Конда, и северная (река Сосьва). При этом центральная группа популяций генетически ближе к южной, формируя вместе с ней общий кластер, хотя и с достаточным уровнем генетического сходства. В пределах группы выборки из разных участков отлова в пределах одной реки объединяются не по географическому признаку, что указывает на значительную роль межпопуляционных обменов в пределах популяций рыб.

Сравнение популяционно-генетической структуры паразита с генетической структурой популяций его промежуточных хозяев – карповых рыб не совпадают. Уровень генетической дифференциации паразита намного ниже, чем у его промежуточных хозяев – карповых рыб. Отсутствие строгих генетических дистанций паразита и хозяев обнаружено у трематод-лягушек (Rannala, 1992). Это несоответствие объясняется, по мнению авторов, разным числом исследованных локусов у паразита и хозяина, разным местом сбора материала, возможной гибридизацией хозяина и высокой скоростью белковой эволюции в разных паразито-хозяинных системах. В нашем случае этими причинами можно пренебречь, поскольку изучали одинаковый набор локусов у паразита и рыб, время и место сбора совпадают, а гибридизация хозяев исключена. Следовательно, можно заключить, что миграция и популяционная структура вторых промежуточных хозяев играет важную роль в формировании популяционно-генетической структуры *O. felis*. Возможной причиной низкой дифференциации популяций *O. felis* может быть влияние на его генетическую структуру окончательного хозяина. Вследствие широкой миграции населения и перевозки рыбной продукции в северные районы для потока генов в популяции паразита.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и педагогические кадры инновационной России» (2009-2013 гг.) (ГК № П71

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shekhovtsov S.V. The complete mitochondrial genomes of the liver fluke *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis* (Trematoda) / S.V. Shekhovtsov [et al.] // *Parasitology* 2010. Т. 59. № 1. С. 100-103.
2. Young N.D. Unlocking the transcriptomes of two carcinogenic parasites, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini* / N.D. Young et al. // *PLoS Negl Trop Dis*. 2010. 4(6): e719.
3. Катохин А.В. Оценка генетических отличий *Opisthorchis felinus* от *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis* по ITS2- и CO1-последовательностям / А.В. Катохин // Доклады академии наук, 2008. Т. 421. № 4. С. 549-552.
4. Polyakov A.V. Comparative analysis of karyotypes of *Opisthorchis felinus* from Siberia / A.V. Polyakov [et al.] // *Contemporary Problems of Ecology*. 2010. Т. 3. № 1. С. 1-5.
5. Shekhovtsov S.V. A novel nuclear marker, Pm-int9, for phylogenetic studies of *Opisthorchis felinus*, *Opisthorchis viverrini*, and *Clonorchis sinensis* (Opisthorchidae, Trematoda) / S.V. Shekhovtsov [et al.] // *Parasitol. Res.*, 2009. Vol. 106. P. 293-297.

- city A., Schuster R., Steuber S. Molecular characterization and differentiation of trematodes of the species *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1905) by polymerase chain reaction // *Parasitol. Res.* 2003. T. 90. № 5. С. 409-414.
- Sithithaworn P. Genetic variation in *Opisthorchis viverrini* (Trematoda: Opisthorchiidae) in Thailand and Laos PDR based on random amplified polymorphic DNA analyses / P. Sithithaworn [et al.] // *Parasitol. Res.* 2007. V. 100. № 3. P. 613-617.
- Saijuntha W. Evidence of a species complex within the food-borne trematode *Opisthorchis viverrini* // *Parasitology*. 2007. Vol. 137. P. 695-703.
- Saijuntha W. Mitochondrial DNA sequence variation among geographical isolates of *Opisthorchis viverrini* in Thailand and Lao PDR and phylogenetic relationships with other trematodes // *Parasitology*. 2008. Vol. 135. P. 1479-1486.
- Laoprom N. Microsatellite loci in the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini* and their use as population genetic markers / N. Laoprom [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. 2008. Vol. 8. P. 146-153.
- Andrews R.H., Sithithaworn P., Petney T.N. *Opisthorchis viverrini*: an underestimated zoonotic health risk // *Trends Parasitol.* 2008. 24(11). P. 497-501.
- Saijuntha W. Enzyme markers to identify and characterize *Opisthorchis viverrini* in Laos / W. Saijuntha [et al.] // *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2007. Vol. 37 (Suppl 3). P. 43-47.
- Kearney D.B., Waters J.M., Poulin R. Diversity of trematode genetic clones within and the timing of same-clone infections // *International journal for parasitology*. 2007. 37(3-4).

Алурер Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в ПИАГ. М.: Мир, 1978. 128 с.

- Peacock A.C. and Dingman C.W. Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamide gel electrophoresis // *Biochemistry*. 1967. V. 6. P. 1818-1827.
- Сорокин Л.И. Генетика изоферментов / Л.И. Корочкин [и др.]. М.: Наука, 1977. 278 с.
- Richardson B.J. Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematics and molecular evolution. London: Academic Press, 1986. 410 p.
- Yeh F.C., Yang R., Boyle T. 1999. POPGENE. Version 1.31. / University of Alberta and Canadian Forestry Research.
- Wei M. The genetic distance between populations // *Amer. Natur.* 1972. V. 106. P. 283-291.
- Vilas R., Paniagua E., Sanmartin M.L. Genetic variation within and among infrapopulations of the digenetic trematode *Lecithochirium fusiforme* // *Parasitology*. 2003. 126(Pt 5):465-72.
- Zhigileva O.N. Populational structure of three fish species (Cypriniformes: Cyprinidae) from the Ob-Irtysh basin, by the data of isoenzyme analysis / O.N. Zhigileva [et al.] // *Parasitology*. 2010. Vol. 140, No. 9. P. 778-787.
- Бесп С.А. Некоторые проблемы природной очаговости гельминтозов человека в бассейне природной очаговости. Сиб., 1999. С. 40-56.
- Zhigileva O.N. The levels of genetic variability of parasites with different life cycle structure in the Ob-Irtysh basin // *Lithuanian Journal of Zoology*. 2007. V. 17, No 2. P. 129-138.
- Gandon S., Michalakis Y. Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite interactions between migration, mutation, population size and generation time // *Journal of Evolutionary Biology*. 2002. 15. P. 451-462.
- Ramsale B. Comparative evolutionary genetics of trematode parasites (Plagiorchiidae) and their hosts // *Canadian Journal of Zoology*. 1991. 70. P. 993-1000.

**STRUCTURE OF POPULATIONS OF TWO CYPRINID FISH SPECIES AND OF THEIR PARASITE - OPISTHORCHIS FELINEUS IN OB-IRTYSH FOCUS OF OPISTHORCHIASIS**

O.N. Zhigileva1,\*, V.V. Ozhirel'ev2, T.F. Stepanova2, T.E. Kozak1

The genetic variability of West Siberian populations of *O. felineus* and two species of Cyprinid fish, its second intermediate host, was studied by isozyme analysis. Low levels of allozyme variation and genetic differentiation in the Ob-Irtysh focus of opisthorchiasis were detected. Comparison of population-genetic structure of *O. felineus* and its intermediate host. Migration and population structure of the second intermediate hosts (fish) does not play a significant role in formation of the population-genetic structure of *O. felineus* in Ob-Irtysh focus of opisthorchiasis.

## ИНДИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕКОТОРЫХ ОСОБО ОПАСНЫХ ВИРУСОВ РЫБ МЕТОДОМ ПЦР

Е.А. Завьялова, Н.Ю. Кандрина\*, Н.Ф. Ломакина, М.И. Гулюкия  
ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной  
ветеринарии имени Я.Р. Коваленко, г. Москва, Россия  
\*natalia.kandrina@gmail.com

Аквакультура в России носит комплексный многоотраслевой характер за счет использования крупнейшего в мире фонда внутренних водоемов и прибрежных акваторий морей. При этом одна из существенных проблем отечественной акваиндустрии – дефицит рыбопосадочного материала, который в ряде регионов приходится закупать в Финляндии, Норвегии и других Европейских странах. В этих регионах у рыб в естественных водоемах и в аквакультуре циркулируют возбудители таких особо опасных вирусных болезней – инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых, инфекционная анемия лососевых, вирусная геморрагическая септицемия и другие. Во всем мире главное направление в борьбе с заразными болезнями рыб и других гидробионтов – профилактика, то есть предотвращение проникновения патогенов в регионы, где его прежде не было. Таким образом, завоз рыбопосадочного материала в Российскую Федерацию из стран с различной эпизоотологической ситуацией требует мониторинга и прогнозирования на его основе возможных рисков.

В комплексе мероприятий по оздоровлению хозяйств от вирусных болезней рыб ведущее место также принадлежит диагностике. На данный момент разработан ряд вирусологических и серологических методов, таких как ИФА (различные варианты), НРИФ, тест коагулирования, иммуноблот. Большинство этих методов требует культивирования вируса на культурах клеток, что занимает достаточно длительное время и выполняется только в крупных научно-исследовательских институтах, имеющих профильные лаборатории. Поэтому в последние годы в России наиболее актуальным является разработка экспресс-методов диагностики, таких как полимеразная цепная реакция. Например, за рубежом уже разработаны и применяются в рутинных лабораторных исследованиях рыб одно- и двухступенчатые варианты ОТ-ПЦР и ПЦР в «реальном времени».

В настоящее время в России отсутствуют адекватные качественные тест-системы, сочетающие невысокую стоимость анализа, простоту в использовании, а главное – высокую чувствительность. Таким образом, целью настоящего исследования являлась разработка тест-систем для индикации и идентификации вирусных возбудителей особо опасных и карантинизируемых заболеваний карповых и лососевых рыб методом ПЦР.

Примеры. Анализ нуклеотидных последовательностей, подбор праймеров и проверку специфичности осуществляли с помощью литературных источников (OIE, 2006, 2009), международной базы данных «GeneBank», программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Штаммы. В работе использовали штаммы вирусных возбудителей весенней вирии карпов (SVC), инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых (IHN), геморрагической септицемии лососевых (VHS), инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPN) из коллекции лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко и любезно предоставленные сотрудниками других институтов, занимающихся сходной тематикой (ВНИИВВиМ, КамчатНИРО).

**Культуры клеток.** Для пассирования вирусов использовали перевиваемые линии клеток – RTG-2 (гонады радужной форели), ЕРС (эпителиальная папиллома гупси), CHSE-214 (эмбрион чавычи), FHM (хвостовой стебель голяяна) и OMG (гонады радужной форели, ВИЭВ), которые культивировали при температуре 15-22 °С (в зависимости от вида вируса).

**Выделение РНК** проводили согласно инструкции к набору «Рибо-преп» (ЦНИИЭ, Москва). При выделении РНК возбудителей из патологического материала проводили предварительную гомогенизацию его в ступке.

**Реактивы.** Реагенты для выделения РНК, постановки обратной транскрипции (ОТ) и проведения ПЦР и агарозного гель-электрофореза: набор для выделения РНК «Рибо-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва), фермент для обратной транскрипции – обратная транскриптаза MMLV в комплекте с 5х буфером для обратной транскриптазы (Promega, США), смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) с концентрацией 10 мМ каждого, 10х реакционный буфер без MgCl<sub>2</sub> и поставляемый в комплекте р-р 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, фермент Taq-полимераза ((ЦНИИ Эпидемиологии, Москва); краска (10-кратный краситель), GenePак™ DNA Markers M 100, маркер размера фрагментов ДНК (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000), бромистый этидий, агароза LE2, буфер для электрофореза TAE 50х (Fermentas, кат. В49), вода для молекулярно-биологических целей, деионизированная, свободная от ДНКаз и РНКаз.

**Идентификация вируса весенней виремии карпов.** В ходе работы с SVCV были подобраны три праймера N3, N4r, N5r согласно референтной последовательности N-гена штамма «Fijan». Метод направлен на выявлении видоспецифических участков в области гена N, который кодирует нуклеопротеин. Показано, что последовательность данного гена является консервативной и не изменяется для разных изолятов вируса.

Методика была успешно применена для идентификации референтного и полевых изолятов вируса SVC. Штаммы были выделены в разные годы сотрудниками лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ из проб, полученных в рыбхозах. Было исследовано 22 пробы культурального вируса, ранее охарактеризованных методом иммуноферментного анализа (ELISA Ag SVCV от «Test-line», Чехия) и содержащих SVC.

Реакцию обратной транскрипции проводили при 42°C - 45 минут, затем полученную кДНК прогревали при 95°C - 5 минут и использовали для постановки полимеразной цепной реакции. Для повышения чувствительности метода применяли полугнездовой вариант ПЦР, с использованием в первом цикле реакции внешних праймеров N3 и N5, а во втором – внутреннего праймера N4 в паре с праймером N3. Внешние праймеры направляют синтез ПЦР - продукта размером 418 п.н (ПЦР-продукт 388 п.н.).

**Идентификация вируса геморрагической септицемии.** Для идентификации VHSV в ПЦР использовали праймеры, комплиментарные определенным участкам гена нуклеопротеина (ОИЕ, 2009). В результате проведенных исследований с этими праймерами на матрице РНК вируса VHS получали четкий ПЦР-продукт ожидаемых размеров 811 п.н.

Разработанная методика позволяет выявлять как вирус, полученный из культур клеток, так и вирус, полученный из полевого клинического материала. Эффективность метода подтверждена в случае выявления вируса у дикой молодежи и озерного лосося в Северо-Западном регионе России, когда в культурах клеток был выделен вирусный цитопатогенный агент, идентифицированный в реакции нейтрализации как вирус VHS лососевых. При этом продолжительность анализа традиционным методом составила 20 дней, а в ПЦР – 4 часа с учётом подготовки проб (Завьялова и др., 2011).

**Идентификация вируса гемопозитического некроза.** Для ИДНУ применяли специфические праймеры, подобранные к гену нуклеокапсида по методу гнездовой ПЦР (ОГЕ, 2006). Реакцию обратной транскрипции проводили при 42° С - 45 минут, затем полученную кДНК прогревали при 95°С - 5 минут и использовали для постановки полимеразной цепной реакции. В первом раунде получали продукт длиной 786 п.н, во втором - 323 п.н. С помощью разработанных методики было проанализировано 80 полевых изолятов и выявлен вирус в нескольких известных рыбобитомниках Краснодарского края. Результаты полимеразной реакции коррелировали с результатами реакции нейтрализации.

**Идентификация вируса инфекционного некроза поджелудочной железы.** На данный момент опубликованы работы по выявлению РНК возбудителя ИДНУ. ПЦР с использованием праймеров, ограничивающих фрагмент гена VP2, характерный для всех бирнавирусов (Williams K et al., 1999), а также способ выявления РНК IPNV методом «гнездовой» ПЦР с использованием праймеров комплиментарных области генов сегмента А, гену главного структурного белка VP2 (Lopez-Lastra et al., 1994). Известные способы выявления РНК вируса инфекционного некроза поджелудочной железы не лишены недостатков, так как амплификация фрагмента, характерного для всех бирнавирусов, не позволяет однозначно идентифицировать IPNV; а использование праймеров, подобранных к генам структурных белков, не исключает возможность ложноположительных результатов вследствие вариабельности областей генов структурных белков вируса серотипов вируса (Heppel et al., 1992).

Для идентификации IPNV нами были выбраны праймеры к сегменту D, который содержит гены, кодирующие РНК-зависимую РНК - полимеразу и являющиеся высококонсервативными участками генома вируса.

Для проведения реакции обратной транскрипции общим объемом 20 мкл использовали 5 мкл матрицы вируса IPNV, которые вносили в реакционную смесь, содержащую 4 мкл буфера 5x для MMLV (Promega), 1 мкл dNTP (10mM), 1 мкл праймеров (10 pmol), 9 мкл воды, 20-30 единиц обратной транскриптазы MMLV (Promega). Реакцию обратной транскрипции проводили при 42° в течении 45 минут, затем полученную кДНК прогревали при 95° в течение 5 минут и использовали для постановки полимеразной цепной реакции, в результате которой получали продукты амплификации длиной 775 пн в первом раунде ПЦР и 326 пн во втором раунде ПЦР, что подтверждалось во всех экспериментах.

Всего было исследовано более 80 образцов различного происхождения, сконструированные праймеры и отработанные условия ПЦР для выявления IPNV позволили обнаружить присутствие этой инфекции в рыбоводческих хозяйствах РФ. Было установлено, что при исследовании материала с невысоким содержанием вируса, а также для выявления скрытого вирусоносительства целесообразно применять гнездовую ПЦР, т.е. последовательно проводимые два этапа ПЦР с наружной и внутренней парами праймеров, в то время как для скрининга при высокой выраженной эпизоотии достаточно использовать одноэтапную ПЦР с внутренней парой праймеров. Встречались также некультивируемые формы вируса, выявляемые только в ПЦР. Результаты, полученные в ПЦР, коррелировали с результатами исследования вируссодержащей суспензии методом электрофореза микроскопии и с помощью коммерческих наборов ELISA Ag IPNV от «Тек Диано» (Чехия).

**Определение чувствительности реакции амплификации с использованием разработанных специфических олигонуклеотидных праймеров.** Анализировали пробы, выделенные из десятикратных разведений суспензии клеток, инфицированных вирусом инфекционного некроза поджелудочной железы. Исходный титр вируса составлял 7,5 IgTCD<sub>50</sub>.

тельным разведением, в котором обнаруживалась специфическая полоса, было  
 яние  $10^{-4}$ , что соответствует  $0,3 \text{ ТТД}_{50/\text{мл}}$ .  
 Специфичность сконструированных праймеров была проверена  
 ментально. Исследование культур после инокуляции вирусами весенней  
 ли карпов, вирусной геморрагической септицемии, инфекционного некроза  
 стической ткани и инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых  
 показало, что выбранные праймеры гибридизируются только с фрагментами,  
 центарными искомому вирусу, и не взаимодействуют с РНК других вирусов.  
 В результате работы были подобраны последовательностям консервативных  
 IPNV, VHSV, согласно референтным последовательностям консервативных  
 ов генома, оптимизированы условия выделения РНК, проведения обратной  
 транскрипции и ПЦР, таким образом, что общее время анализа не превышало  
 4 часов. С помощью отработанных методик была проведена идентификация  
 ов, референтных и полевых, имеющихся в лаборатории ихтиопатологии и  
 яных в разные годы в рыбоводческих хозяйствах. Данные, полученные в ходе  
 ований с применением ПЦР, коррелировали с результатами, полученными  
 ии методами: в ИФА, в реакции нейтрализации, методом электронной  
 микроскопии, при этом были получены в более короткие сроки. Предложенные  
 и позволяют выявить инфицированных рыб до появления клинических  
 янов, в случае скрытого вирусоносительства, что особенно важно при  
 различных перевозках гидробионтов. В последующем необходимо изучение  
 ческого разнообразия возбудителей массовых вирусных болезней рыб,  
 ствующих на территории России.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, OIE; Ed.: 2006.
2. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. OIE; Ed.: 2009.
3. Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Кандрина Н.Ю., Калинина Н.Р. Выделение  
 пель вирусной геморрагической септицемии лососевых от рыб в естественных  
 и / Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные  
 проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп  
 хозяйственных животных, рыб и пчёл», М: 2011., с.75-77.
4. Williams K., Blake S., Sweeney A., Singer J.T., Nicholson B.L. Multiplex reverse  
 transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses // J. of clinical microbiology.,  
 No. 12., Vol. 37: p. 4139-4141.
5. Lopez- Lastra M., Gonzalez M., Jashes M., Sandino A.M. A detection method for  
 infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT) - polymerase chain  
 reaction (PCR) // J. of fish diseases., - 1994 - №17: p. 269-282.
6. Heppel J., Berthiaume L., Tarrab E., Lecomte J. Evidence of genomic variations between  
 infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restrictions fragment profiles. // J. of general  
 virology., - 1992 - N.73: p.2863-2870.

### IDENTIFICATION AND INDICATION OF DANGEROUS AND GUARANTINE FISH DISEASES BASED ON REVERSE TRANSCRIPTION (RT) – POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

E.A. Zavyalova, N.Yu. Kandrina, N.F. Lomakina, M.I. Gulyukin  
 The purpose of the present work was working out of test systems for the indication and identification of  
 dangerous agents by PCR dangerous and quarantine diseases for cyprinid fish and salmon fishes. As a result  
 of the work, primers for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), infectious  
 haematopoietic necrosis virus (IHNV), infectious necrosis of the pancreas virus (INPV) and  
 viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) have been picked up primers, which was complementary to highly  
 conserved sites of the genome, conditions of separation RNA, carrying out of a reverse transcription and PCR  
 were changed and optimized in such a manner that the general time of the analysis didn't exceed more than four  
 hours in fish farms has been spent by means of the fulfilled techniques. The data received during research,  
 which with the data received by other methods such as ELISA, the reaction of the neutralization and method of  
 electron microscopy.



# УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ МИЦЕЛИАЛЬНЫЕ ГРИБЫ-АССОЦИАНТЫ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ С ПАТОЛОГИЯМИ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ

Л.В. Зверева\*, Л.Н. Ушева, О.Г. Борзых

Учреждение Российской академии наук Институт биологии моря им. А.В.  
Жирмунского Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, Россия  
\*zvereva\_lv@mail.ru

Проводятся миколого-гистопатологические исследования двустворчатых моллюсков, в том числе модиолуса курильского *Modiolus modiolus* и тихоокеанской мидии *Mytilus trossulus* с признаками патологии внутренних органов (Зверева, Ушева, 2009; 2010). Данные виды моллюсков являются ценным объектом промысла и широкомасштабного культивирования во многих странах и в том числе в прибрежных водах Дальнего Востока России (Ivin et al., 2006).

Цель исследования – изучение таксономического состава мицелиальных грибов – оппортунистов, выделенных из патологически измененных внутренних органов модиолуса курильского *Modiolus modiolus* и тихоокеанской мидии *Mytilus trossulus*.

В качестве материала были использованы моллюски *Modiolus modiolus* и *Mytilus trossulus*, имеющие патологии внутренних органов.

Микологические методы обследования. Участки раковины и отпрепарированные внутренние органы с различными патологиями: жабры, мантия, пищеварительная железа, мускул, гонады в течение двух часов вымачивали в растворе антибиотиков (пенициллина и стрептомицина в концентрации 500 тыс. ед./л и 0.5 г/л) для подавления роста бактерий, затем промывали в стерильной морской воде. Использовали четыре питательные среды: сусло - агаровую среду, среду Чапека, среду Тубаки, универсальную питательную среду Сабуро (Артемух, 1981; Методы..., 1982). Все питательные среды готовили на профильтрованной морской воде. Инокулированные питательные среды инкубировали при температуре 20°C. Идентификацию грибов проводили с помощью классических микологических определителей и ключей (Билай, Коваль, 1988; Егорова, 1986; Ainsworth et al., 1973; Integration of Modern Taxonomic..., 2000; и др.).

Штаммы мицелиальных грибов хранятся в Коллекции культур морских грибов Учреждения Российской академии наук Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН.

Гистопатологические методы обследования. В исследованиях использованы классические методы гистологического анализа органов и тканей беспозвоночных (Лилли, 1969; Пирс, 1962).

Материал для гистопатологического анализа был зафиксирован в 10 % формалине, разведенном морской водой, в течение 1 – 2 суток. Затем участки тканей моллюсков были залиты в парафин с использованием рутинной технологии. Парафиновые срезы 5 – 6 мкм толщиной были окрашены: на общую морфологию тканей – гематоксилином и эозином, азаном по Гейденгайну и трехцветным методом по Маллори.

Выявлены патологии внутренних органов обследованных двустворчатых моллюсков: у модиолуса курильского *Modiolus modiolus* патологии раковины, мантии, пищеварительной железы, гонад, у тихоокеанской мидии *Mytilus trossulus* патологии раковины, жабр.

У моллюска курьельского обнаружена резко выраженная окраска в зеленый цвет внутренних органов, их гипертрофия и отек. Наиболее сильно была поражена задняя часть мантии, дистальные части гонады, ротовые лопасти, жабры, соединительно-тканые оболочки пищеварительной железы, мускул – аддуктор. Обнаружены опухолевидные образования на поверхности гонады размером 3-4 мм в диаметре и высотой до 3 мм. Многие из аффектированных моллюсков имели деформации раковин в виде притупления и утолщения задней части раковины.

Исследования гистологических препаратов органов моллюсков показало, что органы были заполнены микроводорослями, которыми были поражены соединительные ткани и эпителий разных органов. Наибольшее количество микроводорослей было выявлено в мантии. Также микроводоросли были выявлены в гемолимфе. В связи с тем, что гемоциты активно фагоцитировали одноклеточные водоросли, в соединительной ткани и вблизи эпителиев мантии и пищеварительного тракта обнаружены крупные гранулоцитомы. Выявлен активный диапедез фагоцитированных гемоцитами микроводорослей через эпителии пищеварительного канала и пищеварительной железы.

Опухолевидные разрастания на поверхности гонады по данным гистопатологического анализа состояли из резко гипертрофированных ацинусов семенника. Их локализация была аномальной: они располагались непосредственно под эпителием гонады. Опухолевидные ростки содержали невыметанные половые продукты без признаков патологии. В самой половой железе ацинусы были свободны от половых продуктов.

Таким образом, данное исследование показало, что у мидии *M. modiolus* опухолевидные образования на гонаде и гипертрофия мантии является компенсаторной защитной реакцией моллюсков на инвазию их органов микроводорослями.

У мидии *Mytilus trossulus* обнаружены деформации раковины и гистопатологические изменения в органах: гемодинамические расстройства кровеносной системы (дилатация сосудов, избыточное кровенаполнение и тромбоз сосудов жабр), воспалительные реакции (образование гранулем), пролиферативные нарушения эпителиальных покровов жабр (гиперплазия и образование крупных сростков между жаберными филаментами).

Из обследованных моллюсков выделены колонии 25 видов мицелиальных грибов (таблица). Данные грибы являются эврибионтными, факультативно морскими (вторичноводными), широко распространенными как в наземных, так и в морских местообитаниях.

Большинство обнаруженных видов относится к группе условно – патогенных грибов (оппортунистов) родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Rhizopus* (таблица). Широко известна способность этих видов образовывать микотоксины и вызывать микозы и микотоксикозы животных из наземных и морских местообитаний: *A. flavus* вызывает хронический афлатоксикоз культивируемой в США, Великобритании, Италии радужной форели с опухолевидным поражением печени (гепатомами), *A. flavus* и *A. parasiticus* вызывают афлатоксикоз культивируемых ракообразных, приводящий к раковой болезни пищеварительной железы (Sindermann, Lightner, 1988). Грибы, принадлежащие к роду *Cladosporium*, изолировали из гиперплазированного эпителиа жабр у трески; гифомицет *Hormoconis (Cladosporium) resinae* вызывает заболевание мышц камбалы (Strongman et al., 1997). *A. fumigatus* продуцирует гашлоксин, накапливающийся в мягких тканях культивируемого во Франции двустворчатого моллюска *Mytilus edulis* (Grovel et al., 2003).

Таблица.

Таксономический состав и распределение мицелиальных грибов на поверхности раковины и во внутренних органах *Modiolus modiolus* и *Mytilus trossus*

Виды грибов	<i>Modiolus modiolus</i>						<i>Mytilus trossus</i>				
	1*	2	3	4	5	6	1	2	3	4	
<i>Acremonium charticola</i> (Lindau) W. Gams		+	+	+	+				+	+	+
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	+	+					+				
<i>Aspergillus flavus</i> Link	+	+	+	+	+	+			+	+	+
<i>A. nidulans</i> (Eidam) G. Winter		+	+		+						
<i>A. niger</i> v. Tiegh.		+		+	+				+		+
<i>A. ochraceus</i> K. Wilh.									+	+	+
<i>A. ustus</i> (Bainier et Sartory) Thom et Church.	+										
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill) Tirab.	+				+						
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud	+						+				
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	+						+				
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) B.G. de Vries	+	+	+	+	+		+				
<i>C. sphaerospermum</i> Penz.	+	+		+		+	+	+	+	+	+
<i>Geomyces pannorum</i> (Link) Singler et J.W. Carmichl.	+						+				
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	+	+			+						
<i>P. chrysogenum</i> Thom	+								+	+	+
<i>P. commune</i> Thom		+	+	+					+		+
<i>P. griseofulvum</i> Dierckx		+		+							
<i>P. rubrum</i> Stoll						+					
<i>P. verrucosum</i> Dierckx var <i>verrucosum</i> Samson, Stolk et Hadlock	+	+	+		+		+	+			
<i>Penicillium</i> sp. 1	+									+	+
<i>Penicillium</i> sp. 2	+		+	+	+	+	+			+	+
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	+						+				
<i>Trichoderma koningii</i> Oudem.									+	+	+
<i>Trichoderma viride</i> Rifai	+	+	+	+		+					
<i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenb.	+						+				
Итого: 25	17	12	8	9	9	5	10	9	7	9	9

\* -- 1 - поверхность раковины, 2 - мантия, 3 - мускул, 4 - жабры, 5 - пищеварительная железа, 6 -

Грибы рода *Chaetomium* продуцируют гемолитические то антибиотические метаболиты (Pivkin, 2000). Наши миколого-токсиколо

данных штаммов *Aspergillus flavus*, выделенных из внутренних органов моллюска-гребешка *Mizuhopecten yessoensis*, показали способность гриба продуцировать афлатоксины, которые накапливаются в тканях моллюска (Зверева, и др., 2009).

Таким образом, анализ таксономического состава и характера распределения данных грибов во внутренних органах обследованных моллюсков показал, что в патологиях внутренних органов моллюсков в их органах аккумулируются эндогенные и токсикогенные мицелиальные грибы.

Исследования морских мицелиальных грибов поддержаны грантами ДУМА РАН и ДВО РАН «Микробная биосфера» ДВО-1 № 09-1-П15-04, ДВО-3 Ш-А-06-201, ДВО-1 «Мониторинг биоразнообразия залива Петра Великого того моря» № 09-1-П23-01, ДВО-1 № 09-1-П15-03.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артемчук Н.Я. Микофлора морей СССР. М.: Наука. 1981. 192 с.
2. Билый В. И., Коваль Э. З. Аспергиллы. Киев: Наук. Думка. 1988. 204 с.
3. Егорова Л.Н. Почвенные грибы Дальнего Востока. Гифомицеты. Ленинград: Наука. 1981.
4. Зверева Л.В., Ушева Л.Н. Миколого-гистопатологические исследования ракушек моллюсков // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический. 2009. Т. 114. Вып. 3. Прил. 1. Ч. 1. 2009. С.325-329.
5. Зверева Л.В., Стоянк И.В., Орлова Т.Ю., Чикаловец И.В. Миколого-патологические исследования двустворчатых моллюсков // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический. 2009. Т. 114, вып. 3. Прил. 1. Ч. 1. С. 325-329.
6. Зверева Л.В., Ушева Л.Н. Мицелиальные грибы – оппортунисты при патологиях внутренних тихоокеанской мидии *Mytilus trossulus* (Bivalvia) из залива Петра Великого того моря // «Экология водных беспозвоночных». Сборник трудов Международной конференции, посвященной 100-летию Ф.Д. Мордухай-Болтовского. Борок. Ноябрь, 2010. С. 10-12.
7. Лилли Р. Гистологическая техника и практическая гистология. М.: Мир. 1969. 649 с.
8. Методы экспериментальной микологии. Справочник. Киев: Наук. Думка. 1982. 550с.
9. Парс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М.: Иностранная литература. 1962.
10. Ainsworth G.C., Sparrow F.K., Sussman A.S. The fungi. V. 4A.: A taxonomic review of Ascomycetes and Fungi Imperfecti. New York: Academic Press. 1973. 621 p.
11. Ellis M.B. Dematiaceous hyphomycetes. Kew. Surrey. England. 1971. 608 pp.
12. Grovel O., Y.F. Pouchus, J.-F. Verbist. Accumulation of gliotoxin, a cytotoxic mycotoxin produced by *Aspergillus fumigatus*, in blue mussel (*Mytilus edulis*) // Toxicon. 2003. N 42. P. 297-300.
13. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* spp. Edited by Samson R.A., J.I. Pitt. Harwood Academic Publishers. 2000. 510 pp.
14. Ivin V.V., Kalashnikov V.Z., Maslennikov S.I. and Tarasov V.G. Scallop Fisheries and Aquaculture of Northwestern Pacific, Russian Federation // In: Scallop: Biology, Ecology and Aquaculture. (Ed. S.E. Shumway and G.J. Parsons). Elsevier Science Publishers. 2006. P. 1163 – 1170.
15. Pivkin M. V. Filamentous Fungi Associated with Holothurians from the Sea of Japan, off the Pacific Coast of Russia // Biol. Bull. 2000. V. 198. P. 101-109.
16. Sindermann C.J., Lightner D.V. Disease diagnosis and control in North American marine molluscs. Elsevier Science Publishers. 1988. 431 pp.
17. Strongman D.B., Morrison C.M., McClelland G. Lesions in the musculature of captive scallops *Hippoglossoides platessoides* caused by the fungus *Hormoconis resiniae* // Dis Aquat Org. 1997. V. 28. P. 107-113.

**OPPORTUNISTIC FILAMENTOUS FUNGI ASSOCIATED WITH BIVALVE MOLLUSKS WITH  
PATHOLOGIES OF INTERNAL ORGANS**

**L.V. Zvereva, L.N. Usheva, O.G. Borzykh**

Mycological and histopathological investigations of the bivalves having pathological changes of internal organs have been conducted for several years in Peter the Great Bay (The Sea of Japan). Twenty five species of filamentous fungi were isolated from the examined mollusks. The isolated fungi are eurybiontic, facultative water organisms, widespread in terrestrial and marine habitats.

Most fungi found in the mussels are opportunistic species belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, and *Rhizopus*. It is common knowledge that these fungi can produce mycotoxins and cause mycoses and mycotoxicoses in terrestrial and marine animals. To sum up, the analysis of taxonomic composition and distribution of filamentous fungi in the internal organs of the bay mussel showed that the organisms of mollusks having immunodeficiency disorders and pathologies of internal organs accumulate opportunistic and toxic filamentous fungi.

# ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА КРОВИ ЩЕНКОВ СЕРОГО ТЮЛЕНЯ

Н.Н. Кавцевич, Т.В. Минзюк

Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН, Мурманск, Россия  
chiv1@front.ru

Кроветворная система позвоночных развивается по общему плану, хотя роль разных источников камбиальных клеток, сроки заселения и миграция органов кроветворения сильно варьируют (Чага, Горышина, 1990). Общие закономерности постнатального развития организма наземных млекопитающих и морским млекопитающим. Однако их проявление у этих животных имеют существенные особенности. В частности, периоды онтогенеза, в течение которых происходят интенсивная пролиферация и дифференцировка стволовых клеток, формирование системы крови у наземных и морских млекопитающих могут значительно различаться. В то же время данные о биологических особенностях и функциональных свойствах клеток крови весьма отрывочны.

В настоящей работе мы определяли клеточный состав крови щенков серых тюленей разного возраста по морфологическим и цитохимическим признакам.

Материал для исследования получен на щенках залежках от новорожденных тюленей – до 1 недели), питающихся молоком (2-3 недели), завершивших молочное вскармливание (1-1.5 месяцев) и в аквариальном комплексе ММБИ – от постоянно питающихся рыбой щенков серого тюленя (возраст – 3-4 месяца). Кровь исследовали общепринятым способом, окрашивали по методу Фельдмана-Гимза. Выявляли также белки районов организаторов ядрышка (Miller, Black, 1980) и неспецифическую эстеразу (Miller et al., 1975).

Кровь новорожденных серых тюленей содержит "юные" нейтрофилы, базофилы. У питающихся молоком и завершивших молочное вскармливание тюленей эти клетки более редки, а у питающихся рыбой не выявлены. Среди морфологических лейкоцитов встречаются клетки с ядрами необычной формы: короткие сегменты соединены друг с другом нитями хроматина, сходящимися в одной точке, а не последовательно, как у изученных в данном отношении млекопитающих. Размеры и число гранул эозинофилов щенков серых тюленей меньше, чем у некоторых представителей китообразных (афалина, белуха, морская свинья), изучавшихся нами ранее. Базофильные лейкоциты – постоянная часть лейкоцитарной формулы крови. Их число колеблется от 2.5%, что согласуется с результатами, ранее полученными для других видов тюленей.

Большинство лимфоидных клеток крови серых тюленей – малые лимфоциты, которые в значительном количестве (5-10% от числа лимфоцитов) являются и большие лимфоциты с признаками активированных клеток. Большие лимфоциты, содержащие в цитоплазме азурофильные гранулы, "большие гранулярные лимфоциты" (БГЛ). БГЛ рассматривают как первую линию обороны организма, менее специфичную, чем индуцированный иммунитет, но более реагирующую. Реакции специфического иммунитета у новорожденных тюленей еще не сформированы. Поэтому роль БГЛ в первые дни и недели жизни является значительной и их отсутствие (или низкое число) – признак сниженной иммунологической реактивности. Исследование БГЛ у морских млекопитающих

заслуживает особого внимания, поскольку они, вероятно, предшественниками Т-лимфоцитов в эволюции системы иммунитета позволяют вскармливанию тюленей встречаются также предшественники зрелых эритроцитов содержащее ядро, – нормоциты и даже пронормоциты.

Определение лейкоцитарной формулы крови щенков различных возрастных групп позволило выявить существенные различия между ними (рис. 1). Кроме отсутствия метамиелоцитов у питающихся рыбой тюленей, отличаются наиболее низким содержанием палочкоядерных, т.е. не дифференцированных нейтрофилов, а также, наряду с закончившими питание щенками, более высоким, чем остальные тюлени, содержанием эозинофилов. Последнее, вероятно, является следствием алергизации поступившими из воздуха и пищи. Эозинофилия, согласно исследованиям млекопитающих различных видов, – один из признаков развития аллергических реакций.

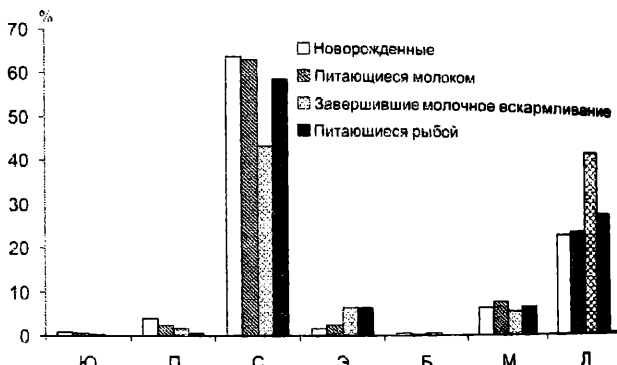


Рисунок. 1. Соотношение различных типов лейкоцитов у щенков серых тюленей

Заслуживает внимания величина соотношения нейтрофилов (С) и лимфоцитов (Л) в третьей группе животных. К возрастным особенностям состава крови относится уравнивание в определенные периоды количества лимфоцитов и нейтрофилов, что получило название "физиологического перекреста". Повышение относительного числа лимфоцитов связывают с интенсивной пролиферацией лимфоидных клеток развивающейся системы специфического иммунитета детенышей млекопитающих. Для человека это явление отмечается на 4-е сутки жизни и в 4 года (Бобова и др., 2003). Позднее окончательно устанавливается нейтрофильный профиль крови, и ее состав в норме остается стабильным. Естественно, что для других видов млекопитающих с разной продолжительностью жизни и особенностями онтогенеза сроки физиологического перекреста могут различаться. Ранее нами установлено, что у щенков гренландского тюленя физиологический перекрест происходит у "бельков", т.е. детенышей, кормящихся молоком матери (Кавцевич, 2003). Кроме того, по нашим данным (Кавцевич, Ерохина, 2006), отсутствие рассматриваемого явления, вероятно, служит одним из признаков низкой жизнеспособности щенков тюленей. Таким образом, щенки серых тюленей, завершившие молочное питание, могут оказаться более подверженными инфекционным заболеваниям, чем гренландские тюлени на данной стадии онтогенеза.

Дополнительную информацию о состоянии лимфоидной системы позволяют цитохимические реакции. В частности, выявление неспецифической (НЭ) и районов организаторов ядрышка (ЯОР) (таблица). НЭ – лимфоидный фермент лизосом. На ранних этапах подготовки клеток к делению ядрышки расщепляются вокруг ядра, их число возрастает, что отражается на количестве окрашенного продукта цитохимической эстеразной реакции и локализации окрашенного продукта цитохимической эстеразной реакции. Различать лимфоциты с различными иммунологическими функциями. Так, «нулевая» реакция (ПН) в виде крупных шляпкообразных отложений на реакции свойственна «нулевым» лимфоцитам и Т-супрессорам и «гранулярную» реакцию (ГР) проявляют Т-клетки - «хелперы» и В-лимфоциты (Соколов и др., 1982; Ferrarini et al., 1980).

Таблица. Параметры лейкоцитов крови щенков серых тюленей (стандартная ошибка)

Параметр	ЯОРАg	НЭ, г/кл	ПН, %	Лф, %	Лкц, Ч10 <sup>9</sup>
г-8	1.52±0.05	2.87±0.27	19.00±3.55	23.25±2.24	11.46±1.3
г-12	1.64±0.05	3.01±0.14	19.83±1.88	23.87±2.05	10.35±0.93
г-6	1.49±0.04	3.34±0.22	14.87±1.58	42.56±5.09	6.25±0.41
г-4	1.15±0.01	2.23±0.18	9.16±1.32	28.08±2.4	7.53±0.58

ЯОРАg – среднее число окрашенных серебром районов организаторов ядрышка в 1 лимфоците; НЭ – среднее число эстеразоположительных гранул в лимфоците; ПН – процент лимфоцитов с «нулевой» реакцией эстеразной реакции; Лф – относительное число лимфоцитов; Лкц – абсолютное число лейкоцитов в 1 л крови.

Число и размеры окрашенных серебром районов организаторов ядрышка (ЯОРАg) – видоспецифические признаки (Maug et al., 1983). Они отражают, в определенной степени, интенсивность пролиферации клеток, изменяются при изменениях в соответствующих участках генома и патологических состояниях. Наибольшая площадь районов организаторов ядрышка (ЯОРАg/Я) наиболее высокая в 3-й группе тюленей, а наименьшая – в 4-й (рис. 2).

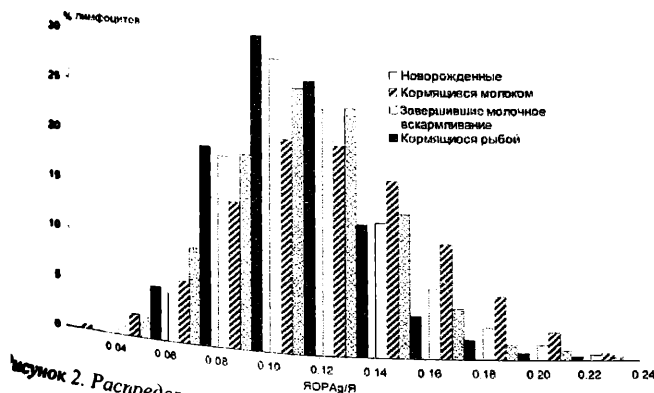


Рисунок 2. Распределения лимфоцитов по относительной площади районов организаторов ядрышка.



Таким образом, после завершения молочного вскармливания, у ювенильной линьки отмечаются значительные изменения лейкоцитарного состава крови детенышей серых тюленей. Представленные данные свидетельствуют о том, что щенки серого тюленя становление системы крови наиболее интенсивно осуществляют в первые 1.5 месяца жизни. В возрасте 3-4-х месяцев, когда животные начинают самостоятельно питаться рыбой, процессы пролиферации и дифференциации лимфоидных клеток замедляются. Дальнейшие сравнительные исследования с применением морфометрических методов позволит выяснить функциональное значение особенностей клеточного состава крови возрастных и других внутривидовых групп ластоногих.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бобова, Л.П., Кузнецов С.Л., Сапрыкин В.П. Гистофизиология крови и органов кроветворения и иммуногенеза // М.: ООО Изд-во "Новая волна", 2003. 157с.
2. Горышина Е.Н., Чага О.Ю. Сравнительная гистология тканей внутренней среды с основами иммунологии. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1990. 320 с.
3. Кавцевич, Н.Н. Особенности клеточного состава крови гренландских тюленей (*Phogophilus groenlandicus*) различного возраста // Зоологический журнал. 2003. Т. 82, № 6. С. 758-761.
4. Кавцевич Н.Н., Ерохина И.А. "Физиологический перекрест" лейкоцитарной формулы крови - показатель жизнеспособности щенков тюленей? // Морские млекопитающие Голарктики: Сб. науч. тр. СПб, 2006. С. 230-234.
5. Соколов В.В., Иванова Л.А. Цитохимическая маркировка и морфологические характеристика субпопуляций лимфоцитов в норме и патологии // Лаб. дело. 1982. №10. С.11-14.
6. Ferrarini M., Cadoni A., Franz A. Ultrastructure and cytochemistry of human peripheral blood lymphocytes. Similarities between the cells of the third population and T-lymphocytes // Eur. J. Immunol. 1980. Vol. 10. N7. P. 62-570.
7. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer. A 1-step method // Experientia. 1980. Vol. 36. P. 1014-1015.
8. Mayr B., Schellander K., Schleger W. Investigation of nucleolar markers in the peripheral blood smear cells in nine species of domestic animals and in man // Zbl. Vet. Med. 1983. Bd. 30, N 2. P. 725-736.
9. Muller J., Brun del Re G., Buerki H., Keller H.U., Hess M.W., Cottier H. Nucleolar acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes // Eur. J. Immunol. 1975. Vol. 5. N 4. P. 270-275.

#### AGE FEATURES OF CELLULAR BLOOD COMPOSITION OF GREY SEAL PUPS

Kavtsevich N.N., Minzyuk T.V.

The objective of present study was to assess changes in the cell composition of the blood of grey seal in different ontogenetic periods. The data indicate that in gray seal pups the development of cell immunity is the most intensive during the first 1.5 months of life. At an age of 3-4 months when the animals start feeding on fish independently, the processes of proliferation and differentiation of lymphoid cells involved in the reactions of specific immunity decreased.

# ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ МИКРОЯДЕР В ЭРИТРОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ СТЕРЛЯДИ *ACIPENSER RUTHENUS* ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ АНАЛОГА КОРТИЗОЛА И ХЕНДЛИНГА

Т.Б. Камшилова\*, Д.В. Микряков, В.Р. Микряков

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок,  
Ярославской обл., \* ktb@ibiw.yaroslavl.ru

Искусственно выращиваемая стерлядь подвергается комплексу рыбоводных действий таких как отлов, сортировка, кратковременное выдерживание на холоде и пересадка. Все эти действия провоцируют стресс-ответ у рыб. Сорные реакции в организме позвоночных животных вызываются гормонами (адреналином и норадренином) и кортизолом (Смит, 1986; Haag Bonga, 1997). Изменения, обусловленные выбросом адреналина и кортизола, происходят менее чем через 1 секунду и длятся от нескольких минут до нескольких часов. Кортизол активизирует изменения менее чем через 1 час и действует порой и в течение нескольких месяцев. В связи с этим в качестве модели для изучения развития стресс-реакции в организме рыб используют инъекции кортизола.

Установлено, что стрессовые воздействия индуцируют генетические изменения в половых и соматических клетках млекопитающих (Ингель и др., Керкис, 1977). Для оценки стабильности генетического аппарата разнотипных рыб как у млекопитающих, так и у рыб, используют микроядерный тест.

Цель работы - определение стабильности генетического аппарата эритроцитов периферической крови стерляди по частоте встречаемости микроядер, с помощью хендлинга и инъекции кортикостероида дексаметазона.

В эксперименте использовали стерлядь со средней массой  $272.5 \pm 10.7$  г и длиной  $37.1 \pm 0.5$  см, выращенную в прудовом хозяйстве «Кадуи» (Вологодская область) сразу после вылова половинка рыб (опытная группа) была парентерально введена синтетическим аналогом природного кортикостероида кортизола - кортизон-фосфатом (КРКА, Novo mesto, Slovenia) в дозе 0,2 мл, или 0,8 мг этого вещества на особь, что соответствует 0,012 мг% эндогенного кортизола при стрессе у рыб. Контрольная группа была подвергнута только хендлингу (отлов и транспортировка). После отлова и инъекции обе группы рыб были доставлены в лабораторию и в течение 8 часов содержались в бассейнах с отстоянной артезианской водой с жесткостью 4.35-5.17 мг/л, температура 16-18°C, концентрация растворенного кислорода 7-8 мг/л.

Для анализа отбирали по 5 контрольных и инъектированных (опыт) рыб. Проба была взята в условиях прудового хозяйства сразу же после отлова (на следующий день, 0 суток), последующие пробы - на 1, 3, 7, 14 и 21 сутки содержания в лаборатории. Препараты-мазки готовили из периферической крови, взятой из хвостовой артерии рыб. Приготовленные мазки фиксировали в 10% забуференном формалине по Романовскому-Гимза и просматривали под иммерсионным микроскопом. Подсчитывали частоту встречаемости эритроцитов с микроядрами (по методу Смит и др. 1986). Подсчет микроядер проводили на 1000 эритроцитов и их процентное содержание (%). Результаты представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений ( $\bar{x} \pm SD$ ). Достоверность различий оценивали методом дисперсионного анализа (ANOVA, LSD-тест,  $p=0.05$ ). Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Excel.

Данные подсчетов частоты встречаемости эритроцитов с микроядрами в периферической крови рыб приведены в таблице.

Таблица.  
Частота встречаемости эритроцитов с микроядрами в периферической крови стерляди

Экспозиция, сут	Общее число рыб	Число рыб с микроядрами	Микроядра, (%)
0	3	0	0
1	5	4	$0.8 \pm 0.4^1$
	5	4	$1.0 \pm 0.6^1$
3	5	5	$1.0 \pm 0.0^1$
	5	3	$1.2 \pm 0.9^1$
7	5	3	$0.8 \pm 0.7^1$
	5	5	$2.0 \pm 0.6^1$
21	4	3	$1.0 \pm 0.8^1$
	4	4	$3.0 \pm 2.1^1$

Примечание: Над чертой – контроль, под чертой – опыт; одинаковые цифры надстрочного указывают на отсутствие достоверных отличий между средними (ANOVA, LSD-тест,  $p=0.05$ ).

Анализ полученных данных показал, что под влиянием аналога кортизола в хендлинга увеличивается число рыб с микроядрами в эритроцитах периферической крови. У контрольных рыб средняя доля эритроцитов с микроядрами варьировала незначительно – от 0.8 до 1.0 %.

Увеличение числа эритроцитов с микроядрами у рыб из опытной группы отмечалось на 7 сутки эксперимента (2%), на 21 сутки эксперимента – до 3 %. В течение всего эксперимента у опытных рыб доля индуцированных микроядер в эритроцитах была заметно выше, чем у контрольных. Однако отличия недостоверны, что связано с высоким уровнем вариабельности данного показателя, особенно у опытных рыб.

Повышенный уровень эритроцитарных клеток с микроядрами у опытной группы рыб можно объяснить понижением эффективности работы иммунной системы, связанным с действием дексаметазона. Известно, что генетические нарушения элиминируются посредством иммунной системы (Ильинских и др., 1987, 1992; Hughes, Hebert, 1991; Al-Sabti, 1992). В то же время показано, что при стрессе происходит угнетение клеточного иммунитета (В. Микряков и др., 2001; Wendelaar Bonga, 1997). Следовательно, в этих условиях может снижаться интенсивность работы систем репарации генетических повреждений и, как следствие, повышаться число aberrантных клеток.

Таким образом, увеличение количества рыб с микроядрами в эритроцитах периферической крови и повышение частоты встречаемости генетически aberrантных клеток свидетельствуют о наличии эффекта дексаметазона в хендлинга. Повышенный уровень клеток с хромосомными aberrациями у опытной группы рыб можно объяснить понижением эффективности работы иммунной системы, связанной с действием гормона.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Бочаров Е.Д. Цитогенетический мониторинг и иммунитет. Новосибирск: Наука, 1987. 255 с.

2. Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н., Ильинских И.Н. Микроядерный тест и мутагенетическая нестабильность. Томск, 1992. 272 с.
3. Ингель Ф.И., Бодягин Д.А., Геворкян Н.М. и др. Модификация психофизиологическим стрессом мутагенных свойств ксенобиотиков // Токсикологический вестник, № 3. С. 5-9.
4. Керксис Ю.Я. Генетические последствия загрязнения окружающей среды. М.: Наука, 1987. С. 37-71.
5. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. и др. Реакция иммунной системы на загрязнение воды токсикантами и закисление воды. М.: Наука, 2001. 126 с.
6. Смит Л.С. Введение в физиологию рыб. М.: Агропромиздат, 1986. 168 с.
7. Al-Sabti K. Monitoring the genotoxicity of radiocontaminants in Swedish lakes by fish micronuclei // Cytobios. 1992. V.70. P. 101.
8. Ellis A.E. Stress and the modulation of defense mechanisms in fish // Stress and Fish. A.D. Wright (ed.). London-N. Y.: Acad. Press., 1981. P. 147-170.
9. Hughes J.B., Hebert A.T. Erythrocyte micronuclei in winter flounder (*Pleuronectes americanus*): results of field surveys during 1980-1988 from Virginia to Nova Scotia and in Long Island Sound // Arch. Environ. Contaminat. Toxicol. 1991. V.20. P. 474.
10. Wendelaar Bonga, S. E. The stress response in fish // Physiol. Rev. 1997. Vol. 77. № 3. 11-625.

**FREQUENCY OF OCCURRENCE OF micronuclei IN erythrocytes of PERIPHERAL BLOOD OF STERILET ACIPENSER RUTHENUS LINNEAUS AFTER INFLUENCE corticosteroid DEXAMETHASONE AND handling**

T.B. Kamshilova, D.V. Mikryakov, V.R. Mikryakov

It was determined that dexamethasone injection causes the increase of erythrocytes level with normal aberrations in peripheral blood of sterlet. Identified changes are part of fish stress response to exposure

# ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ АМУРСКОГО ОСЕТРА *ACIPENSER SCHRENCKI BRANDT, 1869*

В.Н. Кошелев

Хабаровский филиал «Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра» (ФГУП "ХФТИНРО"), Хабаровск, Россия, [scn74@mail.ru](mailto:scn74@mail.ru)

В условиях неблагоприятной экологической ситуации в бассейнах рек, где обитают осетровые, вызывает интерес анализ состояния их органов и тканей. В 1985-1989 гг. у каспийских осетровых были обнаружены дистрофические изменения мышечных волокон, их замещение соединительной и жировой тканями, расщепление и образование очагов некроза (Алтуфьев и др., 1992). Подобные исследования на реке Амуре не проводились. В связи с этим перед нами стояла задача выявить и идентифицировать гистопатологические изменения в поперечнополосатой мышечной ткани (ППМТ) амурского осетра, одного из двух видов осетровых, обитающих в бассейне Амура. Всего в 2007–2009 гг. гистологическими методами были исследованы фрагменты мышечной ткани 26 особей амурского осетра. Обработку микропрепаратов проводили по общепринятым методикам (Ромейс, 1954; Меркулов, 1969).

В результате было установлено, что те или иные нарушения в строении ППМТ амурского осетра отмечены у всех без исключения особей. Наиболее частыми из них были: искривления волокон (изломы, перегибы) (65,4%), расслоение волокон и появление липидных вставок, главным образом в межмышечных пространствах (61,5%). Реже отмечались соединительнотканые включения (30,8%), наличие миофибрилл (30,8%), наличие форменных элементов крови (19,2%) и лимфоидного вещества (7,7%). Тотального распада мышечной ткани, имевшего ранее место у каспийских осетровых (Алтуфьев и др., 1992), не выявлено. В целом отмеченные нарушения можно описать, используя шкалу, разработанную Ю.В. Алтуфьевым с соавторами (1992), как носящие умеренный характер с варьированием у отдельных особей от «слабо выраженной» до «сильно выраженной» патологии. В среднем степень поражения ППМТ составила  $2,4 \pm 0,12$  балла. Это сопоставимо с средней степенью поражения ППМТ русского осетра *Acipenser gueldenstaedti Brandt, in Bonn*, где этот показатель в 1988–1989 гг. варьировал в районе 2,3–2,8 балла. Степень патологии ППМТ амурского осетра не зависит от пола и размеров исследуемых особей, как это было отмечено у белуги *Huso huso* (Linne), севрюги *Acipenser stellatus* (Pallas) и русского осетра в Каспийском бассейне (Алтуфьев и др., 1992).

Исследование мышечной ткани амурского осетра показало наличие ее патологии умеренного характера. Возможно, что выявленные патологические изменения обусловлены ухудшением условий водной среды, как это описано у других осетровых.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтуфьев Ю.В., Романов А.А., Шевелева Н.Н. Гистопатология поперечнополосатой мышечной ткани и печени каспийских осетровых // Вопр. икhtiологии. - 1992. Т.32. Вып. 2. С. 157-171.
2. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. Л.: Медицина, 1969. 423 с.
3. Ромейс Б. Микроскопическая техника. - М.: Изд-во Иностран. лит-ра, 1954. 648 с.

## HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF MUSCULAR TISSUE CONDITION OF AMUR STURGEON *ACIPENSER SCHRENCKI BRANDT, 1869*

V.N. Koshelev

Results of a histological study of Amur sturgeon transversal striated muscle tissue are presented. We reveal some moderate deviations which varied from low-grade to high-grade pathology. We compared our results to a similar data received on sturgeon inhabiting the Caspian Sea and the Volga river. Hypothesis about an anthropogenic character of the deviations was stated. But this statement is to be proved.

# ВЛИЯНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОБИОТИКОВ НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ И ПРОТЕИНАЗ СВЯЗНОЙ ОБОЛОЧКИ КИШЕЧНИКА КАРПА *CYPRINUS CARPIO*

В.В. Кузьмина<sup>1\*</sup>, М.В. Шалыгин<sup>2</sup>, Д.В. Микряков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия  
<sup>2</sup>ГОУ ВПО Ярославская государственная сельскохозяйственная академия,  
Ярославль, Россия

\* vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru

Поражение рыб подвижными аэромонадами приносит значительный ущерб рыбному хозяйству (Рудиков, Грищенко, 1985; Осетрова, 1978). Для борьбы с аэромонадами используются препараты, обладающие антибактериальной активностью, а также неспецифическая иммунопрофилактика с применением антибиотиков. Исследование влияния антибактериальных и пробиотических препаратов на иммунный статус рыб показало, что препарат Антибак 100, основанный на основе ципрофлоксацина, сильнее стимулирует формирование специфического иммунитета у рыб по сравнению с пробиотиком на основе *S. subtilis*, СУБ-ПРО (Гаврилин и др., 2010). На состояние иммунной системы рыб особое влияние оказывает трофический статус рыб. Так, у голодающих рыб, отличающихся более низкой упитанностью и более низким содержанием белка в сыворотке крови по сравнению с питающимися рыбами, интенсивность синтеза антител снижается в 8,4 раза (Микряков, 1991). Вместе с тем сведения о влиянии антибактериальных препаратов на активность ферментов, реализующих гидролиз основных пластических и энергетических компонентов пищи рыб и тем самым обеспечивающих начальные этапы ассимиляции пищи, отсутствуют.

Цель работы - изучение влияния препаратов Антибак 100 и СУБ-ПРО на ферментативную активность (ОАА) и протеолитическую активность (ПА) слизистой оболочки кишечника карпа *Cyprinus carpio* L.

Работа проведена в течение 2010 г. Исследовали клинически здоровых карпов массой 150±10 г, привезенных из ООО «Рыбхоз Нарские острова» Ярославской обл. Рыб в течение 21 сут. содержали в бассейне, затем - в 200 л емкостях с принудительной аэрацией и механической фильтрацией воды при температуре 18±1,5 °С. Для изучения влияния антигена на ОАА и ПА рыб предварительно иммунизировали (внутрибрюшинно вводили 1 млрд. микробных тел культуры *Aeromonas hydrophila* на особь). Рыб (по 5 экз.) исследовали на 3, 7 и 14 сут. Одновременно формировали 6 равноценных групп (по 15 экз. в каждой) и группу из 5 экз. рыб для определения изначального уровня ферментативной активности (группа К). Введение бактериальной суспензии не вызвало появления характерной для аэромонады клинической картины и гибели рыб, поэтому оценивать его как вакцинацию (Lallier et al., 1981). Рыб группы №1, массой 1,5 г/кг живой массы в сутки в течение 5 сут. На 1, 3 и 7 сут. отбирали по 5 экз. рыб для исследования ОАА и ПА. Рыб группы №2 исследовали аналогично группе №1 перед началом кормления пищей, содержащей Антибак 100 (согласно инструкции), а рыб группы №3 - сразу после начала кормления. Кишечники от 5 экз. рыб из группы №2 отбирали на 1, 3 и 7 сут. после окончания кормления, а рыб из группы №3 на 3 и 7 сут. после кормления и ПА. Аналогичным образом исследовали рыб из групп № 4, 5 и 6. Отличие - в составе корма, содержащего СУБ-ПРО. Препарат также вводили согласно инструкции (100 г препарата на тонну комбикорма в течение 5 сут,

норма кормления - 5% от общей живой массы). Комбикорма с преобладающей изготавливали в лабораторных условиях на основе полноценного гранулированного корма для декоративных прудовых рыб Tetra Pond. На гранулы шло желированную суспензию препарата с последующим их подсушиванием. ОАА (активность  $\alpha$ -амилазы, КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы, КФ 3.2.1.3 и ферментов группы мальтаз, КФ 3.2.1.20) определяли по приросту гексоз при помощи метода модификации А.М. Уголева и Н.Н. Иезуитовой (1969). ПА (преимущественно активность трипсина, КФ 3.4.21.4) оценивали по увеличению концентрации тирозина по методу Ансона (Anson, 1938) в некоторой модификации. В качестве субстратов использовали 1% растворы растворимого крахмала (рН 7.4) и глюкозы (рН 8.5). Инкубацию гомогенатов и субстратов осуществляли при температуре 20°C в течение 30 мин при непрерывном перемешивании. Об уровне ферментативной активности судили по приросту продуктов реакции за 1 мин инкубации субстрата ферментативно активного препарата с учетом фона (количество соответствующих компонентов в исходном гомогенате) в расчете на 1 г сырой массы ткани (мкмоль/г·мин). Результаты исследований обрабатывали статистически при помощи стандартного пакета программ (приложение Statistica) с использованием t-теста при уровне значимости 0.05.

**Гликозидазы.** Уровень ОАА слизистой оболочки кишечника интактных карпов до начала формирования опытных групп (группа К) соответствовал  $2.9 \pm 0.2$  мкмоль/г·мин. У рыб, иммунизированных *Aeromonas hydrophila*, на 3-и сут ОАА достоверно не отличается от такового у интактных рыб. На 7-е сут наблюдается увеличение уровня ОАА до  $7.6 \pm 0.7$  мкмоль/г·мин (на 62%), достоверное по сравнению с интактными рыбами. Через 14 сут ОАА снижается в 6 раз. Результаты изучения уровня ОАА слизистой оболочки кишечника карпов, пища которых содержала антибактериальный препарат и пробиотик, представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Динамика общей амилолитической активности слизистой оболочки кишечника у рыб контрольных (№ 1 и 4) групп, а также зараженных *Aeromonas hydrophila* и подвергавшихся действию Антибака 100 до (№ 2) и после (№ 3) кормления и СУБ-ПРО до (№ 5) и после (№ 6) кормления

Группа	Общая амилолитическая активность, мкмоль/г·мин		
	1 сут	3 сут	7 сут
Антибак 100, №1	$3.3 \pm 0.2$	$2.7 \pm 0.5$	-
Антибак 100, №2	$3.2 \pm 0.3$	$0.5 \pm 0.1^*$	$1.4 \pm 0.3$
Антибак 100, №3	-	$1.1 \pm 0.1^*$	$1.1 \pm 0.1$
СУБ-ПРО, №4	$0.7 \pm 0.2$	$0.4 \pm 0.1$	$2.0 \pm 0.3$
СУБ-ПРО, №5	$0.8 \pm 0.2$	$0.6 \pm 0.2$	$0.5 \pm 0.1^*$
СУБ-ПРО, №6	-	$1.2 \pm 0.2^*$	$1.6 \pm 0.4$

Примечание: \* различия между опытом контролем достоверны.

У интактных рыб уровень ОАА соответствовал  $3.7 \pm 0.7$  мкмоль/г·мин. Уровень ОАА у рыб зараженных и до или после кормления на 1-е и 7-е сут не влиянием препарата Антибак 100 достоверно не отличается от контроля. Однако на 3-и сут уровень ферментативной активности достоверно снижается, особенно резко у рыб 2-й группы (на 81.5%). У рыб 3-й группы ферментативная активность уменьшается только на 59.3%. На 7-е сут у рыб 2-й группы наблюдается увеличение ферментативной активности по сравнению с предыдущим сроком. Однако по сравнению с интактными рыбами ОАА достоверно снижается в обоих случаях.

В опытах по влиянию на ферментативную активность препарата СУБ-ПРО уровень ОАА у интактных рыб соответствовал  $0.8 \pm 0.3$  мкмоль/г·мин. Уровень ОАА у иммунизированных по той же схеме, под влиянием этого препарата на 1-е сут достоверно не отличается ни от контроля, ни от таковой у интактных рыб. На 3-е сут уровень ферментативной активности у рыб 5-й группы снижается по сравнению с таковой у интактных рыб, но остается неизменным, у рыб 6-й группы достоверно увеличивается на 200% по сравнению с контролем. На 7-е сут наблюдается резкий подъем значений в контроле, достоверное уменьшение ферментативной активности у рыб 5-й группы и незначительное – у рыб 6-й группы. Следует отметить, что данные, полученные на 3 сут после начала эксперимента, позволяют сделать важный вывод – у рыб, которых иммунизировали до кормления, в случае обоих препаратов уровень ОАА подавляется в меньшей степени по сравнению с таковой у рыб, иммунизированных до кормления.

**Протеиназы.** Уровень ПА слизистой оболочки кишечника у интактных рыб соответствовал  $8.8 \pm 2.6$  мкмоль/г·мин. У рыб, иммунизированных препаратом *Aeromonas hydrophila*, уровень ПА через 3, 7 и 14 сут снизился до  $7.4 \pm 2.7$ ,  $4.7 \pm 0.3$  и  $1.3$  мкмоль/г·мин (на 15.7, 46.0 и 58.3% соответственно). Результаты изучения уровня ПА слизистой оболочки кишечника карпов, пища которых содержала антибактериальный препарат и пробиотик, представлены в табл. 2.

Таблица 2.

Динамика активности протеиназ слизистой оболочки кишечника у рыб у контрольных (№ 1 и 4) групп, а также зараженных *Aeromonas hydrophila* и подвергшихся действию Антибак 100 до (№ 2) и после (№ 3) кормления или СУБ-ПРО до (№ 5) и после (№ 6) кормления.

Группа	Протеолитическая активность, мкмоль/г·мин		
	1 сут	3 сут	7 сут
Антибак 100, №1	$13.06 \pm 3.77$	$14.73 \pm 3.80$	$10.32 \pm 2.53$
Антибак 100, №2	$14.93 \pm 1.63^a$	$19.43 \pm 0.60^a$	$17.47 \pm 1.03^{a,b}$
Антибак 100, №3	-	$13.40 \pm 3.42$	$13.48 \pm 1.74^a$
СУБ-ПРО, №4	$2.12 \pm 0.81^a$	$5.41 \pm 1.17$	$0.58 \pm 0.25^a$
СУБ-ПРО, №5	$3.33 \pm 1.72$	$6.53 \pm 1.63$	$1.87 \pm 0.65^{a,b}$
СУБ-ПРО, №6	-	$2.62 \pm 0.39^b$	$1.83 \pm 0.80^{a,b}$

Примечание: а различия ПА между опытом и интактными рыбами, б различия ПА между опытом и контрольными рыбами достоверны.

У интактных особей уровень ПА соответствовал  $7.3 \pm 1.5$  мкмоль/г·мин. У рыб, пища которых содержала антибактериальные препараты, уровень ПА достоверно повышается по сравнению с интактными особями. У карпов, подвергшихся до кормления, под влиянием препарата Антибак 100 наблюдается достоверное увеличение ПА по сравнению с интактными рыбами. Однако по сравнению с контролем уровень ПА у рыб, зараженных до или после кормления на 3 сут, под влиянием препарата Антибак 100 в большинстве случаев достоверно не повышается (исключение – группа №2, 7-е сут). На 3-и сут уровень ферментативной активности у рыб 2-й группы возрастает на 31.9%. У рыб 3-й группы в этот срок наблюдается ферментативная активность незначительно уменьшается. На 7-е сут у карпов 2-й группы, несмотря на уменьшение ферментативной активности по сравнению с контролем, наблюдается достоверное увеличение ПА по сравнению с контролем. У рыб 3-й группы ПА сохраняется на прежнем уровне, причем ее изменения достоверны по отношению к интактным особям.



Уровень ПА у рыб, иммунизированных по той же схеме, под воздействием препарата СУБ-ПРО на 1-е сут также достоверно не отличается от контроля. На 3-е сут уровень ферментативной активности у рыб 5-й группы увеличивается в 1.8 раза, у рыб 6-й группы достоверно уменьшается в 2.1 раза по сравнению с контролем. На 7-е сут наблюдается резкое достоверное снижение ПА в контроле. При этом уровень ПА у рыб 5-й и 6-й групп достоверно возрастает.

Данные, полученные на 3 сут после начала эксперимента, позволяют прийти к заключению, что у рыб, иммунизированных до кормления, в случае обострения препа­ратов уровень ПА повышается по сравнению с таковым особей, иммунизированных после кормления.

Сопоставление ферментативной активности у рыб контрольной группы и у рыб, получавших препараты СУБ-ПРО и Антибак 100, не позволяет прийти к заключению об их положительном влиянии на уровень активности гликозидаз участвующих в гидролизе полисахаридов. Отчетливо проявляются лишь различия в характере эффектов в течение эксперимента. Так, на 7-е сут в случае Антибак 100 несколько больший уровень ферментативной активности выявлен при иммунизации до кормления рыб, в случае СУБ-ПРО, напротив, после кормления. Однако особого внимания заслуживает тот факт, что у контрольных рыб, получавших Антибак 100, в течение 1 и 3-х сут уровень амилолитической активности был в 4.7 и 6.8 раз выше, чем у контрольных рыб, получавших СУБ-ПРО. Этот факт представляется парадоксальным, поскольку изначально предполагалось, что ципрофлоксацин может подавлять синтез ферментов, синтезируемых в поджелудочной железе и слизистой оболочке кишечника рыб, а СУБ-ПРО, напротив, должен увеличивать их активность за счет ферментов, синтезируемых *Bacillus subtilis*. Действительно, согласно общепринятым представлениям, механизм действия пробиотика заключается в колонизации кишечника рыбы микроорганизмами, которые повышают активность ферментов, функционирующих в кишечнике рыб. Вместе с тем известно, что бактерии р. *Bacillus* не колонизируют кишечник рыб и их концентрация должна постоянно поддерживаться (Бурлаченко, 2008). Не исключено, что снижение уровня ОАА у рыб, получавших в течение 3-х сут СУБ-ПРО, связано с тем, что протеины, синтезируемые пищеварительной системой рыб, подавляют активность ферментов, синтезируемых *Bacillus subtilis*.

Особо следует отметить, что у карпов всех групп, получавших СУБ-ПРО, в отличие от рыб, получавших Антибак 100, уровень ПА значительно снижается по сравнению с интактными особями. Сопоставление ферментативной активности у рыб контрольной группы и у рыб, получавших указанные препараты, позволяет прийти к заключению о положительном влиянии на гидролиз белковых компонентов пищи препарата Антибак 100 и резко отрицательном - СУБ-ПРО. Действительно, у контрольных рыб, получавших Антибак 100, уровень протеолитической активности был на 1, 3 и 7-е сут выше соответственно в 6.2, 8.2 и 17.8 раз, чем у контрольных рыб, получавших СУБ-ПРО. Этот факт по той же причине представляется еще более парадоксальным, чем в случае с гликозидазами. Однако при исследовании пробы оказалось, что более эффективно введение антигена до кормления рыб. Этот факт дает возможность предположить, что ципрофлоксацин, поступающий в просвет кишки, имеет кинетические преимущества при преодолении эпителиального барьера. В этом случае препарат быстрее достигает кровеносных сосудов и рецепторов нервной системы, расположенных в толще слизистой оболочки кишечника. При этом возможно как прямое воздействие препарата на синтетический аппарат адинарных клеток, так и его воздействие, опосредованное через иммунную систему. Также не исключено, что ципрофлоксацин избирательно стимулирует синтез протеиназ. Важно отметить, что эти данные хорошо согласуются с результатами иммунологических исследований. Так, уровень БАСК у рыб

Антибак 100, во все сроки наблюдения был достоверно выше показателя у рыб из группы, получавшей СУБ-ПРО (Гаврилиин и др.). Поскольку гликозидазы играют меньшую роль в ферментативном гидролизе пищи по сравнению с протеиназами (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005), то по совместному существованию ферментов макро- и микроорганизмов, гликозидазы, проходя на уровне протеиназ, в то время как гликозидазы, будучи крупными молекулами, уничтожались протеиназами рыб. Таким образом, под действием препаратов Антибак 100 и СУБ-ПРО уровень АА слизистой оболочки кишечника карпа снижается по сравнению с таковым в группах иммунизированных *Aeromonas hydrophila*, но не получавших эти препараты. Введение антигена после кормления рыб отрицательное влияние указанных препаратов на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника карпа является слабее, чем выявляемое до кормления рыб. На ПА слизистой оболочки кишечника карпа Антибак 100, напротив, оказывает стимулирующее влияние, в то время как СУБ-ПРО как и в случае гликозидаз, - отрицательное. Протеиназы, продуцируемые поджелудочной железой рыб, по-видимому, разрушают гликозидазы, синтезируемые *Bacillus subtilis*. Полученные результаты необходимо учитывать при разработке методов и выборе средств борьбы с бактериозами у рыб, в частности, с аэромонозом.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурлаченко И.В. Актуальные вопросы безопасности комбикормов в аквакультуре рыб. Докл. ВНИРО. 2008. 183 с.
2. Гаврилиин К.В., Микряков Д.В., Силкина Н.И., Суворова Т.А. Влияние бактериальных препаратов и пробиотиков на гуморальные факторы неспецифического иммунитета карпа *Cyprinus carpio* // Ветеринария. 2010. № 6. С. 15-18.
3. Кузьмина В.В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. М. Наука, 2005.
4. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Докл. ИБВВ РАН, 1991. 153 с.
5. Рудиков Н.И., Грищенко Л.И. Микрофлора и бактериальные болезни рыб // Биология (Итоги науки и техники), М.: ВИНТИ, 1985. Т.1. С. 93-160.
6. Справочник по болезням рыб (под ред. Осетрова В.С.). М.: Колос, 1978. 350 с.
7. Уголев А.М., Иезутова Н.Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов. Л.: Наука. С. 169-173.
8. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеоиздат. 1993. 238 с.
9. Anson M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J.Gen. 1938. V. 22. P. 79-83.
10. Lallier R., Mittal K.R., Leblanc D., La Londe G., Oliver G. Rapid methods for the identification of virulent and non-virulent *Aeromonas hydrophila* strains // Serodiagn. vaccines. 1981. P. 119-123.

### EFFECT OF ANTIBACTERIAL PREPARATIONS AND PROBIOTICS ON GLYCOSIDASE AND PROTEINASE ACTIVITY OF INTESTINAL MUCOSA IN CARP *CYPRINUS CARPIO*

V.V. Kuz'mina, M.V. Shalygin, D.V. Mikryakov  
 The effect of Antibak 100 for cyprinid fishes and SUB-PRO on intestinal mucosa amilolytic (AA) and pepsin (PA) activity in carp *Cyprinus carpio* has been investigated. The level of AA decreases under impact of Antibak 100 and SUB-PRO, in the groups of antigen injected fishes which did not receive these substances with the same time. The level of PA, on the contrary, increases under impact of Antibak 100. The level of PA under impact of SUB-PRO decreases too. Both effects are observed in the groups of control and antigen injected fishes. It is shown that pancreatic proteinases destroy the glycosidases of *Bacillus subtilis* in intestinal cavity. The adaptations of enzymes of fish and microflora to the co-existence into enteral medium in the most degree realized in the food of the majority of fish species dominate proteins.

# К ВОПРОСУ О ПАЗАРИТО-ХОЗЯИИИИИИИ ОИНОШЕНИИИИ В СИСТЕМАХ ПИАВКИ-РЫБА

Л.Н. Лапкина

Институт биологии внутренних вод им И.Д. Папанина, Борок, Россия  
lapkina@ibiw.yaroslavl.ru

Пресноводные пиявки семейства рыбы, согласно названию, паразитируют на рыбах, и лишь единичные их виды включают дополнительно в число хозяев бокоплавов или земноводных. Между рыбьими пиявками и рыбами существуют две основные модели отношений: постоянный паразитизм, присущий обычно морским формам пиявок, и временный, к которому склонны пресноводные виды. Постоянные (стационарные) эктопаразиты кормятся соками хозяина, спариваются на нем, крепко к нему свои коконы. Временные эктопаразиты используют рыб для питания и после насыщения покидают их, в промежутках между кормлениями ведут свободный образ жизни (Лукин, 1976).

Стационарные пиявки являются обычно стенофагами, то есть узко специализированы: *Piscicola respirans* Tröschel, 1850 инвазируют форель, *Piscicola fasciata* Kollar, 1842 - сома, *Cystobranchnus mammillatus* (Malm, 1863) - налима. В этот ряд В.М. Эпштейн (1987) ставит пиявку *Limnotrachelobdella sinensis* (Blanchard 1896), паразитирующую на сазанах в пресных водоемах Дальнего Востока (но иногда обнаруживаемую на карасях) и *Limnotrachelobdella taimeni* (Epstein, 1957), предположительно постоянного паразита тайменя. Остальные рыбы пиявки, обитающие в пресных водах нашей страны, являются временными эктопаразитами и обычно они полифаги (жизненные циклы и экология некоторых видов слабо изучены).

Цель работы: высказать некоторые соображения и предположения (возможно дискуссионные) об особенностях паразито-хозяйинных отношений в системах пиявки - рыба, компонентами которых с одной стороны являются пиявки *Piscicola geometra* (L) и *Caspiobdella fadejevi* (Epstein, 1961), наиболее распространенные в водохранилищах Волги и, в частности, в Рыбинском водохранилище, а с другой стороны - разные виды рыб. Представляется интересным обсудить приспособительное поведение этих червей, сформировавшееся в процессе исторического становления паразито-хозяйинных отношений.

По сравнению с выше перечисленными пиявками круг хозяев у *C. fadejevi* широк, хотя в основном ограничен видами подсем. голавлеподобные (сем карповые из отряда карпообразные), но излюбленным хозяином во всех водоемах их обитания является лещ.

*P. geometra* - типичный полифаг, ее хозяева в водохранилищах Волги - около 30 видов рыб, принадлежащих разным семействам, в том числе карповым. В Рыбинском водохранилище эта пиявка в качестве хозяев предпочитает окуня, щуку, судака, но часто ее можно встретить и на леще совместно с *C. fadejevi*, а также на других мирных видах рыб. Факт использования пиявкой *P. geometra* обширного спектра хозяев можно связывать с тем, что она - транспалеаркт и успешно адаптировалась в процессе исторического развития к различным экологическим условиям, в том числе различным хозяевам.

Все другие рыбы пиявки, обитающие в пресноводных водоемах нашей страны, обладают ограниченными ареалами (Лукин 1976). Так, *C. fadejevi* - каспийский вид (Эпштейн, 1961), относительно недавно проникший в Волгу из притока Азово-Черноморского бассейна (Эпштейн, Лапкина, 1980), вид-вселенец и

Водохранилищах Верхней Волги (Лапкина и др. 2001). За 30-40 лет он стал доминирующим здесь наряду с *P. geometra*, несмотря на свою более узкую пищевую специализацию. Успешной интродукции *C. fadejewi* в данные водоемы способствовал ее основной хозяин - лещ, который с преобразованием Волги в каскад водохранилищ нашел в них весьма подходящие условия для жизни и размножения, став самым массовым видом рыб.

Определения «наиболее распространенные, массовые», которые справедливы для рыб - основных хозяев пиявок и самих пиявок - *P. geometra* и *C. fadejewi*, подразумевают прочность и надежное функционирование образованных ими систем паразит-хозяин. Однако в местах локального антропогенного загрязнения водоемов (вблизи крупных городов) стабильность систем нарушается, как и достигнутые состояния равновесия в них. Происходит резкое снижение инвазии рыб данными актопаразитами (Лапкина и др., 2002).

Распределение *C. fadejewi* в пределах популяции хозяина перерасеянное, агрегированное, наряду с лещами, свободными от *C. fadejewi*, встречаются особи, интенсивность инвазии которых доходит до 1-2 сотен пиявок. Одна из причин существования агрегаций объясняется различной вероятностью заражения рыб разных размерных категорий: половозрелые и близкие к этому состоянию пиявки явно предпочитают крупную, товарную рыбу мелкой (различия достоверны), а также самок самцам (различия недостоверны) (Свирицкий и др., 2002).

Паразитологические исследования с уклоном изучения паразито-хозяинных отношений доказали, что жизненные циклы многих паразитов синхронизированы с жизненными циклами их хозяев. Это может быть связано с тем, что компоненты системы одинаково реагируют на изменения ряда природных факторов, особенно температурных; возможно и прямое воздействие гормонального фона хозяина на паразита (Кеннеди, 1978). Похоже, что в рассматриваемых системах жизненные циклы пиявок более (*P. geometra*) и менее (*C. fadejewi*) синхронизированы с жизненными циклами рыб. Пик размножения у обоих видов пиявок в Рыбинском водохранилище в целом приурочен к нерестовому периоду большинства их видов, то есть к весне и первой половине лета, как, впрочем, и у большинства гидробионтов. При этом обнаруживаются как сходство, так и различия в функционировании основных систем, образуемых *P. geometra* с хищной рыбой (лещ, окунем), и системами, сложившимися между *C. fadejewi* и мирными рыбами (лещ, плотва, и др. голавлеподобные).

Выборка червей из популяции *P. geometra*, снятых с рыб в марте-апреле, содержит 65-70 % половозрелых особей с индивидуальной массой 3-9 мг, в мае - уже 95%, с массой особей 6-30 мг. При этом показатели инвазии рыб пиявками постепенно снижаются, а показатели плодовитости пиявок увеличиваются и достигают своего максимума - 1400 коконов от 100 особей за цикл размножения. К началу июня родительское поколение пиявок отмирает (Лапкина, 1986).

В популяции *C. fadejewi* в апреле, мае, июне-июле процент половозрелых пиявок составляет соответственно 86 %, 80, 82 и 96 %. В первой половине лета отмечается наличие наиболее крупных особей массой от 5,5 мг до 16 мг и максимальная плодовитость - около 1900 коконов от 100 особей. Активное размножение пиявки продолжается до середины или конца июля, но совсем не прекращается, как у *P. geometra*, а продолжается в гораздо меньшем масштабе все второе время года, а при переносе выловленных червей в лабораторные условия - круглый год. Половозрелые черви встречаются в ее популяции в любом месяце, хотя интенсивность сказывается на их процентном отношении в выборке, индивидуальной массе, плодовитости. (Лапкина, 1986).

Нерест хищных рыб начинается несколько раньше, чем у мирных рыб - лещ, плотвы и некоторых других. Происходит он при более низких температурах: у леща - при 3-6°C, у окуня - в диапазоне от 7-8°C до 15°C; у судака - начиная с 14°C, всегда в водах, богатых кислородом. Икрометание у леща происходит при температуре воды 12-15°C и растянуто во времени; до середины июня достигают синец; в июне, июле - лещ, при температуре воды 19-20°C (Расс и др., 1983). Икра, при таких температурах эмбриональный период у *P. geometra* продолжается 15-16 суток, у *C. fadejewi* - 25-26 суток. Пиявки обоих видов начинают откладывать коконы при 6-8°C, но оптимальными для их размножения являются более высокие температуры - 17-23°C (Лапкина, 1986).

Анализ размерных характеристик пиявок свидетельствует, что в водохранилище присутствуют: весенняя генерация *P. geometra* и одновременно несколько генераций *C. fadejewi* - весенних, летних, осенних. В отличие от *C. fadejewi* пиявки *P. geometra*, снятые с рыб осенью и зимой, помещенные в лабораторные условия, не размножаются. Инвазия рыб этой пиявкой носит ярко выраженный сезонный характер. Она максимальна зимой, а летом, после отмытия родительского поколения, товарная рыба свободна от *P. geometra* (Лапкина, 1986).

Синхронизация жизненного цикла популяции *P. geometra* с циклом жизни ее предпочитаемых хозяев достаточно хорошо прослеживается. Такое же совпадение характерно для большей части популяции *C. fadejewi*, но не всей: период размножения в водоеме у нее растянут практически на все теплое время года, то есть выходит за временные рамки активного нереста рыб. Хотя нельзя не заметить, что и у рыб-хозяев этой пиявки нерест также растянут больше во времени, чем у рыб-хозяев *P. geometra*. Возможно, жизнь обоих видов пиявок и в большей мере у *P. geometra* подвержена также дополнительной регуляции гормональным фактом хозяина (предположение, требующее экспериментальной проверки).

Помимо жизненных циклов, совпадают места рыбных нерестиц с излюбленными местами откладывания пиявками коконов. Это биотопы, содержащие высшую водную, в том числе прошлогоднюю растительность. Здесь половозрелые пиявки, доставленные нерестящейся рыбой, дружно ее покидают, приступают к спариванию и откладыванию коконов на растительный субстрат. Вышедшая из яиц молодь устремляется на личинок, мальков, позже - на сеголетков, ювенильных рыб, то есть инвазирует особой новой генерации хозяев.

Пиявки - постоянные эктопаразиты рыб имеют общие отличительные признаки от пиявок временных эктопаразитов рыб, а именно для них характерны: большая задняя присоска для надежной фиксации к хозяину, глаза парей редуцированы, окраска покровов блеклая (Лукин, 1976). Рассматриваемые пиявки пиявки являются временными паразитами, но и их морфология, как и поведение, также адаптированы к образу жизни хозяина.

Пиявка *C. fadejewi* по своим морфологическим показателям мелкий вид. Она имеет маленькую заднюю присоску, чуть больше или равную наибольшей ширине тела, и по этому показателю, как и по длине тела, уступает *P. geometra*. Поскольку благодаря более развитой задней присоске, которая в среднем в 1.5 раза больше размеров ее тела, лучше плавает, увереннее передвигается по субстрату и к хозяину, надежнее крепится к нему, что важно, имея таких хозяев как щука, окунь, судак. Это хищные, подвижные виды, способные к быстрым, резким реакциям и молниеносным броскам на жертву.

Отыскать хозяина и удержаться на нем в момент кормления пиявки и *C. fadejewi*, даже ее вылупившейся молодежи, несмотря на малую присоску и слабое плавание. Тем более, что первого хозяина она часто обретает среди неполовозрелых

решенных к травянистому субстрату личинок рыб. Для многих карповых такой вид в развитии характерен, и хотя продолжается он всего около 2 суток, но с тем, что свойственен лещам, плотве, линю, густере, уклейке и т.д., то в нем достаточно растянут. У некоторых из этих рыб нерест порционный и длится около 2 месяца (Расс и др., 1983). Кроме того, на ранних этапах онтогенеза пиявок способны к инвазии личинок и мальков часто не тех видов, что делают их взрослые особи (Лапкина и др., 2002).

Для рыб на ранних личиночных этапах онтогенеза инвазия молодью пиявок генна, даже если ограничивается 1 особью. Непродолжительный контакт с паразитом (мисее часа) заканчивается гибелью личинки. Правда, для рыбной ловли это относительно небольшой урон. Например, особь леща выметывает от 0 до 150000 икринок (Расс и др., 1983), что на 3 порядка больше того потомства, способно оставить 1 пиявка *C. fadejewi* за свою жизнь, осуществив около 5 раз размножения (Лапкина, 1986).

Обе пиявки образуют в процессе жизни несколько раз новые системы с червей и дополнительно еще 3-5 контактов в репродуктивном периоде. В это время их пищевые потребности значительно возрастают, как и требования к виду и месту локализации на нем – пиявки собираются в ротовой и жаберной полости взрослых рыб (Лапкина и др., 2002).

Стационарный паразитизм, когда вся жизнь пиявки проходит на одном хозяине, энергетически выгоден. Черви не теряют времени и энергии на поиск нового хозяина, избегая тем самым множества причин гибели. Достигнув половой зрелости, здесь же на хозяине находят партнера для спаривания, а часто и место для откладки коконов, сберегая энергетические ресурсы организма для увеличения числа потомства.

У временных паразитов *P. geometra* и *C. fadejewi* каждое кормление на хозяине заканчивается уходом с него, поисками укрытия, а у половозрелых особей – поиском субстрата для откладывания коконов. Их молодь появляется на свет в водной среде, подобно свободно живущим хищным пиявкам, а попав впервые на нового хозяина и насытившись, тут же покидает ее, отказываясь тем самым от стационарного образа жизни и его выше оговоренных плюсов. Чем же может компенсироваться у пиявок утрата постоянной тесной связи с хозяином?

Вероятно, это – сведение к минимуму воздействия на паразита иммунной системы хозяина, важен также и температурный фактор. Кокконы откладываются в наиболее прогретаемой полосе водоема, что значительно укорачивает эмбриональный период развития червей и тем повышает процент их выживания. Например, у *C. fadejewi* он сокращается с 86-90 суток при 6-8°C до 19 суток при 26°C (Лапкина, 1986). Кроме того, пиявочная молодь остается в прибрежье и кормится на той же генерации рыб, что, вероятно, более адекватно для нее и предпочтительнее, чем пищевая субстанция взрослого хозяина. Покидая малька после насыщения, пиявки увеличивают шансы сохранения жизни ему и себе: повторный забор крови не губит хозяина в ранний период его онтогенеза; паразит же избавляется от необходимости быть проглоченным вместе с хозяином хищной рыбой, птицей, насекомым.

Поводов для эволюционного закрепления стационарного и временного паразитизма пиявок наверняка больше перечисленных. Они связаны не только с физиологией и биохимией червей и хозяина, что сформировались в процессе длительных взаимных адаптаций на протяжении исторического развития животных между ними. Также множественны и не познаны причины, которые

делают одних рыб предпочитаемыми хозяевами пиявок, других - совсем не привлекательными. Естественно предположить, что для пиявок не различия в показателях крови рыб – межвидовые, внутривидовые (половые). Время свертываемости крови (в сек) у карпа, леща, густеры, окуня и судака, приведенные в справочнике по физиологии рыб за 1986 г. положительно коррелируют с частотой встречаемости *S. fadejewi* в природе у леща, плотве, судаке, окуне. У хищных видов рыб скорость свертываемости крови примерно в 2-5 раз превышает таковую у мирных рыб и, возможно, это способствует их большей резистентности к инвазии пиявками *S. fadejewi*, которая имеет единственный и скорее всего случайный характер.

В заключение отметим, что отношения, сложившиеся в рассматриваемых системах паразит-хозяин между пиявками и рыбами, имеют много общего. *P. geometra* и *S. fadejewi* не имеют столь узкой пищевой специализации, их стационарные пиявки, спектр их хозяев достаточно широк; распределение в популяции рыб агрегированное; паразитирование – временное; размножение полициклически, каждому циклу размножения предшествует кровососание хозяина; половозрелые особи требовательны к виду хозяина, его возрасту, к полу, встречаются на товарной рыбе; пиявочная молодежь инвазирует особей своей генерации рыб, менее требовательна к ее виду.

Различия касаются спектра хозяев: он уже у *S. fadejewi* и много шире у *P. geometra*, инвазия товарных рыб *S. fadejewi* круглогодичная, у *Piscicola geometra* носит ярко выраженный сезонный характер и более жестко синхронизирована с жизненным циклом рыб.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кеннеди К. Экологическая паразитология. 1978. Издательство «Мир». 230 с.
2. Лапкина Л.Н. Биолого-экологические особенности рыбных пиявок *Caspiobdella fadejewi* (Erstein) и *Piscicola geometra* L. // Биология и экология водных организмов. Л.: Наука. 1986. С.195-207.
3. Лапкина Л.Н., Сви́рский А.М., Жарикова Т.И. Пиявки *Caspiobdella fadejewi* (Erstein, 1961) и *Acipenserobdella volgensis* (Zykoff, 1903) - вселенцы в водохранилища Верхней и Средней Волги // Американо-российский симпозиум по инвазионным видам. 27-31 августа 2001 г. Тезисы докладов Борок, Россия. С. 108-111.
4. Лапкина Л.Н., Жарикова Т.И., Сви́рский А.М. Зараженность рыб пиявками (сем. Piscicolidae) в волжских водохранилищах. Паразитология. 2002. Т. 36. Вып. 2. С. 132-139.
5. Лапкина Л.Н., Степанова М.А., Сви́рский А.М. Выбор хозяина рыбными пиявками *Piscicola geometra* L. и *Caspiobdella fadejewi* (Erstein) в природе и эксперименте // Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем востоке. Материалы I межрегиональной научной конференции, посвященной памяти профессора А.А. Мозгового. Новосибирск 8-10 октября 2002. Новосибирск: Издательская компания Лада. 2002. С. 113-116.
6. Лукин Е.И. Фауна СССР. Пиявки. Л.: Наука, 1976. 484 с.
7. Сви́рский А.М., Лапкина Л.Н., Степанова М.А. Распределение пиявки *Caspiobdella fadejewi* (Erstein) в популяции леща Рыбинского водохранилища // Паразиты рыб: современные аспекты изучения. Конф. посвящ. памяти д.б.н., проф. Б.И.Купермана. Борок, 8-22 августа 2003. Тез. докл. Борок, 2003. С. 48.
8. Расс Т.С., Линдберг Г.У. Костистые рыбы (Teleostei) // Жизнь животных. Т. 4. С. 100-517.
9. Эпштейн В.М. Новый вид рыбьей пиявки *Piscicola fadejewi* n.sp. і деякі питання щодо її походження // Діп. АН УРСР. 1961. № 12. С. 1644-1648.
10. Эпштейн В.М. Тип Кольчатые черви – Annelida // Определитель пресноводных рыб фауны СССР. Л.: Наука. 1987. Т. 3. С.340-373.

11. Эпштейн В.М., Лапкина Л.Н. Новые сведения о биологии и географическом  
распространении *Caspiobdella fadejewi* (Epstein) // Тез. докл. IX конф. Украинск. паразит. общ-ва.  
116-117.

## ON PARASITE-HOST RELATIONS IN THE SYSTEM LEECHES-FISH

L.N. Lapkina

The object of the study is different parasite-host systems. One of the components of such systems is two leeches (*Caspiobdella fadejewi* и *Piscicola geometra*), another is different fish species. The relationships parasite and host in various systems have both similarity and specific features.



# СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИРОДНОЙ ОЧАГОВОСТИ САПРОНОВОЗ В ГИДРОЭКОСИСТЕМЕ ВОЛГО-КАСПИЙСКОГО БАССЕЙНА

Л.В. Ларцева<sup>1</sup>, О.В. Обухова<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Астраханский государственный университет

<sup>2</sup> Астраханский государственный технический университет  
г. Астрахань, Россия, \* obuhova-ov@yandex.ru

Природные очаги могут быть представлены водными экосистемами. Единственный и специфический компонент любого природного очага - популяция возбудителей и возможных хозяев. Сегодня концепция природной очаговости болезней -- одно из современных направлений симбиотологии. При этом природные очаги составляют обязательную триаду: возбудитель - переносчик - носитель. Факторы внешней среды учитываются обязательно, т.к. они благоприятствуют формированию и существованию компонентов очага. Природная очаговость свойственна многим болезням животных, в частности, рыбам (вibriоз, аэромонад, псевдомоноз, цитробактериоз и др.) (Ларцева и др., 2008). Представления о сапронозах как о природноочаговых болезнях многие годы подвергались уничтожающей критике или замалчивались. Только в два последние десятилетия целенаправленные исследования по экологии патогенных микроорганизмов в окружающей среде принесли множество новых фактов, совокупность которых не оставляет сомнений в том, что сапронозы в полной мере отвечают критериям природно-очаговых инфекций (Литвин, 1999; Сомов, 1991).

Микроорганизмы характеризуются широким диапазоном толерантности к абиотическим факторам почв и водоемов, адаптации к низким и высоким температурам, миксотрофией и возможностью автотрофного типа питания во внешней среде. Яркое своеобразие природной очаговости сапронозов состоит в многообразных связях возбудителей с другими сочленами, многие из которых служат их естественными хозяевами (Литвин, 1999; Сомов, 1994).

Так, результаты санитарно-гигиенического мониторинга, проводимого в Волго-Каспийском регионе с 1983 г, показали широкое персистирование в различных гидробионтах (промысловые виды рыб, объекты аквакультуры, морские млекопитающие, желетелые-гребневики) различных возбудителей водных сапронозов -- это аэромонады, вибрионы, псевдомоноды, многие виды энтеробактерий и др. Анализ многолетних данных показал доминирование в воде (речной и морской) и исследуемых гидробионтах представителей сем. Enterobacteriaceae, Vibrionaceae и Pseudomonaceae (Ларцева и др., 2008; Лисинский, 2008; Обухова и др., 2009). Такая же тенденция регистрируется и в последние годы (Обухова, Ларцева, 2010). Учитывая особую значимость в современной инфекционной патологии нозоформ, вызываемых условно-патогенными бактериями, изучение их экологии с позиции природной очаговости следует признать весьма актуальным. В связи с этим наличие в гидрозекосистемах условно-патогенных микроорганизмов из числа мутуалистов, комменсалов или сапрофитов является неубедительным мнением, что паразитами являются организмы, существование которых возможно только в составе паразитарной системы (Литвин, Корсаков, 1999; Чайка, 1998). При этом возбудители сапронозов, хотя и являются обычными компонентами различных гидрозекосистем, регулярно или эпизодически выходят в наземные экосистемы, проявляясь в виде эпизоотических вспышек у теплокровных, как это было у тюленя в 2001г. в Северном Каспии. Бактерии родов *Aeromonas* и *Vibrio*, представители сем. Enterobacteriaceae, играют существенную роль в

структуре диарейных инфекций людей. Так, в дельте Волги в эпидемический период (в летне-осенние месяцы) доля острых кишечных инфекций (ОКИ), обусловленных граммопадами, составляла 23%, а вибрионами – 13,7% от всех диарей. Наиболее частыми этиологическими агентами ОКИ были *V. fluvialis*, *V. costicola*, *V. damsela*, *A. hydrophila*, *A. sobria*. *Citrobacter breundii*, *Proteus vulgaris*. Симптоматично, что именно эти же виды бактерий доминировали в бактериоценозе воды и рыбы в Волго-Каспийском регионе. Следует отметить, что наиболее высокая экологическая пластичность характерна только для возбудителей природно-очаговых сапронозов, основной и первичной средой обитания которых служат гидроэкосистемы. Их адаптация к данным условиям наиболее совершенны, разносторонни и имеют характер преадаптации (Литвин и др., 1998). В структуре рода *Aeromonas* нами отифференцированы виды, выделенные от рыб: *A. sobria* 32,9%, *A. hydrophila* 31,9%, *A. salmonicida* 2,2%, *Aeromonas sp.* 4,8% проб. В воде доминировали *A. sobria* 42,5%, *A. sobria* 32,9% и *A. hydrophila* 16,4% от всех выделенных аэромонад. Симптоматично, что у больных людей обнаружены аналогичные виды аэромонад. Причем *A. hydrophila* у взрослых людей обнаруживалась в 44,0%, а *sobria* - в 41,2% случаев (Бойко, 1998; Ларцева и др., 2008; Лисицкая, 2008).

Выделенные от рыб вибрионы отифференцированы до *Vibrio sp.*, составили в среднем 1,4%, превалируя у стерляди - 3,3% проб; от осетровых изолировали *V. costicola* - 2,5%, *V. fluvialis* - 2,2% проб от всей выделенной микрофлоры.

В значительной мере аспекты функционирования во внешней среде обусловлены наличием у возбудителей сапронозов ряда маркеров патогенности: гемолизина, лецитиназы, протеазы, ДНКазы, способности к росту при +37°C.

При этом по результатам многолетних микробиологических исследований выявлено, что водные штаммы бактерий обладали более высокими показателями - маркерами патогенности, чем выделенные от рыб. Общеизвестны факты усиления вирулентности многих патогенных бактерий при пассировании через организмы. Приведены убедительные данные о том, что условно-патогенная гидромикрофлора в море и реке Волго-Каспия не изменяла своих показателей патогенности (Лисицкая, 2008). Выделенные нами представители сем. *Vibrionaceae* и *Enterobacteriaceae* независимо от сезонов года проявляли жизнеспособность при 37°C от 88,0 до 100% проб, псевдомонады – только в 50,0% случаев. Однако протеаза микрофлоры, выделенная от рыб, возрастала от весны к осени в 1,5, лецитиназа, гемолизин и ДНКаза – в 1,3 раза (Лисицкая, 2008; Обухова и др., 2009; Обухова, Ларцева, 2010), что, по-видимому, обуславливает их эпидемическую значимость в ранне-осенний период.

Антибиотикорезистентность как неизбежное биологическое явление не является постоянной и снижается со временем. В настоящее время в животноводстве и птицеводстве антибиотики применяют повсеместно не только для лечения и профилактики заболеваний, но и для стимуляции роста и откорма. Ветеринары считают, что без антибиотиков невозможно было бы создать современную технологию содержания животных, повысить их продуктивность и снизить заболеваемость. Однако систематическое загрязнение животноводческой продукции антибиотиками химического и белкового происхождения приводит к распространению в окружающей среде резистентных форм микроорганизмов, их устойчивости и появлению возбудителей, устойчивых к химиопрепаратам. При этом возникает особое беспокойство потенциальный перенос антибиотикоустойчивых патогенов от животных, используемых в пищу человеком, что свидетельствует о необходимости мониторинга за увеличением резистентности к антибиотическим препаратам. Вследствие широкого использования антибиотиков стали

мощным фактором, определяющим микроэкологические изменения в популяциях бактерий, проявляющиеся в формировании резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Плитов, 2010). Поэтому проблема устойчивости микробов к различным лекарствам стала важной проблемой здоровья населения людей. Процесс распространения резистентности бактерий является масштабным и нарастающим, что связано с географическими условиями и быстрой эволюцией во времени (Кальницкая и др., 2010; Лисицкая, 2008; Rossolini, Mantengoli, 2008).

Независимо от экологической ниши, вся условно-патогенная микрофлора гидрозкосистемы Волго-Каспия имела значительную антибиотикорезистентность, в среднем 88,0% штаммов. Так, выделенная из воды и гидробионтов условно-патогенная микрофлора проявляла максимальную чувствительность к левомицетину - от 2,7 до 15,0%, тетрациклину - от 9,7 до 20,0%, стрептомицину - от 18,0 до 50,0%, фурадонину - от 16,5 до 50,0%, ампицилину - от 69,0 до 79,3%, бензилпеницилину - от 86,0 до 96,0% штаммов. При этом у речных и морских изолятов в многолетней динамике выявлена тенденция к увеличению их устойчивости и обладанию множественной антибиотикорезистентности (Лисицкая, 2008; Обухова, Ларцева, 2010).

Большинство штаммов аэромонад и вибрионов, обсеменяющих рыбное сырье и воду в местах промысла, имело высокую галотолерантность, сохраняя в 30% случаев свою жизнеспособность даже в 10% растворе с хлоридом натрия. Водные штаммы этих бактерий в такой концентрации соли выживали от 16,0 до 20,0% случаев, то есть солоность среды не является для них лимитирующим фактором, что согласуется с результатами ранее проведенных исследований.

К тому же экосистемные механизмы регуляции (хищничество, например, бделловибрионов, конкуренция энтеробактерий в сообществах бактерий, абиотические факторы) прямо или опосредованно воздействуют как на популяцию возбудителей, так и на популяцию их хозяев, например, гидробионтов. В конечном счете распространение определенного возбудителя, как любого биологического вида, зависит от наличия необходимых биотических и абиотических условий. Последние, в частности температурные, обуславливают сезонную динамику и сукцессию всего бактериоценоза гидрозкосистем дельты Волги и Северного Каспия (Лисицкая, 2008; Обухова и др., 2009; Обухова, Ларцева, 2010). Не последнюю роль играет и биотический фактор, например, иммунный статус самого гидробионта. Установлено, что при заболеваниях рыб (язвенное поражение сазана, дерматофибросаркома судака, стресс-фактор у килек) аэромонады, цитробактерии, бактерии группы протей обсеменяли их чаще, чем клинически здоровых. Кроме того, рыбы, приуроченные к пелагиали, контаминированы аэромонадами и энтеробактериями в среднем в 15,9% и 34,5% случаев, а к бентали - в 22,3% и 65,5% случаев, соответственно. Это согласуется с литературными данными, что любая цепь циркуляции возбудителя ограничена во времени и пространстве (Лисицкая, Коренберг, 1999). Однако здесь успешно «работает» схема циркуляции «вертикального» канала передачи по трофическим цепям: бактерии - вода - зоопланктон - рыбы - человек (Литвин и др., 1998).

Таким образом, многие актуальные эпидемиологические проблемы, такие как пищевые инфекции, токсикоинфекции, обусловленные, в частности, аэромонадами, вибриофлорой и энтеробактериями, имеют несомненную причинную связь с природной очаговостью болезней, которая будет только увеличиваться в ходе дальнейшей урбанизации. В связи с этим и вышеизложенным является выявление профилактических мер по предотвращению инфекционных заболеваний различных гидробионтов, обусловленных возбудителями сапронозов, является выявление

среды – источников и носителей сапронозов. Вместе с тем с учетом возможности экспорта рыбы и рыбопродукции для обеспечения ее безопасности целесообразно при микробиологическом анализе сырья и продукции определять видовую идентификацию аэромонад, вибриофлоры и бактерий, чтобы по своему качеству она отвечала бы мировым стандартам.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бойко А.В. Микробиологические и экологические аспекты паразитизма аэромонад // Автореф. дис.... докт. мед. наук. - Челябинск. - 1998. - 43с.
2. Кальницкая О.И., Уша Б.В., Мишнев Э.А. Ветеринарно-санитарная оценка мяса животного происхождения, содержащих антибиотики // Ветеринария. - 2010. - 2010. - С. 61-63.
3. Ларцева Л.В., Обухова О.В., Лисицкая И.А. Микрофлора рыб и других животных [Текст]: Учебное пособие. Астрахань: Изд. дом «Астраханский университет», - 2010. - 108с.
4. Ларцева Л.В., Истелюева А.А., Лисицкая И.А. Экологические аспекты микрофлоры дельты р. Волги // Мат-лы IV Всероссийской научной конференции «Актуальные проблемы экологии и сохранения биоразнообразия России и сопредельных стран» - Сев.-Кавк. гос. университет им. К.Л. Хетагурова. Владикавказ: Изд-во СОГУ, 2010. - 202с.
5. Лисицкая И.А. Бактериальные сообщества некоторых компонентов экосистемы дельты и Северного Каспия: Автореф. дис.... канд. биол. наук. - Астрахань, 2008. - 23 с.
6. Литвин В.Ю., Гинцбург А.Л., Пушкарева В.И., Романова Ю.М., Боев Б.В. Микробиологические аспекты экологии бактерий. М., - 1998. - 256с.
7. Литвин В.Ю., Коренберг Э.И. Природная очаговость болезней: развитие концепции 21 века // Паразитология. - 1999, №3, 33. - с. 179-191.
8. Обухова О.В., Ларцева Л.В., Лисицкая И.А. Санитарно-микробиологическая оценка экосистемы дельты Волги при антропогенном загрязнении // Гигиена и санитария. - 2009, с. 23-25.
9. Обухова О.В., Ларцева Л.В. Экология микробных сообществ в дельте Волги // Экологические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса. - М. - 2010, №1. - С. 10-14.
10. Плитов И.С. Определение чувствительности энтеробактерии к антибиотикам и дезинфицирующим средствам // Ветеринария. - 2010. - № 12. - С. 42-45.
11. Сомов Г.П., Варшавевич Т.Н., Тимченко Н.Ф. Психрофильность патогенных бактерий. Новосибирск. - 1991. - 202с.
12. Сомов Г.П., Бузалева Л.С., Черкасова С.А. О миксотрофии патогенных бактерий // Микробиол., эпидемиол. и иммунологии. - 1994, №5. - с. 3-6.
13. Чайка С.Ю. Паразитизм – существование организмов в составе паразитарных систем // Паразитология. - 1998, Т.32. - с. 3-10.
14. Rossolini G.M., Mantengoli E. Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy // Clin. Microbiol. and Infec. - 2008. - V.14. - P. 33-41.

### CONTEMPORARY ISSUES IN NATURAL FOCUS SAPRONOSIS HYDROECOSYSTEMS VOLGA-CASPIAN BASIN

L.V. Lartseva, O.B. Obuhova

Frequent occurrence of opportunistic microflora in different hydrobionts and water of the Volga-Caspian basin was revealed. The representatives of the family Enterobacteriaceae, Vibrionaceae and Pseudomonaceae were identified. They had features of pathogenicity and plural antibiotic resistance. The given data prove that they are the criteria of natural focal sapronosis infections.

# ТОКСИКОЗЫ ВОДНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ИХ РОЛЬ В СОВРЕМЕННОЙ ЭВОЛЮЦИИ ЭТИХ ЖИВОТНЫХ

А.В. Макрушин<sup>1\*</sup>, Т.А. Асанова<sup>2</sup>, С.М. Голубков<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,  
Борок, Россия, makru@ibiw.yaroslavl.ru

<sup>2</sup>Новгородское отделение ГосНИОРХ, Россия

<sup>3</sup>Зоологический институт РАН, СПб, Россия

Загрязнение среды ведет к тому, что одни виды вымирают, другие к новой обстановке приспосабливаются. Идет ли их приспособление безболезненно? Видимо, не всегда. Об этом говорят и литературные данные, и наше исследование водных беспозвоночных. Цель этого сообщения – краткое изложение полученных нами результатов и их обсуждение. Работа проводилась с перерывами в 1990–2010 годах. Ветвистоусые рачки собирались в Ивановском, Рыбинском, Горьковском, Чебоксарском водохранилищах и в Невской губе Финского залива, моллюски – в этих же водоемах (кроме Чебоксарского водохранилища), а также в Уводском водохранилище и в озерах Ильмень и Селигер. Личинки поденок пойманы в Ивановском водохранилище. Применялась гистологическая методика.

У ветвистоусых рачков *Bythotrephes longimanus* обнаружены разные патологические изменения. Происходило разрушение эпителия средней кишки. Средняя кишка была патологически изменена также у еще не родившейся находящейся в выводковой сумке молодежи. Плацента, выделяющая в выводковую сумку питательные вещества для развивающихся зародышей, была атрофирована. Из-за этого часть зародышей погибала (Макрушин, 1995). У ветвистоусого рачка *Limnosedia frontosa* зародыши в выводковой сумке тоже погибали.

У ветвистоусого рачка *Cercopagis pengoi* разрушался эпителий средней кишки. У ветвистоусых рачков *L. frontosa* и *Leptodora kindtii* наблюдалось местное расслоение раковинки. Это приводило к тому, что на ней возникал заполненный кровью пузырь. Он нарушал кровообращение и уменьшал пространство выводковой сумки. У *L. kindtii* раковинка расслаивалась иногда вся. Она превращалась в прикрепленный к туловищу заполненный кровью шар. У особей с такой раковинкой у выводковой сумки дорзальная стенка отсутствовала и поэтому откладывались яйца в ней не задерживались (Макрушин 2003, Макрушин, Запруднова, 2000).

У личинок поденок *Ecdyonurus affinis*, *Cloeon* гр. *dipterum*, *C. (Centropallium) luteolum*, *C. (Procloeon) bifidum*, *Baetis (Labiobaetis) spp.*, *B. tracheatus* и *Caenis lactea*, как у *B. longimanus* и *C. pengoi*, разрушался эпителий средней кишки (Макрушин и др., 2000). У моллюсков *Anodonta spp.*, *Unio pictorum* и *U. tumidus* была обследована только печень. В этом органе у них обнаружены атрофия пищеварительных трубочек, дистрофия их эпителия, отек и воспаление. У протоков, соединяющих пищеварительные трубочки печени с желудком, отслаивался эпителий от базальной мембраны. Патологически изменялась соединительная ткань печени (Макрушин, 1998, Макрушин и др., 2000).

У ветвистоусых рачков и личинок поденок больны были лишь часть особей, среди моллюсков же особей с неизменной печенью практически не было. Заболевшие особи были средой не всех исследованных видов. У ветвистоусых рачков *Sida crystallina*, *Simocephalus vetulus* и *Eurycercus lamellatus*, а также у личинок поденки *B. fuscatus* патологических изменений не наблюдалось.

Человек привел биосферу в состоянии кризиса. Перечисленные нарушения строения тканей гидробионтов являются его составной частью. Кризисы биосферы

Контрастно происходили в геологической истории. Во время их имело место массовое вымирание видов и ход эволюции ускорялся. Современный кризис эволюции тоже ускорял. Заболевают те особи, которые наиболее чувствительны к загрязняющим веществам. Они оставляют меньше потомства, чем здоровые, или совсем его не оставляют. В результате доля генотипов, способных противостоять любому действию загрязняющих веществ, в популяциях возрастает. На смену стабилизирующему отбору, направленному на сохранение генетического состава популяций неизменным, пришел отбор движущий, направленный на его изменение, приспособление популяций к изменяемой человеком среде обитания.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Макрушин А.В. Гистопатологическое обследование некоторых ветвистоусых ракообразных Рыбинского водохранилища. Зоол. ж. – 1995. Т. 74. №9. – С. 128-130.
2. Макрушин А.В. Опыт биомониторинга загрязнения по результатам гистопатологического обследования печени моллюсков. Биология внутренних вод. – 1998. №3. С. 90-94.
3. Макрушин А.В., Запруднова Р.А.. О патологическом изменении выводковой сумки *Leptodora kindti* (Cladocera, Crustacea). Зоол. ж. – 2000. Т. 79. № 6. – С. 742-744.
4. Макрушин А.В., Жгарева Н.Н., Худолей В.В. Гистопатологическое обследование первичнооседелых верхневолжских водохранилищ. Сб. н. тр. ГосНИОРХ. – 2000. №326. – С. 226-233.
5. Макрушин А.В. О нарушении размножения *Leptodora kindti* (Cladocera, Crustacea). Зоол. ж. – 2003. Т. 39. №2. – С. 116-119.

### TOXICOSIS AQUATIC INVERTEBRATES AND THEIR ROLE IN MODERN EVOLUTION OF THIS ANIMALS

A.V. Makrushin, T.A. Asanova, S.M. Golubkov

Examined using histopathological techniques Cladocera (*Bythotrephes longimanus*, *Cercopagis pengoi*, *Limnocalanus macrurus*, *Leptodora kindti*, *Sida crystallina*, *Simocephalus vetulus*, *Eurycerus lamellatus*), Mollusca (*Unionia* spp., *Anodonta* spp., *Unio pictorum*, *U. tumidus*) and larvae Insecta Ephemeroptera (*Ecdyonurus tenellus*, *Cloeon dipterum*, *C. (Centropitillum) luteolum*, *C. (Procloeon) bifidum*, *Baetis (Labiobaetis) spp.*, *Baetis fuscus*, *Caenis lacteal*). Found toxicosis, accelerating the evolution.

# ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СЕЛЕКЦИОННЫХ ГРУПП КАРПА В ПРУДОВЫХ ХОЗЯЙСТВАХ

Г.И. Пронина

ГНУ ВНИИР Россельхозакадемии, gidrobiont4@yandex.ru

Необходимость оценки иммунофизиологического статуса культивируемых рыб диктуется прежде всего тем, что при разведении они подвергаются воздействию технологических факторов и селекционному отбору на продуктивность, что негативно отражается на состоянии их здоровья. Поэтому важно проводить отбор не только по продуктивным качествам, но и по адаптационным свойствам к условиям среды. Отбор по устойчивости к одной болезни сопряжен с определенными трудностями и в условиях хозяйств в большинстве случаев невозможен по ряду причин:

1. Трудно выполним технически, так как при этом необходимо проводить заражение возбудителем в определенной дозе.
2. Требуется больших финансовых затрат.
3. Длительный процесс.
4. Нельзя ожидать, что полученная селекционная группа сможет адаптироваться к новым биотическим (например, проникновению других возбудителей) и абиотическим факторам.

В этой связи представляется целесообразным повышать неспецифический иммунитет объектов аквакультуры. Ключевым моментом на этом пути является выбор показателей, позволяющих оценить состояние неспецифического иммунитета на клеточном уровне.

В данной работе представлены результаты оценки иммунофизиологического состояния карпа чувашской чешуйчатой и анишской зеркальной пород (по 10 рыб каждой породы) пятого поколения селекции (F5), выращенных в условиях прудового рыбоводного хозяйства Чувашии — п/х «Кирия».

Изучались гематологические, биохимические и цитохимические показатели.

Кровь для анализа отбиралась из хвостовой вены рыб с соблюдением правил асептики и антисептики.

Лейкоцитарную формулу, являющуюся важным показателем, отражающим гомеостаз рыб, определяли методом дифференциального подсчета в окрашенных по Паппенгейму мазках периферической крови. Уровень гемопоза оценивался по доле незрелых форм эритроцитов.

Биохимические исследования крови на сегодняшний день — это наиболее популярный метод лабораторной диагностики общего состояния организма. Основной задачей исследований является объяснение функций живых систем с точки зрения процессов, протекающих в клетках. В данном сообщении приводятся результаты биохимического определения содержания глюкозы и активности некоторых ферментов сыворотки крови: аланинаминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) с помощью прибора Chem Well Awareness Technology.

Ключевым звеном определения естественной неспецифической резистентности организма является функциональное состояние фагоцитирующих клеток и внутриклеточное переваривание бактериальных агентов (Маянский, 1989).

Неферментные катионные белки обладают прямым бактерицидным действием, при котором нарушается структура мембран микробной клетки. Они содержатся в лизосомах фагоцитов. Показатель свидетельствует о потенциальной

фагоцитарной активности нейтрофилов. Катионный белок определялся химическим методом по Шубичу (Нагоев, 1982; Пигаревский, Мазинг, 1981). Для оценки по методу Астальди (Astaldi, Verga, 1957), основанному на степени различной интенсивности специфической окраски. В зависимости от количества образующихся в нейтрофилах гранул исследуемые гранулы делились на 4 группы: 0 – отрицательной реакцией, 1 – единичные гранулы; 2 – гранулы занимают 1/3 цитоплазмы клетки; 3 – гранулы занимают 2/3 и более цитоплазмы клетки. Для количественного выражения результатов таким способом считывалось 100 клеток. Средний цитохимический коэффициент (СЦК) по Low (1955) рассчитывался по формуле:

$$\text{СЦК} = (0 \times N_0 + 1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3) / 100,$$

где  $N_0, N_1, N_2, N_3$  (%) – количество нейтрофилов с активностью 0, 1, 2 и 3 соответственно.

НСТ-тест позволяет оценить переваривающую способность нейтрофилов и определить долю клеток, способных формировать внутри себя фагосому. В основе теста лежит уникальный для фагоцитов способ утилизации кислорода с образованием свободных радикалов и перекиси водорода. В отличие от большинства химических реакций здесь исследуются живые клетки, которые фиксируются после инкубации с гистохимическим индикатором респираторного взрыва – юсиним тетразолием. Это может быть сделано без дополнительной стимуляции спонтанный НСТ-тест) или при стимуляции нейтрофилов *in vitro* (индуцированный НСТ-тест) (Кондратьева, Самуилов, 2001). По мнению комитета экспертов ВОЗ (2003), проба с нитросиним тетразолием (НСТ) является признанным показателем ферментной функции нейтрофилов.

По количеству отложившегося в клетках диформазана оценивалась их активность в условных единицах, и рассчитывался индекс активации нейтрофилов (ИАН) по формуле среднего цитохимического коэффициента. Оценка состояния фагоцитарной активности нейтрофилов проводилась по результатам спонтанного НСТ-теста (ИАН спонтанный) и при стимуляции нейтрофилов зимозаном в концентрации 2 мг/мл (ИАН индуцированный).

Показатели ДАН (динамики активации нейтрофилов) и ФРН (функциональный резерв нейтрофилов) рассчитывались следующим образом:

$$\text{ДАН} = \frac{\text{ИАН индуцированный}}{\text{ИАН спонтанный}}$$

$$\text{ФРН} = (\text{ИАН индуцированный} - \text{ИАН спонтанный}) \times 100\%$$

Эти цитохимические методы, нашедшие применение в медицине, в экспериментальном варианте для рыб подробно описаны в методических указаниях по исследованию селекционных групп обыкновенного сома (Пронина и др., 2010).

Результаты исследований представлены в таблице 1. Рост рыб разных пород карповых. Весной карпы чувашской чешуйчатой породы превышали по массе карпов зеркальных. Осенью ситуация меняется: зеркальные карпы значительно превосходят чешуйчатых. Расход глюкозы в сыворотке крови отражает динамику роста карпа. В весенний период наблюдается некоторое снижение, осенью – резкий скачок расхода глюкозы у чешуйчатой породы карпа. Достоверность различий показателя расхода глюкозы составила:  $t=4,73$  ( $P<0,05$ ).

У обеих пород карпа до и после зимовки наблюдается активное протекание гемопоэза. При этом в крови зеркальных карпов преобладают бластные формы лейкоцитов. Однако весной доля нейтрофилов в крови созревших карпов значительно выше, чем осенью. По-видимому, расходование этих клеток при стимуляции образующихся в процессе гаметогенеза продуктов межклеточного жидкого вещества стимулировало нейтрофилопоз. Осенью увеличилось относительное



количество моноцитов. Эти макрофаги участвуют в фагоцитозе отмерших клеток и крупных чужеродных объектов при подготовке к зимовке и восстановлению организма рыб после нереста и интенсивного роста.

Таблица 1.  
Морфометрическая и физиолого-иммунологическая характеристика чувашской чешуйчатой и ианшской зеркальной пород карпа (F5), п/х «Кирья», 2010

Показатели	Трехгодовики		Четырехлетки	
	Чешуйчатые	Зеркальные	Чешуйчатые	Зеркальные
Масса, г	1916±165,9	1770±99,4	2687±142,6	3188±144,4
Длина тела, см	43,7±1,56	42,6±0,59	49,1±0,95	52,1±0,73
Биохимические показатели				
АЛТ, ед/л	42,7±2,76	45,2±3,73	30,3±1,96	26,4±1,69
ЩФ, ед/л	30,2±2,75	32,0±11,6	15,0±2,89	16,5±5,48
Глюкоза, ммоль/л	4,1±1,09	4,7±1,45	13,5±0,48	3,8±2,01
Эритропоз, %				
Гемоцитобласты, эритробласты	0,6±0,27	0,9±0,27	0,8±0,20	0,6±0,33
Нормобласты	2,8±0,42	3,2±0,42	4,8±1,32	4,3±0,67
Базофильные эритроциты	9,8±1,78	8,6±3,07	9,2±1,93	9,0±0,90
Сумма зрелых эритроцитов	86,8±2,19	87,3±3,60	85,2±2,72	86,0±0,90
Лейкоцитарная формула, %				
Промиелоциты	-	-	-	0,3±0,3
Миелоциты	-	0,2±0,21	0,2±0,2	0,6±0,5
Метамиелоциты	5,0±0,79	7,4±1,64	2,0±0,84	2,0±0,90
Палочкоядерные нейтрофилы	4,4±1,30	5,2±1,67	1,4±0,60	3,0±1,53
Сегментоядерные	3,6±1,44	1,8±0,96	3,4±1,21	1,7±1,67
Всего нейтрофилов	8,0±1,06	7,0±1,46	5,2±1,11	4,7±0,33
Эозинофилы	0,4±0,27	0,2±0,22	0,2±0,20	0,3±0,33
Базофилы	-	0,2±0,22	0,8±0,37	0,7±0,33
Моноциты	1,4±1,35	3,4±0,76	5,2±0,66	5,0±1,15
Лимфоциты	83,0±1,87	81,6±3,11	86,2±0,80	87,0±1,15
Фагоцитарная активность				
СЦК, ед.	1,65±0,13	1,69±0,07	1,70±0,11	1,87±0,09
ИАН спонтанный, ед.	0,15±0,03	0,17±0,01	0,17±0,02	0,24±0,02
% активности	8,8±1,39	9,0±0,35	8,6±1,1	11,8±0,9
ИАН индуцирован., ед.	0,30±0,041	0,32±0,05	0,40±0,03	0,43±0,02
% активности	15,6±1,04	15,6±2,02	18,4±1,7	19,2±0,9
ДАН, ед.	2,3±0,52	1,9±0,25	2,6±0,5	1,8±0,16
ФРН, %	15,4±3,33	15,0±4,42	22,8±5,3	18,8±2,9

Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов крови рыб до и после нереста незначительно различались между собой. Осенью имела место тенденция к повышению функционального резерва нейтрофилов и усилению динамики их активации. Данная закономерность отмечена нами ранее и у рыб других возрастов. Поэтому, это вызвано необходимостью поддержания гомеостаза организма, в частности иммунитета, во время зимовки, когда замедляются процессы метаболизма.

Карпы чувашской чешуйчатой и анишской зеркальной пород, полученные ускоренным методом селекции, обладают высоким темпом роста и хорошей жизнеспособностью. Уровень СЦК у них также достаточно высокий. Кроме того, данный показатель коррелирует с АЛТ сыворотки крови. У трехгодовиков карпов анишской зеркальной породы коэффициент корреляции был равен 0,91.

Таким образом, отбор рыб в племенное ядро для селекции на продуктивность, и в особенности на иммунную устойчивость, целесообразно вести с помощью индикаторов, что позволит ускорить селекционный процесс и прогнозировать его результаты. Для этого подходят показатели НСТ-теста, СЦК лизосомального катионного белка.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге.- Новосибирск, «Наука», 1989 г. - 343 с.
2. Нагоев Б. С. Катионный белок лейкоцитов и его значение: Методические указания.— Нальчик, 1982. - 67 с.
3. Пигаревский В. Е., Мазинг Ю. А. 1981. К методике применения лизосомального теста в лабораторной диагностической практике. Лабораторное дело. 10: 579—582.
4. Практикум по иммунологии: Учеб. Пособие / Под ред. И.А. Кондратьевой, В.Д. Самуилова. - М.: Изд-во МГУ, 2001. - 224с.
5. Пронина Г.И., Маслова Н.И., Петрушин А.Б. Методы оценки селекционных групп обоепоголоваго сома с использованием физиолого-биохимических и иммунологических показателей: Методические указания, Москва, 2010. - 31с.
6. Astaldi G., Verga L. The glycogen content of the cells of lymphatic leukemia // Acta haematol., 1957, vol. 17, P. 129-136.
7. Kaplow L. Blood, 1955, vol. 10, № 10, p. 1023-1029.

### IMMUNOPHYSIOLOGY ESTIMATION OF SELECTION GROUPS OF THE CARP IN FISH-BREEDING PONDS

G.I. Pronina

Studying of hydrobionts immunity on haematology indicators and indicators of cellular immunity has allowed to define their referential values and age sexual distinctions, and also to estimate variability under the influence of selection process. Are offered haematological (erythropoiesis, leukocytes formula) and cytochemical indicators (average cytochemical coefficient cationic protein in lysosome, NBT - nitro blu tetrazolium test) for improvement of the accelerated method of selection.

## ПАТОГЕНЫ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ У ГОРБУШИ КАМЧАТКИ

Н.В. Сергеев\*, Л.В. Овчаренко, Т.В. Гаврюсева, Л.А. Жукова  
Камчатский институт рыбного хозяйства и океанографии,  
г. Петропавловск-Камчатский, Россия, \*nvsergeenko@gmail.com

В 2009 г. во время лососевой путины из района промысла в Карагинской подзоне Камчатки поступила информация о низком товарном качестве мороженой продукции из горбуши — после ее дефростации отмечали размягчение мускулатуры. Доля таких рыб составляла 7-10% от улова. Если перевести процент пораженных рыб в количество штук от общего подхода и вылова горбуши в Карагинской подзоне, то получатся весьма существенные цифры — 14-20 и 8,4-12 миллионов рыб соответственно (Рудакова и др., 2009). Для выяснения причин ухудшения товарного качества горбуши в 2010 г. провели целенаправленные ихтиопатологические исследования в Карагинской и, для сравнения, в Камчатско-Курильской подзонах.

Цель настоящей работы — определить видовой и количественный состав патогенов различной этиологии у горбуши Карагинской и Камчатско-Курильской подзон, снижающих качество рыбопродукции и потенциально опасных для здоровья человека и животных.

Материалом для настоящих исследований послужила половозрелая горбуша, отловленная морскими ставными неводами в Карагинской (район о. Карагинский, лагуна Ложных вестей, бухта Карага) и Камчатско-Курильской подзонах (устьевая часть р. Большая) Камчатки. Вирусологическими методами исследовали 240 экз., бактериологическими — 107 экз., паразитологическими — 135 экз., гистологическими — 10 экз., осмотрено на наличие внешних признаков патологии 16175 экз. рыб.

По результатам визуального осмотра и патологоанатомического вскрытия горбуши в Карагинской подзоне больше всего геморрагий, поверхностных язв в области анального плавника и глубоких на теле отмечали у рыб, отловленных в районе о. Карагинский (23%); обширные гематомы в мышцах с отделением их от костей и дряблость мышечной ткани — в районе лагуны Ложных Вестей и о. Карагинский (40%); больше всего ракообразных на теле рыб регистрировали в бухте Карага (70%). Изменения внутренних органов у обследованных рыб были незначительными, их встречаемость не превышала 10% из выборки. У 25% обследованной горбуши Камчатско-Курильской подзоны регистрировали повреждения кожи от укусов морзверя. У 17% рыб из этого района отмечали поверхностные язвы. При патолого-анатомическом вскрытии у 3% горбуши выявляли изменения внутренних органов (изменение цвета и консистенции почек, кровоизлияния в мышцах).

В результате вирусологических исследований на пяти перевязанных клеточных линиях рыб (EPC, CHSE-214, СНН-1, RTG-2, и ВФ-2) цитопатического эффекта ни в одном опыте не отмечено. Бактериологическое тестирование отобранного материала выявило контаминацию 20% горбуши Карагинской подзоны бактериями *V. anguillarum* и 7% рыб Камчатско-Курильской подзоны — азромонадами *A. hydrophila*, которые вызывают септические процессы в организме рыбы (Austin, Austin, 1993), что приводит к образованию язв и, следовательно, к ухудшению товарного качества рыбопродукции. Условно-патогенная микрофлора рыб в этих районах была представлена псевдомонадами *P. fluorescens* и энтеробактериями *Enterobacter* sp., их встречаемость у рыб не превышала 7%.

При гистологических исследованиях у рыб с язвами регистрировали массивную меланизацию макрофагов, а также скопления лимфоидных элементов крови и коротких палочковидных бактерий в кровеносных сосудах, соединительной ткани и некротизированных мышечных волокнах. Подобные гистопатологические изменения в скелетной мускулатуре отмечали и у рыб с кровоизлияниями в мышцах (рисунок 1).

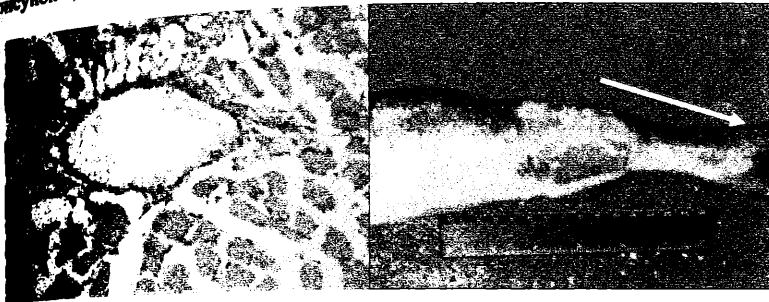


Рисунок 1. Язвы на теле горбуши из Карагинской подзоны, бактерии (↑) в кровеносном сосуде скелетной мускулатуры.

Бактерии рода *Vibrio* и *Aeromonas* отнесены к санитарно-значимым микроорганизмам. В зависимости от места проникновения вибрионы способны вызывать раневые инфекции у людей, первичную септицемию при контакте с морской водой или гастроэнтерит при употреблении контаминированных морепродуктов. Аэромонады, попадая в организм человека, способны вызвать гастроэнтерит, поражения печени, кожи, септицемию и другие заболевания (Горелов и др., 1991). Они устойчивы к колебаниям температуры, pH среды, способны размножаться при низких температурах. Наличие у этих микроорганизмов экзотоксинов, энтеротоксинов и гемолизина обуславливает порчу рыбы. Псевдомонады и энтеробактерии входят в состав обычной микрофлоры воды, но при неблагоприятных условиях вместе с аэромонадами и вибрионами участвуют в развитии септических процессов у рыб.

Паразитологические исследования рыб выявили у горбуши паразитов, потенциально опасных для здоровья человека и теплокровных животных — личинок нематод р. *Anisakis* и плероцеркондов цестод *Diphyllbothrium* sp. (рисунок 2).

Количественные показатели зараженности дифиллоботридами и анизакидами в полости тела рыб в Карагинской и Камчатско-Курильской подзонах были одинаковые. Экстенсивность инвазии составляла 13,3% и 20%, средняя интенсивность — 1 экз., индекс обилия — 0,13 и 0,2 соответственно. При инсектировании мускулатуры рыб зараженность анизакидами была выше в Карагинской подзоне — 66,6% чем в Камчатско-Курильской (13,3%), со средней интенсивностью 3,5 и 2 экз. и индексом обилия 1,86 и 0,26 соответственно. Разнообразные *Lepeophtheirus salmonis* встречали только в Карагинской подзоне, экстенсивность инвазии составила 33,3%, средняя интенсивность — 1,8 экз. и индекс обилия — 0,6 (рисунок 2). Повреждения кожи копеподами *L. salmonis* способствуют проникновению патогенной микрофлоры, что приводит к развитию язв и абсцессов.

Наиболее часто личинки *Anisakis* sp. у рыб локализовались в наружной и внутренней косой мышце брюшка, реже — в мышцах спины и на поверхности печени. При удалении нематод из мышц рыбы на их месте образуются небольшие кровоподтеки от лопнувших капилляров, которые могут стать причиной проникновения вторичной инфекции. Такая рыба быстрее портится, у нее появляется неприятный запах, товарные качества снижаются (Карманова и др., 2002). Как правило, обнаруженные у рыб нематоды были на III стадии развития, поэтому в настоящих исследованиях их видовое название не указывается. По определению и видовой принадлежности плероцеркоидов, выделенных от горбуши, поэтому они объединены под названием *Diphyllobothrium* sp. Плероцеркоиды обнаружили в полости тела на поверхности внутренних органов рыб.

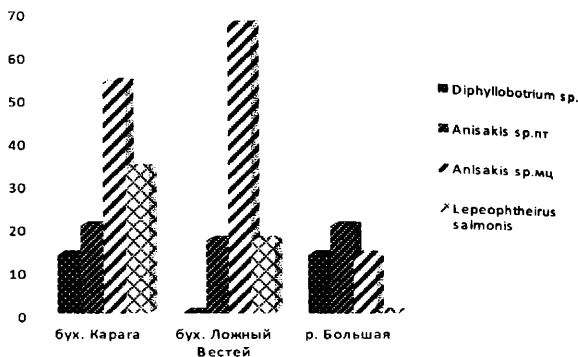


Рисунок 2. Зараженность горбуши (%) Карагинской (бухта Карага, бухта Ложный вестей) и Калчатско-Курильской (р. Большая) подзон паразитами, влияющая на товарное качество рыбопродукции в 2010 г.

При исследовании отпечатков сердца, почки, печени, мускулатуры горбуши из Карагинской подзоны выявлены различные стадии развития простейших, предположительно микроспоридий *Microsporidae* gen. sp. Видовую принадлежность микроорганизмов определить не удалось, так как на отпечатках нет стадии зрелых спор. При гистологических исследованиях рыб с атрофией скелетной мускулатуры из этого же района в желудочке сердца были обнаружены диффузно расположенные споры и плазмодияльные стадии (трофозониты) микроспоридии. Каждая споры размерами от 7 до 10 мкм (фиксированный материал). Трофозониты содержали от 1 до 7 мелких плазмодиев (рисунок 3).

Обнаруженные микроорганизмы могли стать причиной гистонекроза мускулатуры рыб из Карагинской подзоны. Микроспоридии, вызывающие разжижение мускулатуры, впервые были найдены и описаны у тихоокеанских лососей в Японии (Awakura, 1965), затем на Сахалине у горбуши и сима (Виноградова, 1984). Паразит поражает разные виды лососевых рыб, как выращиваемых в рыболовном хозяйстве, так и производителей, идущих на нерест в реки. Болезнь может протекать в острой и в хронической форме. При острой форме характерны массовые отходы рыбы, споры можно обнаружить в туловищной мускулатуре и мускулатуре других органов (глотка, глаза и т.п.). При хроническом течении болезни споры обнаруживают, как правило, только в мускулатуре сердца.

**Рисунок 3.** Микроспоридии *Microsporidae* gen. sp в мазках-отпечатках почки — микродии (А), споры (Б) и в гистологическом срезе сердечной мускулатуры (В) горбуши из Карагинской подзоны

Таким образом, в результате комплексных исследований популяций тихоокеанской горбуши Карагинской и Камчатско-Курильской подзон выявлены патогены, характеризующие санитарно-эпизоотическое состояние популяций горбуши и способные влиять на товарное качество рыбы и рыбопродукции: бактерии *V. anguillarum* и *A. hydrophila* (у 7-20% рыб); нематоды *Anisakis* sp. L. (застенсивность инвазии 13,3-66,6%) и плероцерконды лентецов *Diphyllbothrium* sp. (застенсивность инвазии 13,3%), копеподы *L. salmonis* (у 16,6-33,3% рыб).

Впервые у горбуши в Карагинской подзоне был выявлен инвазионный патоген, предположительно *Microsporidae* gen. sp., присутствие которого могло быть причиной разжижения мускулатуры рыб. Для определения видовой принадлежности выявленного паразита требуются дополнительные исследования.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вилова Г.П. Микроспоридиоз производителей горбуши // Экспресс-информ. ЦНИИТЭИРХю Сер. «Рыбохоз. Исполыз. Внутр. Водоемов». - М., 1984. - Вып. 10. - С. 9-11.
2. Горелов А.Л., Левина Г.А., Сазонов А.А., Пугаева В.П. Аэромонады, их биологические свойства, антибиотикочувствительность, роль в инфекционной патологии. Антибиотики и химиотерапия. М. Г. 36. 1991. С. 51-55.
3. Рудакова С.Л., Гаврусева Т.В., Асеева Н.Л., Устименко Е.А., Овчаренко Л.В. К проблеме товарного качества продукции из горбуши Карагинской подзоны (Камчатка) в 2009 г. // Биол. № 4 реализации «Концепции Дальневосточной бассейновой программы изучения тихоокеанских лососей». Изд-во «ФГУП ТИПРО-центр». Владивосток. 2009. С. 252-256.
4. Карманова И.В., Плапкова В.В., Нечаева О.Ю. и др. Случай анисакидоза у человека на Камчатке // Мед. параз. и параз. болезни. М.: С. ИНФО. 2002. № 2. С. 32-33.
5. Austin B., Austin D.A. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. Second Edition. New York: Ellis Horwood Limited. 1993. P. 70-72.
6. Awakura T. Studies on the Plistophora disease of salmonid fishes - 1. Observation on the state of the occurrence and the cause in Chitose River in Hokkaido // Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatchery Vol. 20, 1965. - P. 1-27.

### PATHOGENS OF DIFFERENT AETIOLOGIES IN THE PINK SALMON OF KAMCHATKA

N.V. Sergeenko, L.V. Ovcherenko, T.V. Gavruseva, **L.A. Zhukova**  
 A thorough investigation of the Pacific pink salmon populations of Karaginskaya and Kamchatskaya subzones was completed in 2010. A major finding of this complex investigation was the discovery of the pathogens that caused important sanitary-epizootic conditions in the Pacific pink salmon populations which negatively influenced the commodity quality of a fish and fish products in both these areas. We have revealed for the first time the potential cause of rarefaction in the muscles of pink salmon, Microsporidae gen. sp.

# РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ИСКУССТВЕННЫХ СУБСТРАТОВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ОТВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ СООБЩЕСТВ ОБРАСТАТЕЛЕЙ НА ИЗМЕНЕНИЕ УСЛОВИЙ ОБИТАНИЯ В ЕСТЕСТВЕННОЙ И АНТРОПОГЕННО НАРУШЕННОЙ ВОДНОЙ СРЕДЕ

И.А. Скальская

Институт биологии внутренних вод имени И.Д. Папанова РАН, 152742 пос. Борок,  
Ярославская обл., skalskaya@ibiw.yaroslavl.ru

Для оценки экологического состояния водных экосистем в системе мониторинга существует огромное количество различных методик. В большинстве случаев они касаются планктона и бентоса. Однако отсутствуют универсальные методы, критерии и индексы, пригодные для всех видов загрязнений и для различных категорий водных объектов. Перспективным в этом плане может быть использование искусственных субстратов, на которых развиваются самые разнообразные сообщества – бактерио-, альго- и зооперифитон, что позволяет специалистам разного профиля при наличии соответствующих условий проводить одновременную комплексную оценку уровней загрязнения водоемов. Кроме того, при изучении экологического состояния малых рек наиболее информативен именно перифитон, характеризующий состояние толщи воды на конкретной станции, в то время как бентос непосредственно показывает загрязненность грунтов и придонного слоя воды, а бактерио- и зоопланктон, сносимые течением, позволяют оценивать усредненное состояние лежащих выше участков реки.

Установка искусственных субстратов из однородных материалов, выбранных исследователем, дает возможность по состоянию перифитонных сообществ наиболее четко очерчивать зоны и уровни загрязнений. Многолетние исследования зооперифитона (мейо- и макрофауна) водохранилищ, озер Дарвинского заповедника и малых рек бассейна Верхней Волги выявили особенности влияния на гидробионтов промышленного, бытового загрязнения и антропогенного закисления, а также структурные изменения в ходе сукцессий зооценозов. Было разработано 4 основных критерия состояния перифитона: видовое разнообразие и количественная характеристика; структурно-таксономические типы сообществ; трофическая структура доминирующих видов; характер связи гидробионтов с водной средой (гомотопы и гетеротопы) и популяционный анализ. Позже был использован дополнительный критерий – средняя сапробность трех первых по численности видов (Скальская, 1992; Скальская и др., 1999; Скальская и др., 2007). На основании этих критериев по степени и характеру загрязнений выделили 3 уровня качества водной среды: экологическое благополучие, удовлетворительное состояние и неудовлетворительное. Последний уровень включал несколько типов: сильное токсическое загрязнение, высокая органическая нагрузка и умеренное загрязнение. Последствия воздействия на сообщества обрастателей специфичны для разных видов загрязнений и для разнотипных водных объектов.

**Промышленное загрязнение.** Стоки промышленных предприятий в зависимости от состава загрязнителей, а также от объема и концентрации антропогенных взвесей, поступающих в водные объекты, способны блокировать процессы обрастания или коренным образом изменить ход естественных сукцессий зооценозов и приводить к формированию техногенных структур. На загрязненных участках водохранилищ истинные беспозвоночные-обрастатели с фильтрационным типом питания (губки, мшанки, дрейссена) испытывали угнетение. В бедных



сообществах в зависимости от характера антропогенного воздействия развивались в основном детритофаги-собиратели - личинки хирономид, нематоды, олигохеты.

В 90-х гг. XX в. впервые была проведена оценка экологического состояния некоторых районов Верхней Волги по разработанным критериям, которая показала, что участки с почти постоянно высоким уровнем загрязнения располагались вблизи крупных городов и поселков – реки Черемуха, Серовка, Ягорба, верховье р. Кошты, Брейтово. Вода была токсичной для беспозвоночных или они испытывали угнетение. Так, в районе Торова в зооперифитоне отсутствовала одна из обычных групп беспозвоночных – олигохеты. Мшанки *Plumatella fungosa* (Pallas) не продуцировали статобласты, трубки цистидов растворялись, и немногочисленные живые зоиды сохранялись лишь по краям колонии. Дрейссена на всех этих станциях испытывала угнетение. В обрастаниях встречались единичные постелигеры и молодые раковинки погибших моллюсков. Наименее загрязненными оказались р. Ухра, р. Сить, Первомайка. Большинство станций находилось в зоне с постоянно меняющимися уровнями загрязнения, что связано не только с антропогенной нагрузкой на водные объекты, но и с ежгодными колебаниями водного, температурного режимов, от которых зависела активность биологических процессов и в конечном итоге интенсивность процессов самоочищения. В целом высокий уровень режим, сформированный паводковыми водами и сохраняющийся длительное время, в сочетании с низким поверхностным стоком и высоким прогревом воды в летний период способствовали снижению уровней загрязнений в Верхневолжском регионе.

В зонах с умеренным искусственным повышением температуры воды за счет работы тепловых электростанций и обогащения воды взвесями естественного происхождения, напротив, происходило увеличение видового разнообразия, усиление процессов обрастания главным образом путем гипертрофии мшанок, при этом наблюдалось ускорение циклов развития и увеличение продолжительности периода размножения у некоторых беспозвоночных. Параллельно происходило снижение таксономического разнообразия холодолюбивых видов. Подобные изменения могут возникнуть в водохранилищах при потеплении климата.

При исследовании степени загрязнения малых рек по зооперифитону отмечалось наличие слабых корреляций между уровнем развития сообществ и функционально значимыми факторами среды, такими как содержание кислорода, ХПК, скорость течения и др., свидетельствующие лишь об отсутствии на данный момент прямой зависимости между ними (Скальская и др., 2007). В связи с этим в исследованиях уровней загрязнения рек высокоинформативную ценность представляют сапробиотические показатели. В зооперифитоне малых рек Латка (приток Рыбинского водохранилища) и Сестра (приток Иваньковского водохранилища), загрязняемыми соответственно стоками сыроваренного завода и промышленными предприятиями г. Клин, происходило подавление олигосапробиотических организмов, характеризовавшихся высоким видовым богатством. Они замещались бентосными организмами, главным образом сапробиотическими личинками хирономид р. *Chironomus*, которые развивались в массе. Одновременно усиливалась роль полисапробиотических видов нематод и олигохет. Однако восстановление естественных структур зооценозов загрязненных водотоков может идти сравнительно быстро. Так, после прекращения сброса сточных вод сыроваренного завода в р. Латка наблюдалось постепенное восстановление естественных структур. Одним из ярких показателей снижения уровня ее загрязнения оказалось выпадение из состава зооценозов полисапробиотических личинок хирономид *Chironomus piger* Strenzke, хотя другие виды р. *Chironomus* все еще занимали лидирующие позиции.



Кроме того, в зооценозах появлялись, хотя и немногочисленные, личинки ручейников, поденок, остракоды и другие беспозвоночные.

**Бытовое загрязнение.** Высокое содержание в толще воды водохранилищ взвесей антропогенного происхождения, аналогично влиянию промышленных стоков, подавляло развитие беспозвоночных-фильтраторов, но не приводило к экспансии на свободные субстраты бентосных организмов. Седиментация в субстратах большого количества органических взвесей вызывала обильное развитие и формирование моно- или бидоминантных сообществ наидидного типа. В районе водохранилища, загрязненной стоками г. Твери, развивались зооценозы, в которых относительная роль червей могла достигать 98.8% общей численности и 96.0% общей биомассы. В числе лидеров оказывались черви *Nais barbata* O.F.Müller, *Dero obtusa* d'Udekem, *Aulophorus furcatus* (O.F. Müller) с высокими индексами сапробиности (2.7-2.8).

**Закисление.** В слабоминерализованных озерах Дарвинского заповедника совместное воздействие неблагоприятных естественных и антропогенных факторов (закисление) в первую очередь проявлялось в снижении таксономического разнообразия зооперифитона. Самой уязвимой группой беспозвоночных оказались моллюски. Дефицит минеральных солей в сочетании с низкими значениями pH послужили главной причиной отсутствия этих беспозвоночных в озерах заповедника, в то время как в зооперифитоне нейтрального с высокой минерализацией воды оз. Плещеево их насчитывалось более двух десятков видов. Кроме того, в закисленных озерах из состава зооценозов выпадали гомотипные беспозвоночные - губки, мшанки, пиявки, ракообразные и другие гидробионты. В слаборазвитых сообществах преобладали личинки амфибиотических насекомых, круглые и малощетинковые черви. Эти же группы беспозвоночных оставались и в сильно загрязненных токсическими веществами участках Рыбинского водохранилища, что позволяет предполагать наличие единых механизмов трансформации среды и биоты в условиях закисления и антропогенного загрязнения водоемов.

При оценке экологического состояния водоемов по различным биотопическим группировкам беспозвоночных часто используется индекс видового разнообразия Шеннона-Уивера, при этом его низкие величины связывают с наличием антропогенного загрязнения, что не всегда подтверждалось нашими исследованиями. При расчете индекса используется два показателя – число видов в пробах и характер распределения их обилия. Совместное влияние этих параметров на величину индекса неоднозначно. Очень часто сообщества, сильно различающиеся по числу видов, имели одинаковые величины индекса или, наоборот, богатые по числу видов ценозы характеризовались крайне низкими его значениями. Для выявления приоритетной значимости каждого из двух учитываемых показателей на величину индекса разнообразия проанализированы его связи с числом видов, с одной стороны, и с индексом доминирования Симпсона по численности и биомассе, с другой (Скальская, 2010). Результаты показали, что наиболее четкая положительная зависимость между этими показателями проявилась в экологически благополучном оз. Плещеево, в котором зарегистрированы самые богатые сообщества обростателей. В зооперифитоне отмечалось наиболее высокое для исследованных водных объектов разнообразие видов, низкий индекс доминирования и максимальное значение индексов Шеннона-Уивера.



В водных объектах, подвергающихся различным видам антропогенного воздействия, как правило, наблюдался рост уровня доминирования отдельных видов при сопутствующем возрастании или снижении видового богатства зооценозов. Подобная ситуация отмечалась на участках, подвергающихся загрязнению бытовыми стоками, причем низкие величины индекса видового разнообразия Шеннона-Уинера зарегистрированы при максимальном числе видов и высоким доминированием 1-2 видов олигохет. В данном случае высокое видовое богатство поддерживалось главным образом за счет червей. В закисленных озерах Дарвинского заповедника снижение общего видового богатства зооперифитона и числа видов в пробах существенно не повлияло на величины индекса разнообразия за счет развития в бедных сообществах ацидотолерантных видов, способных адаптироваться к низким значениям рН.

Низкие величины индекса разнообразия при высоком видовом богатстве отмечались и в экологически благополучных зонах водохранилищ в случае доминирования в зооперифитоне олиго- и  $\beta$ -мезосапробных беспозвоночных (губок, мшанок, дрейссены), что может приводить к ошибочным выводам о наличии загрязнений. Следовательно, величины индекса видового разнообразия Шеннона-Уинера в большей степени зависят от уровня концентрации доминирования отдельных видов по сравнению с видовым богатством сообществ. В связи с тем, что в зонах антропогенного воздействия отмечалось выпадение из состава зооценозов целых групп беспозвоночных из различных таксономических категорий – гидр, пиявок, моллюсков, личинок ручейников, поенок и т.д., свойственных незагрязненным водоемам, оценка разнообразия сообществ на уровне видов недостаточна. Предложено учитывать дополнительно число групп гидробионтов не ниже ранга семейства, экологическую валентность и сапробность видов, входящих в состав доминантов (Скальская, 2002, Скальская и др., 2007).

Антропогенное воздействие на сообщества обитателей в большинстве случаев имело двойственную природу – ингибирование или стимулирование процессов жизнедеятельности гидробионтов, что в итоге приводило к глубоким структурным перестройкам, активизации или подавлению сукцессионных процессов. Накопленный опыт исследования зооперифитона с применением метода искусственных субстратов позволяет рекомендовать его в качестве надежной и объективной оценки экологического состояния различных водных объектов, выявлении уровней и типов антропогенного воздействия на водную среду.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скальская И.А. Методика оценки антропогенного воздействия на водоем по состоянию зооперифитона на искусственных субстратах // Биология внутренних вод: Информ. бюлл. 1992. № 93. С. 82-87.
2. Скальская И.А. Зооперифитон водоемов бассейна Верхней Волги // ИБВВ РАН. Рыбинск, 2002. 255 с.
3. Скальская И.А. Параметрическая оценка структуры зооперифитона разнотипных водных экосистем с помощью некоторых индексов и возможность типизации зооценозов // Сб. Экология и морфология беспозвоночных континентальных вод, посвященный 100-летию со дня рождения Ф.Д. Мордухай-Болтовского. Уч. РАН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папангина. Изд-во «Наука ДНЦ», 2010. С. 344-363.
4. Скальская И.А., Баканов А.И., Флеров Б.А. Зооперифитон и зообентос малой реки и влияние на них антропогенной нагрузки // Биология внутр. вод. 2007. №3. С.56-64.
5. Скальская И.А., Флеров Б.А. Оценка экологического состояния Верхней Волги (территория Ярославской обл.) по зооперифитону // Экология. 1999. № 6. С. 442-448.

**RESULTS AND PERSPECTIVES OF THE APPLICATION OF THE METHOD OF ARTIFICIAL SUBSTRATES FOR THE STUDY OF THE PERIPHYTON COMMUNITY RESPONSE TO CHANGING ENVIRONMENT IN NATURAL AND ANTHROPOGENICALLY DISTURBED AQUATIC MEDIUM**

I.A. Skalskaya

The results of the study of different anthropogenic impact (industrial and domestic pollution, acidification) on zooperiphyton in reservoirs, lakes and small rivers of the Upper Volga basin are presented. The possibility of the application of the method of artificial substrates for assessment of the ecological state of water objects has been considered. Inhibition or stimulation of living activity of true periphyton invertebrates with filtration mode of feeding (sponges, bryozoans and zebra mussels) depended on the type of anthropogenic impact, and the volume and concentrations of suspended matters entering the waterbodies and water courses and resulted in profound structural reorganizations of communities. In most cases the formation of technogenous structures increased the role of detritophage-collectors: meso- and polysaprobic larvae of chironomids, oligochaetes and nematodes. The developed criteria for assessment of the periphyton communities' state make it possible to outline the zones and levels of pollution of reservoirs, lakes and small rivers.

# ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБНЫХ СТРУКТУР В ТКАНЯХ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ

Л.Н. Ушева\*, Л.В. Зверева

Учреждение Российской академии наук Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, Россия  
\*lnusheva@mail.ru

Микологическое обследование двустворчатых моллюсков из залива Петра Великого Японского моря показало, что при раздельном культивировании отпрепарированных органов гидробионтов на питательных средах выявлялись мицелиальные грибы. Однако при этом оставался вопрос, существуют грибы в активном жизненном состоянии или споры грибов обсеменяют органы двустворчатых моллюсков (мантию, жабры и др.), контактирующие с окружающей морской средой. Для успешного решения этого вопроса необходимо было выяснить способность грибов прорастать в ткани гидробионтов и в первую очередь провести скрининг гистопатологических и гистохимических методов идентификации грибных структур в мягких тканях двустворчатых моллюсков. Методы идентификации грибов в тканях морских животных в настоящее время не разработаны и не стандартизированы.

Цель данного исследования – провести скрининг гистопатологических и гистохимических методов идентификации грибных структур в мягких тканях двустворчатых моллюсков и выявить оптимальные методы их обнаружения (распознавания).

В качестве материала для исследования был использован двустворчатый моллюск приморский грёбешок *Mizuhopecten yessoensis* из залива Петра Великого Японского моря. Отпрепарированные органы моллюска - жабры, мускул, пищеварительная железа (ПВЖ), почки, мужская и женская гонады были обработаны в течение двух часов в растворах пенициллина и стрептомицина (в концентрации 500 тыс. ед./л и 0,5 г/л соответственно) для подавления сопутствующей бактериальной флоры. После промывки в стерильной морской воде органы помещали в чашки Петри на агаризованную универсальную среду Сабуро.

Для гистологического анализа были выбраны участки тканей моллюска, покрытые колониями грибов, выросших из инфицированных грибами тканей, с целью выявления мицелиальных структур. В посевах из органов моллюска вырастали колонии грибов 1 – 5 видов, но для чистоты эксперимента выбирался двухкомпонентный участок материала, содержащий фрагмент ткани и 1 колонию гриба. Участки колоний гриба с подлежащими тканями моллюсков размером 5x10 мм были вырезаны, зафиксированы в 10 % нейтральном формалине в 50 % стерильной морской воде в течение двух суток, отмыты в стерильной морской и в дистиллированной воде; парафиновые срезы толщиной 5 - 7 мкм были приготовлены по общепринятым методам.

Данные о видовом составе морских грибов (Pivkin, 2000; Зверева, Высоцкая, 2005; Van Dover et al., 2007; и др.) позволяют предположить, что поскольку грибы, колонизирующие морские субстраты и животных, являются факультативно морскими грибами, широко распространенными и в наземных местообитаниях, то методики гистологических окрасок для выявления фитопатогенных грибов должны быть пригодны и для морских микромицетов. Для выявления грибных структур в тканях моллюска был проведен скрининг комбинированных гистологических

окрасок, используемых в основном в фитопатологии, а также в отдельных работах, выполненных на морских беспозвоночных (Методы экспериментальной микологии, 1982; Барыкина и др., 2004; McGladdery et al., 2006):

- (1) гематоксилин Делафильда и эозин;
- (2) гематоксилин Делафильда и конго красный;
- (3) железный гематоксилин по Вейгерту – прочный зеленый – сафранин О;
- (4) генциан фиолетовый – сафранин О – оранжевый G по Флемингу;
- (5) тионин – оранжевый G по Стоутону.

Также для идентификации грибных структур на тканевых срезах были использованы традиционные гистохимические окраски на нейтральные и кислые полисахариды: PAS-реакция (0,5 % перйодата калия вместо йодной кислоты), альциановый синий по Стивдену (Роскин, Левинсон, 1957; Луппа, 1980). Процесс окрашивания контролировали под микроскопом, подбирая наиболее подходящее для нашего материала время окраски, промывки, дифференцировки и дегидратации. Препараты просветляли в ксилоле и заключали в Дамар лак. Микроскопический анализ препаратов и фотографирование проводили на микроскопах Leica DM 4500 и Axiovert 200 M Zeiss с программным обеспечением Axio Vision 4.8. Использовали при анализе препаратов разные увеличения микроскопа и интерференционный DIC контраст, позволяющие заметно улучшить разрешение при анализе грибных структур.

Проведен гистологический анализ тканей приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*, инфицированных мицелиальными грибами. Большинство мицелиальных грибов, выявленных во внутренних органах моллюска, относятся к анаморфным грибам, 3 вида – к сумчатым (Ascomycota), 1 вид – к зигомицетам (Zygomycota). Ткани моллюска были почти полностью разрушены грибами как питательный субстрат и представляли собой клеточный детрит, окрашенный альциановым синим на кислые мукополисахариды. Исключение составил мускула-аддуктор: он сохранил архитектуру, в нем различались мышечные волокна, сосуды, гранулы (гликоген).

В изученных образцах грибы образовывали субстратный (в ткани и в агаре) и воздушный мицелий, степень развития которого различалась у разных видов. Диаметр мицелия зависел от возраста. Зрелые гифы субстратного и воздушного мицелия обычно имели размеры около 2 мкм в диаметре, стареющие и некротизирующиеся гифы достигали 10 мкм в диаметре. Молодые растущие гифы субстратного и воздушного мицелия были обычно меньше 2 мкм. Самые тонкие гифы гриба найдены в мускуле-аддукторе. Они распространялись вдоль мышечных волокон. Грибы находились в стадии спорообразования и накопления вторичных экзогенных метаболитов. Грибы репродуцировали споры со стенками разной толщины, обладающими разным сродством к использованному красителю. Споры обнаружены в основном на воздушном мицелии грибов. Изредка эндогенные споры грибов находили в конидиогенных клетках мицелия в агаровом слое.

Все грибы были окрашены использованными нами красителями, но с разной интенсивностью (таблица). Красители окрашивали обычно стенки зрелых и стареющих и протопласт молодых растущих гифов. Наиболее интенсивно окрашивались стенки гифов субстратного мицелия на границе с воздушным. Интенсивность окрашивания грибов в одном органе разными красителями значительно различалась (таблица). Некоторые из красителей позволяли наблюдать гифы грибов в тканях уже при малом увеличении микроскопа, тогда как другие красители выявляли гифы при большом увеличении или при использовании

интерференционного DIC контраста. Время окраски грибных структур гематоксилином Делафильда оказалось наиболее длительным и составило 40 минут.

Таблица.  
Сравнительная характеристика интенсивности окрашивания грибов в тканях моллюска *Mizuhopecten yessoensis*

Методы окрашивания	Органы <i>Mizuhopecten yessoensis</i>					
	Почки	Жабры	Гонада мужская	Гонада женская	Мускул - аддуктор	ПВЖ
Гематоксилин Делафильда и розил	+++*	+++	+++/+++	+	++/+	++/+++
Гематоксилин Делафильда - конго красный	+	+++	++	+	++	++
Железный гематоксилин по Вейгерту - прочный зеленый -сафранин О	+ / ++	+	++	++	+++	+++
Сафранин О -генциан фиолетовый-оранжевый G по Флемингу	++/+	++/+++	+	+	+	+
Тионин- оранжевый G по Стоутону	+	+	+	+	++	++/+
Альциановый синий на кислые полисахариды по Сидмэну	+ / ++	+ / ++	+	+ / ++	++	+++
PAS-реакция на нейтральные полисахариды	++	+++	+++	++	+++ / ++++	+ / ++

\* - степень окрашивания: + слабая, ++ умеренная, +++ сильная, ++++ интенсивная

Из исследованных окрасок для морских мицелиальных грибов в тканях моллюсков наиболее оптимальными оказались три: PAS-реакция, тройная окраска железным гематоксилином по Вейгерту - прочным зеленым - сафранином О, двойная окраска гематоксилином Делафильда - конго красным. Эти методы позволяют достоверно выявлять как гифы гриба в тканях моллюска, так и исследовать морфологию разных структур гриба.

Исследования морских мицелиальных грибов поддержаны грантами Президиума РАН и ДВО РАН «Микробная биосфера» ДВО-1 № 09-И-П15-04, ДВО-3 № 09-И-А-06-201, ДВО-1 «Мониторинг биоразнообразия залива Петра Великого Японского моря» № 09-И-П23-01, ДВО-1 № 09-И-П15-03.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барькина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: МГУ. 2004. 312 с.
2. Зверева Л.В., Высоцкая М.А. Мицелиальные грибы-ассоцианты двустворчатых моллюсков из загрязненных биотопов Уссурийского залива Японского моря // Биология моря. 2005. Т. 31. С. 443-446.
3. Луппа Х. Основы гистохимии. - М.: Мир. 1980. 343 с.

4. Методы экспериментальной микологии. Справочник // Ред. Дудка И.А., Вассер С.Д., Элланская И.А. и др. Киев: Наук. Думка, 1982. 550 с.
5. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. М.: Советская наука, 1957. 467с.
6. Hayden, R.T., Qian X., Procop G.W. et al. In situ hybridization for the identification of filamentous fungi in tissue section // *Diagnos. Molec. Pathol.* 2002. 11(2). P. 119-126.
7. McGladdery S.E., Bower S.M., Getchell R.G. Diseases and Parasites of Scallops. 11.3. Mycota // In.: *Scallop: Biology, Ecology and Aquaculture.* (Ed. S.E. Shumway and G.J. Parsons). Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Vol. 35. Elsevier Science Publishers. 2006. P. 612-613.
8. McClenny N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach // *Medical Mycology. Supplement 1.* 2005. V. 43. P. 125-128.
9. Pivkin M.V. Filamentous fungi associated with Holothurians from the Sea of Japan, off the Primorye Coast of Russia // *Biol. Bull.* 2000. V. 198. P. 101-109.
10. Ravindran, J.C., Raghukumar C., Raghukumar S. Fungi in *Porites lutea*: association with healthy and diseased corals // *Dis. Aquat. Org.* 2001. V. 47 (3): 219-228.
11. Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infections // *J Antimicrob. Chemother.* 2005. V. 56. P. 5-11.
12. Van Dover C.L., Ward M.E., Scott J L. et al. A fungal epizootic in mussels at a deep-sea hydrothermal vent // *Mar. Ecol.* 2007. V. 28 (1). P. 54-62.

#### HISTOPATHOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL METHODS OF IDENTIFICATION OF MYCELIAL STRUCTURES IN SOFT TISSUES OF BIVALVES

L.N. Usheva, L.V. Zvereva

Screening of the histopathological and the histochemical methods of the identification of the fungal structures in the soft tissues of scallop *Mizuhopecten yessoensis* was carried out.

Histochemical PAS-reaction on polysaccharides and histopathological Weigert's iron hematoxylin - fast green - safranin O, Delafield's hematoxylin - kongo red methods are the most optimal methods for the identification of the mycelial structures of the marine fungi in the soft tissues of the Bivalves.

# ПАТОЛОГИЯ ПЕЧЕНИ У НЕКОТОРЫХ ВОЛЖСКИХ РЫБ

Н.Н. Федорова, А.А. Джуматова

*Астраханский государственный технический университет. Астрахань, Россия, adeka1988@mail.ru*

Пагубное воздействие синхронного увеличения концентрации тяжелых металлов, нефти и нефтепродуктов, пестицидов и фенолов в водах Волго-Каспийского региона отражается на физиологическом состоянии рыб и, как следствие, приводит к снижению их численности. В большинстве случаев изменения физиологии носит не патологический, а адаптивный характер (Земков, 2003). В настоящее время большое научно-практическое значение имеют физиолого-морфологические исследования рыб, так как они необходимы для оценки влияния условий обитания на организм рыб. Как правило, наиболее четко на изменения состояния окружающей среды реагируют такие органы рыб, как жабры, печень, почки. Спектр изменений в строении этих органов довольно широк (Крючков, 2004).

В связи с этим целью данной работы явился анализ изменений печени шук, окуней, жерехов, выловленных в дельте р. Волги.

В период сбора материал для гистологических исследований отбирался у живой рыбы. Органы и ткани сразу фиксировались в растворе Буэна.

Всего было исследовано 30 экземпляров шук, окуней, жерехов из Наримановского района дельты Волги. Изготовление и окраска препаратов проводилась по общепринятым методикам (Волкова, 1982). Основное внимание обращалось на общие изменения, проявившиеся на тканевом и клеточном уровнях: от незначительных расстройств и обратимых дистрофических процессов до тяжелых нарушений и очаговых некрозов.

В результате проведенного исследования было установлено, что загрязнение волжской воды поллютантами приводило к патологическим изменениям печени у изученных рыб, снижению сопротивляемости их организма, что способствовало загрязнению рыб гельминтами. В печени исследованных рыб чаще всего отмечалось нарушение балочной структуры. В печени наблюдалась разной величины зернистость цитоплазмы гепатоцитов. У некоторых из них была диагностирована жировая дистрофия. При этом в ткани печени обнаружилось многочисленное участие, представленные вакуолизированными гепатоцитами с ядрами, смещенными к периферии клеток. В ткани печени, особенно у окуней, - был обнаружен очаговый гемосидероз. В паренхиме содержалось множество центров скопления меланомакрофагов, аккумулирующих железосодержащий пигмент гемосидерин.

У большинства внешне здоровых рыб в печени наблюдались четко очерченные очаги клеточной алтерации. Кроме того, был отмечен значительный полиморфизм ядер гепатоцитов: от крупных светлых ядер до темных, плотных; наблюдались безъядерные клетки, а также клетки с amitotическим делением ядер. Для изученной группы рыб общим признаком явилось нарушение микроциркуляции крови различной степени тяжести. Обращает на себя внимание венозный застой, особенно на периферии органа: сосуды были неравномерно расширены и заполнены форменными элементами крови, преимущественно эритроцитами. Вокруг стенок крупных и мелких сосудов органа была выявлена инфильтрация лейкоцитами. Были отмечены множественные плазморрагии и геморрагии, особенно вокруг крупных сосудов.

Следовательно, основными патологическими изменениями общего характера в печени жереха, окуня, шуки дельтовой части р. Волги были неспецифическое



воспаление с преобладанием дистрофических и некротических явлений, нарушения кровообращения и сосудистые изменения, нарушения обмена липидов и белков (все и внутриклеточный гемосидероз).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
2. Крючков В.Н., Абдурахманов Т.М., Федорова Н.Н. Морфология органов и тканей водных животных – М.: Наука, 2004 – 144 с.
3. Земков Г.В., Журавлева Г.Ф., Федорова Н.Н., Молдавская А.А. Морфо-функциональные аспекты проявления токсикоза у рыб // Экспериментальные и научные наблюдения. – Астрахань.: АГМА, 2003. – 182 с.

### PATHOLOGY OF THE LIVER IN SOME FISH OF THE VOLGA

N.N. Fedorova, A.A. Dzhyratova

The study found that pollution of the Volga water pollutants lead to pathological changes in the liver of the studied species (pike, chub, perch).

# УЛЬТРАСТРУКТУРА ЛЕЙКОЦИТОВ ОКУНЕОБРАЗНЫХ РЫБ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

Е.А. Флёрва (Назарова)<sup>1\*</sup>, Е.А. Заботкина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГОУ ВПО «Ярославская государственная сельскохозяйственная академия»,  
Ярославль, Россия, \* katarinim@mail.ru

<sup>2</sup>Институт биологии внутренних вод РАН, Борок, Россия

В изменяющихся под влиянием различных факторов условиях окружающей среды особую значимость приобретает изучение функционального состояния организма как в пределах нормы реакции, так и при возникающих патологиях. У костистых рыб, как и у высших позвоночных животных, особый интерес уделяется исследованию иммунной системы, в частности ее клеточному звену, так как именно соотношение, количество и структура лейкоцитов теснейшим образом связаны с функциональным состоянием организма. Чтобы выявить норму или патологию по вышеперечисленным показателям, исследователю прежде всего необходимо правильно идентифицировать различные типы лейкоцитов. Тем не менее, несмотря на большое количество отечественных и зарубежных работ по морфологии лейкоцитов, сделанных на светомикроскопическом уровне, нет единообразия в их наименованиях (Калашникова, 1976). Кроме того, для близкородственных и/или одних и тех же видов рыб приводят лейкоцитарные формулы крови и иммунокомпетентных органов с различным составом лейкоцитов. Это вносит разноречивость в результаты исследований и затрудняет возможность сопоставления отдельных работ.

Настоящая работа посвящена изучению ультраструктуры клеток, образующих интерстициальную ткань мезонефроса судака, берша и окуня, так как именно почка считается основным органом кроветворения костистых рыб (Микряков и др., 2001). Между тем эти виды на территории Европейской части России имеют важное промысловое значение. Кроме того, окунь является объектом разведения, редко аквариумистики, используются как вид-индикатор при мониторинговых исследованиях по оценке влияния на рыб антропогенных факторов среды (Петросян). Поэтому исследования субмикроскопической структуры лейкоцитов данных видов представляют собой интерес с точки зрения сравнительной иммунологии, привнося свой вклад в решение проблемы классификации лейкоцитов.

В работе исследовали тонкое строение лейкоцитов мезонефроса 3 видов костистых рыб отр. Окунеобразные Perciformes: речной окунь *Perca fluviatilis* L., обыкновенный судак *Stizostedion lucioperca* (L.), волжский судак, берш *Stizostedion wolgensis* (Gmelin).

Рыб отлавливали в Волжском (ст. Коприно, р-н Красного ручья) и Главном (ст. Волково, Наволок, Брейтово и Первомайские острова) плесах Рыбинского водохранилища, согласно классификации (Буторин и др., 1975). Данные станции по гидрохимическим характеристикам являются чистыми, количество тяжелых металлов и органических загрязнителей не превышает ПДК (Козловская, Герман, 1997; Флеров и др., 2000; Бикбулатова и др. 2008; Степанова и др. 2008). Кусочки органов фиксировали и проводили по стандартной для электронной микроскопии методике. Ультратонкие срезы просматривали под электронным микроскопом JEM 1011. Полученные результаты подвергали статистической обработке в программе MS Excel 2003, в таблицах они представлены в виде средних значений и их ошибок.

Результаты исследований показали, что в интерстициальной мезонефросе всех исследованных видов выявлены следующие типы **Лимфоциты**, характерной чертой, которых является крупное округлое ядро с 1-2 ядрышками, занимающее почти весь объем клетки. В исследуемой встречаются клетки, узкий ободок цитоплазмы которых содержит 1-2 митохондрий, свободные рибосомы и отдельные цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума. Длина лимфоцитов варьирует от 4 до 5 расположенным округлым ядром. Цитоплазма содержит широкие цистерны развитого шероховатого эндоплазматического ретикулума, свободные митохондрии, лизосомы. Эти клетки крупнее, чем лимфоциты, их длина (Табл.1). **Макрофаги** - наиболее крупные (9 мкм) среди агранулоцитов (Табл.1). Ядро у макрофагов расположено эксцентрично, содержит 1-2 Гетерохроматина мало, в основном он располагается на периферии Цитоплазма содержит фагосомы, которые занимают практически весь объем Основная масса фагосом - это крупные электронно-плотные, иногда электропрозрачные включения. Помимо фагосом цитоплазма макрофагов содержит митохондрии, короткие каналы шероховатого эндоплазматического ретикулума, свободные рибосомы, лизосомы и мелкие светлые везикулы, у небольшого клеток отмечен аппарат Гольджи, располагающийся в околоядерной зоне.

Таблица 1.  
Морфометрические показатели агранулоцитов (мкм)

вид рыбы / тип структуры (lхh)	Окунь	Судак	Берш
<b>Лимфоцит</b>			
клетка	(4,58±0,15)х х(3,59±0,10)	(4,43±0,10)х х(2,03±0,10)	(3,38±0,21)х х(2,98±0,22)
ядро	(3,52±0,11)х х(2,95±0,15)	(2,98±0,13)х х(1,67±0,08)	(2,88±0,32)х х(2,23±0,10)
<b>Плазматическая клетка</b>			
клетка	(6,01±0,94)х х(4,54±0,47)	(5,85±1,34)х х(4,17±0,71)	(6,94±0,38)х х(4,54±0,44)
ядро	(3,89±0,71)х х(2,87±0,23)	(3,03±0,57)х х(2,13±0,35)	(3,99±0,04)х х(2,75±0,21)
<b>Макрофаг</b>			
клетка	(9,44±1,73)х х(6,80±0,29)	(8,68±1,87)х х(4,29±0,87)	(8,89±0,23)х х(5,75±0,05)
ядро	(5,07±0,49)х х(3,11±0,55)	(2,54±0,26)х х(1,62±0,18)	(5,55±0,25)х х(2,34±0,01)
размеры фагосом	(2,40±0,53)х х(1,76±0,28)	(1,38±0,19)х х(1,01±0,14)	(3,38±1,02)х х(1,76±0,37)
количество фагосом	3,33±0,67	5,67±1,67	2,33±0,33

Примечание: данные представлены в виде средних значений и ошибок среднего (х±SE); l-длина, h-ширина

**Нейтрофилы** всех исследованных видов рыб округлой формы с ацентрично расположенным ядром, некоторые клетки имеют псевдоподиеподобные выросты. Размеры гранулоцитов и субклеточных структур приведены в таблице 2. У исследованных видов длина нейтрофилов 6-7 мкм. Форма ядер варьирует от бобовидной до сегментовидной. Цитоплазма этих клеток содержит митохондрии, каналы шероховатого эндоплазматического ретикулума, иногда – фагосомы и мелкие светлые везикулы. Характерным признаком нейтрофилов являются специфические гранулы, заполняющие цитоплазму. Количество гранул в клетках окуня наименьшее по сравнению с судаком и бершом. Наиболее округлые гранулы обнаружены у окуня. Самыми вытянутыми гранулами обладают нейтрофилы берша (табл.2). Для большинства гранул характерны равномерно распределенные электронно-плотные фибриллы, тянущиеся вдоль органеллы. Кроме того, обнаружены гранулы с более светлой центральной частью и светлыми фибриллярными краями.

Таблица 2.  
Морфометрические показатели гранулоцитов (мкм)

вид рыбы / тип структуры (l x h)	Окунь	Судак	Берш
<b>Нейтрофил</b>			
клетка	(6,16±0,16) x x(5,08±0,32)	(5,87±0,51) x x(4,40±0,26)	(7,21±0,48) x x(4,99±0,51)
ядро	(3,81±0,29) x x(2,64±0,25)	(3,59±0,24) x x(2,05±0,03)	(3,51±0,46) x x(2,74±0,45)
размер гранул	(0,39±0,02) x x(0,25±0,02)	(0,31±0,03) x x(0,17±0,01)	(0,46±0,03) x x(0,13±0,01)
форм-фактор (FF)	0,64	0,55	0,28
количество гранул	(15,0±2,53)	(27,5±3,04)	(23,7±3,67)
<b>Эозинофил</b>			
клетка	(6,17±0,86) x x(4,03±0,26)	(4,92±0,65) x x(4,65±0,64)	(5,62±0,61) x x(4,69±0,92)
ядро	(4,20±0,46) x x(2,32±0,19)	(3,01±0,38) x x(1,91±0,25)	(2,74±0,57) x x(2,05±0,21)
размер гранул	(0,61±0,06) x x(0,40±0,05)	(0,53±0,06) x x(0,45±0,05)	(0,61±0,07) x x(0,48±0,05)
форм-фактор (FF)	0,66	0,85	0,79
количество гранул	(11,7±1,20)	(27,4±4,03)	(47,0±6,43)

Примечание: данные представлены в виде средних значений и ошибок среднего ( $\bar{x} \pm SE$ ); l-длина; h-ширина

**Эозинофилы** всех исследуемых видов также имеют округлую форму. У окуня длина гранулоцитов этого типа, как и нейтрофилов, составляет 6 мкм. Клетки судака и берша меньших размеров по сравнению с гранулоцитами I типа (табл. 2). Ядро зрелых эозинофилов, как правило, бобовидное или сегментовидное, располагается на периферии клетки. Цитоплазма гетерогенная, зернистая, содержит митохондрии, цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума, лизосомы,

округлые электронно-плотные специфические гранулы гомогенной структуры. Наибольшее количество гранул обнаружено в клетках берша, наименьшее – в клетках окуня. При сравнении гранулоцитов внутри одного вида рыб гранулы эозинофилов крупнее, чем гранулы нейтрофилов (табл. 2).

Таким образом, изучение иммунокомпетентных клеток рыб отрада окунеобразные показало, что лимфоциты, плазматические клетки, а также макрофаги не имеют каких либо видовых особенностей в тонком строении по сравнению с ранее исследованными агранулоцитами некоторых видов костистых рыб, земноводных, рептилий, птиц и млекопитающих (Хамидов, Нишанбаев, 1975; Балабанова, 2005; Флёрова, 2011; Pitel et al, 2007), незначительно различаясь лишь размерами. Основные отличия наблюдались в количестве и ультраструктуре специфических гранул нейтрофилов и эозинофилов при сравнении их с таковыми у других групп позвоночных животных (Хамидов, Нишанбаев, 1975; Флёрова, 2011), что, по видимому, привело к появлению различной терминологии относительно одних и тех же форм лейкоцитов на светомикроскопическом уровне.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ, грант МК-652.2011.4 и поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ), грант 11-04-01168-а.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балабанова Л. В. Ультраструктура иммунокомпетентных клеток некоторых видов лососеобразных рыб // Биология внутренних вод. - 2005. - №2. - С. 82-87.
2. Бикбулатова Е.М., Бикбулатов Э.С., Степанова И.Э. Изменчивость показателей органического вещества в Рыбинском водохранилище // Мат. докл. конференции «Актуальные проблемы экологии Ярославской области». Ярославль. 2008. - С. 121-124
3. Калашникова З. М. О классификациях морфологических элементов крови рыб // Вопросы ихтиологии. 1976. - Т.16.- № 3 (98). - С. 510-524.
4. Козловская В. И., Герман А. В. Полихлорированные бифенилы и полиароматические углеводороды в экосистеме Рыбинского водохранилища // Водные ресурсы. 1997. - Т.24. - № 5. - С. 563-569.
5. Микряков В. Р., Балабанова Л. В., Заботкина Е. А., Лапирова Т. Б., Попов А. В., Силкина Н. И. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами в закисление среды. - М.: Наука, 2001. 126 с.
6. Петросян В.Г. Позвоночные животные России: волжский судак, берш [электронный ресурс] / -Москва. – Режим доступа <http://www.sevin.ru/vertebrates/index.html?Fishes/216.html> – загл. с экрана.
7. Петросян В.Г. Позвоночные животные России: обыкновенный судак [электронный ресурс] / - Москва. – Режим доступа :<http://www.sevin.ru/vertebrates/index.html?Fishes/215.html> – загл. с экрана.
8. Петросян В.Г. Позвоночные животные России: речной окунь [электронный ресурс] / - Москва. – Режим доступа <http://www.sevin.ru/vertebrates/index.html?Fishes/213.html> – загл. с экрана.
9. Степанова И.Э., Бикбулатов Э.С., Бикбулатова Е.М., Биогенные элементы в Рыбинском водохранилище на современном этапе // Мат. докл. конференции «Актуальные проблемы экологии Ярославской области». Ярославль. 2008. - С. 213-219.
10. Флёров Б.А., Томиллина И. И., Кливленд Л., Баканов А. И., Гапеева М. В. Комплексная оценка состояния донных отложений Рыбинского водохранилища // Биология внутренних вод. 2000. - №2. - С. 148-155.
11. Флёрова Е.А. Особенности ультраструктуры лейкоцитов рыб отряда Карпообразные (Сургинiformes) // Вестник АПК Верхневолжья. 2011. - №1. - С. 87-91.
12. Хамидов Д.Х., Нишанбаев К.Н. Сравнительное электронномикроскопическое исследование лейкоцитов периферической крови позвоночных животных // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1975. - Т. LXIX. - №7. - С. 76-83.

13. Pitol D. L., Issa J. P. M., Caetano F. H., Lunardi L. O. Morphological characterization of the leukocytes in circulating blood of the turtle (*Phrynops hilarii*). Int. J. Morphol. 2007.- 25(4) - P. 677-682.

#### **ULTRASTRUCTURE OF PERCID FISH LEUKOCYTES FROM THE EUROPEAN PART OF RUSSIA**

**E.A. Flerova (Nazarova), E.A. Zobotkina**

The article deals with ultrafine structure of lymphocytes of the following teleost species *Perca fluviatilis* L., *Stizostedion lucioperca* (L.), *Stizostedion volgensis* (Gmelin). It is shown that ultrastructure of lymphocytes, plasmatic cells and macrophages of studied fish species is similar to that of other vertebrates. The only differences were observed in the structure of neutrophil and eosinophil granules. An assumption is made stating that presence of ultrastructural features of the same granulocyte types in different fish species led to different terminology relative of these cells on light microscopy level.

# ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ И ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ РЫБ

С.Д. Чернявских\*, М.З. Федорова

Белгородский государственный национальный исследовательский университет  
«БелГУ», Белгород, Россия, \*Chernyavskikh@bsu.edu.ru

В научной литературе имеется немало работ, посвященных изучению основных этапов фагоцитарного процесса белых клеток крови млекопитающих животных и человека. Выявлены особенности спонтанной и стимулированной миграции, а также изменения поглотительной способности и адгезионных свойств лейкоцитов при различных функциональных и патологических состояниях организма (Ерьюхин и др., 1989; Маянский, 1993). Эритроциты низших позвоночных животных, в частности земноводных, также способны к миграционной активности и поглощению чужеродных частиц (Fedorova et al., 2008). Высказано предположение, что все ядерные эритроциты обладают локомоционной и поглотительной способностями (Prunescu, 1971).

Целью исследования была сравнительная оценка фагоцитарной активности эритроцитов и лейкоцитов рыб в опытах *in vitro*.

В работе использовали кровь, взятую у наркотизированных эфиром сазанов (*Cyprinus carpio*) (30 особей). Забор крови осуществляли из хвостовой вены. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (10 ед./мл.). Полученную кровь центрифугировали 4 мин. при 1500 об/мин, собирали граничащий с плазмой слой клеток с более высоким, чем в цельной крови, содержанием лейкоцитов. Отмытые и ресуспендированные гемоциты подсчитывали в камере Горяева.

В осенний (октябрь) и зимний (февраль) периоды было проведено 3 серии опытов. В первой, предварительной, изучали способность ядерных эритроцитов *Cyprinus carpio* к локомоциям. Во второй серии определяли миграционную активность красных и белых клеток крови рыб при разной температуре инкубации (8°C, 22°C, 37°C) в условиях *in vitro*. В третьей серии оценивали поглотительную способность эритроцитов и полиморфноядерных лейкоцитов.

Спонтанную локомоционную активность оценивали по площади миграции клеток под агарозой. За основу был взят классический метод, описанный в многочисленных работах (Nelson et al., 1975; Дуглас и др., 1983) в модификации (Федорова и др., 2001). В лунки, вырезанные в агарозном геле, нанесенном на предметное стекло, помещали по 3 мкл суспензии гемоцитов, содержащей около 1 млн клеток. Стекла с эритроцитами и лейкоцитами инкубировали в среде с 5% содержанием CO<sub>2</sub> при разной температуре в течение суток, после чего клетки фиксировали глutarовым альдегидом и окрашивали азур-эозином. На малом увеличении микроскопа (x40) с помощью окуляр-микрометра определяли площадь спонтанной миграции клеток.

Для изучения поглотительной способности суспензию лейкоцитов и эритроцитов с объектами фагоцитарной реакции в соотношении 1:50 помещали в пробирки и инкубировали в течение 30 мин. Подсчитывали процент фагоцитирующих клеток (фагоцитарную активность) и среднее число поглощенных частиц (фагоцитарный индекс) (Александров и др., 1988). При подсчете использовали иммерсионное увеличение - объектив x90ММ, окуляр x15. В качестве объектов фагоцитоза использовали дрожжевые клетки (*Saccaromyces cerevisiae*) и сенную палочку (*Bacillus subtilis*) (Воробьев и др., 2001; Глик и др., 2002).

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием специальных программ на персональном компьютере. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента.

В первой серии опытов было показано, что ядерные эритроциты рыб являются клетками, способными к спонтанному локомоциям. После 24-х часов инкубации при комнатной температуре за края лунки мигрировали как лейкоциты, так и эритроциты сазана (рис.).

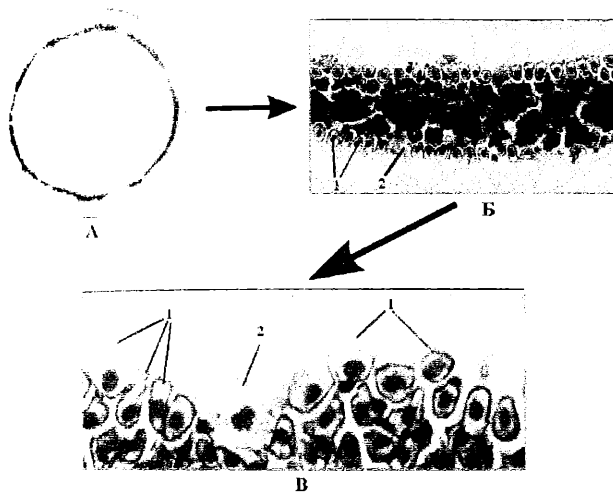


Рисунок. Распределение клеток крови в лунке через сутки после инкубации.

А – малое увеличение (x40). Б – большое увеличение (x400). Б' – большое увеличение (2000).

1 – эритроциты, 2 – лейкоциты.

Во второй серии опытов было установлено, что у рыб в осенний период повышение температуры инкубации клеток крови до 37°C способствует увеличению площади спонтанной миграции эритроцитов и лейкоцитов на 7,03% и 21,61% в сравнении с температурой 22°C и на 11,11% и 15,93% в сравнении с температурой 8°C (табл.1).

Таблица 1.

Показатели площади спонтанной миграции клеток крови рыб (мм<sup>2</sup>)

Температура инкубации	Период исследования	Вид клеток крови	
		Эритроциты	Лейкоциты
8°C	Осенний	3,15±0,15	3,64±0,60
	Зимний	3,08±0,18	3,13±0,12
22°C	Осенний	3,27±0,25	3,47±0,25
	Зимний	3,12±0,40	3,18±0,50
37°C	Осенний	3,50±0,28 <sup>бс</sup>	4,22±0,17* <sup>бс</sup>
	Зимний	2,85±0,18	3,36±0,47

Примечание: \* - достоверность различий по сравнению с эритроцитами, & - по сравнению с температурой 8°C, ° - по сравнению с температурой 22°C по t-критерию Стьюдента (p<0,05).



В зимний период изменение температуры инкубации не влияло на миграционную активность красных и белых клеток крови сазана. Осенью при температурах 8°C и 22°C площадь миграции эритроцитов и лейкоцитов отличалась незначительно. При температуре 37°C зарегистрировано снижение миграционной активности эритроцитов по сравнению с лейкоцитами (20,57%).

Фагоцитарная активность и фагоцитарный индекс в зимний период у эритроцитов выше, чем у лейкоцитов к клеткам дрожжей на 25,91% и 30,95%, к сенной палочке на 16,92% и 17,65% (табл. 2). В осенний период процент фагоцитирующих красных клеток крови также выше, в сравнении с белыми, к сенной палочке. Разница составляет 30,65%.

Таблица 2.

Показатели поглотительной способности клеток крови рыб

Объект фагоцитоза	Показатели поглотительной способности, ед. изм.	Период исследования	Вид клеток крови	
			Эритроциты	Полиморфно-ядерные лейкоциты
Дрожжи	ФА, %	Осенний	29,60±2,90	24,30±2,02
		Зимний	38,60±1,8 <sup>®</sup>	28,60±1,85*
	ФИ, отн. ед.	Осенний	0,31±0,03	0,26±0,02
		Зимний	0,42±0,02 <sup>®</sup>	0,29±0,02*
Сенная палочка	ФА, %	Осенний	33,60±2,20	23,30±1,85*
		Зимний	32,50±2,50	27,00±0,01*
	ФИ, отн. ед.	Осенний	0,34±0,06	0,23±0,02
		Зимний	0,34±0,03 <sup>а</sup>	0,28±0,01* <sup>®</sup>

Примечание: ФА - фагоцитарная активность; ФИ - фагоцитарный индекс; достоверность различий: \* - в сравнении с эритроцитами; <sup>®</sup> - в сравнении с осенним периодом, <sup>а</sup> - в сравнении с клетками дрожжей по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

Сравнительный анализ данных, полученных при изучении поглотительной способности гемцитов рыб, показал наличие сезонных колебаний показателей фагоцитарной активности и фагоцитарного индекса красных и белых клеток крови. У эритроцитов зимой выше ФА и ФИ к клеткам дрожжей на 30,41% и 35,48%, чем осенью (см. табл. 2). У лейкоцитов в зимний период среднее число поглощенных частиц к сенной палочке на 21,74% превышает показатель, полученный в осенний период. Зимой у эритроцитов фагоцитарная активность к дрожжам выше, чем к сенной палочке на 15,80%. Такого рода различия свидетельствуют о значительной напряженности в зимние месяцы физиологических реакций клеток, выполняющих в организме защитные функции. Результаты, демонстрирующие усиление защитных свойств организма в зимний период описаны и другими авторами (Деряпа, 1985).

В результате проведенных исследований установлено, что у эритроцитов и лейкоцитов рыб площадь миграции возрастает по мере увеличения температуры окружающей среды. Значимость этого фактора для функционального состояния клеточных мембран как пойкилотермных, так и гомойотермных организмов обусловлена тем, что он определяет так называемые «слабые» взаимодействия между молекулами, регулируя микровязкость липидного бислоя, фазовое распределение липидов, микроокружение белков, белок-липидные взаимодействия и другие характеристики структурной организации мембраны (Горюнов и др., 2001). Данные, полученные на крови рыб, согласуются с результатами других авторов.

которые отмечают положительное влияние повышенной температуры на клеточные и гуморальные звенья иммунитета при значениях температуры, не превышающих 40°C (Васильев и др., 1992). Одним из пусковых механизмов является сигнал с рецепторных белков теплового шока, индуцирующий иммунный ответ (Александров и др., 1996). Полученные несоответствующие по выраженности и направленности изменения поглотительной способности и локомоторных реакций эритроцитов и лейкоцитов рыб отражают сложность регуляторных механизмов, координирующих клеточные реакции в организме (Тышко, 1992).

Более высокая фагоцитарная активность эритроцитов к дрожжевым клеткам, возможно, связана с наличием у рыб видовой иммунитета к данным микроорганизмам. Общеизвестно, что одним из мест обитания дрожжей являются природные воды (Simon et al., 2002), являющиеся для рыб средой обитания. Сниженная фагоцитарная активность к сенной палочке у рыб в сравнении с дрожжами может быть следствием нескольких причин. Во-первых, для сенной палочки, несмотря на ее широкую распространенность в природе, водоемы не являются средой обитания (Глик, 2002). Во-вторых, данный микроорганизм синтезирует антибиотик субтилин (Янгирова, 2005), который, возможно, у рыб ингибирует процессы фагоцитоза.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров М.Т., Кудрявицкий А. И., Румянцева Е.Г., Климova Л.А., Ларская М.В. Метод вычисления абсолютных показателей фагоцитоза // Лабораторное дело. - 1988. - №9. - С. 30-32.
2. Воробьев А.А., Кривошеник Ю.С., Быков А.С. и др. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. М.: Магстерство, 2001. – 221 с.
3. Глик Б., Пастернак Д. Молекулярная биотехнология. – М.: Мир, 2002. – С. 27.
4. Горюнов А.С., Борисова А.Г., Суханова Г.А. Терморезистентность эритроцитов и гемоглобина при акклиматизации радужной форели *Salmo irideus* // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2001. Т. 37. С. 416-418.
5. Деряна Н.Р., Мошкин М.П., Посный В.С. Проблемы медицинской биоритмологии - М.: Медицина, 1985. 208 с.
6. Дуглас С.Д., Кун П.Г. Исследование фагоцитоза в клинической практике: Пер. с англ. - М.: Медицина, 1983. - 112 с.
7. Ерюхин И.А., Белый В.Я., Вагнер В.К. Воспаление как общебиологическая реакция: на основе модели острого перитонита. - Л.: Наука, 1989. - 262 с.
8. Маянский А.Н. Фагоцитоз: проблемы и перспективы // Вестник РАМН. - 1993. - №4. - С.52-55.
9. Тышко Н.А. Действие аутосыворотки на функции фагоцитирующих клеток периферической крови // Клиническая лабораторная диагностика. - 1992. - №11-12. - С. 53-54.
10. Федорова М.З., Левин В.Н. Спонтанная миграция нейтрофилов крови в смешанной популяции лейкоцитов и ее изменения под влиянием веществ аутоплазмы при различных функциональных состояниях организма // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. - №5. – С. 16-19.
11. Янгирова З. З. Разработка и изучение иммунологических свойств нового лекарственного средства – бактиспоринпласта. Дис.... канд. биол. наук. – Уфа, 2005. – 132 с.
12. Nelson R.D., Quie P.G., Simmons R.L. Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes // J. Immunol. - 1975. - v.115. - P.1650-1656.
13. Prunesco H. Natural and experimental phagocytosis by erythrocytes in Amphibians // Nature. New Biol. 1971. V. 231. N 22. P. 143-144.
14. Simon P., Houston P., Broach J. Directional bias during mating type switching in *Saccharomyces* is independent of chromosomal architecture // EMBO J. — 2002. — T. 21. — №9. — С.2282 — 2291.

15. Fedorova M.Z., Chernyavskikh S.D., Zabinyakov N.A., Pavlov N.A., Zubareva E.V. Comparative evaluation of the locomotion activity of vertebrates' blood cells / M.Z. Fedorova, // Biological motility. Achievements and perspectives. - Pushchino, 2008. - P. 212-213.

## **THE PHAGOCYTTIC ACTIVITY OF ERYTHROCYTES AND LEUKOCYTES OF FISH BLOOD**

**S.D. Chernyavskikh, M.Z. Fedorova**

We established that nuclear fish red blood cells are the ones who have the capability to locomotion. The raise of the spontaneous migration area was recorded after the temperature increasing of hemocytes incubation both for red and white blood cells in the in vitro experiments at 37°C temperature. Seasonal differences in absorptive capacity of hemocytes indicated considerable stress of physiological cell reactions, which play the defensive role in the living organism, in winter period. The phagocytic activity of nuclear fish red blood cells is higher than polymorphonuclear leukocytes have in winter by using the yeast and grass hay bacillus cells as the targets for phagocytosis.

## СЕКЦИЯ II. ИММУНИТЕТ РЫБ И ДРУГИХ ГИДРОБИОНТОВ К ПАРАЗИТАМ

### ИММУНОПРОФИЛАКТИКА ЛОСОСЕВЫХ РЫБ В ФГУП ПФЗ «АДЛЕР»

Я.В. Кондратенко, Ю.А. Папазян

Федеральное государственное унитарное предприятие племенной форелеводческой  
завод «Адлер» 354393 г. Сочи-А 393, пос. Казачий Брод,  
stbf.adler@mail.ru

ФГУП ПФЗ «Адлер» является одним из крупнейших рыбоводных предприятий в Российской Федерации. Одной из основных целей предприятия является поставка на рынок качественного, жизнестойкого рыбопосадочного материала и живой икры лососевых рыб, свободных от инфекционных заболеваний. С этой целью осуществляется регулярный эпизоотический мониторинг хозяйства.

Современное рыбоводство делает свой выбор в пользу наиболее экономичных, но при этом, экологически чистых способов выращивания рыбы. Однако увеличение плотностей посадки и многократное использование биологически отчищенной воды, в рамках интенсификации производства, а также осуществление стандартных технологических операций (сортировка, меченье, отбор половых продуктов, транспортировка и пр.) увеличивает стрессовое воздействие, оказываемое на рыб. В связи с этим иммунопрофилактика, будучи наиболее безопасным методом в борьбе с болезнями рыб, имеет наибольшую привлекательность для рыбоводства.

Одним из методов иммунопрофилактики лососевых рыб, применяемых на ФГУП ПФЗ «Адлер» является проведение лечебно-профилактических кормлений. Начиная с перехода личинок лососевых рыб на активное питание, производится регулярное введение в их корма различного рода витаминных премиксов, кормовых пробиотиков и прочих иммунопрофилактических препаратов. Для проверки действия используемых препаратов на хозяйстве был поставлен ряд производственных экспериментов на молоди радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* W.) и черноморской кумжи (*Salmo trutta labrax* L.), всех испытуемых рыб разделяли на две группы – опытную и контрольную – в трех повторностях. Были использованы следующие препараты и схемы кормления:

1. Введение в корма повышенных доз витамина С (4 г/кг корма) в комплексе с β-каротином (жидкая форма (2%) 2,5 мл/кг корма). Ежедневное четырехкратное кормление в течение двух недель двумя курсами по пять дней. Прокармливались мальки радужной форели и черноморской кумжи.

2. Введение в корма пробиотиков. Бактериальные культуры *Bacillus Subtilis* и *V. Lichineformes* в количестве 10 мл жидкого пробиотика ( $5 \times 10^6$  КОЕ/г). Ежедневное четырехкратное кормление в течение двух недель двумя курсами по пять дней. Прокармливались сеголетки радужной форели.

3. Введение в корма иммунокорректора «Ронколейкин» (рекомбинантный интерлейкин-2 человека). Кормление один раз в сутки по 4000 МЕ/кг ихтиомассы в

течение трех дней, двумя курсами с перерывом 10 дней. Прокормливались мальки радужной форели и черноморской кумжи.

Введение в корм повышенных доз витамина С в комплексе с  $\beta$ -каротином, привело к повышению выживаемости молоди радужной форели из опытной группы на 10% по сравнению с контрольной группой, молоди черноморской кумжи – на 8%. Содержание гемоглобина после 2 недельного курса кормления в крови опытных групп рыб увеличилось в среднем на 11 % по сравнению с контрольными группами.

После проведенного кормления молоди радужной форели с добавлением бактериальной культуры *Bacillus subtilis* и *B. Licheniformis* на посевах из внутренних органов и крови рыб из опытной группы условно-патогенная флора, представленная *Aeromonas hydrophila* и *Flavobacterium sp.*, выделялась у 18% особей. У особей из контрольной группы рыб на аналогичных посевах условно-патогенные бактерии выделялись от 80% рыб. Скорость роста рыб из опытной группы превысила скорость роста рыб из контрольной группы на 6%, а выживаемость на 5%.

Микробиологические исследования лососевых спустя две недели выращивания показали, что у групп рыб, прокормленных препаратом Ронколейкин условно-патогенная микрофлора (*A. hydrophila* и бактерии рода *Flavobacterium*) во внутренних органах не выделены, а присутствуют только на поверхности тела и жабр. В контрольных группах рыб условно-патогенные бактерии *A. hydrophila* и бактерии рода *Flavobacterium* выделены не только на поверхности тела и жабр, но и из крови и внутренних органов 85% молоди радужной форели и 82% молоди черноморской кумжи. Содержание гемоглобина в крови опытной группы рыб по окончании курса лечебно-профилактического кормления выросло на 12 % - для радужной форели, и на 8% - для черноморской кумжи, в контрольных группах осталось без видимых изменений.

В настоящее время на ФГУП ПФЗ «Адлер» продолжают исследования по подбору наиболее эффективных иммуностимуляторов лососевых рыб с целью повышения выживаемости получаемой продукции и улучшения её качества.

#### IMMUNOPROPHYLAXIS OF SALMONID FISH IN HATCHERY "ADLER"

Y.V. Kondratenko, Y.A. Papazyan

The Trout hatchery «Adler» is the Russian leading supplier of trout eggs and fry. One of the main aim of hatchery is the production of healthy fish. Immunoprophylaxis is the safest method for fish diseases prevention. Here, we report the results of a study of feeding salmonids using various immunomodulators and probiotics in order to enhance nonspecific immunity.

# ИЗМЕНЕНИЕ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО СОСТАВА ГОЛОВНОГО ОТДЕЛА ПОЧКИ КАРАСЯ СЕРЕБРЯНОГО ПРИ ДИГРАММОЗЕ

И.А. Кутырев, Н.М. Пронин, Ж.Н. Дугаров

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, г. Улан-Удэ, Россия  
ikutyrev@yandex.ru

Диграммоз рыб – тяжелая паразитарная болезнь, вызываемая плероцеркоидами ленточных червей *Digramma interrupta* (Rudolphi, 1910), широко распространенная в Евразии. В Байкальской Сибири болезнь имеет локальное распространение в карасиных озерах (Пронин, Пронина, 2005). Общая эпизоотология и патология диграммоза хорошо изучена, однако многие аспекты иммунопатологии не исследованы, в том числе – возможное супрессивное влияние паразита на иммунную систему второго промежуточного хозяина.

**Материалы и методы.** Исследован карась серебряный *Carassius auratus* из оз. Шилэн (бассейн рр. Уда, Селенга) Еравно-Харгинской группы (Республика Бурятия) в июле-августе 2007 г., в котором, по нашим данным (1960, 1968, 1981-82, 2007-2008 гг.), существует устойчивый очаг диграммоза. Для исследований были взяты отпечатки головного отдела почек от 19 экз. карасей, в том числе – 6 незараженных и 13 – с интенсивностью инвазии 1-8, включая 5 с паразитарной кастрацией. Отпечатки окрашивали азур-эозином по Романовскому-Гимза. Дифференцировку клеток лейкоцитарного ряда проводили согласно данным Балабановой (1997), Ивановой (1983).

**Результаты исследований.** У карасей, пораженных диграммозом, наблюдается выраженная иммуносупрессия в головном отделе почки: подавляются пролиферативные процессы (в 2,4 раза), и уменьшается в 3,2 раза число эозинофилов, участвующих в противопаразитарных иммунологических реакциях (таблица). С другой стороны, усиливаются воспалительные реакции. Во-первых, об этом свидетельствует увеличение числа нейтрофильных метамиелоцитов в 1,6 раза и уменьшение количества палочкоядерных нейтрофилов в 2,4 раза. Во-вторых, увеличивается в 1,6 раза число пролимфоцитов. Лимфоциты, кроме того, участвуют в реакциях врожденного иммунитета.

Частичное подавление иммунного ответа хозяина способствует благоприятному существованию и развитию плероцеркоидов диграммы. Хотя жизнедеятельность диграммы и приводит к патологическому изменению морфобиологических характеристик и поведения карасей, но оно неletalно для второго промежуточного хозяина. В результате плероцеркоиды благополучно достигают инвазионности и вместе с рыбами попадают окончательными хозяевами – водоплавающими птицами.

Работа выполнена по проекту VI.43.1. РАН. Авторы выражают благодарность сотрудникам ИБВВ РАН: профессору В.Р. Микрякову, к.б.н. Л.В. Балабановой, к.б.н. Д.В. Микрякову, к.б.н. Е.А. Заботкиной за консультативную помощь.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пронин Н.М., Пронина С.В. Гостально-пространственное распределение плероцеркоидов ремнецов (*Pseudophyllidea*, *Ligulidae*) и экология *Ligula intestinalis* в водоемах бассейна озера Байкал // Проблемы цестодологии. Выпуск 3. Сб. научных трудов. С.-Петербург: Изд-во ЗИН РАН. 2005. С. 207–228.
2. Балабанова Л.В. Ультраструктура иммунокомпетентных клеток почек рыб сем. *Surgrinidae* // Биология внутренних вод. 1997. № 2. С. 65–69.
3. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб М., 1983.

Таблица.  
Изменение лейкоцитарного состава головного отдела почки *C. auratus* при заражении *D. interrupta*, %

Клетки	Незараженные рыбы (6)	Зараженные рыбы (13)
Бласты	12.7±1.51	5.3±0.80* <sup>3</sup>
Гранулоциты, в том числе:	30.5±1.60	27.9±2.49
промиелоциты	4.2±0.61	3.9±0.82
миелоциты	8.2±0.96	6.8±1.05
метамиелоциты	9.1±0.87	11.5±1.5
палочкоядерные	3.2±0.67	1.3±0.34* <sup>1</sup>
сегментоядерные	2.3±0.52	1.2±0.38
нейтрофилы, в том числе:	16.8±1.21	19.1±1.89
миелоциты	6.0±0.88	5.9±1.09
метамиелоциты	6.7±0.89	10.8±1.43* <sup>1</sup>
палочкоядерные	2.9±0.61	1.2±0.31* <sup>1</sup>
сегментоядерные	1.9±0.39	1.1±0.38
эозинофилы, в том числе:	5.7±0.91	1.8±0.54* <sup>3</sup>
миелоциты	2.6±0.43	0.9±0.32* <sup>2</sup>
метамиелоциты	2.4±0.53	0.7±0.29* <sup>2</sup>
палочкоядерные	0.5±0.08	0.2±0.11
сегментоядерные	0.2±0.04	0.09±0.09
вакуолизованные	3.4±0.58	3.3±0.99
Агранулоциты, в том числе:	56.4±1.68	66.8±2.26* <sup>3</sup>
лимфоидный ряд, в том числе:	56.4±1.68	66.8±2.26* <sup>3</sup>
пролимфоциты	31.8±2.38	50.1±3.37* <sup>3</sup>
лимфоциты	24.6±2.27	17.5±2.34* <sup>1</sup>

Примечания: \* - имеются достоверные различия с группой «Незараженные»; 1 -  $p < 0,05$ ; 2 -  $p < 0,01$ ; 3 -  $p < 0,001$ .

#### CHANGES OF LEUCOCYTE COMPOSITION OF CRUCIAN CARP HEAD KIDNEY DURING DIGRAMMOSIS

I.A. Kutryev, N.M. Pronin, Zh.N. Dugarov

In crucian carps, *Carassius auratus* infected and not infected with *Digramma interrupta*, leucocyte composition of head kidney was investigated. On the one hand, by digrammosis, pronounced immunosuppression of blasts and young eosinophiles proliferation was disclosed. On the other hand, inflammatory and humoral adaptive immune reactions become stronger. Partial suppression of *C. auratus* organism's immune response favours the profitable development of the parasite.

# ФОРМИРОВАНИЕ ИММУНИТЕТА ЛЕЩА *ABRAMIS BRAMA* L. К АЭРОМОНАДНОЙ ИНФЕКЦИИ НА РАННИХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА

Т.Б. Лапирова, В.Р. Микряков

Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод им.  
И.Д.Папанина Борок Ярославской обл., Россия  
lhb@ibiw.yaroslavl.ru

Процесс онтогенеза рыб активно изучается с середины прошлого века. С. Г. Крыжановский (1949) предложил выделять в индивидуальном развитии рыб эмбриональный, личиночный, мальковый и половозрелый периоды жизни. Каждый период характеризуется своей спецификой. Так, для эмбрионального периода характерно эндогенное питание за счет желточного мешка. В начале личиночного периода рыбы питаются еще смешанной пищей, то есть эндогенно-экзогенно, а затем полностью переходят на внешнее питание. Они имеют временные личиночные органы, которые с наступлением малькового периода исчезают, и появляются новые, характерные для взрослых рыб. В течение каждого периода организм рыбы проходит ряд этапов, которые в свою очередь состоят из стадий развития (Иванов, 1988).

В.В. Васнецовым были сформулированы основные положения теории этапности развития рыб. Они сводятся к тому, что в течение различных периодов онтогенеза развитие рыб идет не только постепенно и непрерывно, но и прерывисто, скачкообразно. При этом происходят резкие изменения в строении систем органов, протекающие очень быстро. Эти морфологические изменения неразрывно связаны с изменениями биологических особенностей рыб. Между такими скачкообразными изменениями происходят постепенный рост и медленные, иногда едва заметные изменения. Все эти сдвиги прстекают в определенных пределах, поэтому они не изменяют основного качества, характеризующего данный интервал развития рыбы. Такие интервалы относительной стабильности в развитии рыб между двумя скачкообразными изменениями В.В. Васнецов назвал этапами (Васнецов, 1953).

Каждому этапу присущи свои особенности структурно-функциональной организации, темпов роста, развития, выживания, устойчивости к меняющимся условиям среды обитания, а также возбудителям инфекционных и инвазионных болезней. Исследование этих особенностей позволило выявить несколько стадий в развитии молоди рыб, характеризующихся максимальной смертностью особей и названных критическими периодами. В настоящее время под критическими периодами развития понимают определенные периоды дифференцировки организма; считается, что в этот момент регулятивная способность организма понижается, и он приобретает высокую чувствительность к внешним воздействиям (Владимиров, 1964). Первый такой период связан с завершением эмбриональной стадии развития и перехода личинок на экзогенное питание, в этот момент происходит основной отход молоди (более чем 90%), следующий пик смертности приходится уже на мальковый период (Никольский, 1961; Владимиров, 1975; Тюрин, 1972).

В литературе имеются сведения, посвященные изучению становления и формирования иммунной системы на ранних этапах онтогенеза (van Loon et al., 1981; Ellis, 1988; Tatner, 1996; Magnadottir et. al., 2005; Zapata et. al., 2006), но причины высокой смертности рыб в этот период окончательно не выяснены.

Настоящая работа посвящена изучению формирования естественного иммунитета молоди леща *Abramis brama* L. к аэромонадной инфекции. Целью



исследования явилось определение напряженности иммунитета молоди леща, находящегося на разных стадиях развития.

Материал для исследования (эмбрионы) был получен в период нереста леща из Рыбинского водохранилища. Напряженность иммунитета оценивали по выживаемости рыб, подвергнутых заражению вирулентной культурой *Aeromonas hydrophila*, выделенной от больных аэромонозом карпов.

Для опыта использовали суточную культуру *A. hydrophila*, выращенную на рыбопептонном агаре. Бактерии вносили в воду до нужной концентрации: 10 и 50 млн. микробных тел/мл. Заражение проводили иммерсионным способом, т.е. погружением рыб в бактериальную суспензию. Контрольных рыб содержали в чистой воде. До месячного возраста рыбы находились в аквариумах при температуре воды 16-18<sup>0</sup>, затем были пересажены в бетонные садки. В течение эксперимента рыб кормили ежедневно. Данные по смертности представлены в процентах от общего числа особей в опыте. Эксперимент длился 70 дней.

Для исследования связи напряженности иммунитета с факторами гуморальной неспецифической защиты проводили анализ содержания лизоцима в гомогенатах тканей рыб. Концентрацию фермента определяли методом диффузии в агар (Каграманова, Ермольева, 1966), результаты выражали в мкг/мг веса тканей.

Проведенные исследования показали, что напряженность естественного иммунитета молоди леща подвержена резким колебаниям и определяется периодами развития. Максимальная устойчивость исследуемых рыб к возбудителю аэромоноза была установлена в течение первых 10 дней после выклева (рис. 1).



Рис. 1 Смертность леща, % на различных этапах раннего онтогенеза

Высказывается мнение, что основной отход личинок у многих видов рыб происходит на стадии рассасывания желточного мешка. Некоторые исследователи считают, что причиной высокой смертности в этот период является смерть от голода из-за отсутствия соответствующей пищи в момент перехода к активному питанию. По мнению В.И. Владимирова, наблюдаемая у ряда видов рыб высокая смертность в конце рассасывания желтка и начала питания экзогенной пищей, объясняется не голоданием, а другими, внутренними причинами, а именно тем, что в данный момент органогенеза происходит реализация дефектов, возникших еще при развитии яйца в организме матери и при эмбриональном развитии (Владимиров, 1964).

Полученные нами данные подтверждают это положение. Начиная с 17-х суток, выживаемость личинок резко снижается. Сопоставление результатов по уровню смертности как в контрольной, так и опытных группах, позволяет заключить, что минимальным уровнем устойчивости обладали личинки в возрасте 24 суток. В этот период, вероятно, еще продолжается отход особей с дефектами пищеварительной системы и в то же время начинается интенсивное формирование иммунокомпетентных органов. Согласно существующим данным, становление иммунной системы в зависимости от видовых и экологических особенностей рыб завершается у карповых рыб на стадии малька (van Loon et. al. 1981; Tatner, 1996; Magnadottir et. al., 2005; Zapata, 2006).

При этом работа иммунной системы в целом еще не сбалансирована, и уровень жизнеспособности личинок очень низок. Самой уязвимой в этот срок оказалась группа рыб, получивших максимальную дозу заражения, отход в ней составил около 90%.

Следующий месяц характеризовался периодом относительной стабильности, через 7 недель после вылупления смертность всех трех групп рыб упала в разы по сравнению с предыдущими двумя сроками.

На 56-е сутки опыта выявлен следующий пик смертности с высоким процентом отхода мальков контрольной группы. Этот период резкого снижения выживания рыб совпадает со сроками интенсивного развития гонад и началом половой дифференциации.

По достижении мальками двухмесячного возраста наступает период относительной стабильности, смертность рыб, даже получивших максимальную дозу инфицирования, не превышала 10%. Это может свидетельствовать о том, что дальнейшее развитие мальков происходило уже не скачкообразно, с появлением новых качественных характеристик, а преимущественно по пути количественных изменений существующих параметров.

Анализ содержания лизоцима в гомогенатах личинок и мальков не позволил установить определенной связи между напряженностью естественного иммунитета рыб и динамикой изменения показателя. Содержание лизоцима было максимальным в тканях личинок в возрасте от 10-17 дней (рис. 2). Поскольку в этот период собственные иммуноциты еще не способны к выработке защитных соединений, можно предположить наличие передачи личинкам каких-то протективных агентов от материнского организма. Далее уровень фермента снижился и к концу 2-го месяца в тканях он уже не обнаруживался. Эти результаты согласуются с полученными нами ранее на мальках другого вида карповых – плотве (*Rutilus rutilus*, L.). Проведенные исследования по определению гуморальных факторов неспецифической защиты показали, что в норме бактериостатические свойства (БА) в гомогенатах тканей мальков плотвы в возрасте 2 месяцев также отсутствовали (Лапинова и др., 2000). Это позволяет заключить, что на этом этапе развития противомикробные соединения, полученные от матери, уже отсутствуют, а выработка собственных еще

не началась. Эти данные также объясняют низкую выживаемость рыб в эти сроки, до начала относительно полноценного функционирования иммунной системы малька.

Как видно на графике, концентрация лизоцима в контрольной группе была несколько выше, чем у подопытных рыб, кривая изменений показателя у леща, получившего максимальную дозу инфицирования, была более сложной по сравнению с остальными, однако принципиальный ход кривых всех групп рыб был сходен.

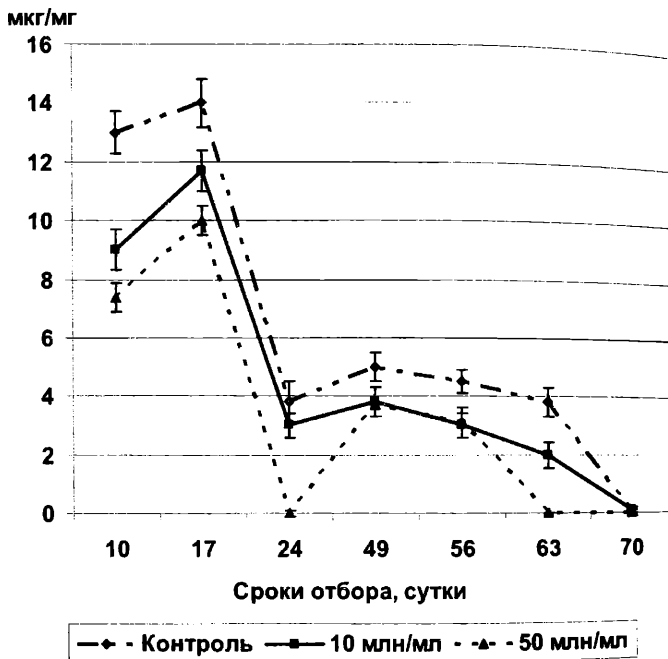


Рис. 2. Содержание лизоцима в гомогенатах тканей леща, мкг/мг

Таким образом, полученные результаты показывают, что периоды серьезных морфо-физиологических изменений, происходящих в раннем онтогенезе рыб, характеризуются резким снижением выживаемости. Однозначной зависимости между дозой заражения и уровнем смертности не выявлено. Устойчивость к аэромонадной инфекции в целом определяется скорее этапом развития рыб, чем силой оказываемого воздействия.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васнецов В.В. Этапы развития костистых рыб // Очерки по общим вопросам ихтиологии. М.-Л.: Изд-во АН СССР. 1953. С. 207-217.
2. Владимиров В.И. 1975. Критические периоды развития у рыб // Вопр. ихтиологии. Т. 15. Вып. 6. С. 955-975.
3. Владимиров В.И. Личиночные критические периоды развития и смертности у рыб. // Вопр. ихтиологии, 1964. Т.4. Вып. 1(30). С. 104-117.

4. Иванов А.П. Рыбоводство в естественных водоемах. М.: Агропромиздат, 1988.
5. Каграманова Л.К., Ермольева З.В. Сравнительная характеристика методов определения активности лизоцима // Антибиотики, 1966. Т. 11, N 10. С. 917 - 919.
6. Крыжановский С.Г. Эколого-морфологические закономерности развития карповых, вьюновых и сомовых рыб (Cyprinidae и Siluridae) // Тр. Ин-та морфологии животных АН СССР, 1949. Вып. 1. С. 5 - 332.
7. Лапирова Т.Б., Изюмов Ю.Г., Микряков В.Р. Влияние ионов кадмия на антибактериальные свойства тканей личинок плотвы (*Rutilus rutilus*, L.) // "Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре". Тез. научно-практической конф. М. Россельхозакадемия. 2000. С. 80-81.
8. Никольский Г.В. О причинах флуктуаций численности рыб. Вopr. иxтиологии, 1961. Т.1. вып. 4(21), с. 660-666.
9. Тюрин Т.В. Нормальные кривые переживания и темпов естественной смертности рыб как теоретическая основа регулирования рыболовства. Изв. ГосНИОРХ, Л., 1972. Т.71. С. 71-129.
10. Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: «Наука», 1980, 288 с.
11. Ellis A.E. Ontogeny of the immune system in teleost fish. In "Fish Vaccination, Acad. Press, London, (A.E. Ellis, ed) 1988, pp. 20-31.
12. Magnadottir B., Lange S., Gudmundsdottir S., Bogwald J., Dalmo R.A. Ontogeny of humoral immune parameters in fish, in Fish and Shellfish immunology, 2005, V.19, p. 429-439.
13. van Loon, J. J.-A., van Oosterom, R., and van Muiswinkel, W.B. Development of the immune system in carp, *Cyprinus carpio* L. In "Aspects of Developmental and Comparative Immunology" (J.B. Solomon, ed.), 1981. Vol. 1. Pp. 469-470.
14. Tatner M.F. Natural changes in the immune system of Fish, in the fish immune system: organism pathogen and environment. Copyright Acad. Press in the USA., 1996. Pp. 252-285.
15. Zapata A., Diez B., Cejalvo T., Gutierrez-de Frias C., Cortes A. Ontogeny of the immune system of fish. Fish and Shellfish immunology. 2006, V. 20. Pp. 126-136.

#### FORMATION OF BREAM *ABRAMIS BRAMA* L. IMMUNITY TO *AEROMONAS* INFECTION AT THE EARLY STAGES OF ONTOGENY

V.R. Mikryakov, T.B. Lapirova

The immunity of juvenile bream at the stages of larvae and fry to *Aeromonas* infection has been studied. The dependence of the peaks of fish mortality on critical periods of juvenile bream development is shown. The correlation between the lysozyme activity levels of fish homogenates and fish resistant to bacteria has not been found.

# СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГЕМОЦИТОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ

Т.А. Пигалева, А.А. Присный

Белгородский государственный университет, Белгород, Россия, Prisny@bsu.edu.ru

Традиционными объектами для исследования клеточных элементов систем циркуляции являются позвоночные животные. Это объясняется относительной легкостью содержания животных и возможностью получения достаточного объема крови. Вопрос о форменных элементах и свойствах крови и жидкостей, выполняющих её функцию, у беспозвоночных остается открытым.

Пиявки (Hirudinea) являются самостоятельным классом типа Кольчатые черви (Annelidae). Для проведения исследований был выбран типичный представитель подкласса настоящих пиявок (Euhirudinea) – *Hirudo medicinalis* (отряд Arhynchobdella, сем. Hirudinidae) (Лукин, 1976).

Медицинская пиявка является пресноводным гидробионтом. Кровеносная система у Euhirudinea подверглась редукции, и функция распределения полностью перешла к остаткам целома (Беклемишев, 1964). Первые исследователи кровеносной системы пиявок не сомневались, что Hirudinae обладают настоящей кровеносной системой. Но после того как Л. Сленот обратил внимание на то обстоятельство, что у челюстных пиявок сократимыми являются боковые сосуды, сложилось мнение о редукции кровеносной системы (Сленот, 1891).

В настоящее время огрублевая ряд работ, освещающих клеточный состав и механизмы работы иммунной системы пиявок. Функции клеточного иммунитета обычно выполняют целомоциты. Так, Vetvicka and Sima выделяли для пиявок только два вида иммунных клеток: амебоциты и хлорогеноциты (Vetvicka and Sima, 2009). Для пиявки *Theromyzon tessulatum* выделено три обособленные популяции целомоцитов, которые обозначены как большие целомоциты, гранулярные амебоциты и малые целомиические клетки (Lefebvre et al., 2008).

Согласно Eguileor et al., пиявки способны комбинировать различные способы защитных реакций в зависимости от степени угрозы для организма и вида антигена: микроантиген (бактерии с липополисахаридной оболочкой) или макроантиген (простейшие, дрожжи или шарики латекса). Каждая инъекция антигена провоцирует миграцию макрофагоподобных, НК-подобных клеток и гранулоцитов, затем происходят реакции дегрануляции, фагоцитоза и инкапсуляции. Мигрирующие и принимающие участие в этом процессе клетки имеют сходные CD маркеры с клетками позвоночных и многих беспозвоночных животных (Eguileor et al., 2002).

Известны попытки изучения трансплантационного иммунитета. В то время когда ауто трансплантат обычно абсорбировался на теле хозяина, ксено- и аллотрансплантаты были разрушены совместным действием мигрировавших клеток (Eguileor et al., 2002).

Таким образом, в доступной литературе представлена достаточно разноречивая информация об особенностях морфологии и функциональной активности гематоцитов пиявок.

В связи с вышесказанным целью нашей работы является изучение морфофункциональных показателей гематоцитов пиявок.

Для проведения исследования были использованы пиявки *Hirudo medicinalis*, которых содержали в стеклянных банках с водой, из расчета один литр на одну особь. Еженедельно меняли воду, животных не кормили. Для получения целомической жидкости пиявку обездвигивали кратковременным погружением в

10% этанол, затем фиксировали препаровальными иглами, делали разрез кожи и мышцы брюшной стороны. Материал для исследования отбирали микропипеткой непосредственно из вентрального целомического канала.

Каплю крови помещали во влажную камеру и изучали прижизненные морфологические и функциональные особенности гемоцитов под оптическим инвертированным микроскопом Nikon DIGITAL ECLIPSE Ti-E. Для изучения фагоцитарных способностей клетки инкубировали во влажной камере с добавлением частиц латекса, туши и клеток дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*). Прижизненное наблюдение за клетками проводили при помощи программного приложения Nis Elements.

В исследованиях использовали специальный физиологический раствор для пиявок (Nicholls and Kuffler, 1965). Клеточную суспензию, разбавленную физиологическим раствором, проверяли на жизнеспособность в тесте на окрашивание трипановым синим.

Для измерения упругости и адгезии использовали атомно-силовой микроскоп Интегра Вита NT-MDT, сканирование клеток проводили в полуконтактном режиме. В работе применяли кремниевые зонды серии NSG03 (NT MDT), жесткостью 1,4 Нм с радиусом закругления 10 нм, частотой развертки сканирования порядка 0,6-0,8 Нз. В контактном режиме проводили спектроскопию при наложении нагрузки в 10 локальных участках клеточной поверхности, по результатам которой рассчитывали модуль юнга  $E$  [Pa] при помощи программного приложения «E3» (NT-MDT, Зеленоград). Силу адгезии рассчитывали по силовым кривым при помощи программного приложения “Nova 1.0.26 Build 1397” (NT-MDT) и формулы  $F=k \times \Delta \text{Height}$ . В результате получали адгезию клетки к кантилеверу в точке подвода зонда. При расчете модуля Юнга количество клеток в выборке составляло 30, при определении силы адгезии выборка составила 38 клеток.

В результате проведенных наблюдений были получены морфологические данные, которые позволили разделить все гемоциты *Hirudo medicinalis* на 4 типа (таблица 1).

Таблица 1.

Гемоциты медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*

	линейные размеры клетки по длинной оси, мкм	линейные размеры клетки по короткой оси, мкм	линейные размеры ядра по длинной оси, мкм	линейные размеры ядра по короткой оси, мкм
тип 1	8,5±1,1	7,6±1,1	5,2±0,8	4,3±0,7
тип 2	10,9±1,7	9,9±1,5	6,9±1,1	5,8±1,1
тип 3	23,9±4,7	14,3±3,2	7,5±0,8	6,8±0,9
тип 4а	15,1±2,5	13,5±2,1	10,1±1,7	8,8±1,7
тип 4б	13,1±2,7	12,2±2,1	8,7±0,7	7,26±1,3

Тип 1 – это наиболее часто встречаемый тип клеток в целомической жидкости *Hirudo medicinalis*, клетки округлой формы и небольшого размера (8,5±1,1 мкм) с гомогенным содержимым цитоплазмы и однородным ядром, смещенным к периферии клетки. При добавлении чужеродных агентов способны к фагоцитозу, на что указывает быстрое образование вакуолей в цитоплазме и

накапливание окрашенных частиц. Данный тип целомочитов не способен к активному линейному передвижению, но за счет длинных филоподий нередко происходит поворот клеток и небольшое спонтанное смещение.

Тип 2 – клетки более крупные ( $10,9 \pm 1,7 \mu\text{м}$ ) с эксцентрично расположенным ядром, цитоплазма вакуолизирована, в некоторых случаях присутствуют гранулы. Клетки способны выпускать длинные филоподии и фагоцитировать чужеродные объекты. Направленного движения целомочитов данного типа не наблюдали.

Тип 3 – крупные ( $23,9 \pm 4,7 \mu\text{м}$ ) клетки, которые при прижизненном наблюдении демонстрировали быстрое изменение формы клетки и направленное перемещение к чужеродному объекту (*Saccharomyces cerevisiae*). Цитоплазма содержит вакуоли, а также большое количество светлых и темных гранул, которые, возможно, являются фагоцитированным материалом. Целомочиты перемещаются посредством образования широких лобоподий и совершенно не способны к образованию филоподий. Ядро имеет небольшие размеры ( $7,5 \pm 0,8 \mu\text{м}$ ) и занимает положение, близкое к центральному. По мере перемещения клетки положение ядра активно меняется.

Тип 4 – клетки круглые или овальные с четкими контурами, которые в зависимости от размера были поделены на два подтипа: большие (4а) – крупные клетки ( $15,1 \pm 2,5 \mu\text{м}$ ) с крупным ядром ( $10,1 \pm 1,7 \mu\text{м}$ ) и относительно меньшие по размеру (4б) – клетки ( $13,1 \pm 2,7 \mu\text{м}$ ) с относительно небольшим ядром ( $8,7 \pm 0,7 \mu\text{м}$ ). Это целомочиты с небольшим ядерно-цитоплазматическим отношением, ядро обычно смещено к периферии клетки, цитоплазма может содержать гранулы и вакуоли.

При проведении экспериментов по способности изучаемых клеток к фагоцитозу определили, что три типа клеток из четырех активно фагоцитировали частицы латекса. Клетки типа 4 в описанных исследованиях не проявляли способности к фагоцитозу. При инкубации гемоцитов с дрожжами во влажной камере фагоцитоза не наблюдали, но клетки третьего типа активно перемещались, при этом зафиксировано целенаправленное движение к клеткам *Saccharomyces cerevisiae*; отдельные гемоциты закрепляли клетки дрожжей на цитоплазматической мембране и некоторое время двигались с ними.

При инкубации гемоцитов с частицами латекса происходил активный фагоцитоз латекса амебоцитами. Был рассчитан фагоцитарный индекс (ФИ) как отношение числа клеток, совершивших фагоцитоз, к общему числу клеток. После 30-минутной экспозиции ФИ составил 0,59. При более детальном анализе определили, что среднее количество включений в клетке составило три, в ряде случаев клетки захватывали по 6-7 частиц. Основную массу фагоцитов составили клетки первого типа.

В результате проведенной работы, удалось рассчитать такие характеристики, как модуль Юнга, силу адгезии, также получили данные по морфологическим особенностям и линейным размерам гемоцитов.

Модуль Юнга характеризует упругостные свойства мембраны, и для гемоцитов *Hirudo medicinalis* он значительно различался в показателях для разных точек, относящихся к одной клетке. Наибольшее и наименьшее средние значения составляли  $38,74 \pm 0,1 \mu\text{Па}$  и  $7,3 \pm 0,8 \mu\text{Па}$ , соответственно.

Силы адгезии в точке подвода кантилевера также сильно разнятся в пределах одной клетки. Для клеток *Hirudo medicinalis* этот показатель варьировал в пределах от  $15,4 \pm 3,1 \text{ нН}$  до  $62,1 \pm 7,5 \text{ нН}$ .

При изучении сканов с целью выявления морфологических особенностей клеток выделили четыре типа гемоцитов для *Hirudo medicinalis*.

Гемоциты *Hirudo medicinalis* были разделены на основании показателей величины ядерно-цитоплазматического соотношения и изменения тургора клеток при подсыхании:

- клетки размером  $7,3 \pm 1,3$  мкм с большим ядерно-цитоплазматическим отношением и цитоплазмой, образующей валик вокруг ядра размером  $3,8 \pm 0,8$  мкм;
- клетки с небольшим ядерно-цитоплазматическим отношением, размер клеток составляет  $15,9 \pm 4,4$  мкм, ядра –  $5,7 \pm 0,8$ ;
- клетки, у которых тургор значительно снижается при подсыхании ( $6,3 \pm 0,8$  мкм);
- клетки, у которых тургор незначительно снижается при подсыхании ( $6,1 \pm 0,8$  мкм).

Таким образом, были получены данные по некоторым структурным и функциональным параметрам клеток крови *Hirudo medicinalis*, на основе которых удалось выделить 4 типа клеток.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беклемишев В.Н. Основы сравнительной анатомии беспозвоночных: Т. 2. Оргология. – М: Наука, 1964. – 448 с.
2. Луккин ЕИ. Пиявки пресных и солоноватых водосмов. В серии: Фауна СССР. Пиявки. – Л: Наука, 1976. – 484 с.
2. Lefebvre C., Vandenbulcke F., Bocquet B., Tasiemski A., Desmons A., Verstraete M. *et al.* Cathepsin L and cystatin B gene expression discriminates immune coelomic cells in the leech *Theromyzon tessulatum*. – Dev. Comp. Immunol., 2008. – 32. – P. 795-807
3. Vetricka V., Sima P. Origins and functions of annelid immune cells: the concise survey. – Inv. Surv. J., 2009. – 6. – P. 138-143.
5. Kuffler S.W., Nicholls J.G. How do materials exchange between blood and nerve cells in the brain? – Perspectives Biol. Med., 1965. – 9. – P. 69–76.
7. Cuenot L. Etudes sur le sang et les glandes lymphatiques dans la serie animale. / Arch. Zool. Exptl et gen., 1891. – ser. 2, – P. 9.
8. Eguileor M.D., Tettamanti G., Grimaldi A., Congiu T., Ferrarese R, Perletti G., Valvassori R., Cooper E. L., Lanzavecchia G. Leeches: Immune Response, Angiogenesis and Biomedical Applications. – Current Pharmaceutical Design, 2002. – 8. – P. 99-110

### STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF HEMATOCYTES OF THE MEDICAL BLOODSUCKER

T.A. Pigaleva, A.A. Prisky

Features of blood elements of the medical bloodsucker (*Hirudo medicinalis*) are shown. It is identified four types of hematocytes. Spherical hematocytes are capable to spreading and to formation numerous of pseudopodium, that allows to participate in phagocytal reactions actively. The oval cells of the steady form seldom forming pseudopodium, are capable adhesive on the surface alien objects. Features of elasticity and adhesive ability of hematocytes membranes are revealed.



# ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ БОЛЕЗНИ У СТЕРЛЯДИ И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА РЫБ НА ИНФЕКЦИЮ

И.Б. Прокаева

ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии,  
г. Покров, Россия, prokaeva-ul@yandex.ru

Промышленному выращиванию осетровых рыб с целью воспроизводства природных запасов и получения товарной продукции уделяется возрастающее внимание во всем мире. Интенсификация осетроводства повлекла за собой появление и распространение болезней этих видов рыб, наибольший ущерб из которых наносят вирусные болезни, в том числе вызываемые герпесвирусами.

Болезнь, вызываемая герпесвирусом осетровых 2 типа (AcHV-2), впервые зарегистрирована у американских белого *Acipenser transmontanus* и тупорылового *Acipenser brevirostrum* осетров (Watson et.al, 1995).

В России схожая болезнь была диагностирована весной 2006 г. у сибирского осетра *Acipenser baeri* и бестера в одном из осетровых хозяйств Тверской области (Щелкунов и др., 2007).

Герпесвирусная болезнь сибирского осетра характеризуется острым течением и массовой гибелью разновозрастной молоди сибирского осетра с признаками некрогеморрагического синдрома. Болезнь поражает промышленные популяции осетра и наиболее тяжело протекает в условиях индустриального разведения (Щелкунов А.И., Щелкунов И.С., 2010).

Одним из наиболее распространенных объектов выращивания в осетроводстве России является стерлядь *Acipenser ruthenus*, поэтому целью настоящей работы было изучение особенностей течения герпесвирусной болезни у этого вида рыб.

**Рыба.** В эксперименте использовали 2,5-месячную молодь стерляди со средней массой тела 6,3 г, свободную от вирусных инфекций.

**Вирус.** В работе использовали герпесвирус (штамм SK1/0406, изолированный из покровных тканей больных осетров) (Щелкунов и др., 2007).

**Культура клеток.** Для выделения и накопления вируса, определения его титра и уровня вируснейтрализующих антител в сыворотках рыб использовали постоянную линию клеток SSO-2 (Щелкунов, Щелкунова, 2009).

**Постановка биопробы.** Заражение рыбы герпесвирусом проводили методом ванн с конечной концентрацией вируса  $10^4$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> воды. Продолжительность заражения составляла 1 час. После заражения рыбу содержали в 250-литровых емкостях с проточной аэрируемой водой при температуре 15 – 17°C при регулярном кормлении форелевыми комбикормами.

От погибших рыб индивидуально отбирали патматериал (слизь с поверхности тела, сифон, грудные плавники, жабы, печень, почки, селезенка, сердце) с целью определения содержания вируса.

При завершении эпизоотии, спустя примерно 3,5 месяца после заражения, температуру воды подняли до 20°C в течение 3 недель. Начиная с 121 суток с момента заражения и далее с интервалом в 2 – 2,5 месяца, отбирали сыворотку крови с целью определения титров вируснейтрализующих антител.

Отбор и обработку патматериала проводили по общепринятой методике (Метод. указ., 1998). Расчет титров вируса и антител проводили по методу Рида и Менча (Reed, Muench, 1938). Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами (Лакин, 1990).

В результате проведенных исследований показано, что течение герпесвирусной болезни у стерляди схоже с течением болезни у сибирского осетра. Инкубационный период болезни у 2,5-месячной молоди стерляди более продолжительный (11 дней), чем у сибирского осетра примерно такого же возраста (6 дней) (Щелкунов и др., 2007).

Заболевание начиналось с постепенного снижения поедаемости корма и появления угнетенных особей. У заболевших рыб появлялись кровоизлияния на вентральной стороне рострума, вокруг ротового отверстия (сифона), в межлучевой ткани грудных плавников, экзофтальм, анемия жабр. У стерляди в отличие от сибирского осетра не наблюдали появления на коже бляшек гиперплазированного эпидермиса.

Гибель рыбы начиналась на 22 сутки после заражения и в итоге достигала 40% (рис.1), тогда как гибель 2-месячной молоди сибирского осетра составляла 100% (Щелкунов и др., 2007).

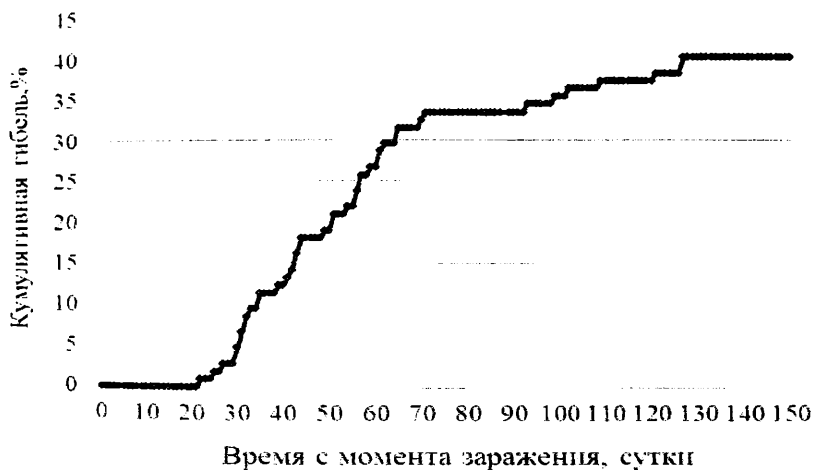


Рисунок 1. Динамика гибели зараженной герпесвирусом молоди стерляди

На стадии максимального подъема эпизоотии у стерляди отмечали общую бледность внутренних органов. Пищеварительный тракт обычно был свободен от пищевых масс, его задний отдел нередко имел признаки геморрагического воспаления. В целом патологоанатомическая картина заболевания у стерляди была аналогична таковой у сибирского осетра, за исключением цвета печени, которая у стерляди имела кремово-белый цвет, в то время как у сибирского осетра была молочно-белой (Щелкунов и др., 2007).

При определении содержания вируса в органах и тканях зараженной стерляди на разных стадиях эпизоотии получены следующие результаты. На стадии максимального подъема эпизоотии (22-35 сутки после заражения) вирус удавалось выделять почти изо всех исследованных органов и тканей погибающих рыб, за исключением селезенки, из которой вирус выделялся не всегда. На стадии угасания эпизоотии (39-65 сутки после заражения) наблюдали стертые признаки болезни с

переходом к ее хроническому течению. В этот период вирус обнаруживали не во всех органах и тканях. Наиболее продолжительное время вирус выявляли в тканях сифона - доля вирус-позитивных рыб через 65 суток после заражения составила 83,3% (табл.1). На постэпизоотической стадии (71-127 сутки после заражения) вирус выделен не был. На стадии максимального подъема эпизоотии содержание вируса во всех органах и тканях было достоверно выше, чем на стадии угасания эпизоотии ( $P < 0,05$ ).

Таблица 1. Содержание герпесвируса сибирского осетра в клиническом материале экспериментально зараженных 2,5-месячных сеголетков стерляди

Показатели	слизь	сифон	грудной плавник	жабры	почка	печень	сердце	селезенка
Стадия максимального подъема эпизоотии (22-35 сутки после заражения)								
диапазон титров вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{г}$ ткани (n=9)	4,9-8,1	5,3-7,9	4,1-7,4	5,1-7,9	5,1-7,4	4,4-5,9	6,4-8,6	3,1-5,9
$\bar{x} \pm s_x$	6,5 $\pm$ 1,2	6,7 $\pm$ 0,8	5,6 $\pm$ 1,2	6,5 $\pm$ 1,3	6,0 $\pm$ 0,7	5,2 $\pm$ 0,7	7,0 $\pm$ 0,8	4,5 $\pm$ 1,1
Доля вирусопозитивных рыб, %	100	100	100	100	100	100	100	87,5
Стадия угасания эпизоотии (39-65 сутки после заражения)								
диапазон титров вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{г}$ ткани (n=12)	3,1-6,1	3,1-7,1	3,1-4,9	3,1-7,1	3,1-5,4	3,1-4,9	3,1-6,9	3,1-4,4
$\bar{x} \pm s_x$	3,9 $\pm$ 1,0	4,6 $\pm$ 1,5	3,3 $\pm$ 0,5	4,5 $\pm$ 1,7	3,7 $\pm$ 1,0	3,5 $\pm$ 0,7	3,9 $\pm$ 1,2	3,2 $\pm$ 0,4
Доля вирусопозитивных рыб, %	50	83,3	25	50	44,4	33,3	33,3	8,3
Постэпизоотическая стадия (71-127 сутки после заражения)								
диапазон титров вируса $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{г}$ ткани (n=3)	-	-	-	-	-	-	-	-
$\bar{x} \pm s_x$	-	-	-	-	-	-	-	-
Доля вирусопозитивных рыб, %	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание:  $\bar{x} \pm s_x$  - средняя арифметическая  $\pm$  среднее квадратическое отклонение; «-» - вирус не выделен (слепые пассажи не делали), порог детектирования  $10^{3,1}$  ТЦД<sub>50</sub>/г.

Как показал проведенный эксперимент, покровно-тканевой тропизм герпесвируса у стерляди был выражен не так явно, как у сибирского осетра,

разница титров вируса в покровных тканях и внутренних органах была не столь заметна. Предпочтительного накопления вируса в печени, как это имело место у сибирского осетра (Щелкунов, 2008), у стерляди не отмечали. В то же время содержание его в сердце стерляди было наиболее высоким.

Известно, что переболевшие особи сибирского осетра могут оставаться вирусносителями. В их крови появляются вируснейтрализующие антитела - у двухгодоваликов нередко в титрах 1:2000 и выше (Щелкунов А.И., Щелкунов И.С., 2010). К сожалению, определить титры антител у сеголетков сибирского осетра не представилось возможным по причине 100%-ной гибели рыб в короткие сроки (Щелкунов и др., 2007). В нашем эксперименте у 2,5-месячной стерляди наиболее высокая доля позитивных сывороток (66,7%) и титры антител (до 1:1076, т.е.  $10,07 \log_2$ ) были зарегистрированы на 121 сутки после заражения (3 недели после выздоровления). Исследование сывороток в более поздние сроки показало снижение доли позитивных сывороток и титров вируснейтрализующих антител (до 1:31,3 т.е.  $4,64 \log_2$ ) (табл. 2, рис.2).

Таблица 2.

Динамика специфического гуморального иммунного ответа 2,5-месячных сеголетков стерляди при экспериментальном заражении герпесвирусом сибирского осетра

Время после заражения, сутки	Количество исследованных сывороток	Доля позитивных сывороток, %	Реципрокные титры антител, $\log_2$	
			Диапазон	$\bar{x} \pm s_x$
121	30	66,7*	3,81-10,07	$6,63 \pm 1,78^{**}$
175	30	40	3,81-8,82	$4,91 \pm 1,65$
247	60	23,3	3,58-7,87	$5,09 \pm 1,44$
310	62	19,4	3,58-5,83	$4,64 \pm 1,04$

Примечание: порог детектирования  $\leq 1:8$ ; \* - достоверно выше доли позитивных сывороток через 175, 247 и 310 суток после заражения ( $0,01 < P < 0,05$ ); \*\* - достоверно выше средних значений титров антител через 175, 247 и 310 суток после заражения ( $P < 0,001$ ).

Показано, что течение герпесвирусной болезни у молоди стерляди в основных чертах схоже с течением болезни у сибирского осетра. Главными отличиями заболевания у стерляди являются отсутствие бляшек гиперплазированного эпидермиса, менее выраженный покровно-тканевой тропизм вируса, не столь сильное поражение печени и преимущественное накопление вируса в сердце рыб.

При температуре 19-20°C примерно через 1-3 месяца после выздоровления вырабатываются вируснейтрализующие антитела (в титрах до 1:1076) и выявляются на протяжении не менее 7 месяцев после выздоровления. Наличие вируснейтрализующих антител в сыворотках крови сеголетков стерляди позволяет проводить ретроспективную диагностику данной болезни.

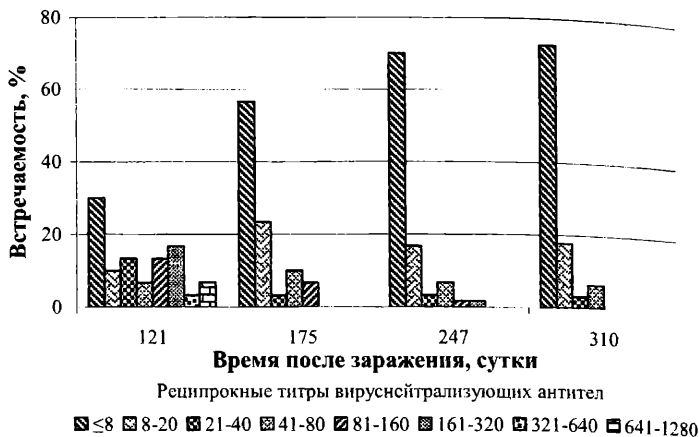


Рисунок 2. Динамика встречаемости титров вируснейтрализующих антител у 2,5-месячных сеголетков стерляди после экспериментального заражения герпесвирусом сибирского осетра.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лакин Г.Ф. Биометрия / – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
2. Методические указания по идентификации и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб. Вирусные болезни. Сб. инструкций по борьбе с болезнями рыб. - М.: Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998. - Ч.1. - С. 60-113.
3. Патент на изобретение РФ № 2348689, зарегистрирован в Гос. реестре изобретений РФ 10 марта 2009 г. Постоянная линия клеток SSO-2 пула паренхиматозных органов сибирского осетра *Acipenser baeri* / Щелкунов И.С., Щелкунова Т.И.
4. Щелкунов А.И. Покровно-тканевой тропизм герпесвируса сибирского осетра // Современное состояние и перспективы исследований по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчел: материалы междунар. науч.-практ. конф. – М., 9-10 октября 2008. – С. 437-440.
5. Щелкунов А.И., Щелкунов И.С. Герпесвирусная болезнь сибирского осетра // Ветеринария. – 2010. - № 1. – С. 18-21.
6. Щелкунов И.С., Щелкунова Т.И., Щелкунов А.И., Колбасова Ю.П., Диденко Л.В., Быковский А.Ф. Герпесвирусная болезнь у осетровых рыб в России // Российский вет. журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2007. - № 1. - С. 10-12.
7. Reed L.J., Muench H.A. A simple method of estimating fifty percent endpoints // American J. Hygiene. - 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.
8. Watson L.R., Yun S.C., Groff J.M., Hedrick R.P. Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and subadult white sturgeon *Acipenser transmontanus* // Dis. Aquat. Org. – 1995. – Vol. 22. – P. 199-210.

### PECULIARITIES OF HERPESVIRAL DISEASE IN STERLET *ACIPENSER RUTHENUS* AND HUMORAL IMMUNE RESPONSE OF FISH TO INFECTION

I.B. Prokaeva

Under experimental conditions, it was shown that in sterlet fingerlings the course of disease caused by isolate SK1/0406 belonging to the AcHV-2 type virus, was similar to that in Siberian sturgeon. The principal differences of clinical picture in diseased sterlet compared with Siberian sturgeon were the absence of epidermal hyperplasia plaques, less prominent integumentary tropism of the virus, milder pathology of the liver and high virus titres in the heart. High titres of virus neutralizing antibodies (up to 1 : 1076) were found in sera of sterlet, which recovered from disease. This makes possible retrospective diagnosis of the disease.

# ПОКАЗАТЕЛИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У КАРПА *CYPRINUS CARPIO* ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ОСПОЙ

Н.И. Силкина, Д.В. Микряков\*, В.Р. Микряков

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок 152742  
\*daniil@ibiw.yaroslavl.ru

Оспа (Epithelioma papulosum cyprinorum - папилезная эпителиома) - вирусное заболевание рыб (Гончаров, 1960; Щербина, 1973). В основном болеют карповые рыбы в возрасте двух лет и старше (Бауэр и др., 1977, 1981; Васильков и др., 1999; Головина и др., 2007). Оспа является одной из причин снижения темпов развития и роста, размягчения мышечной ткани и остеомалации. Согласно существующим представлениям, неблагоприятные условия содержания являются одной из причин массовой болезни рыб. Они связаны с высокими плотностями посадки, кормлением рыб недоброкачественными кормами, с низким содержанием витаминов, дефицитом кальция и др. Вместе с тем сведения о характере функционирования иммунной системы рыб, пораженных оспой, в доступной литературе отсутствуют.

Цель данной работы - сравнительное исследование показателей гуморального иммунитета у здоровых и больных рыб.

Работа проведена на 24 здоровых и больных двухлетках карпа *Cyprinus carpio* средней массой 150-160 г., длиной 21-22 см. Больных особей определяли визуально по наличию на теле рыб эпителиом (эпидермальные разрастания). Реакцию гуморального звена иммунной системы рыб на заражение изучали по бактериостатической активности сыворотки крови (БАСК) и содержанию в крови гемолизина. Определение БАСК осуществляли нефелометрическим методом (Смирнова, Кузьмина, 1966) в модификации В.Р. Микрякова (1991). В качестве тест-микробов использовали суточную культуру *Aeromonas hydrophila*. В зависимости от уровня БАСК рыб подразделяли на иммунодефицитных (ИМД), сыворотка крови которых не угнетала развития тест-микробов, и иммунореактивных (ИМР), сыворотка которых подавляла рост и развитие микробов. Содержание в крови гемолизина исследовали по интенсивности перекисного гемолиза эритроцитов (ПГЭ) по F. Jager (Горячковский, 1998). Принцип метода заключается в определении оптической плотности крови при длине волны 540 нм. Величину гемолиза рассчитывают по формуле: % гемолиза =  $(E_1 + E_2) / 2E_K \times 100\%$ , где  $E_1$  и  $E_2$  - оптическая плотность опытных проб;  $E_K$  - оптическая плотность контрольной пробы. Результаты исследований подвергали статистической обработке при помощи стандартного пакета программ (приложение Statistica 6.0) с последующей оценкой различий с использованием  $t$ -теста,  $p \leq 0.05$ .

Проведенное исследование выявило различия исследуемых показателей между больными и здоровыми рыбами (табл.).

Карпы, пораженные оспой, достоверно отличались от здоровых более низкими величинами БАСК. Это свидетельствует о том, что болезнь вызывает супрессию естественного иммунитета. Кроме того, в этой группе рыб выявлены особи с признаками вторичного иммунодефицита, сыворотка крови которых не обладала антимикробными свойствами. Сходные изменения количественных характеристик БАСК установлены нами при заражении рыб возбудителями других инфекционных и инвазионных заболеваний (Микряков, Силкина, 1997; Силкина и др., 2008, 2011).

В отличие от показателей БАСК у больных оспой рыб отмечены повышенные (более чем в 2 раза по сравнению со здоровыми) величины ПГЭ.

Известно, что гемолизины относятся к аутогемолитическим антителам, появляющимся при воздействии на рыб неблагоприятных стресс факторов биотической и абиотической природы. Известно, что стресс факторы инициируют активацию эритропоэза и интенсивное разрушение красных кровяных телец (Микряков, Флеров, 1971; Житенева и др., 1988; Иммунология. Справочник, 1981). Последние считаются одной из причин образования гемолитических аутоантител, обладающих гемолитическими свойствами. Из материалов исследований следует, что у больных карпов наблюдается снижение стабильности мембраны эритроцита, выражающееся в увеличении процента гемолиза. Интенсификация процессов гемолиза характерна при резких стрессовых воздействиях различной природы, в том числе инфекционного характера.

Таблица.

Показатели гуморального иммунитета и уровень перекисного гемолиза эритроцитов (ПГЭ) у здоровых и больных острой карпов

Показатели	Здоровые	Больные
Число рыб, экз	10	14
БАСК, %	51.3±9.27	24.2±8.33*
Количество ИМД: экз.	0	5
% от общего числа	0	35.7
ПГЭ, %	12.6±1.38	26.3±2.27

Примечание: \* - достоверно в группе относительно здоровых при  $P \leq 0.05$ .

Таким образом, проведенные исследования показали, что при заболевании рыб оспой угнетаются неспецифические защитные функции системы крови и истощаются факторы поддержания гомеостаза организма. Полученные данные характерны для организма рыб с ослабленным иммунитетом, когда нарушены внутри- и внеклеточные контролирующие регуляторные механизмы. Отличия в уровнях исследуемых показателей у рыб могут быть использованы при осуществлении мероприятий по мониторингу за состоянием здоровья рыб.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бауер О.Н., Мусселиус В.А., Николаева В.М., Стрелков Ю.А.. Ихтиопатология. М.: Лёгкая и пищевая промышленность, 1977. 431 с.
2. Бауер О.Н., Мусселиус В.А., Стрелков Ю.А. Болезни прудовых рыб. М.: Лёгкая и пищевая промышленность, 1981. 320 с.
3. Васильков, Г.В., Грищенко Л.И., Енгашев В.Г. и др. Болезни рыб: справочник / Под ред. Осетрова В.С. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Агропромиздат, 1989. 288 с.
4. Головина Н. А., Стрелков Ю.А., Воронин В.Н. и др. Ихтиопатология. М., Мир, 2007. 448 с.
5. Гончаров Г. Д. Элементарные тельца оспы рыб // Вопросы вирусологии. М.: Медгиз, 1960, № 2. С.115-118.
6. Горячковский А.М. Клиническая биохимия. Одесса: Астропринт, 1998. 603 с.
7. Житенева. Л.Д., Полтавцева Т.Б., Рудницкая О.А. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб. Справочник. Ростов-на-Дону, 1989. 112 с.
8. Иммунология. Справочник. Киев, Наукова думка, 1981. С. 144-146.
9. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. 154 с.

10. Микряков В.Р., Силкина Н.И. Иммуно-физиологическое состояние лепа Рыбинского водохранилища при лигулезе // Инф. бюлл. МИК Итоги научно-практических работ в актиопатологии. М., 1997, С. 79-80.
11. Микряков В.Р., Флеров Б.А. Картина крови карпа при хронической фенольной интоксикации // Информ. Бюлл. ИБВВ АНСССР, Борок, 1971, № 9. С. 52-55.
12. Силкина Н.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Изменение некоторых иммуно-биохимических показателей у карпа *Cyprinus carpio* L. при экспериментальном заражении *Aeromonas hydrophila* // Актуальные вопросы инвазионной и инфекционной патологии животных. Матер. Междунар. научно-практ. конф., Улан-Удэ. 2008. С.56-58.
13. Силкина Н.И., Микряков В.Р., Микряков Д.В. Иммуно-биохимический статус плотвы *Rutilus rutilus* при сапролегниозной инвазии // Вопросы рыболовства, 2011. Т. 12. № 1(45). С. 24-26.
14. Щербина А.К. Болезни рыб. К.: Урожай, 1973. 404 с.

#### INDICATORS HUMORAL IMMUNITY AT CARP *CYPRINUS CARPIO* AT INFECTION WITH THE SMALLPOX

N.I. Silkina, D.V. Mikryakov, V.R. Mikryakov

Results of the comparative analysis of indicators humoral immunity at carps *Cyprinus* healthy and sick of a smallpox carpio are presented. It is shown, that fishes sick of a smallpox differed from healthy lower indicators humoral immunity that testifies to oppression antimicrobial functions of blood and an exhaustion of factors of maintenance of a homeostasis.



## ОСОБЕННОСТИ ТРАНСКАПИЛЛЯРНОГО ОБМЕНА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У КАРПА *CYPRINUS CARPIO L.* ПРИ АЭРОМОНОЗЕ

Р.А. Федоров<sup>1</sup>, Д.В. Микряков<sup>1</sup>, О.А. Шарапова<sup>1</sup>, О.Ю. Слынько<sup>2</sup>, А.М. Андреева<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>Институт биологии внутренних вод им.И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия  
<sup>2</sup>Ярославский Государственный Университет им. П.Г.Демидова, Ярославль, Россия  
\*aam@ibiv.yaroslavl.ru

Аэромоноз – инфекционная болезнь, часто встречающаяся у многих рыб, возбудителем ее являются бактерии. Именно аэромоноз является основной причиной неблагополучия культивируемых в условиях прудового хозяйства рыб (Рудиков, Грищенко, 1985). Одним из методов борьбы с этим заболеванием является использование антибиотиков и пробиотиков. Последние представляют собой апатогенные для человека бактерии, обладающие антагонистической активностью в отношении патогенных и условно патогенных бактерий и обеспечивающие восстановление нормальной микрофлоры в организме (Бурлаченко, 2008; Гаврилин и др., 2010). Целью работы является анализ относительного содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови и тканевой жидкости карпов при заражении аэромонозом, а также оценка данного показателя при использовании в качестве медикаментозных средств антибиотика Антибак 100 и пробиотика СУБ-ПРО.

В работе использовали плазму крови и перитонеальную жидкость годовичков карпа (масса  $150 \pm 10$  г). Образцы биологических жидкостей отбирали по ранее отработанной методике (Андреева и др., 2007). Для адаптации к экспериментальным условиям рыб в течение 21 суток содержали в бассейне, далее - в 200-литровых аквариумах с принудительной аэрацией и механической фильтрацией воды при температуре  $18 \pm 1.5^\circ\text{C}$ . Предварительно были проведены опыты по влиянию иммунизации рыб путём внутривентральной инъекции 1 млрд. микробных тел агаровой культуры *Aeromonas hydrophila* на особь для изучения влияния антигена на содержание иммуноглобулинов. Рыб (по 5 экз.) исследовали через 3, 7 и 14 сут. Одновременно формировали 6 равноценных групп (по 15 экз. в каждой) и группу из 5 экз. рыб для определения изначального уровня содержания иммуноглобулинов Ig (группа  $K_0$ ). Инъецирование бактериальной суспензией не вызвало появления характерной для аэромоноза клинической картины и гибели рыб, что позволило оценивать это воздействие как вакцинацию (Lallier et al., 1981). Рыб группы №1, согласно действующей инструкции, кормили пищей, содержащей Антибак 100 в дозе 0.5 г/кг живой массы в сутки в течение 5 сут. На 1, 3 и 7 сут. отбирали пробы от 5 экз. рыб для исследования. Рыб группы №2 иммунизировали аналогично группе №1 перед началом кормления пищей, содержащей Антибак 100 (согласно инструкции), а рыб группы №3 - сразу после завершения кормления. Плазму крови и перитонеальную жидкость от 5 экз. рыб из группы №2 отбирали на 1, 3 и 7 сут. после окончания кормления, а рыб из группы №3 на 3 и 7 сут. после кормления (2 и 6 сут. после введения антигена). Затем оценивали влияние Антибака 100 на содержание иммуноглобулинов. Аналогичным образом исследовали рыб из групп № 4, 5 и 6. Отличие – использование корма, содержащего СУБ-ПРО. Препарат также вводили согласно действующей инструкции (100 г препарата на тонну комбикорма в течение 5 сут, норма кормления - 5% от общей живой массы).

Идентифицировали иммуноглобулины по наличию в структуре молекулы низкомолекулярных субъединиц с ММ около 20 кДа (L-цепь) и выше (H-цепи). Для этого сыворотку и перитонеальную жидкость карпа обрабатывали денатурирующей смесью и дифференцировали в 2D-SDS-электрофорезе (Laemmli, 1970). Для определения величин ММ цепей использовали маркер Fermentas PageRuler™ Protein Ladder Plus (11, 17, 28, 36, 55, 72, 95, 130 и 250 kDa). Диссоциацию стартовой фракции гамма-2-глобулинов на низкомолекулярные цепи в восстанавливающих

условиях и наличие среди них цепей с ММ около 20 кДа считали признаком наличия иммуноглобулинов в анализируемой фракции белков (Андреева, 2001).

Сывороточные гамма-2-глобулины карпа содержали высокомолекулярные стартовые белки с ММ выше 950 кДа. Такие белки присутствовали в плазме крови и во всех тканевых жидкостях карпа (Рис.1).

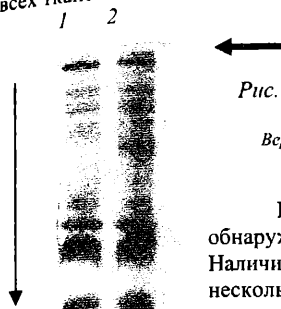


Рис.1. Диск электрофорез плазмы крови (1) и тканевой жидкости мозга (2) карпа.

Вертикальная стрелка указывает направление электрофореза, горизонтальная на расположение гамма-2-глобулинов.

В SDS-ПААГ в составе гамма-2-глобулинов обнаружены субъединицы с ММ от 25 до 250 кДа (Рис.2). Наличие цепей с ММ около 20 кДа, с одной стороны, и нескольких цепей с ММ выше 40 кДа, с другой, позволяет предположить наличие среди гамма-2-глобулинов белков с Y-образной структурой, то есть иммуноглобулинов.

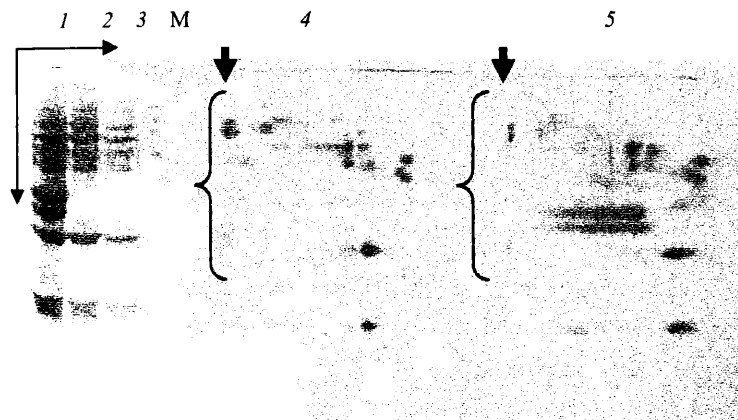


Рис.2. 2D-SDS-электрофорез в восстанавливающих условиях тканевой жидкости (1, 5), сыворотки (2) и плазмы крови (3, 4) карпа.

Вертикальная стрелка указывает направление SDS-электрофореза, горизонтальная – диск-электрофореза, фигурные скобки показывают область расположения на геле H- и L цепей иммуноглобулина с ММ 25-250 кДа, маленькие вертикальные стрелки указывают дорожки иммуноглобулина.

При заражении карпов аэромонадом выявлен рост относительного содержания иммуноглобулинов (ОСИ) в сыворотке и тканевой жидкости на третьи сутки. На 7-и и 14-е сутки относительное содержание Ig в сыворотке снижалось до контрольных величин, а в тканевой жидкости в 8-10 раз превысило показатели в норме (Рис.3).

У карпов, принимавших до и после иммунизации препарат Антибак 100, вариабельность ОСИ в СК и ПЖ имела значительный размах и перекрывалась со значениями ОСИ в контроле (Рис.4).

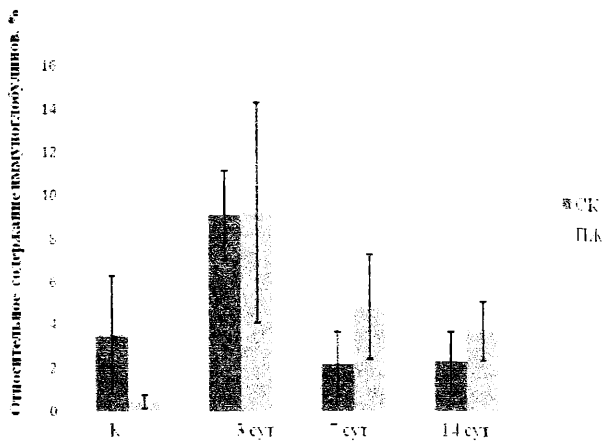


Рис.3 Относительное содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови СК (темная заливка) и перитонеальной жидкости ПЖ (светлая заливка) у карпов, не иммунизированных *Aeromonas hydrophila* (K – контроль) и иммунизированных *A. hydrophila*. Время экспозиции иммунизированных рыб составило 3, 7 и 14 суток.

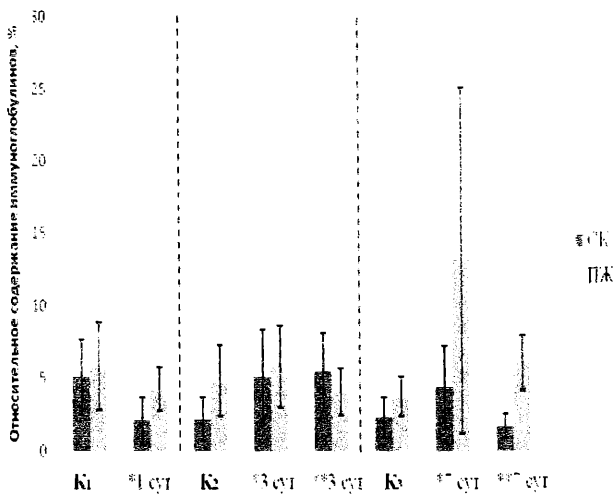


Рис.4. Относительное содержание Ig в сыворотке и перитонеальной жидкости у карпов, принимавших Антибак 100.

K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> и K<sub>3</sub> – контроли (группа 1), (\*) иммунизации *A. hydrophila* до (группа 2) и (\*\*) иммунизация после (группа 3) курса кормления. 1, 3 и 7 сут – время экспозиции после кормления рыб. Исходный уровень относительного содержания Ig в крови и тканевой жидкости (K) см Рис.3.

У карпов, принимавших до и после иммунизации пробиотик Суб-Про, вариабельность ОСИ в СК и ПЖ также имела значительный размах и перекрывалась со значениями ОСИ в контроле (Рис.5).

Таким образом, заражение карпов *A. hydrophila* приводило к достоверному росту относительного содержания иммуноглобулинов в тканевой жидкости. Использование препаратов Антибак 100 и Суб-Про для лечения зараженных рыб не приводило к достоверным изменениям относительного содержания иммуноглобулинов в их сыворотке крови и перитонеальной жидкости.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 10-04-00954-а).

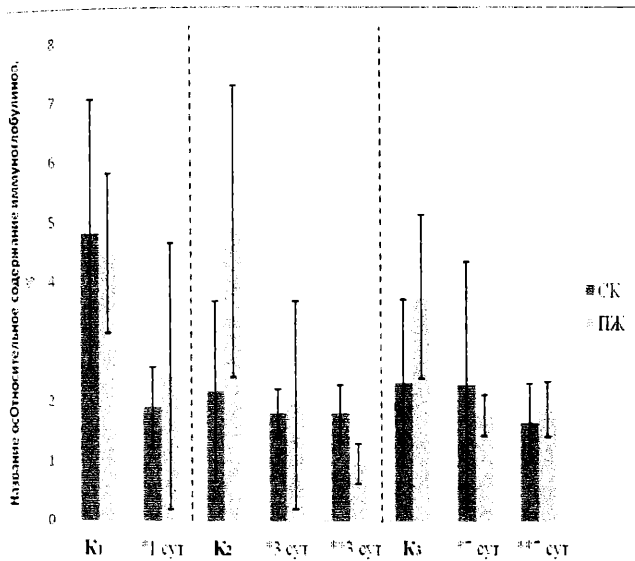


Рис.5. Относительное содержание Ig в сыворотке и перитонеальной жидкости у карпов, принимавших Суб-Про.

K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> и K<sub>3</sub> – контроли (группа 4), (\*) иммунизации *A. hydrophila* до (группа 5) и (\*\*) иммунизация после (группа 6) курса кормления. 1, 3 и 7 сут – время экспозиции после кормления рыб. Исходный уровень относительного содержания Ig в крови и тканевой жидкости (K) см Рис.3.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева А.М. Сывороточные гамма-глобулины рыб // Вопр. ихтиол.-2001.-Т.41 - №4 - С. 550-556.
2. Андреева А.М., Чалов Ю.П., Рябцева И.П. Особенности распределения белков плазмы между специализированными компартаментами внутренней среды на примере карпа *Cyprinus carpio* (L.) // Журн. эвол. биох и физиол. - 2007. - Т. 43 - №6 - С. 501-504.
3. Бурлаченко И.В. Актуальные вопросы безопасности комбикормов в аквакультуре рыб. - М.: ВНИРО, 2008. - 183 с.
4. Гаврилин К.В., Микряков Д.В., Силкина Н.И., Суворова Т.А. Влияние антибактериальных препаратов и пробиотиков на гуморальные факторы неспецифического иммунитета карпа *Cyprinus carpio* // Ветеринария. - 2010. - № 6 - С. 15-18.

5. Рудиков Н.И., Грищенко Л.И. Микрофлора и бактериальные болезни рыб // Ихтиология (Итоги науки и техники). - М.: ВИНТИ, 1985. - Т. 1 - С. 93-160.

6. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature. - 1970. - V. 4 (227) - № 5259-P. 680-685.

7. Lallier R., Mittal K.R., Leblanc D., LaLonde G., Oliver G. Rapid methods for the differentiation of virulent and non-virulent *Aeromonas hydrophila* strains // Serodiagn. vaccines.- Leetown, 1981. - P. 119-123.

#### **SPECIAL FEATURES OF THE TRANSCAPILLARY EXCHANGE OF IMMUNOGLOBULINS IN THE CARP *CYPRINUS CARPIO* L. WITH AEROMONOSIS**

**R.A. Fedorov, D.V. Mikryakov, O.A. Sharapova, O.J. Slynko, A.M. Andreeva**

The infection under the experimental conditions of the carp with *Aeromonas hydrophila* led to the significant increase of the relative content of immunoglobulins in the tissue fluids of fishes. The using of the preparation of Antibak 100 and Sub-Pro for the treatment of the fishes infected doesn't led to significant changes of the immunoglobulins relative content in the blood serum and tissue fluids.

# СЕКЦИЯ III. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ К АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

## ТЕМПОРЕГУЛЯЦИОННОЕ ПОВЕДЕНИЕ И ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ГРАНИЦЫ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ У ИНФИЦИРОВАННОЙ МОЛОДИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ

В.К. Голованов\*, Д.В. Микряков

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия  
golovan@biw.yaroslavl.ru*

Определение зоны эколого-физиологического оптимума и температурных границ в процессе сезонных жизненных циклов у водных животных – актуальная и «интригующая» область исследования экологии, которая привлекает внимание экологов, гидробиологов, ихтиологов и физиологов. Каково соотношение эколого-физиологического и эволюционного оптимумов роста, развития и питания гидробионтов? Где располагаются границы существования и как соотносятся зоны оптимума и пессимума в общем диапазоне жизнедеятельности рыб и беспозвоночных? Насколько физиологически, биохимически и иммунологически «взвешены» механизмы, позволяющие рыбам эффективно существовать, а также противостоять условиям предельно высоких и низких температур? Эти вопросы, глубоко теоретические по своей сути, имеют и большое практическое значение, определяя стратегию и тактику современной аквакультуры и рыболовства в водоемах, а также их перспективу.

Количество методов, посредством которых определяют оптимальные и граничные условия существования, огромно, но в последнее время все чаще предпочтение отдается сравнительно простым, логичным, хотя технически и несколько сложным методам оценки окончательных избираемых температур, а также верхних и нижних сублетальных и летальных температур у рыб. Суть метода «термопреферендума» заключается в том, что единичную особь или группу рыб помещают в условия температурного градиента, после чего регистрируют в течение нескольких часов, суток или 1-2 недель самопроизвольный выбор животными зоны окончательного избираемых температур (ОИТ), совпадающих по значениям с областью эколого-физиологического оптимума (Jobling, 1981; Голованов, 1996; Golovanov, 2006). Для оценки границ жизнедеятельности температуру воды в аквариуме с единичной особью или группой рыб нагревают (или охлаждают) с определенной скоростью, регистрируя текущее поведение и реакции рыб и в конечном итоге переворот кверху брюшком или на бок (Beitinger et al., 2000; Голованов, Смирнов, 2007). Потеря локомоторной способности характеризует сублетальную температуру – критический термический максимум (КТМ) – в случае верхних границ. В случае возврата к исходным температурам среды рыбы остаются живы, при продолжении нагрева они погибают. Это верно для скоростей нагрева от 1 до 60°C/ч. При очень медленной скорости нагрева, 0.04–0.08°C/ч или 1–2°C/сут получают значение хронического летального максимума (ХЛМ) или соответственно минимума. Значения ХЛМ характеризуют максимально возможную верхнюю (или в области вблизи нулевых значений температур – нижнюю) границу

жизнедеятельности рыб. Величины КТМ и ХЛМ для верхних и нижних температурных границ жизнедеятельности, как правило, имеют общее название верхних и нижних летальных температур (ВЛТ и НЛТ).

Как правило, температурные требования рыб определяются физиологическим и иммуно-биохимическим статусом. Количество данных, характеризующих оптимум и пессимум у инфицированных рыб, сравнительно невелико. В связи с этим цель настоящей работы состояла в сборе, систематизации и обобщении существующих данных, включая собственные экспериментальные, по определению ОИТ и ВЛТ у некоторых видов пресноводных рыб.

Общее количество опытов, позволяющих оценить разницу в реакциях больных и инфицированных рыб в условиях температурного градиента, где рыбы самопроизвольно выбирают зоны ОИТ, сравнительно невелико. Для теплолюбивых рыб, у которых зона температурного эколого-физиологического оптимума довольно высока, от 28 до 30°C, показано, что больные особи проявляют в градиенте температур реакцию «поведенческой лихорадки» (табл. 1).

Таблица 1.

Окончательно избираемые температуры у здоровых и больных рыб

Вид	Возбудитель инфекции	ОИТ у рыб, °С	
		Интактных	Инфицированных
<i>Carassius auratus</i> <sup>3,4</sup>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	27.9	32.7
<i>Carassius auratus</i> <sup>3</sup>	<i>Escherichia coli</i>	27.9	33.8
<i>Cyprinus carpio</i> <sup>5,6</sup>	<i>Aeromonas punctata</i>	29.5	31.5–33.0
<i>Micropterus salmoides</i> <sup>1</sup>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	30.1	32.2
<i>Lepomis macrochirus</i> <sup>1</sup>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	30.5	33.2
<i>Lepomis macrochirus</i> <sup>2</sup>	<i>Escherichia coli</i>	30.5	33.0
<i>Lepomis macrochirus</i> <sup>2</sup>	<i>Staphylococcus</i>	30.5	33.1

Примечание. <sup>1</sup> – Reynolds, Casterlin, Covert, 1976; <sup>2</sup> – Reynolds, Casterlin, Covert, 1978; <sup>3</sup> – Reynolds, Covert, Casterlin, 1978; <sup>4</sup> – Kluger, 1979; <sup>5</sup> – Голованов, Микряков, 1985; <sup>6</sup> – Голованов, 2004.

Такие виды, как сазан (каarp), серебряный карась, большеротый окунь, обыкновенный и длиннопёрый солнечник, а также ряд других, например, лещ *Abramis brama* (L.) и плотва *Rutilus rutilus* (L.), после инъекции возбудителя инфекции выбирают в термоградиентных условиях зоны температур, на 2–6°C большие по сравнению с контролем (Reynolds et al., 1976; Kluger, 1979; Голованов, В. Микряков, 1985, 2000). «Поведенческая лихорадка» проявляется в широком диапазоне температур (по крайней мере в диапазоне температур акклимации от 10 до 35°C), в то же время она не зависит от метода изучения конечного термопреферендума, а также вида возбудителя инфекции (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas punctata*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saprolegnia*) (Голованов, В. Микряков, 2000). В отличие от рыб, содержащихся в оптимальных температурах и погибавших после инъекции аналогичных доз возбудителей инфекции (Голованов, В. Микряков, 2000; Kluger, 1979), инфицированные особи теплолюбивых карповых и ушастых окуней в процессе поведенческой лихорадки выживают. Достоверная информация о том, каким образом инъекция возбудителя инфекционного заболевания повлияет на реакцию холодолюбивых видов рыб, например, лососевых и сиговых, в градиенте температур, пока отсутствует. Однако, по-видимому, у более холодолюбивых видов реакция поведенческой лихорадки может и не проявляться. В том, что это возможно, убеждают единичные данные по термоизбиранию взрослых особей обыкновенного голяна *Phoxinus phoxinus* (L.), которые, избрав зону ОИТ –

16–17°C, в конце опыта заболели ихтиофтириусом и сдвинулись в более холодные отсеки с температурой на 4–5°C ниже. Существенный интерес представляет и то, будет ли проявляться феномен «поведенческой лихорадки» у молоди рыб в случае не инфекционного, а инвазионного заболевания.

Данные о том, каким образом происходит выбор значений ОИТ в экспериментальном градиенте температур у здоровых (контроль) и инфицированных рыб, представлены в табл. 2.

Таблица 2.

Динамика выбора зоны окончательно избираемых температур у здоровых и инфицированных сеголетков карпа (температура акклимации 10°C, февраль–март)

Опыт	Инъекция возбудителя	ОИТ за дни опыта, °C			Соотношение (8–9 сут.) у инфицированных и контрольных рыб, °C
		5 и 6	8 и 9	10 и 11	
1	– (контроль)	25.5–27.5	29.5	29.5–29.5	–
2	<i>A. punctata</i> , до опыта	29.0–31.5	32.3–32.8	32.8–32.4	+2.8–3.1
3	<i>A. punctata</i> , 5 сутки опыта	29.8–30.3	30.5–32.1	32.1–31.8	+1.0–2.6
4	<i>Saprolegnia</i> , 5 сутки опыта	30.0–31.0	32.4–32.0	33.0–32.3	+2.9–2.5

Общий характер выбора оптимальных значений температуры в градиенте у здоровых и больных рыб существенно не различался. В то же время есть и ряд особенностей. В контроле выбор зоны оптимума был замедлен, только на 8–9 сутки установилось полное значение ОИТ молоди карпа. Напротив, при любом варианте инъекции возбудителя переход в область эколого-физиологического оптимума существенно ускорился и равнялся всего пяти, а при сапролегниозе – даже четырем суткам. Очевидно, инфекция ускоряет реакцию поведенческой терморегуляции. Характерно, что особой разницы в динамике выбора зоны ОИТ у сеголетков, инфицированных возбудителем *A. punctata* до опыта и на 5-ые сутки эксперимента, не отмечено. Однако значения ОИТ на 8–9 и 10–11 сутки во втором случае были несколько ниже. Разница значений ОИТ у здоровых и инфицированных особей в целом составила 1.0–3.1°C.

Для молоди леща и плотвы показаны зависимые от дозы эффекты реакции поведенческой лихорадки, ее ослабление со временем после инокуляции возбудителя, а также более слабое проявление при повторной инъекции (Голованов, В. Микряков, 1985, 2000). В целом получается, что у теплолюбивых рыб в температурах выше окончательно избираемых механизмы иммунной защиты животных действуют более эффективно (Kluger, 1979; Голованов, В. Микряков, 1985, 2000).

Данные о верхних летальных температурах, полученных с помощью методов КТМ и ХЛМ у здоровых и инфицированных видах рыб, минимальны. Тем не менее, исходя из многолетних опытов по изучению сезонной зависимости КТМ и ХЛМ у молоди и взрослых рыб, можно заключить следующее. Любая инфекция ослабляет организм рыб и приводит к понижению, иногда весьма существенному, на 5–7°C,



значений ВЛТ. Приведен ряд примеров, характеризующих особенности КТМ и ХЛМ у молоди и взрослых карповых и окуневых видов рыб.

Изучение терморегуляционного поведения и температурных границ жизнедеятельности у инфицированных рыб актуально по ряду причин. Во-первых, это может способствовать разработке методов лечения, профилактики и оздоровления рыб в аквакультуре, а также при содержании в аквариумах. Во-вторых, могут быть выявлены отдельные физиолого-биохимические механизмы адаптации рыб к температуре. В-третьих, получаемая информация ценна для оценки и прогнозирования поведения и распределения молоди и взрослых рыб в условиях «термального загрязнения» водоемов и долговременных изменениях климата.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голованов В.К. Эколого-физиологические аспекты терморегуляционного поведения пресноводных рыб // Поведение и распределение рыб. Докл. 2-го Всероссийск. совещ. «Поведение рыб». Борок. 1996. С. 16–40.
2. Голованов В.К. Методологические аспекты лечения и профилактики болезней рыб с использованием температурного фактора // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расширенные материалы докл. Всерос. науч. - практ. конф. М., 2004. С. 456–463.
3. Голованов В.К., Микряков В.Р. Реакция карпа в градиенте температур после инокуляции возбудителей бактериальной инфекции // Экол. физиология и биохимия рыб. Вильнюс. 1985. С. 50–51.
4. Голованов В.К., Микряков В.Р. Эволюционные и эколого-физиологические аспекты поведенческой лихорадки рыб // Сб. тез. докл. научно-практ. конф. «Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре», М., 2000. С. 47–48.
5. Голованов В.К., Смирнов В.К. Влияние скорости нагрева на термоустойчивость карпа *Cyprinus carpio* в различные сезоны года // Вопр. ихтиол. 2007. № 47. № 4. С. 555–561.
6. Anitha B., Chandra N., Gopinath P.M., Durairaj G. Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius auratus*) // 2000. Mutat. Res. Genet. Toxicol. and Environ. Mutagen. V. 469. № 1. P. 1–8.
7. Beitinger T.L., Bennet W.A., McCauley R.W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature // Environ. Biol. Fish. 2000. V. 58. № 3. P. 237–275.
8. Golovanov V.K. The ecological and evolutionary aspects of thermoregulation behavior of fish // J. Ichthyology. 2006. V. 46. Suppl. 2. P. S180–S187.
9. Jobling M. Temperature tolerance and the final preferendum – rapid methods for the assessment of optimum growth temperature // J. Fish. Biol. 1981. V. 19. № 4. P. 439–455.
10. Kluger M.J. Fever in ectotherms: evolutionary implications // Thermoregulation in ectotherms. Symp. Richmond. 1978. / Amer. Zool. 1979. V.19. N 1. 295–304.
11. Reynolds W.W., Casterlin M.E., Covert J.B. Behavioral fever in teleost fishes // Nature. 1976. V. 259. № 5538. P. 41–42.
12. Reynolds W.W., Casterlin M.E., Covert J.B. Febrile responses of bluegill (*Lepomis macrochirus*) to bacterial pyrogens // J. Therm. Biol. 1978. V. 3. № 1. P. 129–130.
13. Reynolds W.W., Covert J.B., Casterlin M. E. Febrile responses of goldfish *Carassius auratus* (L.) to *Aeromonas hydrophila* and to *Escherichia coli* endotoxin // 1978. J. Fish. Diseases. Vol. 1. P. 271–273.

### THERMOREGULATORY BEHAVIOUR AND TEMPERATURE LIMITS OF LIFE ACTIVITY IN INFECTED JUVENILE SOME SPECIES OF FRESHWATER FISHES

V. K. Golovanov, D.V. Mikryakov

The questions of definition of optimum zones and temperature limits of life activity at freshwater fishes are discussed. For an estimation of a ecological and physiological optimum the method «thermopreferendum» – estimation of finally selected temperatures is offered. The methods of a critical thermal maximum and chronic lethal maximum are applied for revealing the upper borders of life activity. The data on finally selected temperatures, also critical thermal maximum and chronic lethal maximum in some species of freshwater fishes, healthy and illness are given.

# ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КАРАСЯ ОБЫКНОВЕННОГО *CARASSIUS CARASSIUS* ИЗ ВОДОЕМОВ ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ ЗОНЫ ОТЧУЖДЕНИЯ И РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

Д.И. Гудков<sup>1</sup>, Д.В. Микряков<sup>2</sup>, В.Р. Микряков<sup>2</sup>, Н.А. Поморцева<sup>1</sup>,  
Л.В. Балабанова<sup>2</sup>, Н.К. Родионова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт гидробиологии НАН Украины

<sup>2</sup>Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина (ИБВВ РАН)  
daniil@ibiw.yaroslavl.ru

<sup>3</sup>Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии  
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины

Одной из важнейших радиозэкологических проблем, связанных с аварией на Чернобыльской АЭС (ЧАЭС), остается оценка повреждений биосистем в результате интенсивного радионуклидного загрязнения и обусловленного этим хронического радиационного воздействия. За минувшие послеаварийные годы выполнен значительный объем работ, посвященных медико-биологическим последствиям аварии. По вполне понятным и в какой-то мере оправданным причинам основным объектом этих исследований был человек. При этом происходило существенное развитие и совершенствование методов оценки дозовых нагрузок, а также эффектов радиационного воздействия у лиц, подвергшихся облучению. В значительно меньшей степени внимание радиобиологов и радиозэкологов было уделено другим, как предполагалось менее радиочувствительным представителям животного и растительного мира, в частности водным организмам. Гидробионты зоны отчуждения, обитающие в разнообразных условиях формирования повышенных доз облучения, остаются недостаточно изученным в этом отношении объектом.

Особый интерес при изучении хронического радиационного воздействия на водные организмы представляют рыбы, занимающие в биогеоценозах верхние трофические уровни и характеризующиеся сравнительно низкой радиостойчивостью. Однако радиобиологические исследования рыб в водоемах Чернобыльской зоны отчуждения (далее зона отчуждения) были ограничены в основном анализом морфометрических показателей, включая флуктуирующую асимметрию парных органов, а также оценкой состояния репродуктивной системы представителей ихтиофауны, в основном водоема-охладителя ЧАЭС. К сожалению, одни из наиболее радиочувствительных систем – кроветворная и иммунная – остались вне внимания исследователей как для рыб водоема-охладителя ЧАЭС, так и других водоемов зоны отчуждения, характеризующиеся крайне низкими темпами самоочищения и повышенными хроническими дозовыми нагрузками на гидробионтов.

Основная цель работы – сравнительный анализ состава лейкоцитов периферической крови рыб, обитающих в водоемах Чернобыльской зоны отчуждения и Рыбинского водохранилища.

Объектом исследований был карась обыкновенный *Carassius carassius*. Сбор материала проводили в августе 2009 г. в озерах Глубокое и Азбучин, расположенные в ближней (10-километровой) зоне отчуждения. Полученные результаты сравнивали с лейкограммами обыкновенного караса Рыбинского водохранилища (Балабанова, Микряков, 2002; Микряков, Микряков, 2005). Озеро Глубокое – замкнутый пойменный водоем, находящийся на территории левобережной поймы р. Припять на расстоянии 7 км от ЧАЭС. Озеро Азбучин – замкнутый пойменный водоем,

расположенный на правобережной пойме р. Припять в 2-х км от ЧАЭС. Обе озерные экосистемы характеризуются высоким содержанием радионуклидов во всех компонентах. Рыбинское водохранилище – одно из крупнейших водоемов озерного типа с площадью водного зеркала 4580 км<sup>2</sup> и объемом воды 24,5 км<sup>3</sup>, отдалено на тысячи км от ЧАЭС и расположено на северо-западе Российской Федерации.

Исследования гематологических показателей проводили на живых, внешне здоровых особях. Кровь отбирали из гемального канала хвостового стебля. Препараты периферической крови изготавливали на месте вылова рыб, высушивали на воздухе и фиксировали в 99,8% метаноле. Мазки окрашивали азур-эозином по Паппенгейму. Дальнейший анализ заключался в определении морфологического состава крови под световым микроскопом (увеличение 90×10). В мазках проводили подсчет лейкограммы: молодых гранулоцитов – миелобластов, промиелоцитов, метамиелоцитов, миелоцитов; палочко- и сегментоядерных нейтрофилов; псевдоэозинофилов, псевдобазофилов, моноцитов, лимфоцитов, пенистых клеток. Клетки крови и их патологические изменения идентифицировали по Н.Т. Ивановой (1983) и Л.Д. Житеневой (1989). Лейкоцитарную формулу определяли на основе 200 клеток белой крови.

Известно, что кроветворная и иммунная системы рыб являются наиболее чувствительными к воздействию ионизирующего излучения. И.А. Шеханова (1980) приводит минимальные пороговые мощности поглощенной дозы для разных систем рыб: кроветворной – 0,0005–0,001; воспроизводительной – 0,002–0,005; эндокринной – 0,007–0,01; дыхательной – 0,35 Гр/сут. Однако в природных условиях далеко не всегда удается установить столь четкое проявление зависимости радиобиологических эффектов от мощности поглощенной дозы. Это в значительной мере определяется периодом развития, эколого-физиологическими особенностями рыб, характером ионизирующего излучения и комплексом модифицирующих факторов, которые всегда действуют в природных условиях. И.А. Шеханова (1983), пришла к выводу о том, что мощность дозы для рыб как одного из наиболее радиочувствительных компонентов водных экосистем не должна превышать 0,04 Гр/год. Выше этого предела простирается зона, в которой проявляются разнообразные нарушения функций жизнедеятельности рыб.

По данным Т.Г. Sazykina, А.И. Kryshev (2003), пороговый уровень для появления первых изменений в крови рыб и первых признаков снижения функционирования иммунной системы существует при мощности поглощенной дозы 0,5–1,0 мГр/сут с общей дозой 0,05–0,2 Гр.

Рыбы, обитающие в озерах Глубокое и Азбучин, характеризуются высокой удельной активностью основных дозообразующих радионуклидов – <sup>90</sup>Sr и <sup>137</sup>Cs. В оз. Глубоком на протяжении 1999–2006 гг. удельную активность <sup>90</sup>Sr регистрировали в диапазоне 660–29000 (10550), а <sup>137</sup>Cs – 2500–19000 (8640) Бк/кг. Средняя активность <sup>137</sup>Cs для 7 видов рыб была в диапазоне 4300–12120 Бк/кг, при этом минимальные значения отмечены у караса, линя и леща, а максимальные у хищных видов – окуня и щуки. Еще более интенсивное накопление <sup>90</sup>Sr отмечено в рыбе оз. Азбучин, где удельная активность <sup>90</sup>Sr достигала 7000–139500 (26000), а <sup>137</sup>Cs – 1800–13000 (4260), при этом средние значения удельной активности <sup>90</sup>Sr более чем в 6 раз превысили этот показатель для <sup>137</sup>Cs. Аномально высокая удельная активность <sup>90</sup>Sr в организме рыбы была зарегистрирована для караса, отловленного в 2003 г., у которого она составила 139500 Бк/кг и более чем в 23 раза превысила удельную активность <sup>137</sup>Cs – 5900 Бк/кг (Гудков и др., 2008; Каглян и др., 2008). Средние уровни загрязнения рыб озерных экосистем зоны отчуждения <sup>90</sup>Sr и <sup>137</sup>Cs на три и более порядка превышают аналогичные показатели в водоемах с фоновым

уровнем радионуклидного загрязнения. Какие либо сведения о содержании радионуклидов в компонентах экосистемы Рыбинского водохранилища в доступной литературе отсутствуют. Поэтому, исходя из значительной удаленности водохранилища от Чернобыльской АЭС, а также из того, что на территории его водосбора отсутствуют локальные источники поступления радиоактивных веществ, данный водоем был отнесен к условно незагрязненной радионуклидами экосистеме.

Анализ усредненных показателей мощности поглощенной дозы от инкорпорированных радионуклидов свидетельствует, что в настоящее время в замкнутых водоемах зоны отчуждения 90% дозы внутреннего облучения рыб приходится на долю  $^{90}\text{Sr}$ . Максимальными значениями этого показателя характеризуются рыбы оз. Азбучин, для которых доза облучения от внутренних источников составляет в среднем 17 мкГр/ч, а вклад  $^{90}\text{Sr}$  в мощность поглощенной дозы благодаря высокой удельной активности радионуклида в воде и особенностям гидрохимического режима превышает 95%. В оз. Глубоком  $^{90}\text{Sr}$  формирует до 90% дозовой нагрузки от инкорпорированных радионуклидов при общей дозе внутреннего облучения рыб около 15 мкГр/ч. В украинских водоемах с фоновым уровнем радионуклидного загрязнения вклад  $^{90}\text{Sr}$  в дозу внутреннего облучения рыб в среднем составил около 40%, а средняя мощность поглощенной дозы от инкорпорированных радионуклидов 0,01 мкГр/ч. То есть внутренняя доза облучения рыб исследованных озер зоны отчуждения составляет около 0,4 мГр/сут с годовой дозой 0,15 Гр. Однако в данном случае речь идет о дозе, которую рыбы получают только от инкорпорированных радионуклидов. Известно, что карась значительную часть времени в период нагула и зимовки проводит вблизи донных отложений. Таким образом, учитывая высокие уровни радиоактивного загрязнения донных отложений исследованных озер, можно предположить, что внешняя доза облучения для карася из оз. Глубокое и оз. Азбучин может существенно превысить дозу от инкорпорированных радионуклидов и поэтому общая мощность поглощенной дозы будет в несколько раз выше.

Сравнительный анализ лейкограмм периферической крови рыб из исследованных водоемов и литературных данных показал существенные различия в процентном содержании всех типов клеток (табл.).

Таблица. Морфологические показатели крови карася обыкновенного, %

Клетки крови	Озеро Глубокое	Озеро Азбучин	Рыбинское водохранилище
Лимфоциты	74,4±9,2	84,5±4,4	88,0±2,0
Базофилы	3,9±1,4	0,3±0,1	1,0±0,3
Эозинофилы	4,6±1,7	1,1±0,3	2,0±0,2
Моноциты	0,7±0,3	0,3±0,2	1,2±0,7
Молодые гранулоциты	12,0±6,6	6,7±0,8	1,2±0,5
Нейтрофилы п/я	1,2±0,6	2,0±0,5	2,6±0,3
Нейтрофилы с/я	0,7±0,3	1,2±0,2	4,0±1,3
Пенистые клетки	2,5±1,6	2,9±0,9	-

Рыбы из водоемов зоны отчуждения по сравнению с таковыми Рыбинского водохранилища отличались низкими величинами лимфоцитов, моноцитов и высокими – молодых гранулоцитов и пенистых клеток. Оз. Глубокое от таковых оз.

Азбучин различались размахом изменчивости отдельных форм лейкоцитов. Это указывает на то, что хроническое радиационное воздействие, по-видимому, оказывает модифицирующее влияние на процессы дифференцировки стволовых кроветворных клеток, последствиями которых является изменение содержания отдельных типов клеток в периферической крови. Эти изменения соответствуют аналогичным данным, ранее полученным Г.С. Шлейфер (1978) на карпах при изучении влияния  $^{90}\text{Sr}$  на гематологические и иммунологические показатели.

Таким образом, сравнительный анализ лейкограмм периферической крови карася обыкновенного из озер Чернобыльской зоны отчуждения и Рыбинского водохранилища показал существенное различие между особями, обитающих в различных по уровню радионуклидного загрязнения водоемах.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балабанова Л.В., Микряков В.Р. Сравнительная характеристика действия нафталина и фенола на показатели белой крови карася *Carassius carassius* (L) // Биология внутренних вод, 2002, № 2. С. 100-102.
2. Гудков Д.И., Каглян А.Е., Киреев С.И., Назаров А.Б., Кленус В.Г. Основные дозообразующие радионуклиды в рыбе зоны отчуждения Чернобыльской АЭС // Радиационная биология. Радиэкология. 2008. Т. 48, №1. С. 48-58.
3. Житенева Л.Д., Полтавцева Т.Г., Рудницкая О.А. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб. Ростов-на-Дону: Ростовское книжное издательство, 1989. 111 с.
4. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 184 с.
5. Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние гормона стресса кортизона на состав лейкоцитов крови золотого карася *Carassius carassius* L. // Биология внутренних вод, 2005, № 4. С. 72-76.
6. Шеханова И.А. Радиэкологические аспекты защиты поверхностных вод при мирном использовании ядерной энергии // Проблемы и задачи радиэкологии животных. М.: Наука, 1980. С. 14-35.
7. Шеханова И.А. Радиэкология рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 204 с.
8. Шлейфер Г.С. Влияние ионизирующей радиации на иммунофизиологическое состояние рыб: Автореф. дис... канд. биол. наук. М., ИЭМЭЖ, 1978, С. 19.
9. Sazykina T.G., Kryshev A.I. Effects of ionizing radiation to aquatic organisms. The EPIC database // Contributed Papers of the International Conference on the Protection of the Environment from the Effects of Ionizing Radiation, 6-10 October 2003, Stockholm, Sweden. Stockholm, 2003. P. 91-94.

### FEATURES OF STRUCTURE OF LEUKOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD OF THE CRUCIAN *CARASSIUS CARASSIUS* FROM RESERVOIRS OF THE CHERNOBYL ZONE OF ALIENATION AND THE RYBINSK WATER BASIN

D.I. Gudkov, D.V. Mikryakov, V.R. Mikryakov, N.A. Pomortseva,  
L.V. Balabanova, N.K. Rodionova

The comparative analysis leucograms peripheral blood of a native kind of a crucian *Carassius carassius* is carried out. From polluted radionuclide lakes of the Ukrainian site of the Chernobyl zone of alienation and the Rybinsk water basin. Maintenance sizes, similarity and distinction of leukocytes of fishes of investigated reservoirs are defined.

# ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА, ПОЛА И АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ НА УРОВЕНЬ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ В КРОВИ МОРСКОГО ЕРША

И.И. Дорохова

Институт биологии южных морей, г. Севастополь, Украина, [mirenri@bk.ru](mailto:mirenri@bk.ru)

В настоящее время для анализа состояния морских акваторий наиболее удобным объектом являются рыбы. Негативное воздействие на их организмы приводит к усилению процессов эндогенной интоксикации, возникающих вследствие естественного снижения функционирования защитных систем и дисбаланса активности протеазной и антипротеазной систем. В результате этого происходит образование большого количества продуктов распада белков – среднемолекулярных пептидов с молекулярной массой 300-5000 Д. Они способны оказывать негативное влияние на метаболизм и функции клеток, так как близки по строению к регуляторным пептидам (Карякина, Белова, 2004). Рядом работ показано, что с возрастом многие биохимические показатели гидробионтов значительно изменяются. Известно также, что пол зачастую оказывает определенное влияние на некоторые параметры состояния рыб (Рощина, 2010; Скуратовская, 2009; [Chin-Yuan Hsu, Ya-Chi Chiu et al.](#), 2008; Кузьминова, Скуратовская, 2008). В связи с этим целью данного исследования является выявления изменений уровня эндогенной интоксикации в крови морского ерша разных возрастных групп в зависимости от пола и места обитания.

Материалом исследования служила кровь морского ерша *Scorpaena porcus L.* Рыб отлавливали в двух бухтах в районе Севастополя в период с 2008 по 2010 год и подвергали стандартному биологическому анализу. Кровь отстаивали на холоду сутки, отбирали сыворотку, эритроцитарную массу промывали физиологическим раствором для удаления остатков сыворотки и затем заливали дистиллированной водой (1 объем эритроцитарной массы: 4 объема дистиллированной воды) и оставляли при температуре 4 С° еще на 24 часа. Уровень эндогенной интоксикации (ЭИ) определяли по содержанию средних молекул (молекул средней массы, олигопептидов). Содержание белка в пробах устанавливали по методу Лоурн (Чиркин, 2002). Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента (Лакин, 1990).

На рисунке 1 представлены полученные данные уровне ЭИ в крови самок и самцов разных возрастных групп.

У самок данный показатель несколько превалирует для большинства групп. Как видно из представленных данных, такая тенденция характерна практически для всех исследованных возрастных групп. Несколько более высокий уровень ЭИ установлен для самцов групп 4+ - 5 и 8+ - 9. Достоверно большее содержание среднемолекулярных олигопептидов для самок показано в возрастной группе 5 + - 6 и у рыб старше 9-ти лет.

Данные о ЭИ в крови разновозрастных рыб из бухт с различным антропогенным влиянием представлены на рисунке 2.

Существенных достоверных отличий в содержании среднемолекулярных олигопептидов в крови рыб одного возраста, но обитающих в бухтах с различной антропогенной нагрузкой, не выявлено. Однако установлено, что исследуемый показатель достоверно выше у рыб группы 4+ - 5 из б. Карантинная по сравнению с особями из б. Александровская. В большинстве других возрастных групп обнаружена аналогичная тенденция. У рыб из б. Александровская данный

показатель несколько выше у самых младших и самых старших особей, а также у рыб возрастной группы 5+ - 6, однако отличия не достоверны.

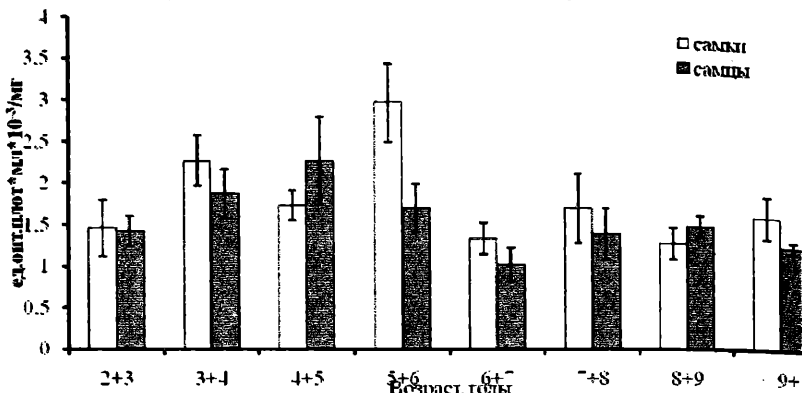


Рисунок 1. Уровень эндогенной интоксикации у самок и самцов морского ерша разных возрастных групп.

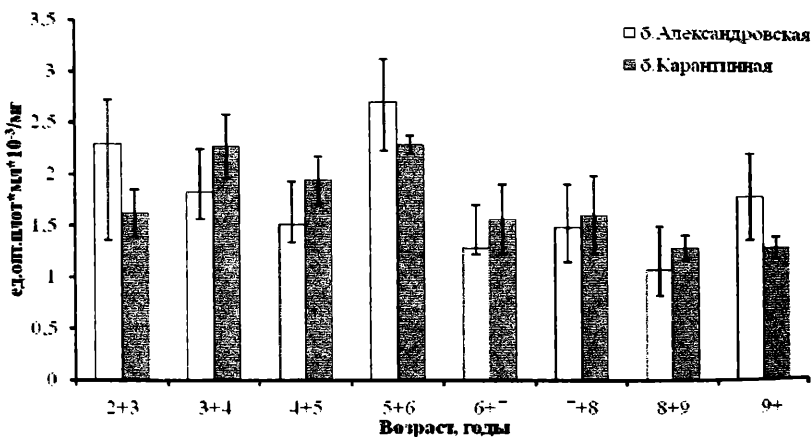


Рисунок 2. Уровень ЭИ в крови морского ерша разных возрастных групп, обитающего в бухтах с различной антропогенной нагрузкой.

Для дальнейшего анализа были отобраны наиболее многочисленные группы, взяты особи в возрасте от 3+ до 8 лет и исследовано антропогенное влияние отдельно на самок и самцов разных возрастных групп. Полученные для самок результаты представлены на рисунке 3.

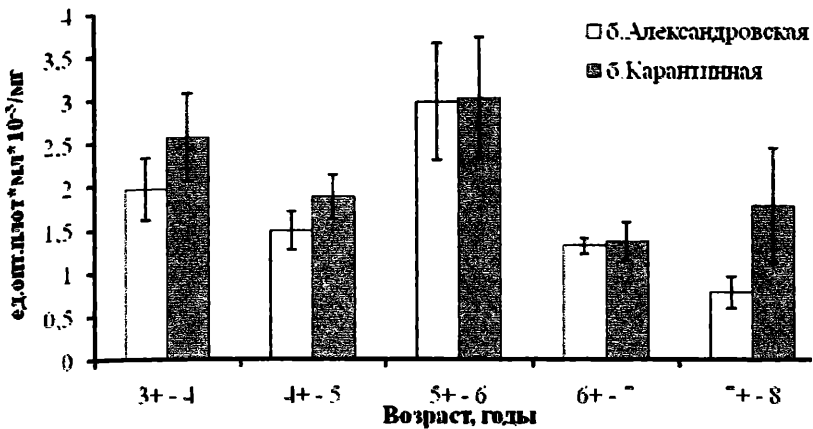


Рисунок 3. Уровень эндогенной интоксикации в крови самок морского ерша в зависимости от возраста и антропогенной нагрузки

Уровень ЭИ в крови самок из б. Карантинная выше у всех возрастных групп. Особенно выражена эта тенденция к 8 годам ( $p < 0,05$ ). Однако следует отметить некоторое возрастание содержания олигопептидов в крови рыб из б. Александровская в возрасте 5-7 лет, когда значения данного показателя становятся практически равными таковым у рыб из б. Карантинная.

Несколько иная закономерность выявлена для самцов скорпены (рис.4.)

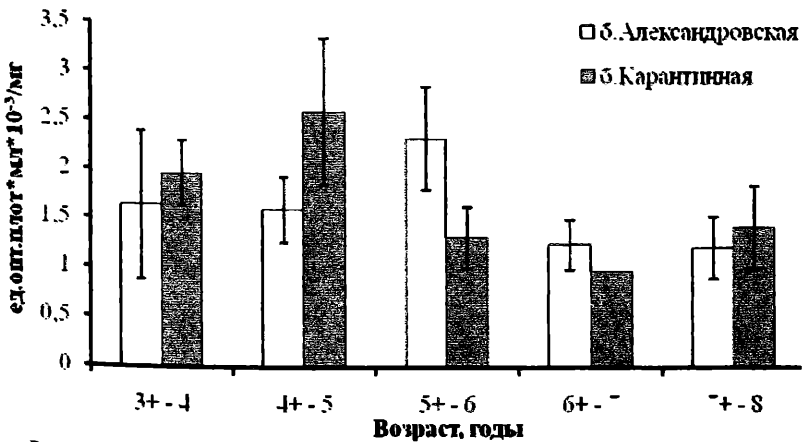


Рисунок 4. Уровень эндогенной интоксикации в крови самцов морского ерша в зависимости от возраста и антропогенной нагрузки.

В крови ершей в возрасте от 3+ до 5 и 7+ - 8 уровень ЭИ выше в б. Карантинная. У рыб в возрастной группе от 5 до 7 лет, как и у самок, отмечено



увеличение исследуемого показателя в б. Александровская. В возрастной группе 5+ - 6 данные отличия достоверны ( $p < 0,05$ ).

Морской ерш является типично донным видом и, следовательно, находится в непосредственной близости к грунтам морских акваторий. Известно, что грунты б. Александровская являются более загрязненными по сравнению с таковыми в б. Карантинная (Скуратовская, 2009; Осадчая, 2004). Возможно, в возрасте 5+ - 6 вследствие пика половой активности и связанных с этим изменений этиологии и усиленным расходом запасных и защитных средств особой данного вида он становится наиболее восприимчив к токсическим веществам в грунтах. Это объясняет и достоверное снижение исследуемого показателя в крови самцов как менее живучих по сравнению с самками, и возрастание уровня ЭИ у рыб из б. Александровская, особенно выраженное опять же у самцов (Кузьминова, Скуратовская, 2008). С возрастом, по-видимому, происходит некоторая адаптация, и уровень ЭИ у рыб из б. Александровская падает, также имеет место и общее снижение метаболической активности в организме с возрастом.

Таким образом, несмотря на отсутствие видимых различий в общем уровне ЭИ в крови рыб разного пола и обитающих в разных районах, более детальное исследование данного вопроса у разновозрастных особей позволило выявить некоторые отличия. Так, отмечено, что у рыб возрастной группы 5+ - 6 лет, по-видимому, происходят изменения метаболизма, что делает половые отличия заметными. Также отмечено изменение чувствительности исследуемого показателя морского ерша к антропогенному загрязнению с возрастом.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карякина Е.В., Белова С.В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 3. – С. 3-8
2. Кузьминова Н.С., Скуратовская Е.Н. Половые и возрастные особенности устойчивости морского ерша *Scorpaena porcus* L. по отношению к антропогенному фактору // Сб. научн. тр. НАН Украины. МГИ. - Севастополь, 2008. С. 414-420.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. / 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – С. 352.
4. Осадчая Т.С., Алемов С.В., Шадрин Т.В. Экологическое качество донных осадков Севастопольской бухты: ретроспектива и современное состояние // Экология моря. – 2004. – Вып. 66. – С. 82 – 87.
5. Практикум по биохимии: Учеб. пособие / А.А. Чиркин. – Мн.: Новое Знание, 2002. – 512 с. - (Медицинское образование).
6. Рощина О.В. Влияние природных и антропогенных факторов на активность ферментов сыворотки крови черноморских рыб (на примере морского ерша): Автореферат дис ... кандидата биол. наук: 03.00.04 – Москва, 2010. – 20 с.
7. Скуратовская Е.Н. Состояние антиоксидантной ферментной системы крови черноморских рыб в условиях комплексного хронического загрязнения: Дис... кандидата биол. наук: 03.00.04 – Севастополь, 2009. – 148 с.
8. Chin-Yuan Hsu, Ya-Chi Chiu, Wei-Lun Hsu, Yu-Pei Chan. Age-Related Markers Assayed at Different Developmental Stages of the Annual Fish *Nothobranchius rachovii* // The Journals of Gerontology: Series A/ Volume63, Issue12 / 2008 Pp. 1267-1276.

### INFUENCE OF AGE, SEX AND ANTHROPOGENIC IMPACT ON THE LEVEL OF ENDOGENOUS INTOXICATION IN THE BLOOD OF SCORPIONFISH

I.I. Dorohova

Significant differences in the overall level of endogenous intoxication in blood of scorpion fish of different genders and caught in different areas were not shown. More detailed study of this issue during fish aging has allowed to reveal some peculiarities. It was noted that in fish belonging to 5+ - 6 years age group, apparently, changes in metabolism make sexual differences appreciable. Sensitivity of investigated indicator of scorpion fish to anthropogenic pollution modified with age.

# ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СТРУКТУРЕ ТКАНЕЙ И КЛЕТОК ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНОВ СЕГОЛЕТК ПЛОТВЫ *Rutilus rutilus* L. ПРИ ДЕЙСТВИИ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ (ХОЗ)

Е.А. Заботкина, Г.М. Чуйко

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия  
zabel@biw.yaroslavl.ru

Хлорорганические поллютанты, в том числе полихлорированные бифенилы (ПХБ) и хлорорганические пестициды (ХОП), в настоящее время являются одними из наиболее опасных и стойких органических загрязнителей окружающей среды. Это связано как с их устойчивостью к деградации, так и способностью к накоплению в грунтах и гидробионтах, что определяется физическими свойствами соединений (Чуйко и др., 2010).

Известно, что ПХБ и ХОП оказывают эмбриотоксическое, тератогенное, мутагенное, генотоксическое и иммуносупрессивное воздействия как на высших, так и на низших позвоночных (Авхименко, 2000; Изюмов и др., 2003; Лапинова, Заботкина, 2004; Iwanowicz et al., 2005). По данным ряда авторов, ПХБ действуют на организм подобно стероидным гормонам, приводят к гемолитической анемии, снижают активность антиоксидантных и пищеварительных ферментов, поражают эндокринную и половую системы, вызывая феминизацию популяций (Otto, 1998; Bockman et al., 2007; Голованова и др., 2008). Рыбы как наиболее крупные представители гидробионтов в пресноводных экосистемах, а также существенная часть пищевого рациона человека, подвергаются влиянию ХОЗ, содержащихся в воде, кормах и грунтах.

Однако изменения, происходящие на тканевом и клеточном уровнях в органах, отвечающих за осуществление защитных реакций у рыб, особенно молоди, исследованы мало. Плотва *Rutilus rutilus* L. - один из наиболее обычных и многочисленных обитателей каскада волжских водохранилищ. Молодь ее обитает на хорошо прогреваемых заросших мелководьях и питается зоопланктоном, тогда как взрослую плотву относят к эврифагам. При наличии большого количества молоди взрослая плотва может переходить на питание мальками (Атлас пресноводных рыб России, 2002).

В связи с этим цель данной работы – исследовать динамику изменений гисто- и цитологических показателей сеголеток плотвы при длительном питании кормами с разной концентрацией ХОЗ и при обитании на грунтах разной степени загрязненности ХОЗ.

Исследования были проведены на молоди плотвы в возрасте 0+, массой  $3.59 \pm 1.19$  г и длиной  $6.55 \pm 0.50$  см. До начала эксперимента мальков подращивали в прудах с естественным кормом на экспериментальной прудовой базе ИБВВ РАН с мая 2006 г по сентябрь 2007 г. Для акклимации к лабораторным условиям рыб по 100 особей содержали в двух 200-литровых аквариумах с принудительно аэрируемой отстоянной артезианской водой в течение 3 мес. С начала эксперимента рыб пересаживали в аквариумы, на дне которых находились грунты, отобранные дночерпателем во время экспедиции на экспедиционном судне «Академик Топчиев» осенью 2007 г. в районе станций Первомайка (условно чистый участок) и Кошта (загрязненный участок) Рыбинского водохранилища. Согласно данным Чуйко с соавторами (2010), общее содержание ПХБ в донных отложениях на этих участках Рыбинского водохранилища составляло 24.8 нг/кг сухой массы на ст. Первомайка и 425.6 мкг/кг сухой массы на ст. Кошта. Общая сумма ХОП на тех же станциях равнялась 2.3 мкг/кг и 27.1 мкг/кг сухой массы грунта соответственно.

Одновременно рыб переводили на питание рыбным фаршем. Ежедневный рацион составлял 10% от общей массы рыб в эксперименте. Фарш готовили из мышц лещей *Abramis brama* (L.), выловленных соответственно в Моложском (контроль) и Шекснинском (опыт) плесах Рыбинского водохранилища. Содержащие загрязняющих веществ в фарше составляло: общее суммарное содержание ПХБ 3.6 и 50.8 мкг/кг и ХОП - 2.8 и 6.8 мкг/кг сырой массы соответственно (Чуйко и др., 2010).

В начале эксперимента (0 сут), через 40, 96, 218 сут экспозиции в контрольной и опытной группах рыб после предварительного оглушения отбирали пробы головной и туловищной почек, селезенки и печени. Пробы фиксировали в 2.5% глутаровом альдегиде на 0.1M фосфатном буфере, затем в 1% тетраокиси осмия на том же буфере, обезживали в батарее спиртов и заливали в смесь аралдита с Эпоном по стандартной методике (Мионов и др., 1994).

Через 40 сут эксперимента в контрольной группе в головном и туловищном отделе почек и селезенке отмечены активированные лимфоциты и активно функционирующие плазматические клетки. Достаточно большое количество палочковых клеток. Их выброшенные в ходе секреции гранулы обнаруживаются в макрофагах, нейтрофилах и эозинофилах. Во всех этих органах отмечено много митотически делящихся клеток. В печени замечен выброс секрета палочковых клеток в просвет сосудов. Структура гепатоцитов и эпителиоцитов желчных капилляров подобны таковой других костистых рыб. В опытной группе рыб в эти сроки в головном и туловищном отделах почек эозинофилы содержали большее количество опустошенных гранул, гранулы палочковых клеток, кроме нейтрофилов и макрофагов, обнаруживали также в просвете сосудов и межклеточном пространстве. Лимфоциты содержали ядерные петли, во всех органах также много митозов, но увеличилось количество молодых клеток, произошло уплотнение соединительно-тканых элементов вокруг сосудов, в боуеновой капсуле. Помимо этого отмечены инфильтрация гранулоцитами и лимфоцитами эпителиев проксимальных и дистальных канальцев, повреждение митохондрий в эпителиоцитах дистальных канальцев, слущивание эпителия дистальных канальцев. В печени наблюдали усиление окраски содержимого сосудов печени и появление липидных капель в гепатоцитах.

Через 96 сут в опытной группе рыб в головном отделе почек наблюдали появление разрушенных клеток, крупных макрофагов с большим количеством включений и соединительнотканые разрастания вокруг сосудов. В туловищном отделе почек – уплотнение и разрастание соединительнотканых элементов в боуеновой капсуле, появление разрушенных боуеновых капсул, уменьшение количества клеток с ресничками в проксимальных канальцах, их инфильтрацию лейкоцитами, разрушение митохондрий в клетках эпителия проксимальных канальцев, слущивание эпителия и большое количество белка в просвете канальцев и разрастание соединительнотканых оболочек вокруг сосудов и канальцев. Отмечены полностью разрушенные канальцы, просвет которых закрыт. Также наблюдали разрушенные клетки в дистальных канальцах, их слущивание в просвет канальцев, полностью разрушенные дистальные канальцы. В интерренальной ткани – изменение структуры гранул нейтрофилов, опустошение гранул в эозинофилах, большое количество митозов и молодых клеток с мелкими митохондриями. В селезенке наблюдали фагоцитирующие эозинофилы, большое количество макрофагов и молодых клеток. В печени помимо изменений, отмеченных в более ранние сроки, можно отметить увеличение скоплений гликогена в гепатоцитах и изменение характера его отложения.

На 218 сут в опыте в головном отделе почек наблюдали очень много эозинофилов с опустошенными гранулами и нейтрофилов с измененными гранулами, большое количество митозов и молодых клеток. Все типы клеток

содержали поврежденные митохондрии. В туловищном отделе почек наблюдали присутствие меланоцитов, в ткани, помимо канальцев и боуменовых капсул, замещенных клетками соединительной ткани (Рис. 1), наблюдали зоны некроза. Во всех типах клеток наблюдали поврежденные митохондрии (диссоциация внутренней мембраны, просветление матрикса). В интерренальной ткани - много митотически делящихся клеток. В гепатоцитах печени отмечено повреждение митохондрий, появление крупных секреторных гранул, увеличение количества каналов шероховатого эндоплазматического ретикулума и липидных включений (Рис. 2 а, б).

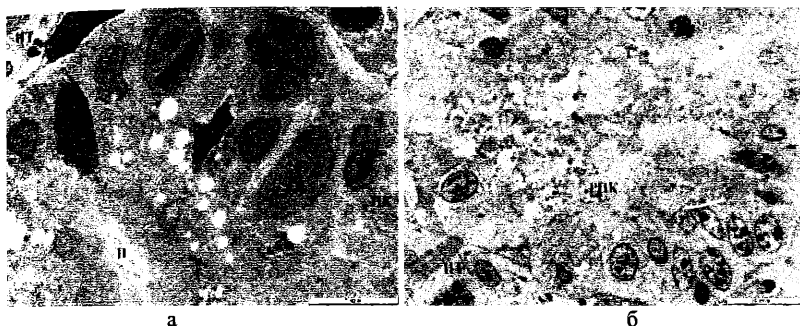


Рисунок 1. а – проксимальный отдел почечного канальца. Контроль. 40 сут эксперимента. б - Заросший клетками соединительной ткани почечный каналец. Опыт. 218 сут эксперимента. П – просвет канальца, ПК – почечный каналец, РПК – разрушенный почечный каналец; ИТ - интерренальная ткань.

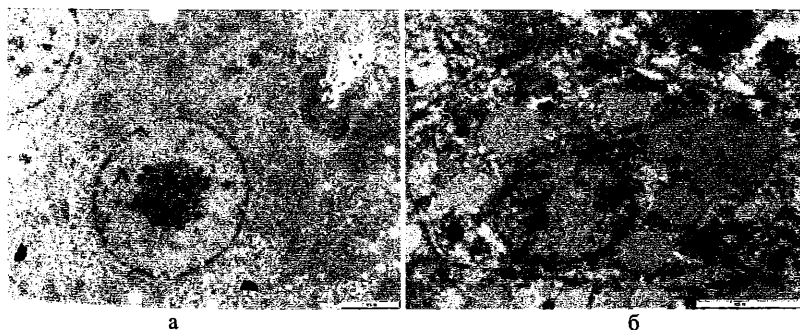


Рисунок 2. Структура гепатоцита сеголетки плотвы. а - контроль. 40 сут эксперимента; б - опыт, 218 сут эксперимента. Хорошо видны липидные включения (Л).

Анализ полученных данных показал, что наиболее чувствительными к действию данных факторов оказались головной и туловищный отделы почек. Наблюдаемые изменения свидетельствуют о развитии в почках рыб в опытной группе острых воспалительных процессов типа гломерулонефрита. В печени отмечали накопление гемосидерина, свидетельствующее о разрушении эритроцитов, а также изменение соотношения гликогена и липидов в сторону накопления липидов в клетках. Все вышеуказанные изменения свидетельствуют о сдвигах белкового, углеводного и липидного обменов. Вместе с тем развивающееся в ходе

эксперимента прогрессирующее повреждение митохондрий, которое к концу эксперимента затрагивало все типы клеток, свидетельствует о нарушении свободно-радикальных процессов на уровне всего организма, а не только отдельных органов или систем. Наблюдаемое визуальное увеличение митотической активности клеток, количества молодых клеток и активности плазматических клеток совпадает с проведенными ранее светомикроскопическими исследованиями.

Таким образом, ХОЗ, содержащиеся в корме и грунте, оказали влияние на структуру тканей и клеток всех исследованных органов сеголеток плотвы. Изменения носили признаки хронического воспалительного процесса, а также свидетельствовали о сдвиге обмена веществ в организме.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авхяменко М.М. Медицинские и экологические последствия загрязнения окружающей среды полихлорированными бифенилами // В кн. Арский Ю.М. Полихлорированные бифенилы. Супертоксиканты XXI века. 2000. Инф. вып. № 5. М.: ВИНТИ. С. 14-31.
2. Атлас пресноводных рыб России: в 2-х т. Т.1. / под ред. Ю.С.Решетникова. М.: Наука, 2002. 379 с.
3. Голованова И.Л., Чуйко Г.М., Филиппов А.А. Влияние ПХБ на устойчивость карбогидраз плотвы к действию Cu и Zn // Организмы, популяции, экосистемы: проблемы и пути сохранения биоразнообразия. Мат-лы Всеросс. Конф. С междунар. Участием. Вологда, 2008. С 28-32.
4. Изюмов Ю.Г., Таликина М.Г., Чеботарева Ю.В., Чуйко Г.М. Влияние Ароклора 1254 на эмбриональную гибель, количество микроядер и митоз в родительском и первом поколениях плотвы *Rutilus rutilus* (L.) // Биол. внутр. вод. 2003. №4. С. 85-91.
5. Лапирова Т.Б., Заботкина Е.А. Влияние пестицидов на иммунофизиологическое состояние рыб // Усп. соврем. биологии. 2004. Т. 124. № 4. С. 361 – 368.
6. Мионов А.А., Комиссарчик Я.Ю. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб.: Наука, 1994. 400 с.
7. Чуйко Г.М., Законнов В.В., Морозов А.А., Бродский Е.С., Шелепчиков А.А., Фешин Д.Б. Пространственное распределение и качественный состав полихлорированных бифенилов (ПХБ) и хлорорганических пестицидов (ХОП) в донных отложениях и леще (*Abramis brama* L.) из Рыбинского водохранилища // Биол. внутр. вод. 2010. № 2. С. 98-108.
8. Buckman A.H., Brown S.B., Small J., Muir D.C.G., Parrott J., Solomon K.R., Fisk A.T. Role of temperature and enzyme induction in the biotransformation of polychlorinated biphenyls and bioformation of hydroxylated polychlorinated biphenyls by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Environ. Sci. and Technol. 2007. Vol. 41. № 11. P. 3856—3863.
9. Iwanowicz L.R., Lerner D.T., Blazer V.S., McCormick S.D. Aqueous exposure to Aroclor 1254 modulates the mitogenic response of Atlantic salmon anterior kidney T-cells: Indications of short- and long-term immunomodulation // Aquat. Toxicol. 2005. V. 72. № 4. P. 305-314.
10. Otto D.M.E. Polychlorinated biphenyl (PCB) alterations of antioxidant defenses and xenobiotic metabolism in teleost fish: role of tissue glutathione metabolism in xenobiotic detoxication pathways // Dissertation Abstracts International. 1998. V. 58. № 6. P. 2998.

### PATHOLOGICAL CHANGES OF TISSUE AND CELL STRUCTURES OF IMMUNOCOMPETENCE ORGANS IN FINGERLING ROACH *RUTILUS RUTILUS* L. AT CHLORORGANIC POLLUTANT EFFECT

E.A. Zobotkina, G.M. Chuyko

The histo- and cytological changes in fingerling roach kidney, spleen and liver at effect chlororganic pollutants (ChP) were investigated. Chlororganic pollutants that contained in bottom and fish muscles from Molozhskiy (1) and Sheksninskiy (2) stretches of Rybinsk reservoir were used as control (1) and experience (2).

The chronic inflammation changes (glomerulonephritis) in kidney were noted. In liver the modifications of protein, lipid and carbohydrates metabolisms were observed.

# РЕАКЦИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ГУМОРАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ ГИДРОБИОНТОВ НА КСЕНОБИОТИКИ

Т.Б. Лапирова

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия  
ltb@ibiw.yaroslavl.ru*

Несмотря на то, что влияние антропогенного воздействия на водные биоценозы активно изучается уже несколько десятилетий, многие проблемы остаются до сих пор нерешенными. Изучение влияния на гидробионтов поступающих в водоемы загрязняющих веществ (ЗВ) включает в себя как лабораторные исследования, направленные на изучение реакции организма на какие-то конкретные поллютанты, так и анализ полевых данных о физиологическом состоянии животных, находящихся в условиях хронического поступления в водоем ксенобиотиков.

К ксенобиотикам относят чужеродные (не участвующие в пластическом или энергетическом обмене) вещества, попавшие во внутренние среды организма (Саловарова и др., 2007.). Поступление их в окружающую среду, как правило, связано с хозяйственной деятельностью человека. К наиболее распространенным ксенобиотикам относятся соли тяжелых металлов, пестициды, детергенты и т.д. Попадая в живые организмы, они могут вызывать различные прямые нежелательные эффекты, такие, как токсические или аллергические реакции, изменения наследственности, снижение иммунитета, нарушение обмена веществ, либо в процессе биотрансформации образовывать токсичные метаболиты.

При воздействии на организм внешних факторов, в том числе токсических, развивается стрессовая реакция. У рыб, как и у высших позвоночных, в эту реакцию одной из первых включается иммунная система. Поскольку механизмы специфического иммунитета у рыб развиты слабее, первостепенное значение для них имеют неспецифические факторы резистентности (Кондратьева, Киташова, 2002; Anderson, Zeeman, 1995). Клеточные факторы защиты включают фагоцитоз, гуморальные – продуцирование различных антимикробных соединений.

Важнейшим гуморальным фактором неспецифической защиты являются протективные свойства сыворотки крови. Обеспечиваются они рядом литических и бактерицидных соединений, выявленных как у высших позвоночных, так и у рыб: это комплемент, лизоцим, интерферон, неиммунные глобулины, С-реактивный белок и др. (Грищенко и др., 1999). Они осуществляют не только барьерную функцию при внедрении чужеродных агентов, но и принимают участие в поддержании гомеостаза организма также и при других, в том числе токсических, воздействиях. Определение бактериостатических свойств сыворотки крови (БАСК) дает ценную информацию о состоянии гуморального звена неспецифического иммунитета рыб.

Данных о функционировании иммунной системы моллюсков на настоящий момент недостаточно. Многие соединения, обуславливающие антимикробные свойства сыворотки крови рыб, имеют аналоги среди беспозвоночных. Важным компонентом неспецифической гуморальной защиты животных практически всех систематических групп является лизоцим – фермент, гидролизующий гликозидные связи пептидогликана клеточной стенки бактерий. Обнаружен он в сыворотке крови, гемолимфе беспозвоночных, тканевых жидкостях, слизи и т.д., вырабатывается фагоцитирующими клетками (Галактионов, 2005). Следует отметить, что сведений в

литературе о реакции иммунной системы моллюсков на поступление ЗВ крайне мало.

Целью данной работы явился анализ изменений показателей гуморальной неспецифической защиты гидробионтов на воздействие ксенобиотиков. В работе представлены результаты экспериментальных исследований по влиянию на антимикробную активность сыворотки крови рыб токсикантов различных классов, а также анализ данных полевых наблюдений по БАСК рыб и уровню лизоцимной активности дрейссены из зон с различными уровнями антропогенного влияния.

Уровень БАСК оценивали нефелометрическим методом, рассчитывая прирост суточной культуры тест-бактерий *Aeromonas hydrophila* в питательной среде, содержащей сыворотку, по отношению к среде без сыворотки (контроль). Результаты выражали в % угнетения роста бактерий (Методические указания..., 1999).

Концентрацию лизоцима определяли турбидиметрическим методом с использованием лиофилизированной культуры *Micrococcus lysodeicticus* (Практикум по иммунологии, 2002). Результаты обрабатывали статистически в программе Excel при уровне значимости  $p \leq 0.05$  с использованием t-критерия Стьюдента.

Экспериментальные исследования проводили на молоди карповых рыб. На годовиках карпа *Cyprinus carpio* (L.) изучали влияние некоторых ксенобиотиков неорганического и органического происхождения. В качестве токсических агентов использовали нитрат кадмия и карбофос, концентрации по действующему веществу составляли 0.2 и 0.1 от LC<sub>50</sub> соответственно. Продолжительность опытов равнялась 28-30 сут.

В результате проведенных исследований выявили значительное увеличение показателя на начальном этапе воздействия токсикантов. Ионы кадмия вызвали рост БАСК на 40% (Рис. 1а), экспозиция в карбофосе – в 6 раз (Рис. 1б). Динамика изменения показателя рыб, помещенных в раствор пестицида, оказалась более сложной, что связано с прохождением всех стадий реагирования на стрессовое воздействие: фаза мобилизации, супрессивная фаза (4-ые сутки) и адаптивная. В случае с кадмием активационная фаза была менее выраженной, а супрессивная фаза отсутствовала, что может быть связано с недостаточной силой действия раздражителя. Как в случае первого, так и второго токсиканта, к концу эксперимента уровень БАСК подопытных и контрольных рыб практически сравнялся.

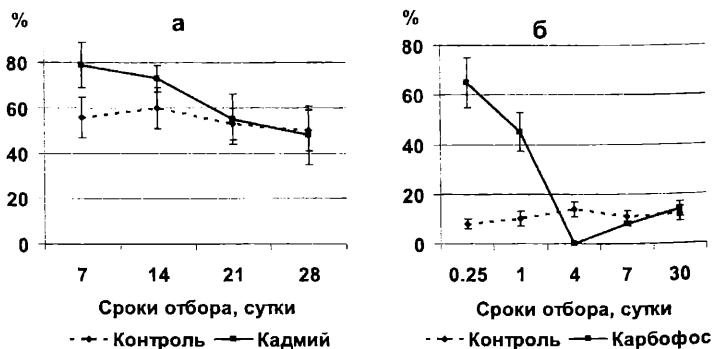


Рисунок 1. Бактериостатическая активность сыворотки крови карпа.

Эти результаты согласуются с данными В.Н. Крючкова и Ю.Б. Алиновской, показавших, что экспозиция карпа в соли кадмия вызвала рост БАСК. Важно отметить, что авторами было выявлено не только повышение активности неспецифических гуморальных факторов, но и количество иммуноглобулинов (Крючков, Алиновская, 2000.). Как следует из литературных данных, на срок наступления фазы активизации, вероятно, может влиять концентрация ксенобиотика. Показано, что при экспозиции карпа в растворе ионов кадмия меньшей концентрации, чем в нашем опыте, увеличение уровня БАСК выявлялось значительно позже, через 30 суток (Алиновская, 2001).

Характер реагирования естественных механизмов антибактериального иммунитета при краткосрочном воздействии различных концентраций ионов Cd был изучен также на личинках плотвы *Rutilus rutilus L.* Рыб на 7 суток помещали в растворы соли хлорида кадмия с концентрацией 2,5; 5,0 и 7,5 мг/л (в расчете на ионы металла). Затем личинок гомогенизировали целиком, экстракты тканей получали по стандартной методике (Вихман, Генералова, 1991). В полученном экстракте определяли бактериостатическую активность (БА).

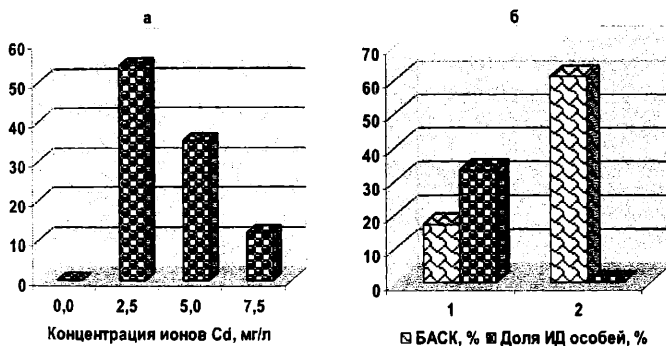


Рисунок 2. а – Бактериостатическая активность гомогенатов личинок плотвы, %; б – показатели леца 1 – из оз. Чашице, 2 – из Рыбинского водохранилища.

В результате проведенного эксперимента было установлено, что экстракты тканей контрольных рыб не обладали антибактериальными свойствами. Экспозиция рыб в растворах токсиканта вызвала выраженную активизацию гуморальных неспецифических факторов защиты, причем степень проявления этого эффекта находилась в обратной зависимости от концентрации токсиканта. Максимальное угнетение роста тест-бактерий было выявлено в тканях личинок, находившихся в растворе токсиканта самой низкой концентрации, минимальное – в группе рыб, выдержанных при концентрации ионов Cd, равной 7,5 мг/л (Рис. 2а). Различия между значениями показателя всех опытных групп статистически достоверны.

Полученные результаты показывают, что на этом этапе онтогенеза собственные механизмы гуморального врожденного иммунитета в норме находятся еще в неактивном состоянии. Под влиянием токсического стресса они активизируются, наиболее выраженная стимуляция защитных свойств происходит в диапазоне низких концентраций поллютанта, в то время как с ростом концентрации этот эффект снижается.

В целом полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что непродолжительные экспозиции в сублетальных концентрациях ксенобиотиков



разных классов на начальных этапах воздействия оказывают выраженное стимулирующее влияние на гуморальное звено врожденного иммунитета. Прохождение последующих фаз стрессовой реакции зависит от природы и концентрации токсиканта, но для относительно низких доз процесс заканчивается адаптационной фазой с выходом показателей на контрольный уровень.

Для изучения влияния хронического поступления ксенобиотиков в водоем на неспецифические гуморальные факторы защиты гидробионтов нами проводились работы на Рыбинском водохранилище и оз. Чашницкое.

Рыбинское водохранилище активно используется как транспортная артерия, по берегам растет число объектов рекреации. Кроме того, в водоем поступают стоки прибрежных населенных пунктов и сельскохозяйственных предприятий. При этом уровень антропогенной нагрузки в разных участках водоема сильно отличается. Наиболее загрязненным районом водохранилища (по качеству воды, донных отложений, состоянию бентоса и ихтиофауны) является Шекснинский плес, куда поступают стоки Череповецкого коммунально-промышленного комплекса (Колпакова и др., 1996).

Нами был проведен сравнительный анализ антимикробных свойств сыворотки крови леща из разных участков водоема. Первую группу составили рыбы, выловленные в Волжском плесе – «условно чистом» участке водохранилища, вторую группу – лещи из Шекснинского плеса. Анализ показал, что уровни БАСК этих групп рыб отличались практически вдвое:  $25 \pm 9$  и  $51 \pm 12\%$  в Волжском и Шекснинском плесах соответственно. При этом сыворотка крови 50% особей первой группы вообще не обладала противомикробной активностью, т.е. они оказались иммунодефицитными (ИД), в то время как среди рыб второй группы таких особей было выявлено всего 14%. Приведенные данные однозначно свидетельствуют о более высоком уровне активности неспецифической гуморальной защиты у лещей из загрязненного района.

Большой интерес при изучении хронического влияния ЗВ антропогенного происхождения на рыб представляет популяция лещей из оз. Чашницкое. Оно располагается в южной части Ростовского района Ярославской обл. Характерной чертой озера является полная изолированность его от ближайших рек, водоснабжение осуществляется в основном за счет родников в его центральной части, относится озеро к олиготрофному типу, антропогенное воздействие минимально. Сравнение проводили с лещами из Рыбинского водохранилища, отобранными в те же сроки.

Полученные данные выявили значительные различия в защитных свойствах сыворотки крови рыб из этих водоемов. Так, БАСК у леща из оз. Чашницкое была достаточно низка – всего  $17 \pm 10\%$ , при этом треть от общего числа обследованных рыб оказалась ИД. Уровень БАСК леща из Рыбинского водохранилища равнялся  $61 \pm 15\%$ , причем иммунодефицитных особей в обследуемой выборке не выявлено (Рис. 26).

Таким образом, можно заключить, что длительное воздействие низких концентраций ксенобиотиков поддерживает механизмы выработки защитных факторов в сыворотке крови рыб в активном состоянии, в то время как у особей, обитающих в условиях минимального поступления ЗВ, напряженность естественного иммунитета оказалась значительно ниже.

Для исследования неспецифических гуморальных факторов защиты пресноводного моллюска *Dreissena polymorpha* (Pall.) определяли уровень лизоцимной активности гемолимфы. Отбор дрейссены проводили практически по всей акватории Рыбинского водохранилища, включая впадающую в него р. Ягорба. Эта река протекает непосредственно в черте г. Череповца и относится к наиболее загрязненным участкам из всех обследованных (Козловская, Герман, 1997).

Анализ полученных данных выявил в этом пункте как самое высокое содержание фермента в гемолимфе, так и самую низкую долю нулевых по этому признаку особей, что свидетельствует о максимальном уровне активности этого защитного фактора в данной выборке дрейссены. Полученные результаты позволяют предположить сходство реакции гуморальных неспецифических защитных факторов рыб и моллюсков, а именно их активизацию в условиях хронического поступления сублетальных доз токсикантов.

Подытоживая приведенные результаты, можно говорить как о стимулирующем действии ксенобиотиков на защитную систему крови рыб при краткосрочном воздействии, так и об обратимости этого явления. При хроническом поступлении в водосм 3В механизмы выработки защитных факторов у рыб из зон с более высоким уровнем загрязнения поддерживаются в более активном состоянии, чем у особей из более благополучных районов. Влияние ксенобиотиков на лизоцимную активность дрейссены требует дальнейшего изучения, однако полученные данные позволяют предположить сходство реагирования гуморальных неспецифических факторов у рыб и моллюсков.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиновская Ю.Б. Восстановление некоторых физиологических показателей карпа после отравления ионами кадмия // Рыбохоз. наука на пути в 21 век: тез. докл. Всерос. конф. мол. ученых. – Владивосток. – 2001. – С. 4.
2. Вихман А.А., Генералова Л.П. Методические указания по количественному анализу гуморальных факторов резистентности в органах и тканях рыб. – М.: ВНИИПРХ, 1991. – 70 с.
3. Галактионов В.Г. Эволюционная иммунология: Учеб. Пособие. – М.: ИКЦ «Академкинга», 2005. – 408 с.
4. Грищенко Л.И., Акбаев М.Ш., Васильков Г.В. Болезни рыб и основы рыбоводства. – М.: «Колос», 1999. – 456 с.
5. Козловская В.И., Герман А.В. Полихлорированные бифенилы и полиароматические углеводороды в экосистеме Рыбинского водохранилища // Водные ресурсы. – 1997. – Т. 24, № 5. – С. 563-569.
6. Колпакова Е.Н., Лулоф И., Руттемаан Й. Отчет об исследованиях, проведенных в г. Череповец в августе 1995 г. // Проект «Волга в Череповце». – Н.Новгород: Экоцентр «Дронт». – 1996. – 23 с.
7. Кондратьева И.А., Киташова А.А. Функционирование и регуляция иммунной системы рыб // Иммунология. – 2002. – №2. – С. 97-101.
8. Крючков В.Н., Алиновская С.Б. Обратимость некоторых иммунологических показателей карпа после интоксикации кадмием // Вопр. Рыболовства., 2000. - Т.1, №2-3. С. 21-22.
9. Методические указания по определению уровня естественной резистентности рыб к инфекционным болезням. – М.: Госагропром РСФСР, 1999. – 38с.
10. Практикум по иммунологии: Учеб. Пособие / Под ред. И.А. Кондратьевой, В.Д. Самуилова. – М.: Изд-во МГУ. – 2002. – 224 с.
11. Саловарова В.П., Приставка А.А., Берсенева О.А. Введение в биохимическую экологию. — Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2007. — 159 с.
12. Anderson D.P. and Zeeman M.G. Immunotoxicology in fish / In book Fundamentals of aquatic toxicology (2th Ed.). Ed. by Gary M. Rond. Taylor Francis, W.D.C., U.S.A. - 1995. — P. 371-404.

### THE RESPONSE OF ANTIMICROBIAL FACTORS OF NONSPECIFIC HUMORAL DEFENSE OF HYDROBIONTS TO XENOBIOTICS

**T.B. Lapirova**

In this article it is shown that short-term effects of toxicants in fish cause a phase increase of the protective properties of serum, while the chronic influence of low dose of pollutants supports the nonspecific defense mechanisms in a more active state than in fish from cleaner areas. Data on the level of lysozyme activity in *Dreissena polymorpha* (Pall.) from the Rybinsk reservoir show similar reactions to the environment contamination with fish.

# ИЗМЕНЕНИЕ КИНЕТИКИ ПРОДУКЦИИ АФК ФАГОЦИТИРУЮЩИМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ РЫБ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ СРЕДЫ РАДИОНУКЛИДАМИ

Г.В. Макарская<sup>1,2\*</sup>, С.В. Тарских<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Международный научный центр исследований экстремальных состояний организма при Президиуме Красноярского научного центра СО РАН,

<sup>2</sup>Институт вычислительного моделирования СО РАН, Красноярск, Россия  
\*mgv@icm.krasn.ru

Система неспецифической резистентности организма представляет собой сложный комплекс взаимозависимых и кооперативно действующих клеточных и гуморальных факторов, в достаточно высокой степени локализованных в периферической крови и предназначенных для поддержания гомеостаза организма в изменяющихся условиях его существования. Генерация активных форм кислорода (АФК) является обязательным сопровождением активации нормально функционирующих фагоцитирующих клеток – ведущих элементов неспецифической резистентности и специфического иммунитета. Несомненно, физиологически обусловленные процессы генерации АФК иммунокомпетентными клетками, регулируемые активностью про- и антиоксидантных систем организма, являются чувствительными к воздействию даже низкой концентрации радионуклидов и слабых доз ионизирующего излучения (Соломатина и др., 2000). В зонах расположения предприятий радиохимического производства сохраняется вероятность поступления радионуклидов в пределах допустимых норм, но выше фоновых, во внешнюю среду с последующей их миграцией и накоплением в организмах разного уровня трофической пирамиды (Болсуновский, 2004). Вследствие этого возникает опасность повреждения организма рыб, способных наряду с бентосными организмами в десятки тысяч раз концентрировать в тканях собственного организма присутствующие в водной среде и донных отложениях радионуклиды (Вакуловский и др., 2004), в результате внутреннего облучения даже при уровне загрязнения среды ниже допустимого, но выше фонового.

Динамика и направленность изменений иммуногематологического статуса рыб, обитающих в неблагоприятной зоне, может стать основой прогноза не только здоровья рыб, но и состояния экосистемы в целом (Babior, 1984; Stasiak, 1996), определения степени отклонения от «нормы» показателей гемоиммуногенеза в зависимости от дозовой значимости инкорпорированных радионуклидов (Бурлакова, 1999; Соломатина и др., 2000).

Цель настоящей работы состояла в исследовании особенностей продукции АФК фагоцитирующими клетками крови рыб в условиях загрязнения среды радионуклидами.

Объектом исследования явились рыбы аборигенных видов (елец и хариус) реки Енисей, обитающие на различных ее участках: зона контроля - 45-80 км выше места сброса технических вод ГХК; 1 - зона влияния ГХК в 1-10 км ниже места сброса технических вод; 2 - зона влияния ГХК в 15-20 км ниже места сброса; 3 - зона влияния ГХК в 35-40 км ниже места сброса; 4 - зона влияния ГХК в 45-50 км ниже места сброса.

Состояние системы гемоиммуногенеза рыб оценивали гематологическими методами (содержание гемоглобина, численность эритроцитов и лейкоцитов) и по кинетике генерации АФК клетками крови при антигенной стимуляции *in vitro*, регистрируемой методом люминолуциллированной хемилюминесценции с

используем аппаратно-программного комплекса "Хемиллюминометр СІ-3604 - ПЭВМ" (СКТБ «Наука») (Макарская и др., 2006). О кинетике генерации АФК судили по параметрам хемиллюминесцентной кривой, принимая во внимание наиболее информативные: амплитуду максимальной активности хемиллюминесцентной реакции ( $I_{\max}$  - имп./с), время достижения максимума ( $T_{\max}$  - мин.) и площадь под кривой хемиллюминесценции ( $S$  - имп. за 120 мин.), определяющей общее количество АФК, генерируемых клетками за время записи хемиллюминесцентной кривой.

Анализ содержания радионуклидов в тканях рыб выполнен в лаборатории радиэкологического контроля Железногорского ГХК. Мощность дозы внутреннего облучения рыб рассчитывали согласно (Blaylock et al., 1993).

Уровень загрязнения водной среды радионуклидами на исследуемых участках реки не превышал предельно допустимого уровня, но был выше фоновых контрольных показателей. Расчетная мощность дозы внутреннего облучения от инкорпорированных радионуклидов, в основном  $^{32}\text{P}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{152}\text{Eu}$ ,  $^{65}\text{Zn}$ ,  $^{90}\text{Sr}$ , составляла от 0,75 мкГр/час у ельца до 3,05 мкГр/час у хариуса в 1-й зоне влияния ГХК. Кратность превышения мощности дозы внутреннего облучения относительно этой величины в контрольной зоне у обследованных видов рыб варьировала от 2000 до 250 раз в 1-й зоне, резко снижалась во 2-й и более удаленных зонах до фонового уровня (табл.1).

Таблица 1.

Показатели мощности дозы внутреннего облучения ( $D$ ) и размерно-возрастных характеристик рыб в зоне влияния стоков ГХК

Вид	Зона вылова	$D$ , мкГр/час	Длина тела промысловая, мм	Вес, г	Возраст, год
Елец	контрольная	0,003	174 ± 3	102 ± 7	4,3 ± 0,2
	1	0,753	157 ± 2	72 ± 2	5,8 ± 0,2
	2	0,186	149 ± 2	61 ± 2	5,8 ± 0,1
	3	0,119	155 ± 1	69 ± 2	7,0 ± 0,1
	4	0,045	157 ± 2	59 ± 2	6,5 ± 0,3
Хариус	контрольная	0,002	184 ± 11	115 ± 19	2,4 ± 0,3
	1	3,053	192 ± 3	105 ± 4	2,4 ± 0,1
	2	0,172	206 ± 2	132 ± 4	3,0 ± 0,1
	3	0,125	239 ± 7	198 ± 15	3,7 ± 0,2
	4	0,048	202 ± 2	116 ± 5	2,6 ± 0,1

Визуально регистрируемых внешних изменений тела и внутренних органов у обследованных особей рыб не отмечено. Сравнительный анализ размерно-возрастных и гематологических характеристик рыб из контрольной и разно удаленных зон от места сброса стоков ГХК обнаружил незначительное отклонение их значений в относительных показателях к их значению в контрольной зоне (табл.1, 2). У ельца в загрязненных зонах отмечается снижение веса у более взрослых особей, некоторое увеличение эритроцитов, в 4-й зоне увеличение содержания гемоглобина и снижение численности лейкоцитов. Для хариуса характерно 1,5-2-х –

кратное сокращение численности лейкоцитов при возрастании содержания гемоглобина.

Таблица 2.

Гематологические характеристики рыб в зоне влияния стоков ГХК

Вид	Зона вылова	Hb, г/л	эр-ты, млн.кл./мл	лей-ты, млн.кл./мл	n
Елец	контрольная	70 ± 3	609 ± 41	50 ± 4	31
	1	86 ± 7	933 ± 42	43 ± 3	34
	2	59 ± 4	676 ± 24	56 ± 3	107
	3	80 ± 5	931 ± 35	48 ± 3	44
	4	131 ± 10	827 ± 86	25 ± 4	13
Хариус	контрольная	81 ± 4	904 ± 90	78 ± 8	15
	1	142 ± 9	589 ± 32	23 ± 2	34
	2	84 ± 5	749 ± 24	43 ± 3	105
	3	150 ± 12	1180 ± 92	47 ± 7	12
	4	142 ± 10	675 ± 42	25 ± 2	32

Наиболее заметные отклонения от фоновых значений характерны для параметров кинетики продукции АФК ( $I_{\max}$  - амплитуда максимальной интенсивности продукции АФК в имп./с,  $T_{\max}$  - время достижения максимума в мин., S - общее количество квантов света, выделенных за время регистрации, как площадь под кривой кинетики в имп. за 120 мин.) в периферической крови рыб при антигенной активации *in vitro* (рис.2). У ельца отмечается 2-3 – кратное возрастание максимальной интенсивности и общего объема продукции АФК в 1-й и 2-й зонах. У хариуса в 1-й зоне влияния стоков ГХК мощность дозы внутреннего облучения инкорпорированными радионуклидами в 4 раза выше, чем у ельца, и проявляется эффект снижения уровня продукции АФК клетками при антигенной активации. Подобное явление свидетельствует об утрате иммунокомпетентными клетками способности реагировать на присутствие антигенного фактора продукцией АФК, что, возможно, является следствием истощения системы про- и антиоксидантных ферментов. По мере удаления от места поступления в реку загрязненных стоков хемилюминесцентная кинетика продукции АФК у хариуса и ельца возвращается к кинетике в контрольной зоне. Следует отметить, что эффект отклонения кинетики продукции АФК более выражен для особей всех видов рыб, отловленных во второй зоне, в которой уровень загрязненности радионуклидами в 4,8 (у ельца) – 13 (у хариуса) ниже. Не исключено, что в зону 2 могут «скатываться» рыбы из 1-й с изменившейся активностью кислородного метаболизма клеток крови в результате полученной дозы внутреннего облучения от преобладающего в тканях рыб короткоживущего радионуклида  $^{32}\text{P}$  (период полураспада 14,28 суток).

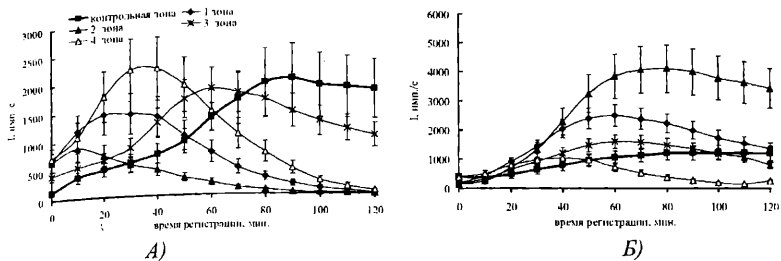


Рисунок 1. Кинетика генерации АФК антигенактивированными *in vitro* клетками в цельной крови хариуса (А) и ельца (Б), обитающих в зоне влияния стоков ГХК.

Оценка хемилюминесцентных кривых кинетики генерации АФК антигенактивированными *in vitro* клетками крови хариуса из различных зон методом компонентного анализа Магриссо (Magrisso et al., 2000) выявила особенности изменения различных этапов респираторного взрыва у особей в различных зонах. Согласно методического подхода, каждая хемилюминесцентная кинетическая кривая может быть представлена как сумма трех статистических (тип Пуассона) распределений, причем первая компонента (I) представляет процессы, происходящие около плазматической мембраны, связаны с фагоцитозом и представляют внеклеточную генерацию АФК (рис.2). Вторая компонента (II) характеризует внутриклеточные процессы, связанные с фагоцитозом и представляют внутриклеточную генерацию АФК. Третья компонента (III) описывает кинетику генерации внутриклеточных АФК, напрямую не связанной с фагоцитозом. Особенностью кинетики продукции АФК клетками крови хариуса из зоны 1 является резкое увеличение внутриклеточной генерации АФК ( $S_{II}$ ) (табл.3) по сравнению с особями из контрольной зоны на фоне сокращения площади компонент I и III при почти двукратном сокращении объема третьей компоненты на фоне снижения общего объема генерации АФК.

Таблица 3.

Величина площади (относ. ед.) компонент хемилюминесцентной кинетики генерации АФК антигенактивированными клетками крови хариуса в зоне влияния стоков ГХК относительно данных контрольной зоны

	Зона контроля	Зона 1	Зона 2	Зона 3	Зона 4
S	1,00	0,76	0,42	1,14	1,06
$S_I$	1,00	0,84	0,81	1,40	0,56
$S_{II}$	1,00	1,76	0,83	1,74	2,56
$S_{III}$	1,00	0,56	0,29	1,01	0,83

У особей из зоны 2 при еще более резком сокращении площади III-й компоненты уменьшается и внутриклеточная, связанная с фагоцитозом продукция АФК. Для зоны 3 характерно восстановление объема III-й компоненты и активизация продукции вне- и внутриклеточной продукции АФК, связанной с фагоцитозом. В зоне 4 при общем объеме продукции АФК, равном таковому в контрольной зоне, основной объем продукции приходится на внутриклеточный фагоцитарный процесс.

Из выявленных закономерностей следует, что у рыб физиологически обусловленные процессы генерации активных форм кислорода иммунокомпетентными клетками в процессе функционирования (например, фагоцитоз), играющие важную роль в противомикробном и противоопухолевом иммунитете и регулируемые активностью про- и антиоксидантных систем организма являются чувствительными к воздействию слабых доз ионизирующего излучения от инкорпорированных в организм из внешней среды водоема радионуклидов. Прослеживается обратно пропорциональная зависимость АФК-продукционной активности фагоцитирующих клеток хариуса как от удельной активности инкорпорированных радионуклидов, так и от величины мощности дозы  $\beta$ -излучения тела рыбы ( $r = -0.89$ ), а для ельца – прямо пропорциональная ( $r = 0.97$ ). Т.е. проявляются изменения на уровне кислородного метаболизма клеток неспецифической резистентности, изменение которой может стать причиной снижения устойчивости организма рыб к паразитарным агентам или развития аутоиммунных воспалительных процессов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болсуновский А.Я., Суковатый А.Г. Радиоактивное загрязнение водных организмов реки Енисей в зоне влияния горно-химического комбината // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2004. - Т.44, №3. - С.361-366.
2. Бурлакова Е.Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности // Российский химический журнал. - 1999. - Т. XLIII, №. 5. - С. 3-11.
3. Вакуловский С.М., Крышев А.И., Тертышник Э.Г. и др. Накопление  $^{32}P$  в рыбе Енисея и реконструкция дозы облучения населения / Атомная энергия. - 2004. - Т.97, Вып.1. - С.61-67.
4. Макарская Г.В., Тарских С.В., Лопатин В.Н. и др. Функциональная активность клеток крови рыб, обитающих в условиях влияния стоков радиохимического производства // Доклады АН - 2006. - Т.407, - № 1. С.133-137.
5. Соломатина В.Д., Малиновская М.В., Фомовский М.А., Могилевич Н.А. Особенности метаболизма рыб в условиях радиоактивного загрязнения // Гидробиологический журнал. - 2000. - Т.36, № 3. - С.51-57.
6. Babior M. The respiratory burst of phagocytes // Journal of Clinical Investigations. - 1984. - V.73. - P.599-601.
7. Blaylock B.G., Frank M.L., O'Neal B.R. Methodology for Estimating Radiation Dose to Freshwater Biota Exposed to Radionuclides in the Environment / Oak Ridge: Oak Ridge Nat. Lab.; ES/ER/TM-78, 1993.
8. Stasiak S.A., Baumann P.C. Neutrophilic activity as a potential bioindicator for contaminant analysis // Fish & Shellfish Immunology. - 1996. - v.6. - P.537-539.
9. Magrisso M.Y., Alexandrova M.L., Markova V.I. et al. Functional states of polymorphonuclear leukocytes determined by chemiluminescent kinetic analysis // Luminescence. - 2000. - V. 15. - P. 143-145.

#### THE CHANGE OF KINETICS OF THE ROS PRODUCTION BY PHAGOCYtic BLOOD CELLS OF FISHES IN CONDITIONS OF RADIO-ACTIVE CONTAMINATION OF ENVIRONMENT

G.V. Makarskaya, S.V. Tarskikh

The representative changes of an oxygen metabolism of cells of whole blood at antigenic activation *in vitro* were revealed in the fish out of the natural reservoir with a low level of pollution radioactive drains. It was shown, that the hematological parameters and characteristics of kinetics of reactive species of oxygen (ROS) production by fish blood cells aspire to a background level in process of removal from a place of receipt of the polluted drains in the river.

**МЕЛАНО-МАКРОФАГАЛЬНЫЕ ЦЕНТРЫ ОРГАНОВ ПЛОТВЫ *RUTILUS RUTILUS* В ПЕРИОД МАССОВОЙ ГИБЕЛИ РЫБ В ОЗ. КОТОКЕЛЬСКОЕ (2008-2009 гг.)**

**С.В. Пронина<sup>1</sup>, М.Д.-Д. Батуева<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Бурятский государственный университет, Улан-Удэ;

<sup>2</sup> Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия  
badmm\_@rambler.ru

Озеро Котокельское (площадь - 69 км<sup>2</sup>, средняя глубина – 3,5 м) расположено в 2 км от восточного берега оз. Байкал и имеет сток в него через систему «протока Исток - реки Коточик и Турка». До недавнего времени озеро было наиболее рыбопродуктивным (до 72 кг/га) среди эвтрофных водоемов Байкальской Сибири (Пронин, и др., 2007). Вследствие влияния природных и антропогенных факторов, включая высокий уровень рекреационной нагрузки и последствия от непреднамеренной интродукции чужеродного вида элодеи канадской *Eloдея canadensis* и ее отмирания, в последние десятилетия произошли существенные изменения в структуре биоты озера, в том числе видового состава и численности рыб. В настоящее время водоем фактически выпал из рыбохозяйственного фонда Республики Бурятия (Пронин и др., 2007). На фоне этих изменений весной 2008 года началась массовая гибель рыб, погибли птицы, кошки, собаки. В июле 2008 г. в прибрежных населенных пунктах оз. Котокельское была зарегистрирована вспышка заболевания у 17 человек (с одним смертельным исходом), связанная с употреблением рыбы из этого водоема (Качина, Комарова, 2008). Болезнь была диагностирована как алиментарно-токсическая пароксизмальная миоглобинурия (АТПМ), схожая с ранее описанной гаффско-сартланской болезнью, спорадически возникающей в разных странах (Германия, Россия, Норвегия, США).

Мелано-макрофагальные (ММЦ) центры выявлены у рыб и амфибий. У первых они содержатся в почках, печени и селезенке (Agius, Roberts, 2003). Основными функциями ММЦ являются хранение, разрушение и детоксикация экзогенного и эндогенного материала, включая паразитов (Roberts, 1975; Agius, Roberts, 2003). При этом меняется морфологическая структура и количество их в органе. Ввиду высокой чувствительности ММЦ к внешним воздействиям исследователи часто используют их как биомаркеры для оценки воздействия патогенов на рыб (Khan et. al., 1994; Coullard, Hodson, 1996).

Цель настоящего исследования - изучить реакцию ММЦ в органах кроветворения и иммунной защиты плотвы из оз. Котокельское в период ее массовой гибели.

Для изучения патогистологических изменений у плотвы из оз. Котокельское органы (печень, почки, селезенка, мышцы, кишечник, жабры) были зафиксированы 10% нейтральным формалином и жидкостью Карнуа, а головной мозг – 96 % этиловым спиртом. В качестве контроля служили органы от рыб из благополучного водоема (Чивыркуйский залив оз. Байкал). Материал для исследования был взят 24 декабря 2008 г. (25 экз. плотвы) и 6-8 июня 2009 г. (16 экз. плотвы). Парафиновые гистосрезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, азур 2 - эозином, PAS-реакцией, альциановым синим при pH 2,6 по Маллори, метиловым зеленым по Бреше.

Морфометрические измерения проведены под микроскопом MC300A (Austria) на пяти случайно выбранных срезах органа. Данные морфометрических измерений обработаны статистически с помощью пакета программ «Statistica 6.0»



для непараметрических данных «Mann-Whitney U-тест» при уровне достоверности  $p \leq 0,05$ .

*Печень.* В декабре 2008 г. в оз. Котокельское продолжалась массовая гибель рыб, преимущественно плотвы. Исследование печени котокельской рыбы выявило значительные патогистологические изменения. Наблюдалась диффузная жировая дистрофия с очагами жирового перерождения гепатоцитов, гемостаз в одних участках органа, заустение кровеносных капилляров и спадение их стенки в других (Пронина, Пронин, 2009).

ММЦ в печени плотвы из оз. Котокельское в декабре малочисленные, мелкие, светлые, слабо различимые, часто с нечеткими контурами. Среди желто-серых гранул пигмента содержатся светлые пустые вакуоли и немногочисленные пикнотичные ядра. При постановке PAS-реакции ММЦ окрашиваются очень слабо. Такая структура ММЦ указывает на их дегенеративное состояние.

У июньской плотвы (2009 г.) печень по микроморфологическим характеристикам близка к норме. ММЦ в печени многочисленные, располагаются по всему органу, часто вблизи сосудов и порталных зон. Они различных размеров, от единичных клеток до крупных (до  $14 \text{ мм}^2$ ), чаще округлой формы, структур с четкими границами. От паренхимы органа их отделяет тонкая мембрана, содержащая коллагеновые фибриллы. Гранулы пигмента в ММЦ лежат плотно, окрашиваются в желтый цвет и разные оттенки коричневого. В центре содержатся клетки с округлыми ядрами, богатыми гетерохроматином. При постановке PAS-реакции ММЦ окрашиваются интенсивно в темные малиновые и красные оттенки. При действии амилазы окраска становится чуть светлее, что свидетельствует о большом содержании в ММЦ нейтральных гликопротеинов.

Структура ММЦ в печени июньской плотвы из оз. Котокельское и контрольного водоема (Чивыркуйского залива) аналогична. Различия относительного содержания их в этих водоемах статистически не достоверны.

Реакция ММЦ в почках плотвы в значительной степени зависит от интенсивности инвазии миксоспоридией *Myxidium rhodei*, массового паразита почек плотвы в бассейне оз. Байкал. В связи с этим получить достоверные данные по структурным и количественным изменениям ММЦ в почках плотвы в оз. Котокельское не представилось возможным.

*Селезенка* в отличие от печени содержит значительно больше ММЦ. В селезенке они достигают больших размеров (до  $300 \text{ мм}^2$ ) и богаче более темными (почти черными) гранулами пигмента при одновременном содержании гранул разных оттенков желтого и коричневого цвета. ММЦ среднего и крупного размера, часто окружены толстым слоем лейкоцитов, иногда достигающим значительных размеров. На границе ММЦ и лейкоцитов лежит слой уплощенных клеток с веретеновидными темными ядрами. Лейкоцитарный вал отделен от гемопозитической ткани тонкой фибриллярной пластинкой, местами прерывающейся. При постановке PAS-реакции ММЦ окрашиваются в разные оттенки красного цвета.

ММЦ в селезенке декабрьской плотвы отличаются от таковых июньской плотвы большим содержанием темных пигментных гранул и слабее выраженной лейкоцитарной реакцией. Они часто локализуются непосредственно в просвете крупных кровеносных сосудов.

В целом ММЦ в селезенке плотвы из оз. Котокельское и контрольного водоема сходны по структуре, но относительное содержание их у котокельской плотвы значительно выше. В селезенке котокельской плотвы относительное содержание ММЦ колеблется от 6,2% до 21,1%, у плотвы из контрольного водоема – от 2,0% до 5,1%.

*Заключение.* Результаты проведенного исследования показали, что реакция ММЦ в целом отражает функциональное состояния органов рыб и могут служить хорошим биотестом при оценке токсического воздействия внешней среды на организм рыб.

**Благодарности:** Благодарим за помощь в получении материалов для исследования сотрудников ИОЭБ СО РАН д.б.н., проф. Н.М. Пронина и к.б.н. Т.Г. Бурдуковскую.

Работа выполнена при поддержке гранта БГУ «Инновационные научные исследования 2009 г.» и проекта Министерства природных ресурсов РБ (госконтракт на проведение НИР по выявлению причин и условий вспышки АТПМ на оз. Котокельском).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Качина Е.А., Комарова Е.В. Анализ клиники, диагностики, лечения гаффской болезни в Республике Бурятия // Сб. материалов Междунар. научно-практ. конф. Красноярск, ООО «Версо», 2009. – С. 314-315.
2. Пронина С.В., Пронин Н.М. Патологические изменения в печени плотвы *Rutilus rutilus* из оз. Котокельское (Прибайкалье) в период вспышки гаффской болезни // Сб. науч. тр. ФГНУ «ГосНИОРХ». – С.-П., 2009. – Вып. 338. – С. 171-173.
3. Пронин Н.М., Матвеев А.Н., Самусенок В.П. и др. Рыбы озера Байкал и его бассейна Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2007. – 284 с.
4. Agius C., Roberts R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology // *Journal of Fish Diseases*, 2003. - 26. - P. 499–509
5. Couillard C.M, Hodson P.V. Pigmented macrophage aggregates: a toxic response in fish exposed to bleached-kraft mill effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1996 - 15. - P. 1844–1854.
6. *Fish Pathology* / Roberts R.J. - Philadelphia, PA: 3rd edn. W.B. Saunders, 2001. - 650 p.
7. Khan R.A., Barker D.E., Hooper R., Lee E.M., Ryan K., Nag K. Histopathology in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) living adjacent to a pulp and paper mill / *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1994. - 26. - P. 95–102.

### MELANO-MACROPHAGE CENTERS RUTILUS RUTILUS OF ROACH ORGANS DURING OF MASS MORTALITIES OF FISHES IN LAKE KOTOKELSKOE (2008-2009)

S.V. Pronina, M.D. Batueva

The reaction of melano-macrophage centers in hematopoietic and immunological organs of roach can be influenced by functional condition of fish organs and also can be presented as biomarkers of exposure of pollution in fish.

# ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА ИММУНО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МОЛЛЮСКА *RAPANA THOMASIANA* CROSSE

Н.И. Силкина, Д.В. Микряков\*, В.Р. Микряков

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок 152742  
\*daniil@ibiw.yaroslavl.ru

Акватории Черного моря подвержены интенсивному антропогенному воздействию, которое приводит к химическому, физическому и биологическому загрязнению воды, снижению биоразнообразия, смене доминирующих видов гидробионтов, появлению новых видов (Романенко, 2004). Известно, что гидробионты, обитающие в загрязненных зонах, отличаются от таковых из чистых акваторий темпами роста и развития, состоянием здоровья, выживаемостью, плодовитостью, продолжительностью жизни и т. д., что свидетельствует о глубоких изменениях происходящих в функционировании механизмов гомеостаза (Кравченко, Крицкая, 2007; В. Микряков и др., 2001; Немова, 2008). В настоящее время особенности влияния антропогенного загрязнения на беспозвоночных гидробионтов слабо изучены, в частности, сведения о биохимических показателях крупного брюхоногого моллюска - рапаны (*Rapana thomasiana* Crosse) немногочисленны, а данные по иммунологическим параметрам отсутствуют (Полякова, 1995; Шевченко, Фроленко, 2003; Абросимова, Саенко, 2005) Между тем, такие данные необходимы при мониторинговых экологических исследованиях, поскольку рапана широко распространена в шельфовой зоне Черного моря и является объектом промысла.

Цель работы – сравнительное исследование иммунобиохимических показателей у рапаны, обитающей в акваториях Черного моря. Материалом для исследования послужили взрослые особи моллюска *Rapana thomasiana* Crosse, отряд Saenogastropoda, семейство Muricidae. Рапану отбирали в сентябре – октябре 2007 и 2008 г. на 3-х станциях: в районе порта г. Туапсе, вблизи устья реки Мзымта (Адлерский район г. Сочи) и у поселка Цандрипш (Абхазия). Наиболее загрязненной зоной является акватория крупного морского порта г. Туапсе, которая постоянно подвергается многокомпонентному загрязнению (нефтью, разными видами топлива, отходами нефтехимической и машиностроительной промышленности, цементного производства, судоремонтного завода, производства строительных материалов и т.д.). К загрязненному участку можно отнести также устье реки Мзымта, в этой акватории превышено содержание нефтяных углеводородов, нитритов и др. Акваторией с условно низким уровнем загрязнения можно считать станцию в Абхазии, где полностью отсутствуют промышленные предприятия.

Анализ иммунологических и биохимических показателей проводили в мягких тканях моллюсков по содержанию неспецифических иммунных комплексов (ИК), общих липидов (ОЛ), продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и показателю общей антиокислительной защиты (АЗ).

Функциональное состояние гуморального звена неспецифического иммунитета оценивали по содержанию неспецифических иммунных комплексов (ИК) методом Гриневич и Алферова (1981), адаптированному нами для водных гидробионтов. Липиды экстрагировали из ткани и определяли общепринятым способом по Фолчу (Folch et al., 1957; Кейтс, 1972). Интенсивность ПОЛ оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА) – одного из конечных продуктов перекисления липидов (Андреева и др., 1988). Состояние процессов АЗ определяли по интегральному показателю КОС (константе ингибирования окисленного

субстрата 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха) стандартным методом Семенова и Ярош (1985). Результаты исследований подвергали статистической обработке при помощи стандартного пакета программ (приложение Statistica 6.0) с использованием t-теста при уровне значимости 0,05.

Проведенное исследование функционального состояния гуморальных факторов врожденного иммунитета, содержания ОЛ, соотношения процессов ПОЛ и АЗ в мягких тканях рапаны выявило различия исследуемых показателей в зависимости от уровня антропогенного загрязнения (табл.1.).

Таблица 1.

Иммуно-биохимические показатели рапаны, обитающей в акваториях с разным уровнем антропогенной нагрузки.

Показатели	Место обитания		
	Туапсе	Сочи	Абхазия
Число особей, экз.	27	33	28
ИК, у.е.	3.61±0.5 <sup>аб</sup>	5.12±0.7 <sup>а</sup>	2.44±0.4
Общие липиды, мг%	1858±47 <sup>а</sup>	1885±54 <sup>а</sup>	1327±35
Содержание МДА, нмоль	3.124±0.08 <sup>аб</sup>	3.551±0.09 <sup>а</sup>	1.42±0.09
КОС, л/мл×мин	1.147±0.053 <sup>аб</sup>	1.071±0.068 <sup>а</sup>	0.765±0.082

Примечание: <sup>а</sup> - достоверно для показателей Туапсе и Сочи относительно станций в Абхазии; <sup>б</sup> - достоверно для показателей Туапсе относительно Сочи.

В загрязненных акваториях г. Сочи и г. Туапсе количественные характеристики ИК рапаны достоверно превышали аналогичный показатель у моллюсков из условно чистого района. Общеизвестно, что при инфекционных, токсических и аутоиммунных болезнях у человека и животных появляются ИК, которые формируются в результате взаимодействия антигена и антитела. ИК играют важную роль в регуляции иммунных реакций, а их образование является фазой нормального иммунного ответа организма, направленного на поддержание постоянства внутренней среды. Однако в случае длительного пребывания ИК в организме и несвоевременного удаления их из русла крови они вызывают супрессию иммунных реакций и обуславливают развитие неконтролируемого иммунокомплексного патологического процесса. Интенсификация образования ИК в живых организмах свидетельствует о дисбалансе в системе клеточного и гуморального иммунитета и о непрерывном или хроническом попадании в русло крови чужеродных раздражителей, приводящих к нарушению постоянства внутренней среды (Купер, 1980; Логинов и др., 1999; Галактионов, 1995). Увеличение содержания ИК у моллюсков из разных по качеству вод мест обитания свидетельствует о развитии системного аутоиммунного процесса при хроническом загрязнении водной среды.

Сходный характер изменчивости с таковыми иммунологических показателей нами установлен при изучении липидного обмена. Глубокие нарушения отмечались в метаболизме липидов мягкой ткани рапаны из загрязненных зон. Содержание ОЛ у моллюска из Туапсе и Сочи превышало на 40 и 42% таковой уровень в Абхазии. По возрастанию концентрации основных липидов в мягком теле рапаны можно судить об интенсификации катаболических процессов (липолиза) в загрязненных районах. Явление повышенного содержания ОЛ в разных тканях гидробионтов является адаптационной реакцией на загрязнение вод и часто наблюдается в природных

условиях в зонах с повышенной антропогенной нагрузкой (В. Микряков и др., 2001; Немова, 2008).

Хроническое отравление рапаны в загрязненных районах отражает четко выраженные изменения их прооксидантного статуса, характеризующегося активацией процесса липопероксидации, на что указывает возрастание содержания МДА в 2.2 и 2.5 раза в Туапсе и Сочи соответственно по сравнению с таковыми уровнем из относительно чистого района Абхазии. При техногенном загрязнении рапана накапливала больше продуктов перекисления липидов по сравнению с чистым районом. Параллельно изменялся и интегральный показатель антиоксидательной защиты: КОС у таких особей повысился соответственно в 1.5 и 1.4 раза сравнительно с чистой зоной, что свидетельствует о резком снижении уровня антиоксидантных структур в мягких тканях рапаны. При недостатке антиоксидантов в организме развиваются процессы окислительного стресса, сопровождающиеся нарушением баланса в системе прооксиданты–антиоксиданты. Равновесие в системе ПОЛ – АЗ смещается в сторону усиления ПОЛ. Процессы сдвига и нарушения баланса в системе ПОЛ-АЗ у гидробионтов встречается в районах с повышенной антропогенной нагрузкой а также установлено в токсикологических опытах (Микряков и др., 2001; Winston, 1991; Möller et al., 1996; Moseley et al., 2004; Yagi, 1992).

Таким образом, из полученных материалов следует, что у рапаны Черного моря, обитающей в условиях хронического антропогенного загрязнения вод, по сравнению таковыми из относительно чистой акватории, наблюдается интенсификация процессов липолиза. В результате усиления процессов ПОЛ и снижения компонентов АЗ отмечается дисбаланс прооксидантно-оксидантной системы в сторону липиперекисеобразовательных процессов. Такие отклонения могут быть причинами, вызывающими патологии и снижение адапционных способностей организма в обеспечении оптимального роста, развития и сохранения индивидуальной целостности. Это подтверждается пониженными показателями естественного иммунитета. Полученные результаты в целом говорят о том, что присутствие в воде акваторий Туапсе и Сочи поллютантов приводит к нарушению липидного обмена и подавлению функций механизмов неспецифического иммунитета в организме рапаны.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абросимова Н.А., Саенко Е.М. Методические основы оценки состояния популяции моллюсков по биохимическим показателям (на примере рапаны) // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов европейского Севера. Сб. матер. IV (XXVII) Международ. конф. Вологда, 2005, С. 8-10.
2. Андреева Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело, 1988. № 11. С. 41-43.
3. Галактионов В.Г. Очерки эволюционной иммунологии. М.: Наука, 1995. 256 с.
4. Гриневич Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лабораторное дело, 1981, № 8. С. 493-496.
5. Кейте М. Техника липидологии. М. 1972. 300 с.
6. Кравченко Ю.А., Крицкая Е.Б. Современный мониторинг загрязнений Черного моря // Фундаментальные исследования, 2007, № 10. С. 80-98.
7. Купер Э. Сравнительная иммунология. М., Мир, 1980. 422 с.
8. Логинов С.И., Смирнов П.Н., Трунов А.Н. Иммунные комплексы у животных и человека: норма и патология. РАСХН. Сиб. Отд-ние. ИЭВСИДВ.: Новосибирск, 1999. 144 с.
9. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Попов А.В., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука. 2001. 126 с.

10. Немова Н.Н. Биохимические реакции гидробионтов на действие антропогенных факторов // Матер. III Всерос. конф. по водной токсикологии, Борок, 2008. С.109-112.
11. Полякова Л.К. Рапана. Использование на пищевые цели. (Обзор) Севастополь, 1995. 26 с.
12. Романенко В.Д. Основы гидроэкологии: Учебник для студентов высших учебных заведений. Киев: Генеза. 2004. 664 с.
13. Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Укр. биохим. журн. 1985, Т.57, № 3. С. 50-52.
14. Шевченко В.Н., Фроленко Л.Н. Характеристика состояния нерыбных промысловых объектов Азово-Черноморского бассейна // Матер. Междунар. Науч. конф., Ростов-на-Дону, Эверест, 2003. С. 172-179.
15. Folch J., Lees M., Stanley G.N. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues // J. Biol. Chem. 1957. V.226, № 3. P. 497-509.
16. Moseley R., Hilton J.R., Waddington R.J., et al. Comparison of oxidative stress biomarker profiles be tween acute and chronic wound environments // Wound Repair Regen., 2004. V. 12. M 4. P. 419-429.
17. Möller P., Wallin H., Knudsen L.E. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors // Chemico-Biological Interactions. 1996. V.102. P. 17-36.
18. Winston G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Compar.biochem. and Physiol. 1991. V.100. № 1-2. P. 173-176.
19. Yagi K. Lipid peroxides in biology and medium. 1982. New-York.: Acad.Press. 364 p.

#### INFLUENCE OF ANTHROPOGENOUS POLLUTION ON IMMUNO-BIOCHEMICAL INDICATORS OF MOLLUSC *RAPANA THOMASIANA* CROSSE

N.I. Silkina, D.V. Mikryakov, V.R. Mikryakov

Results of the comparative analysis immuno-biochemical indicators of mollusc *Rapana thomasiana* Crosse, living in water areas of Black sea with different level of anthropogenous loading arc resultcd. It is shown, that molluscs from the polluted areas differed from individuals from rather pure water area in low sizes immunity functions, infringement lipid an exchange, high sizes of processes the lipid peroxidation and low – antioxidant activity.

# ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ КАТРАНА *SQUALUS ACANTHIAS*

Н.И. Силкина, Д.В. Микряков\*, В.Р. Микряков

Институт биологии внутренних вод им И.Д.Папанова (ИБВВ РАН)

\**daniil@ibiw.yaroslavl.ru*

В последние годы антропогенное загрязнение прибрежных акваторий Кавказского побережья Черного моря постоянно увеличивается. Наиболее сильному загрязнению разными по природе и происхождению поллютантами подвергаются морские воды вблизи крупных портовых городов, таких как Туапсе и Сочи. Ежегодно растет сброс загрязненных сточных вод в море, отдельные участки акватории утратили способность к самоочищению. Это объясняется низкими темпами строительства водоохраных объектов, их неэффективной работой, аварийными сбросами и др. (Современное состояние..., 1995; Романенко, 2004; Кравченко, Крицкая, 2007).

Наиболее загрязненной зоной является акватория крупного морского грузо-пассажирского порта г. Туапсе – перевалочного пункта экологически опасных грузов: нефти, нефтепродуктов, химических удобрений, сыпучих грузов (уголь) и др. К загрязненному участку можно отнести также акваторию крупного курорта -г. Сочи, где зафиксировано превышение ПДК по содержанию нефтяных углеводородов, нитратам, фенолу, синтетических ПАВ, сероводороду и др. Траверз устья реки Мзымта (Адлерский р-он г. Сочи) загрязнен нефтепродуктами, фенолом, сероводородом, отходами строительной отрасли и т. д. Условно чистым участком можно считать станцию в Абхазии, где полностью отсутствуют промышленные предприятия, а загрязняют воду только бытовые сточные воды.

Известно, что рыбы, обитающие в загрязненных зонах, отличаются от таковых из чистых акваторий низкими темпами роста и развития, устойчивостью к паразитам, выживаемостью, состоянием здоровья, плодовитостью, продолжительностью жизни и т.д. Это свидетельствует о глубоких нарушениях механизмов гомеостаза и процессов адаптации рыб к неблагоприятным факторам среды (Микряков и др., 2001; Руднева и др., 2005; Силкина и др., 2009; Микряков и др., 20011). Сведений о характере влияния многокомпонентного антропогенного загрязнения на состояние иммунной системы у различных по экологии морских рыб, обитающих в экосистемах, испытывающих интенсивный антропогенный пресс, в доступной литературе немного. Между тем такие данные необходимы при мониторинговых исследованиях, а также при анализе последствий повреждающего действия антропогенного загрязнения на механизмы иммунологической адаптации рыб.

Цель работы – сравнительное исследование гуморальных факторов врожденного иммунитета у черноморской колючей акулы, обитающей в акваториях с разным уровнем антропогенного загрязнения.

Материалом для исследования послужили катраны средней длиной 60-65 см и массой 5,2-5,4 кг, отловленные в сентябре 2007 и 2008 г. Катран *Squalus acanthias*, или колючая акула - единственный широко распространенный Черном море вид акул, занесённый в международную Красную Книгу, принадлежит к числу стайных пелагических бентоядно-хищных рыб и является одной из немногих живородящих рыб. Особенности функционирования неспецифического иммунитета оценивали по бактериостатическим свойствам сыворотки крови (БАСК) и содержанию неспецифических иммунных комплексов (ИК) в печени. Интегральный показатель

гуморального иммунитета БАСК рыб определяли нефелометрическим методом (Смирнова, Кузьмина, 1966). В качестве тест-бактерий использовали суточную бактериальную культуру *Aeromonas hydrophila* (Микряков и др., 2001). Анализировали также долю иммунодефицитных по БАСК особей (ИМД), сыворотка крови которых не угнетала развития тест-микробов. Содержание ИК устанавливали методом Гриневич и Алферова (1981), адаптированным нами для водных гидробактерий. Результаты исследований подвергали статистической обработке при помощи стандартного пакета программ (приложение Statistica 6.0) с использованием t-теста,  $p < 0.05$ .

Анализ полученных результатов показал, что катраны, выловленные в акваториях с высоким уровнем антропогенной нагрузки, достоверно отличались от таковых из условно чистого района исследуемыми показателями (табл.).

Таблица.

Иммунологические показатели катрана из акваторий с разным уровнем загрязнения

Показатели	Станция отлова			
	I	II	III	IV
Число рыб, экз.	12	10	13	12
БАСК, %	39.9±0.5*	40.0±0.8*	42.2±0.6*	51.9±1.6
ИМД, % от общего числа	52*	55*	46*	28
ИК, %	233±26*	206±22*	198±15*	168±19

Примечание: Станции отлова рыб: I - центральная часть акватории порта г. Туапсе; II - центральная часть акватории порта г. Сочи; III - район устья р. Мзымты (Адлерский р-он); IV - вблизи п. Цандрици (Гаитшанди, Абхазия); \* - достоверно относительно станции IV.

У рыб из загрязненных акваторий уровень БАСК был в 2,4-2,8 раза ниже, чем у особей из чистого района. Во всех исследуемых группах рыб присутствовали ИМД особи. Однако в I, II и III группах доля особей с признаками вторичного иммунодефицита по БАСК была более чем в 1,5 раза выше, чем в IV группе. Это свидетельствует о супрессивном воздействии загрязнений на напряженность естественного иммунитета.

В загрязненных акваториях количественные характеристики ИК катрана на 17,8-38,7% превышали аналогичный показатель у особей из условно чистой зоны. Максимум накопления ИК у катрана зафиксирован на наиболее загрязненном участке - в порту г. Туапсе. Полученные результаты показывают, что пребывание катрана в загрязненных водах вызывает супрессию гуморального иммунитета. Известно, что ИК образуются в результате взаимодействия антигена и антитела и играют важную роль в регуляции иммунных реакций, а их образование является фазой нормального иммунного ответа организма, направленного на поддержание постоянства внутренней среды. При длительном пребывании ИК в организме и несвоевременного удаления их из русла крови они вызывают супрессию иммунных реакций и обуславливают развитие неконтролируемого иммунокомплексного патологического процесса. Увеличение содержания ИК у рыб из разных по качеству вод мест обитания соответствует таковому, происходящим при развитии системного аутоиммунного процесса, вызванного хроническим воздействием стресс факторов (Микряков, 1991; Логинов и др., 1999; Ройт и др. 2000; В.Микряков и др., 2001; Силкина и др., 2009).



Таким образом, проведенные исследования показали, что обитание катрана в загрязненных водах приводит к супрессии неспецифических гуморальных факторов иммунитета. Отличия в уровнях исследуемых показателей у катрана могут быть использованы при осуществлении мероприятий по мониторингу за состоянием здоровья рыб и качеству среды обитания.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гриневиц Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лабораторное дело, 1981, № 8. С.493-496.
2. Кравченко Ю.А., Крицкая Е.Б. Современный мониторинг загрязнений вод Черного моря // Фундаментальные исследования. 2007. № 10. С. 80-100.
3. Логинов С.И., Смирнов П.Н., Трунов А.Н. Иммунные комплексы у животных и человека: норма и патология. РАСХН. Сиб. Отд-ние. ИЭВСиДВ.: Новосибирск, 1999. 144 с.
4. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. 154 с.
5. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Попов А.В., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука. 2001. 126 с.
6. Микряков В.Р., Силкина Н.И., Микряков Д.В. Влияние антропогенного загрязнения на иммунологические и биохимические механизмы поддержания гомеостаза у рыб Черного моря // Биология моря, 2011, Т. 37. № 2. С. 142-148.
7. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. 2000. М.: Мир, 592 с.
8. Романенко В.Д. Основы гидроэкологии: Учебник для студентов высших учебных заведений. К.: Генева, 2004. 664 С.
9. Руднева И.И., Шевченко Н.Ф., Залевская И.Н., Жерко Н.В. Биомониторинг прибрежных вод Черного моря // Водные ресурсы. 2005. Т. 32, № 2. С. 238-246
10. Силкина Н.И., Микряков В.Р., Микряков Д.В. Влияние техногенного загрязнения на иммунофизиологическое состояние леща *Abramis brama* Рыбинского водохранилища // «Региональная экология в условиях неустойчивого развития» Мат. межд. науч. конф. Шарья. 2009. С. 193-195.
11. Смирнова О.В., Кузьмина Т.А. Определение бактерицидной активности сыворотки методом нефелометрии // Журн. микробиол. 1966. № 4. С. 8-11.
12. Современное состояние ихтиофауны Черного моря. Севастополь: ИнБЮМ. 1995. 215 с.

### INFLUENCE OF ANTHROPOGENOUS POLLUTION ON HUMORAL IMMUNITY SQUALUS ACANTHIAS

N.I. Silkina, D.V. Mikryakov, V.R. Mikryakov

Results of studying of indicators humoral immunity *Squalus acanthias*, the Black sea caught in coastal waters with different level of anthropogenous loading are presented. It is established, that fishes from the polluted areas in comparison with individuals from rather pure were characterised by low sizes humoral immunity and a high share of the maintenance immunodeficient individuals.

## СЕКЦИЯ IV. ПРОБЛЕМЫ ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ОБЪЕКТОВ АКВАКУЛЬТУРЫ

### ВЛИЯНИЕ ТЕСТОСТЕРОНА НА СОСТАВ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ СТЕРЛЯДИ *ACIPENSER RUTHENUS*

Д.В. Балабанова\*, Т.А. Суворова, Д.В. Микряков

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия

\*balab@ibiv.yaroslavl.ru

Хорошо известно, что тестостерон принимает участие не только в регуляции репродуктивной функции, но и влияет на рост (Reshkin *et al.*, 1989; Sparks *et al.*, 2003), метаболизм (Sparks *et al.*, 2003; Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2006; Arjona *et al.*, 2008), осморегуляцию (Arjona *et al.*, 2008), транспорт глюкозы (Reshkin *et al.*, 1989), а также функциональную настройку рецепторных систем рыб (Шпарковский, 1986). При этом уровень тестостерона в разные периоды жизни значительно меняется не только в тканях половых органов, но и в плазме крови (Pavlidis *et al.*, 1994; Баранникова и др., 1997). В работах (Vainikka *et al.*, 2004; 2005) на плотве и лине показано, что введение тестостерона повышает уровень данного гормона в плазме крови, но не подавляет литическую активность сыворотки крови и фагоцитов головной почки. Однако этих данных недостаточно, чтобы судить о влиянии тестостерона на состояние иммунной системы рыб.

Целью настоящей работы было определение характера влияния тестостерона на состав лейкоцитов периферической крови рыб.

Исследования проводили на стерляди *Acipenser ruthenus* в возрасте 3+, средней массой – 400–450 г, длиной тела – 40–42 см. Рыб содержали в принудительно аэрируемых бассейнах при температуре воды 16–18°C. Особям из опытных групп внутривбрюшинно вводили 0.2 мл раствора тестостерона (0.7 мг/кг массы тела, или  $5 \cdot 10^{-4}$  М), приготовленного на физиологическом растворе для холодокровных животных, что выше содержания гормона в плазме крови в период нереста рыб –  $10^{-6}$  М (Schmidt, Idler, 1962). Использование более высокой дозы обусловлено тем, что у рыб низкий уровень обменных процессов, и после внутривбрюшинной инъекции только незначительная часть гормона попадает в кровь. Рыбам контрольной группы вводили равное количество физиологического раствора. Для анализа отбирали по 5 контрольных и инъектированных (опыт) рыб. Перед началом опыта были взяты пробы у 5 интактных рыб (0 сут), последующие пробы – на 1, 3, 7, 14 и 21 сут эксперимента.

О влиянии тестостерона на состав лейкоцитов судили по данным анализа характера изменений в лейкограммах периферической крови. Состав лейкоцитов определяли в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимза. Кровь получали из хвостовой артерии после каудозектомии. В каждой мазке определяли относительное количество лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов и бластных форм клеток под тринокулярным микроскопом "Биомед-6ПР1-ФК", просчитывая по 200 клеток.

Результаты обработаны статистически при помощи стандартного пакета программ (Microsoft Office' 95, приложение Excel). Степень различия между

средними арифметическими рассчитывали с помощью критерия Стьюдента при  $p \leq 0.05$ .

При исследовании лейкограмм периферической крови у опытных рыб по сравнению с интактными и особями, которых инъецировали физиологическим раствором, отмечены различия в содержании лейкоцитов (табл.). Через 1 сут после введения гормона установлено достоверное снижение относительного количества лимфоцитов (~ на 5%) и незначительное эозинофилов при одновременном увеличении моноцитов, нейтрофилов и бластных форм клеток по сравнению с интактными особями. На 3 и 7 сут относительное количество лимфоцитов у опытных рыб продолжает оставаться на более низком уровне, тогда как доля нейтрофилов и бластных форм клеток – увеличивается, а эозинофилов – падает.

Количественные характеристики лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов, полученные на 14 и 21 сутки, приближаются к уровню значений интактных групп рыб. Остается повышенным содержание бластных форм клеток и пониженным – эозинофилов.

Таблица.

Динамика изменения лейкограммы периферической крови стерляди после инъекции тестостерона, %

Время, сут	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы		Эозинофилы	Бластные формы
			ПЯ	СЯ		
0	71,10±1,10	3,40±0,60	15,50±0,89	4,10±1,34	1,20±0,12	4,70±0,62
1	68,16±2,31	7,16±1,20 <sup>a</sup>	12,83±2,60	3,33±0,16	1,83±0,60	6,66±1,33
	66,30±1,44 <sup>a</sup>	5,50±0,96	17,00±1,02	4,80±0,64	0,80±0,33	5,60±1,44
3	74,83±2,33	3,33±0,88	11,16±2,16	2,16±0,33	0,50±0,00 <sup>a</sup>	8,00±1,04 <sup>a</sup>
	65,60±3,62	3,70±0,25	17,50±3,32	6,00±1,18	0,50±0,15 <sup>a</sup>	6,70±1,20
7	75,50±1,04 <sup>a</sup>	3,16±0,33	11,00±1,25	3,33±0,44	0,50±0,28 <sup>a</sup>	6,50±0,76
	63,80±2,35 <sup>ab</sup>	3,40±0,36	18,00±2,58	7,90±1,39	0,70±0,20	6,20±0,75
14	70,33±1,92	3,83±0,44	13,00±2,50	4,33±0,66	0,50±0,28 <sup>a</sup>	8,00±1,50
	69,00±1,15	4,70±0,58	14,50±0,94	4,70±0,93	1,00±0,27	6,10±1,06
21	69,21±2,35	4,28±0,47	12,00±1,49	5,42±0,93	0,71±0,18	8,35±0,67 <sup>a</sup>
	67,10±3,34	3,60±0,50	13,10±2,85	7,50±0,92	1,00±0,35	7,60±1,19

Примечание. Над чертой – физ. р-р (контрольные); под чертой – после инъекции гормона. <sup>a</sup> – достоверно отличающиеся от интактных (0 контроль), <sup>b</sup> – отличающиеся от получивших инъекцию физ. р-ра.

Из анализа следует, что введение тестостерона вызывает нарушение доли содержания лейкоцитов в крови стерляди. Вместе с тем сходные изменения в лейкограммах происходили не только у рыб, инъецированных тестостероном, но и у получавших физиологический раствор. Последнее может быть связано с тем, что рыбы в обеих группах испытывали как стресс в результате хендлинга, так и стресс от самой процедуры инъекции. Как известно, стресс сопровождается выбросом кортикотропин-релизинг фактора, запускающего каскад реакций, направленных на высвобождение глюкокортикоидов и выброс катехоламинов (Селье, 1960), последствиями которых является нарушение направления процесса

дифференцировки стволовых кроветворных клеток, приводящее к изменению состава лейкоцитов в циркулирующей крови (В. Микряков и др. 2007, 2009).

Таким образом, проведенные исследования показали, что тестостерон вызывает модификацию доли содержания отдельных групп лейкоцитов. Однако обнаруженные изменения в лейкоцитарной формуле рыб, получивших инъекцию тестостерона, могут быть следствием стресса в результате хендлинга и процедуры инъекции, на что указывают незначительные различия величин доли содержания лейкоцитов, установленные после введения тестостерона и физиологического раствора.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барашникова И.А., Баюнова Л.В., Саенко И.И. Динамика половых стероидных гормонов у осетра *Acipenser gueldenstaedti* при различном состоянии гонад в начале андромной миграции в Волгу // Вопр. ихтиол. 1997. Вып. 37. №3. С. 400-406.
2. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Микряков Д.В. Влияние транспортировки на состав лейкоцитов периферической крови карпа *Surginus carpio L.* // Вопросы рыболовства, 2007, Т. 8, № 2(30), С. 209-214.
3. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Микряков Д.В. Реакция лейкоцитов стерляди *Acipenser ruthenus* на гормониндуцируемый стресс // Вопросы ихтиологии, 2009, Т. 49. № 4. С. 554-557.
4. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. М.: Медгиз. 1960. 254 с.
5. Шпарковский И.А. Физиология пищеварения рыб. Двигательная активность. Л.: 1986. 176 с.
6. Arjona F.J., Sangiao-Alvarellos S., Polakov S., Garcia-Lopez A., Martin del Rio M.P., Martinez-Rodriguez G., Soengas J.L., Mancera J.M. Interaction of short-term testosterone treatment with osmotic acclimation in the gilthead sea bream *Sparus auratus* // Mar. Biol. 2008. V. 153. P. 661-671.
7. Pavlidis M., Dimitriou D., Dessypris A. Testosterone and 17 $\beta$ -estradiol plasma fluctuations throughout spawning period in male and female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), kept under several photoperiod regimes // Ann. zool. fenn. 1994. V. 31, №3. P. 319-327.
8. Reshkin S.J., Grover M.L., Howerton R.D., Grau E.G., Ahearn G.A. Dietary hormonal modification of growth, intestinal ATPase, and glucose transport in tilapia // Am J Physiol. 1989. V. 256. P. E610-E618.
9. Sangiao-Alvarellos S., Polakov S., Arjona F.J., Garcia-Lopez A., Martin del Rio M.P., Martinez-Rodriguez G., Miguez J.M., Mancera J.M., Soengas J.L. Influence of testosterone administration on osmoregulation and energy metabolism of gilthead seabream *Sparus auratus* // Gen. Comp. Endocrinol. 2006. V. 149. P. 30-41.
10. Schmidt P.J., Idler D.R. Steroid hormones in the plasma of salmon at various stages of maturation // Gen. comp. Endocrinol. 1962. V. 2. P. 204-214.
11. Sparks R., Shepherd B.S., Ron B., Richman III N.H., Riley L.G., Iwama G.K., Hirano T., Grau E.G. Effects of environmental salinity and 17 $\beta$ -methyltestosterone on growth and oxygen consumption in the tilapia, *Oreochromis mossambicus* // Comp. Biochem. Physiol. 2003. V. 136B. P. 657-665.
12. Vainikka A., Jokinen E.J., Kortet R., Taskinen J. Gender- and season-dependent relationships between testosterone, oestradiol and immune functions in wild roach // J. Fish Biol. 2004. V 64. № 1. P. 227-24.

### INFLUENCE TESTOSTERONE ON STRUCTURE OF LEUKOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD OF STERLET *ACIPENSER RUTHENUS*

L.V. Balabanova, T.A. Suvorova, D.V. Mikrjakov

Influence testosterone on structure of peripheral blood of a sterlet is investigated. It is established, that the given hormone causes minor alteration of a share of the maintenance of separate groups of leukocytes.

# ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА БПС-44 НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДВУХЛЕТОК КАРПА В УСЛОВИЯХ ГЕРБИЦИДНОЙ НАГРУЗКИ

Е. В. Барбухо

Черниговский национальный педагогический университет им. Т.Г. Шевченко  
г. Чернигов, Украина, lena-gum@mail.ru

Поступление токсических веществ в водоемы, где выращивается рыба, угрожает сохранению и воспроизводству рыбных запасов, здоровью людей. Гербицид раундап (действующим веществом является глифосат (N-(фосфонометил)глицин) применяют для уничтожения водной растительности оросительных каналов, водохранилищ, что приводит к загрязнению водоемов и созданию стрессовой ситуации для рыб.

Одной из интегративных систем, позволяющих проследить сдвиги на различных уровнях функционирования, является система крови. Исследование клеток крови как индикатора состояния организма является одним из широко распространенных методов оценки жизнедеятельности рыб. Направление и степень выраженности изменений гематологических показателей под влиянием антропогенных факторов может использоваться для диагностики оценки физиологического состояния рыб.

Одними из наиболее эффективных препаратов, сглаживающих действие неблагоприятных факторов окружающей среды на организм рыб, являются пробиотики, использование которых в практике медицины и ветеринарии получило широкую поддержку. Нами использовался пробиотический препарат БПС-44 (ТУ У 24.4-00497360-691-2003), основу которого составляют аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus subtilis* 44-р. Препарат произведен Институтом сельскохозяйственной микробиологии УААН (г. Чернигов).

Исследования проводили в 200 л аквариумах, в которые рыбу размещали из расчета 1 экземпляр на 40 дм<sup>3</sup> воды в трех вариантах: контроль, действие 2 ПДК (предельно допустимая концентрация) раундапа (концентрацию гербицида создавали путем внесения 0,04 мг/дм<sup>3</sup> 36 %-ого водного раствора раундапа (Петрунук и др., 2001)) и совместное действие БПС-44 (суспензию пробиотика в количестве  $1,25 \times 10^8$  КУО/дм<sup>3</sup> добавляли в воду за 2 суток до внесения гербицида) с раундапом (2 ПДК). Продолжительность эксперимента составляла 14 суток. Во всех случаях контролировали гидрохимический режим воды. Кровь у рыб брали путем пункции сердца (Давыдов и др., 2006) на 7-е и 14-е сутки эксперимента и стабилизировали путем добавления гепарина — 0,01 % (в 1 мг препарата 130 ЕД). Начальную пробу крови без первой капли использовали для определения ее свертываемости (Денисюк, 1992). С целью определения возможности компенсации токсического действия гербицида раундап на организм карпа с использованием пробиотического препарата БПС-44 исследовали основные диагностические показатели крови — концентрацию эритроцитов, лейкоцитов (подсчитывали в камере Горяева), гемоглобина (по Сали) при помощи гемометра (Денисюк, 1992) и скорость оседания эритроцитов. Для определения концентрации форменных элементов и гемоглобина кровь брали один раз на 14-е сутки от начала эксперимента, а для определения скорости оседания эритроцитов — дважды, на 7-е и 14-е сутки.

Под действием раундапа в крови карпа наблюдается значительный эритроцитоз (рис. 1), о чем свидетельствует увеличение концентрации эритроцитов в

1,5 раза по сравнению с кровью контрольных рыб. Увеличение количества эритроцитов способствует повышению вязкости крови, увеличивается ее общая масса, что приводит к замедлению тока крови по сердечно-сосудистой системе (это, в свою очередь, негативно отражается на эффективности поступления кислорода к органам и тканям организма рыб) и повышает вероятность образования тромбов. Действие пробиотика БПС-44 способствует незначительному повышению концентрации эритроцитов по сравнению с контрольной группой (на 15,3 %), что в 1,3 раза меньше тех рыб, которые находились под действием только раундапа.

В условиях гербицидной нагрузки наблюдается достоверное снижение концентрации лейкоцитов в крови исследуемых рыб — на 39 % по сравнению с контролем, что негативно влияет на общую сопротивляемость рыб к инфекционным заболеваниям (рис. 2). Вместе с тем при компенсации токсического действия раундапа пробиотиком БПС-44 происходит нормализация содержания лейкоцитов, и хотя их количество несколько увеличивается по сравнению с кровью рыб контрольной группы, лейкоцитоза не наблюдается — оно находится в пределах физиологической нормы.

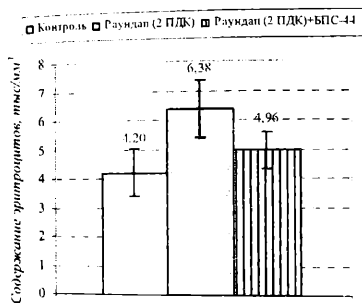


Рис. 1. Содержание эритроцитов в крови двухлеток карпа на 14 сутки эксперимента ( $M \pm t$ ,  $n = 5$ ).

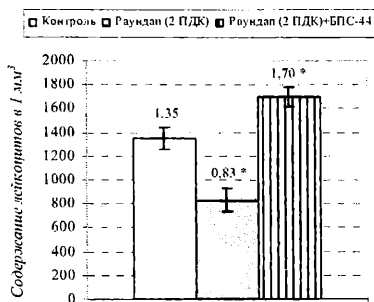


Рис. 2. Содержание лейкоцитов в крови двухлеток карпа на 14 сутки эксперимента ( $M \pm t$ ,  $n = 5$ ).

Концентрация гемоглобина (рис. 3) под действием исследуемого гербицида достоверно снижается на 28 % в сравнении с контрольной группой. Такие изменения свидетельствуют о наличии у двухлеток карпа гипохромии, которая может быть следствием микроцитоза — уменьшения объема эритроцита или ненасыщенности гемоглобином нормальных по объему эритроцитов. Если учитывать данные относительно увеличения концентрации эритроцитов в крови в условиях гербицидной нагрузки (рис. 1), становится очевидным, что при таком содержании гемоглобина эритроциты в значительной степени утрачивают способность переносить кислород к органам и тканям рыб. Действие пробиотика БПС-44 способствует нормализации общего количества гемоглобина на уровне контрольной группы, что свидетельствует о возможности предотвращения у рыб нарушений транспортной функции крови в случае гербицидного загрязнения.

При изучении динамики скорости оседания эритроцитов было установлено (рис. 4), что использование раундапа не приводит к существенному отклонению этого показателя от значений, полученных у рыб контрольной группы. Вместе с тем совместное действие пробиотика и гербицида на 7-е сутки экспозиции приводит к увеличению скорости оседания эритроцитов на 25 % относительно контроля.

Однако это не является свидетельством негативного действия исследуемого пробиотика на один из ключевых гематологических показателей, поскольку уже на 14-е сутки этот показатель становится меньше контрольного на 21 %, находясь при этом в пределах физиологической нормы. Такая динамика свидетельствует о протекании в организме карпа адаптивных изменений как стимулированной пробиотическим препаратом реакции систем крови на токсическое действие гербицида.

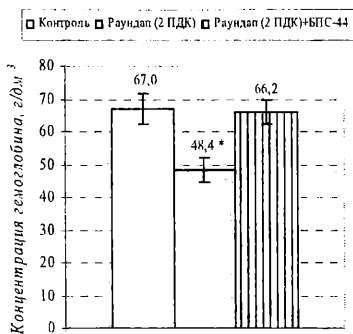


Рис. 3. Концентрация гемоглобина в крови двухлеток карпа на 14 сутки эксперимента ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ).

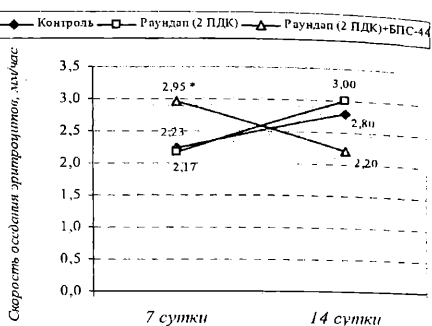


Рис. 4. Динамика скорости оседания эритроцитов в крови двухлеток карпа ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ).

Таким образом, действие глифосата на двухлеток карпа проявляется в смещении основных гематологических показателей за пределы нормальных значений, что в свою очередь негативно отражается на работе других физиологических систем организма.

Использование пробиотического препарата БПС-44 компенсирует токсическое действие гербицида раундап и способствует нормализации функций крови карповых рыб.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Давыдов О.Н., Темниханов Ю.Д., Куровская Л.Я. Патология крови рыб / К.: ИНКОС, 2006. 206 с.
2. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні / [В.Л. Петрунук, Г.О. Лагуточкіна, Д.В. Іванов та ін.]. — К.: Юнівест Маркетинг, 2001. 274 с.
3. Посібник з клінічної лабораторної діагностики / за ред. В.Г. Денисюка. К.: Здоров'я, 1992. 296 с.

### INFLUENCE OF PROBIOTIC PREPARATION BPS-44 ON HEMATOLOGICAL INDEXES OF TWO YEARS OLD CARP IN THE CONDITIONS OF HERBICIDES EFFECT

O.V. Barbukho

Influence of herbicide roundup in 2 MAK concentrations on hematological indexes of two years old carp is studied. As a result of glyphosat action the change of red corpuscles maintenance, leucocytes, hemoglobin in fish blood is detected. The action of probiotic BPS-44 in purpose of indemnification of toxic roundup action normalizes the process of bloodforming and brings to normalization of these parameters.

## НОВЫЙ МЕТОД ОБРАБОТКИ ПРУДОВЫХ РЫБ ПРОТИВ ЛЕРЕНЕЙ И АРГУЛЮСОВ

К.В. Гаврилин

ООО "НВЦ Агроветзащита", г. Москва, Россия, fish@vetmag.ru

Значительный ущерб мировой и отечественной аквакультуре наносят заболевания рыб, вызываемые паразитическими рачками – представителями типа членистоногих (Arthropoda), класса ракообразных (Crustacea). Согласно данным центральной научно-методической ветеринарной лаборатории (ФГУ ЦНМВЛ), аргулез зарегистрирован в 9 (10,1%), лернеоз – в 8 (9,0) и эргазилез в 7 (7,86) регионах РФ (Сапожников, Седов, 2001). В связи с чем, разработка средств борьбы с этим классом заболеваний представляется весьма актуальной. У рыб паразитируют ракообразные, относящиеся к трем отрядам: веслоногие (Copepoda), жаброхвостые (Branchiura) и равноногие рачки (Isopoda).

Рачки раздельнополые с выраженным половым диморфизмом. Развитие этих паразитов проходит с метаморфозом без участия промежуточных хозяев. Веслоногие рачки вынашивают яйца в мешках, жаброхвостые приклеивают к подводным предметам, равноногие – к конечностям самок.

На территории РФ паразитические рачки вызывают ряд тяжелых заболеваний ценных пород рыб, преимущественно осетровых, лососевых и карповых. Эти заболевания наносят существенный экономический ущерб рыбоводным предприятиям, вызывая у рыб отставание в темпе роста, потерю товарных качеств и гибель пораженных рыб (Осетров, 1978; Васильков и др., 1989).

Лернеи (представители рода *Lernaea*), называемые также «якорными рачками», поражают большинство карповых, лососевых, осетровых и множество других видов диких промысловых и товарных рыб. Самки проникают сквозь кожу рыб в мышечный слой и закрепляются там. Они питаются кровью, поэтому на месте прикрепления паразита образуется язва, затем абсцесс и свищ. Течение болезни часто осложняется секундарной микрофлорой. Поврежденные покровные ткани служат входными воротами для бактериальной инфекции. В ряде случаев, при проникновении этих паразитов во внутренние органы, наблюдаются специфические поражения, например, травматический гепатит (Головина и др., 2003).

Пожалуй, наиболее распространенным crustaceозом является аргулез. В нашей стране у рыб паразитируют три вида рачков: *Argulus foliaceus*, *A. japonicus*, *A. coregoni*. Аргулюсы - крупные рачки (4-12 мм), ведут эктопаразитический образ жизни (в нашей коллекции имеются экземпляры длиной 15 мм). Прикрепляясь к телу рыбы, паразит прокалывает кожу и сосет кровь. На месте прокола образуются ранки, а затем мелкие язвочки, служащие входными воротами для инфекции. Крупные размеры рачка обуславливают сильное травмирование рыб. Рачок может произвольно покидать рыбу и до 3 суток свободно плавать в воде, при желании нападая на рыб.

Профилактика crustaceозов в основном базируется на недопущении в рыбоводный водоем инвазионного начала. Этой цели служат рыбоуловители, призванные не допустить попадания в пруд диких рыб, которые могут являться носителями паразитов. При этом они не в состоянии предотвратить попадание в водоем свободноплавающих науплиальных стадий паразитов. Большое значение в борьбе с crustaceозами придается контролю перевозок рыбы и рыбоводно-мелиоративным мероприятиям.



По целому ряду причин экономического и технического характера профилактические мероприятия, как правило, недостаточно успешны. Следовательно, возникает необходимость в эффективных терапевтических средствах.

В отечественной рыбоводной практике для борьбы с crustaceозами рыб в различное время использовали хлорофос, органические красители (основной фиолетовый К и некоторые другие), хлорную и негашеную известь (Сборник..., 1998).

Единственный из вышеперечисленных препаратов, способный убить взрослую, продуцирующую яйца самку и оборвать эпизоотический процесс – хлорофос – запрещен к применению в рыбоводстве. Остальные препараты в незначительной степени подавляют развитие свободно плавающих стадий паразитов. Эффект от применения этих средств нестабильный, а системное их использование слишком трудоёмко и высоко затратно.

В связи с этим нами был произведен поиск информации по препаратам, эффективным против crustaceозов рыб. Практически все использующиеся в сельском хозяйстве инсектицидные вещества можно применять, только растворяя их в воде. Но для создания даже в небольшом рыбоводном водоеме концентрации, смертельной для паразитов, потребуется израсходовать очень большое количество препарата, что приведет к неоправданным финансовым затратам, гибели естественной кормовой базы (дафний, мoin, коловраток и т.д.) и недопустимому загрязнению окружающей среды. Помимо этого большинство инсектицидов относятся к химически устойчивым, достаточно медленно распадающимся соединениям. В результате возникает риск хронического токсикоза рыб и практически неразрешимая задача быстрого удаления препаратов из водоема.

Выходом из данной ситуации могло стать создание препарата для групповой обработки рыб путем лечебного кормления. В связи с этим наше внимание привлекли вещества – ингибиторы синтеза хитина (ИСХ), обладающие высокой специфичностью биологического действия.

На их основе был разработан препарат Крустацид, предназначенный для приготовления кормолекарственных смесей (КЛС). Препарат изготавливает ООО "НВЦ Агроветзащита С.-П.", г. Сергиев Посад на высокотехнологичном оборудовании, согласно кодексу GMP (надлежащая производственная практика лекарственных препаратов).

При обнаружении на рыбах паразитических рачков (обычно пик зараженности приходится на июль - август) назначают Крустацид в дозе 0,3 г на один кг ихтиомассы в сутки в течение 14 дней подряд. Длительный срок лечебного кормления связан с тем, что действующие вещества препарата не являются ядами, а, представляя собой группу гормоноподобных соединений, препятствуют построению хитиновых оболочек рачков. На весь курс лечения затраты препарата составляют 4,2 г/кг рыбы.

Благодаря современной лекарственной форме организовать лечебное кормление рыб достаточно просто. Если количество нуждающихся в лечении рыб достаточно велико, то удобнее приготовить лечебный гранулированный корм с Крустацидом на комбикормовом заводе. Препарат отлично выдерживает даже самые жесткие режимы гранулирования и экструдирования. Требования, предъявляемые к комбикормовому заводу: наличие смесителей, способных вводить премиксы на уровне 0,5 - 1 %, и способность обеспечить водостойкость гранул согласно ГОСТ 28758-97 (в состав препарата входят специальные карамелизаторы, повышающие водостойкость гранул при их тепловой обработке).

Альтернативным методом изготовления значительных количеств КЛС может служить приготовление плотной кормовой мешанки. С этой целью дробленое зерно в смеси с различными шротами, жмыхами засыпают в бункер кормораздатчика, обогащенный внутренними шнеками. Туда же высыпают соответствующее количество препарата и проводят сухое перемешивание. Затем к смеси постепенно

добавляют воду до получения плотной смеси, напоминающей по консистенции пластилин. Водостойкость комка смеси должна быть не менее 30 минут. Не следует пытаться изготовить мешанку, если в корме не достаточно компонентов, образующих с водой плотное тесто. Следует помнить: если комок КЛС быстро распадётся в воде, препарат будет потерян.

И, наконец, современная лекарственная форма Крустацида обеспечивает возможность его нанесения на гранулированный корм. Для этого к препарату добавляют воду в пропорции 1:6-12 и тщательно перемешивают до образования равномерной суспензии без комков. Полученную суспензию смешивают с гранулированным кормом, добиваясь равномерного увлажнения всех гранул. Затем гранулы, периодически перемешивая, подсушивают в течение 12 часов. В результате на поверхности гранулы образуется водостойкая пленка, обеспечивающая сохранность препарата до полного распада гранулы.

Независимо от выбранного Вами типа КЛС, кормление рыб лучше осуществлять в обычном режиме, к которому привыкла рыба. Если КЛС отличается от обычно используемого корма, например, рыб обычно кормят плотной мешанкой, а КЛС изготовили в виде гранул, то до начала лечебного кормления желательно несколько дней приучать рыб к новому типу корма. В течение лечебного кормления обязательно осуществляют контроль поедаемости КЛС, так как очевидно, что при плохой поедаемости КЛС терапевтический потенциал препарата не реализуется.

В ходе проведенных в 2010 г. испытаний на базе ООО "Рыбколхоз им. И.В. Абрамова" препарат продемонстрировал высокую терапевтическую эффективность при лернеозе карпа (излечено более 80000 экз.). Получены данные, свидетельствующие об эффективности Крустацида и при аргулезе русского осетра. В одном из Подмосковных частных хозяйств не только излечено 40 экз. этих ценных рыб, но и прекращена эпизоотия. Несмотря на благоприятные условия для своего развития, аргулозы отсутствовали на рыбе вплоть до окончания рыбоводного сезона.

При проведении экспериментальных и производственных испытаний препарата не было отмечено никаких побочных эффектов или осложнений, связанных с применением препарата. В настоящий момент инициирована процедура регистрации препарата и утверждения инструкции по его применению Россельхознадзором.

В заключение хотелось бы выразить благодарность руководству и трудовому коллективу ООО "Рыбколхоз им. И.В. Абрамова" за поддержку научных инновационных проектов и огромный вклад в развитие отечественного рыбоводства.

### Список литературы

1. Васильков Г.В., Грищенко Л.И., Енгашев В.Г. Болезни рыб: Справочник. М.: Агропромиздат, 1989. – 288 с.
2. Головина Н.А., Стрелков Ю.А., Воронин В.Н., Головин П.П., Евдокимова Е.Б., Юхименко Л.И. Ихтиопатология. Под ред. Н.А.Головиной, О.Н.Бауэра.- М.: Мир, 2003. - 448 с.
3. Осетров В.С. Справочник по болезням рыб. М.: Колос, 1978. – 351 с. 8.
4. Сапожников Г.И., Седов В.А. Ветеринария. №2, 2001. С. 3-8.
5. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. М.: отдел маркетинга АМБ-агро, 1998. 309 с.

### NEW METHOD OF TREATMENT OF POND FISH AGAINST LERNEAE SPP. AND ARGULUS SPP.

K.V. Gavrilin

This article present a new preparation Crustacid used against Lernae spp. and Argulus spp. Preparation gave pond carp and pond sturgeon in dose 0,3 g per kg of life weight fish during 14 days. Crustacid demonstrate 100% efficiency in therapy parasitic crustacean diseases of fish.

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОБИОТИКА БПС-44 С ЦЕЛЬЮ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ ГЕРБИЦИДОВ НА РЫБ

А.А. Жиденко, Е.В. Бибчук, В.В. Кривошница

Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г. Шевченко,  
Чернигов, Украина  
chgpu@chgpu.cn.ua; zaa2006@ukr.net

Многочисленные исследования, проведенные в лаборатории экологической физиологии и биохимии водных организмов Черниговского национального педагогического университета имени Т.Г. Шевченко (Жиденко, 2009, Мехед, 2005), показали неблагоприятное влияние гербицидов на организм карпа. Степень патологии на разных уровнях организации рыб зависит от физико-химических свойств гербицидов, их растворимости в воде и в органических растворителях, от значений Log P, от распределения в водной среде, дозы и длительности действия гербицида, а также от вида, породы, возраста рыб и присутствия в воде других загрязнителей. В прибрежных акваториях и в пресных водоемах фиксируется наличие ядохимикатов в тех случаях, когда поблизости используют большое количество пестицидов для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур и древесной растительности. Согласно Интернету (<http://www.3tm.info.>, 2011), самым продаваемым в мире гербицидом в настоящее время является «Раундап» (производитель компания «Монсанто»), так как он применяется на трансгенных растениях, а большая их часть имеет устойчивость к этому химикату. Резистентность к раундапу является основной целью генной модификации более 70 процентов существующих сегодня ГМ-культур. В недавно опубликованном исследовании (Benachour & Se'ralini, 2008) было показано, что гербицид "Раундап", к которому устойчивы наиболее распространенные ГМ-культуры, даже в самых минимальных количествах (0.000001%) приводит к гибели клеток эмбрионов, клеток пуповинной крови и плаценты человека, запуская апоптоз (запрограммированную смерть клеток) (<http://www.3tm.info.>, 2011). Обработка соевых бобов гербицидами проводится с помощью самолета, поэтому определенная их часть попадает в близлежащие водоемы, в организм гидробионтов и далее – в пищу человеку.

Целью работы было установить возможность использования пробиотика БПС-44 для предотвращения токсического влияния глифосата на показатели белковых фракций в сыворотке крови и печени сеголеток карпа чешуйчатого. Известно, что применение данного пробиотика приводит к улучшению протекания зимовки карповых рыб (Смольский и др., 2004) и повышению жизнеспособности икры рыб в условиях гербицидного загрязнения (Барбухо, 2010).

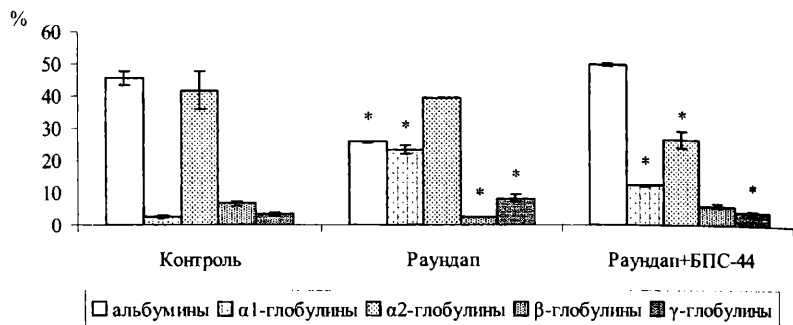
Эксперименты проводились в лаборатории экологической физиологии и биохимии водных организмов Черниговского национального педагогического университета имени Т.Г. Шевченко на сеголетках карпа *Cyprinus carpio*, выращенных в ОАО "Черниговрыбхоз". Рыб содержали в 200 л аквариумах с отстоянной водопроводной водой, которую постоянно аэрировали и меняли через каждые трие суток. Величина pH составляла  $7,50 \pm 0,25$ , содержание кислорода –  $5,6 \pm 0,4$  мг/л, температура воды выдерживалась приближенной к природной, в зависимости от сезона. Карпов в аквариумах размещали из расчета 20 л воды на одну особь в трех вариантах: 1) контроль; 2) действие 2 ПДК (предельно допустимая концентрация  $0,04$  мг/дм<sup>3</sup>) (Седокур, 1986) гербицида «Раундап» (действующее вещество — изопропиламинная соль глифосата, N-фосфометилглицин, 480 г/л) (Перелік пестицидів, 2001); 3) при совместном влиянии пробиотического препарата

БПС-44 (с концентрацией микроорганизмов *Bacillus subtilis* 44-р 1,25 x 10<sup>8</sup> КОЕ микробных клеток на 1 дм<sup>3</sup> воды, которые добавляли в виде суспензии в воду аквариума за 1 сутки до глифосата), и 2 ПДК «Раундапа». Во всех вариантах эксперимента количество использованных рыб составило по 12 экземпляров. Пробиотический препарат БПС-44 (ТУО 24.4-00497360-691-2003) был создан на основе штамма бактерий *Bacillus subtilis* 44-р в Институте сельскохозяйственной микробиологии НААНУ, г. Чернигов. Во всех трех случаях в течение 14 суток эксперимента контролировали гидрохимический режим.

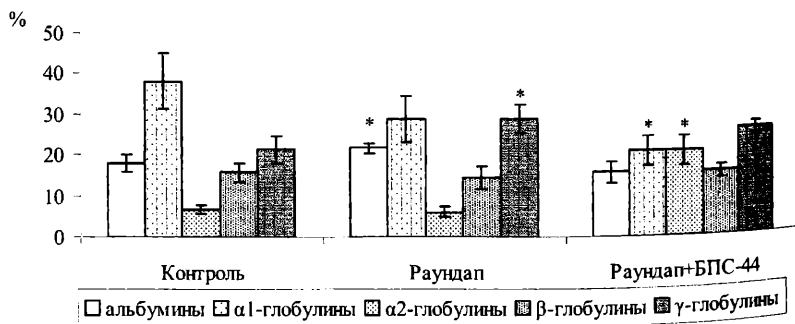
Материалом биохимического исследования была печень и кровь сеголеток карпа чешуйчатого. Для анализа навески замороженных тканей печени измельчали с помощью гомогенизатора РТ-2 и после центрифугирования (3000 об, 15 мин.) в центрифуге определяли количественные значения биохимических показателей. Отбор крови и получение сыворотки проводили по общепринятой методике (Давыдов, 2005). Использованный нами метод определения белковых фракций базируется на том, что фосфатные растворы определенной концентрации осаждают разные белковые фракции сыворотки крови с образованием очень мелкой эмульсии (Колб Г., 1976). По степени мутности растворов делали вывод о соотношении белков в исследуемом материале. В штатив помещали 7 пробирок (объемом 10 мл), обозначенных цифрами "0", "1", "2", "3", "4", "5", "6". В пробирку "0" помещали 10 мл дистиллированной воды, а в пробирки "5", "4", "3", "2", "1" – по 5 мл соответствующих фосфатных буферов: № 5 – 1,622 М, № 4 – 1,959 М, № 3 – 2,359 М, № 2 – 2,496 М, № 1 – 3,084 М (рН = 6,50 ± 0,10). В "6"-ю пробирку вносили 0,5 мл сыворотки, 0,75 мл дистиллированной воды и 3,75 мл раствора основного фосфатного буфера (3,347 М, рН = 6,50 ± 0,10). Содержание пробирки перемешивали 5-кратным переворачиванием её, избегая образования при этом пузырьков воздуха. Потом в пробирки с номерами 1-5 переносили по 0,5 мл полученной смеси, а в "0" пробирку добавляли 1 мл её. Содержания каждой пробирки аккуратно перемешивали и через 15 мин. замеряли оптическую плотность 5, 4, 3, 2 и 1 растворов против раствора из нулевой пробирки. Перед фотометрированием содержание всех пробирок ещё раз тщательно перемешивали, аккуратно поднимая со дна осадок. Оптическую плотность определяли на фотоэлектроколориметре при 670 нм с использованием кюветы с оптическим путем 10 мм. Для вычисления оптической плотности альбуминов от показателя "1"-й пробы отнимали показатель "2"-й пробы. Для вычисления оптической плотности α<sub>1</sub>-глобулинов от показателя "2"-й пробы отнимали показатель "3"-й пробы. Для вычисления оптической плотности α<sub>2</sub>-глобулинов от показателя "3"-й пробы отнимали показатель "4"-й пробы. Для определения оптической плотности β-глобулинов от показателя "4"-й пробы отнимали показатель "5"-й пробы. Показатель "5"-й пробы – это показатель γ-глобулинов. Дальше вычисляли соотношение каждой фракции в абсолютных процентах. Для исследования содержания белковых фракций использовали реактивы производства АО «Реагент» (Украина).

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере с помощью прикладного программного обеспечения Microsoft® 2003 Excel с использованием t-критерия Стьюдента. Рассчитывали среднюю величину (M), среднее квадратическое отклонение (m), достоверность различий (P). Кроме того, рассчитывали коэффициент вариации и использовали однофакторный дисперсионный анализ (по F-критерию Фишера). Различия между сравнимыми группами считали достоверными при \* – P < 0,05 (Johnson, 1992).

Результаты определения содержания белковых фракций в сыворотке крови сеголеток карпа соответствуют литературным данным по показателям альбуминов и  $\gamma$ -глобулинов (Иванов, 2003). В содержании  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов наблюдаются некоторые отличия, обусловленные сезоном или физиологическим состоянием рыб (рис. 1А). По данным К.Ф. Сорвачева (Сорвачев, 1982), фракция альбуминов у чешуйчатого карпа составляет 15,70%, а у зеркального – 17,26%, фракция глобулинов составляет 84,30% и 82,74% у чешуйчатого и зеркального карпа соответственно (Сорвачев, 1982). Согласно исследованиям В.Б. Адрианова (1937), результаты которых приводит К.Ф. Сорвачев, альбумино-глобулиновое соотношение (А/Г коэффициент) у карпа составляет 0,641 (0,481-0,886). Рассчитанный А/Г коэффициент в нашем исследовании в сыворотке крови составил 0,84.



А



Б

Рисунок 1. Изменение содержания белковых фракций в сыворотке крови (А) и в печени (Б) сеголеток карпа в условиях действия гербицида «Раундапа» и «Раундапа» с БПС-44 ( $M \pm m$ ,  $n = 12$ ,  $* - P < 0,05$ ).

Под влиянием глифосата в крови происходит резкое снижение содержания альбуминов (в 1,8 раза) и соответствующее возрастание  $\alpha_1$ -,  $\gamma$ -глобулинов. Согласно литературным данным (Архипчук, 2008), при нарушениях функционального состояния печени белковый сдвиг крови характеризуется возрастанием именно

содержания глобулинов и снижением содержания альбуминов. В частности, известна способность альбуминов связывать различные вещества, в том числе токсические. Рост фракции глобулинов можно рассматривать как компенсаторную реакцию, направленную на выравнивание онкотического давления крови, которое снижается в результате патологического уменьшения выброса в кровь альбуминов (возможно, в результате нарушения их синтеза в печени) (Романенко, 1978). А/Г коэффициент составил 0,35, что также может свидетельствовать о хроническом поражении печени, о наличии воспаления, распространении процесса зернистой и вакуольно-капельной дистрофии. Кроме того, существенное возрастает (в 9,5 раза) содержание фракции  $\alpha_1$ -глобулинов и снижается в 2,6 раза фракция  $\beta$ -глобулинов (в эту фракцию входит трансферин – переносчик железа), гемопексин (связывает гем и препятствует его выведению почками и потере железа), компоненты комплемента и часть иммуноглобулинов, в 2,5 раза возрастают  $\gamma$ -глобулины.

При использовании БПС-44 показатели альбуминов и  $\beta$ -глобулинов в сыворотке крови приближаются к контрольным значениям, а коэффициент А/Г составляет 1,0, что может свидетельствовать о позитивных изменениях в организме рыб. Содержание  $\gamma$ -глобулинов по сравнению с контролем также несколько возрастает (на 19,2%). Высокая обеспеченность организма альбуминами и  $\gamma$ -глобулинами создает благоприятные предпосылки для оптимизации обменных процессов и гарантирует высокую неспецифическую резистентность. Однако наблюдаются определенные изменения во фракции  $\alpha$ -глобулинов: содержание  $\alpha_1$ -глобулинов приближается к норме по сравнению с влиянием «Раундапа», но уровень  $\alpha_2$ -глобулинов снижается ещё больше.

В печени сеголеток карпа под влиянием «Раундапа» (рис. 1Б) наблюдается рост относительного содержания альбуминов – на 17,0% и  $\gamma$ -глобулинов – на 26,1% (в эту фракцию входят иммуноглобулины, которые функционально являются антителами и обеспечивают иммунную защиту организма от инфекций и чужеродных веществ (Иванов, 2003). Соответственно можно предположить протекание в организме рыб воспалительных процессов. Содержание остальных белковых фракций достоверно не отличается от контрольных значений (рис. 1Б).

Действие БПС-44 приводит к существенному изменению фракции  $\alpha_2$ -глобулинов (фракция  $\alpha_2$ -глобулинов преимущественно включает белки острой фазы:  $\alpha_2$ -макроглобулин (принимает участие в развитии инфекционных и воспалительных процессов), гаптоглобин (образовывает комплекс с гемоглобином, который освобождается из эритроцитов при внутрисосудном гемолизе), церулоплазмин (специфически связывает ионы меди, а также является оксидазой аскорбиновой кислоты, адрепаллина, диоксифенилаланина, способные инактивировать свободные радикалы), а также аполипротеин В (принимает участие в транспорте липидов) (Иванов, 2003) – наблюдается возрастание содержания этой фракции в 3,1 раза. Существенным является и снижение в 1,8 раза фракции  $\alpha_1$ -глобулинов (эта фракция включает белки острой фазы:  $\alpha_1$ -антитрипсин (ингибитор многих протеолитических ферментов),  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин (в зоне воспаления способствует фибрилlogenезу), транспортные белки,  $\gamma$ -глобулины под влиянием БПС-44 тоже возрастают, хотя и не так существенно, как при влиянии раундапа – на 18,9%. Такие изменения данной фракции также могут свидетельствовать о негативных иммунных реакциях организма сеголеток карпа.

Таким образом, полученные результаты показали, что действие гербицида «Раундап» приводит к негативным изменениям в крови сеголеток карпа: уменьшается процент альбуминов и возрастает содержание  $\gamma$ -глобулинов как свидетельство наличия воспалительных процессов и снижения неспецифической

резистентности организма карпа. Действие пробиотического препарата БПС-44 в сыворотке крови приводит к позитивным изменениям: наблюдалось выравнивание всех показателей белковых фракций, кроме фракции  $\alpha_2$ -глобулинов.

### Список литературы

1. Архипчук В.В. Исследования в области цитологии рыб и биотестирования: Сб. научн. трудов. / Под ред. М.В. Малиновской. – К.: “Реликвий”, 2008. – 536.
2. Барбухо Е.В. Повышение жизнеспособности икры карпа при гербицидном загрязнении пробиотическим препаратом БПС-44 // Биология внутренних вод: тезисы докл. XIV Школы-конференции молодых ученых (Борок, 26-30 октября 2010 г.). — Борок, 2010. — С. 5.
3. Давыдов О.Н., Темниханов Ю.Д., Куровская. Л.Я Патология крови рыб, – К.: МВЦ “Медінформ”, 2005. – 210 с.
4. Жиденко А.О. Морфологічні адаптації різновікових груп *Surginus carpio* L. за несприятливої дії екологічних факторів – Автореф. дис....докт. біол. наук. – зі спеціальності 03.00.16. – екологія. – Одеса, 2009– 40 с.
5. Иванов А.А. Физиология рыб. – М.: Мир, 2003. – 284 с.
6. Колб Г., Камышников С. Клиническая биохимия. – Минск: Беларусь, 1976. С. 20–22.
7. Мехед О.Б. Вплив пестицидного забруднення водного середовища на іхтіологічні показники та метаболічні перетворення в організмі коропа: Автореф. дис. ... канд. біол.наук. – зі спеціальності 03.00.10. – іхтіологія. К., 2005. – 20 с.
8. Романенко В.Д. Печень и регуляция межлужечного обмена (млекопитающие и рыбы). – К.: Наук. думка, 1978. – 184 с.
9. Смольський О.С., Смольська Т.М., Агеев В.О. та ін. Регуляторна роль пробіотика БПС-44 на систему антиоксидантного захисту рыб в умовах зими // Пробиотики — XXI століття. Біологія. Медицина. Практика: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції (20–22 травня 2004 р.). — Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. — С. 160–162.
10. Сорвачев К.Ф. Основы биохимии питания рыб. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 247 с.
11. Справочник по пестицидам: гигиена применения и токсикология. Сост. Л.К. Седокур, под ред. А.В. Павлова. – К.: Урожай, 1986.– 432 с.
12. Перелік пестицидів і агрохімікатів дозволених до використання в Україні. – Київ: Юнівест Маркетинг, 2001. – 274 с.
13. Johnson R.A., Wichern D.W. Applied multivariate statistical analysis – London: Prentice-Hall, 1992. – 154 p.
14. <http://www.3rm.info/5336-gerbicide-raundap-predstavlyayet-vysokuyu-opasnost.html>

### USE OF PROBIOTIC BPS-44 TO PREVENT THE TOXIC EFFECTS OF HERBICIDES ON FISH

A.A. Zhidenko, E.V. Bibchuk, V.V. Krivopisha

The regularities of changes in the protein fractions in the liver of carp fingerlings under the influence of the herbicide "Roundup", as the toxic factor of the aquatic environment and probiotic preparation BPS-44 to prevent the negative effect of glyphosate was investigated. The results indicate negative changes in the liver of carp fingerlings: lower percentage of albumin and increases the content of  $\gamma$ -globulin, which indicates the presence of inflammatory processes and reduction of nonspecific resistance of carp. Effect of probiotic preparation BPS-44 resulted in positive changes in blood serum: observed alignment of all protein fractions indicators, except fraction  $\alpha_2$ -globulins.

# АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ДИКОЙ И ЗАВОДСКОЙ МОЛОДИ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ КОЛЬСКОГО ПОЛУОСТРОВА

Л.А. Мишанина

ФГОУ ВПО «Мурманский государственный технический университет»,  
г. Мурманск, Россия, ludapoh@yandex.ru

В современных условиях становится все более актуальным изучение физиолого-биохимических механизмов адаптации рыб к экологическим условиям среды обитания и выяснение функциональной роли различных классов органических веществ в адаптивных механизмах (Хочачка, Сомеро, 1988). Значимым критерием оценки физиологического состояния рыб является исследование аминокислотного состава (Джабаров, 2006). Особый интерес в этом плане представляет исследование такой ценной промысловой рыбы, как атлантический лосось, или семга.

Целью настоящей работы является сравнительный анализ аминокислотного состава белков мышечной ткани молоди атлантического лосося *Salmo salar* L. Кольского полуострова, дикой и выращенной на рыбоводных заводах Мурманской области.

Объектом исследования служила молодь атлантического лосося *Salmo salar* L. из рек Кольского полуострова (Пак, Печа – притоки реки Туломы, Западная Лица, Кола, Йоканьга, Поной, Умба) и заводская молодь с рыбоводных заводов Мурманской области – Кандалакшского экспериментального лососевого (КЭЛЗ), Умбского (УРЗ) и Тайбольского (ТРЗ) рыбоводных. В качестве материала для исследований использовали мышечную ткань. Аминокислотный состав белков исследовали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Методика разделения смеси..., 1995). Калибровку колонки выполняли по стандартным образцам аминокислот фирмы «Sigma» (США) методом абсолютной калибровки. Статистическую обработку результатов измерений проводили общепринятыми методами с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Гипотезу о принадлежности сравниваемых независимых выборок к одной генеральной совокупности проверяли с помощью метода однофакторного дисперсионного анализа (Лакин, 1990).

Мышечная ткань молоди рек Кола и Умба и рыбоводных заводов по сравнению с мышечной тканью молоди остальных рек отличается пониженным содержанием следующих незаменимых аминокислот для рыб: гистидина, изолейцина, валина и треонина. Это, вероятно, свидетельствует о разной кормовой базе исследуемых объектов. Известно, что в реках Кола и Умба количественный состав зоопланктона невелик (Зубченко, 2003; Зубченко, 2007). Полученные данные по рыбоводным заводам подтверждают факт длительного кормления молоди лосося всех трех рыбоводных заводов кормом одинакового качества состава.

Потребность рыб в любой из незаменимых аминокислот зависит от уровня других аминокислот в рационе. Недостаток аминокислот приводит к увеличению затрат корма на единицу прироста. При недостатке незаменимых аминокислот вступает в силу «закон минимума», согласно которому дефицит лишь одной незаменимой аминокислоты ограничивает эффективность использования всего рациона, что приводит к снижению роста, повышенному жиросложению, и в конечном итоге увеличиваются затраты белка на единицу прироста рыб. При недостаточном количестве поступаемых с пищей незаменимых аминокислот в течение первых двух недель у рыб наблюдается снижение аппетита, приостановка роста (Щербина, 1983; Гамыгин, 1996). Для молоди из рек Печа, Пак, Западная



Лица, Йоканьга, Поной спектр незаменимых аминокислот близок к таковому эталонного белка. У заводской молодежи и молодежи из рек Кола и Умба уровень валина, треонина и изолейцина гораздо ниже, чем в эталонном белке (табл. 1).

Таблица 1.

Содержание незаменимых аминокислот в белке мышечной ткани речной и заводской молодежи атлантического лосося, %

АК	Эталонный белок*	Белок лосося				
		с ТРЗ	с КЭЛЗ	с УРЗ	из р. Кола	из р. Умба
Валин	5,00	2,20±0,06 э	2,24±0,07 э	2,37±0,07 э	3,21±0,06 э	2,26±0,04 э
Треонин	4,00	2,30±0,05 э	2,63±0,06 э	2,38±0,05 э	2,98±0,13 э	2,57±0,13 э
Изолейцин	4,00	2,71±0,06 э	2,25±0,05 э	2,32±0,05 э	3,40±0,07 э	3,48±0,06 э

Примечание: \* ФАО/ВНО, 1991 г.; э – достоверность различий по сравнению с эталонным белком,  $p \leq 0,05$

Возможно, сеголетки из этих рек были выпущены с рыбоводных заводов, так как их аминокислотный состав имеет существенное сходство с таковым заводской молодежи. Таким образом, аминокислотный состав можно считать индикатором происхождения сеголеток, а именно молодежи естественного и искусственного воспроизводства.

#### Список литературы

1. Гамыгин Е.А. Кормление лососевых рыб в индустриальной аквакультуре: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – М., 1996. – 77 с.
2. Джабаров М.И. Аминокислотный состав тканей различных видов рыб в онтогенезе и при изменении экологических условий – М.: Изд-во ВНИРО, 2006. – 213 с.
3. Зубченко А.В., Долотов С.И., Крылова С.С. Лососевые реки Кольского полуострова. Река Кола - Мурманск: ПИНРО, 2003. - 66 с.
4. Зубченко А.В., Калюжин С.М., Веселов А.Е., Алексеев М.Ю., Красовский В.В., Балашов В.В., Аликов Л.В. Особенности воспроизводства атлантического лосося (*Salmo salar* L.) в реке Умба (Кольский полуостров) – Петрозаводск: Институт биологии КарНЦ РАН, 2007. – 163 с.
5. Лакин Г. Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов / 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
6. Методика разделения смеси 23 свободных аминокислот методом двумерной хроматографии. – СПб: Ленхром, 1995. – 8 с.
7. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация – М.: Мир, 1988. – 567 с.
8. Щербина, М.А. Методические указания по физиологической оценке питательности кормов для рыб – М., 1983. – 83 с.

#### AMINO ACID COMPOSITION OF PROTEINS OF MUSCLE TISSUE OF WILD YOUNG GENERATION SALMO SALAR AND FROM FISH FACTORY OF KOLA PENINSULA

L.A. Mishanina

The aim of this work is the comparative analysis of the amino acid composition of proteins of muscle tissue of wild young generation *Salmo salar* and from fish factory of Kola Peninsula. The study of amino acids composition of different tissues of animals allows to estimate the particularities of protein metabolism and physiological state of organism.

# К ВОПРОСУ О БЕСКОНТРОЛЬНЫХ ПЕРЕВОЗКАХ ИКРЫ И ЛИЧИНОК ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ РЫБ В РЫБОВОДНЫХ ХОЗЯЙСТВАХ РОССИИ

С.Л. Рудакова

Сахалинский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Россия, Южно-Сахалинск, rud\_sve\_leon@mail.ru

В настоящее время в России большое внимание уделяют развитию аквакультуры. В 2003 г. была разработана "Концепция развития рыбного хозяйства Российской Федерации на период до 2020 г.", которая определила, что важнейшей составляющей рыбохозяйственного сектора экономики России является аквакультура, и интенсивное развитие этого направления - одна из главных задач. Наиболее динамично развивающейся отраслью рыбного хозяйства на Северо-Западе России является садковое товарное рыбоводство в естественных водоемах, которое сейчас достаточно активно развивается на территории Карелии, Мурманской, Астраханской и Ленинградской областей. Проведена предварительная оценка возможных объемов садкового выращивания форели в условиях Карелии от 1000 т (Арсендоранко, 1975) до 5 тыс. т. (Житний, Климов, 2003) и для Европейского Севера - 50 тыс. т (Альтов, 2002). Основным объектом садкового форелеводства является радужная форель (*Parasalmo mykiss* Walbaum), родиной которой считают Северную Америку, а также ее гибридные формы.

Вместе с тем в условиях многоукладной экономики динамичное развитие аквакультуры в стране не подкреплено адекватной законодательной и нормативно-правовой базами, отражающими современные реалии аквакультуры. Это относится и к эпизоотическому контролю, как на рыбоводных хозяйствах, так и в естественных водоемах, на которых они располагаются. Задачи эпизоотического контроля ситуации с водными животными возложены на Департамент Ветеринарии и Россельхознадзор. Однако на официальном сайте этих организаций нет информации об эпизоотической ситуации в России по болезням рыб, хотя достаточно подробно освещена информация по болезням животных и птиц. На официальном сайте Международного эпизоотического бюро (МЭБ) указано, что по всем эпизоотически значимым болезням рыб от России информации не поступает (рис. 1).

Таким образом, ни внутри нашей страны, ни на международном уровне не ведется обобщения и учета эпизоотической обстановки по болезням рыб, что может привести, а в некоторых регионах уже привело, не только к экономическим потерям на самих предприятиях, но и к расширению ареала патогенов и/или их адаптации к не типичным хозяевам, за счет массовой бесконтрольной перевозки рыбопосадочного материала как внутри страны, так и из-за рубежа. Как известно, в искусственных условиях выращивания, особенно при интенсивных формах рыбоводства, при высоких плотностях посадки патогенов происходит более интенсивно, и гибель рыб может достигать 100%, особенно при высоко контагиозных инфекциях и инвазиях.

Масштабным примером этому служит занос в 70-е годы XX века моногенеи *Gyrodactylus salaricus* в реки Атлантического бассейна Скандинавии, в результате чего рыбному хозяйству Норвегии был причинен значительный экономический ущерб. Паразит был занесен вместе с молодью балтийского лосося при проведении рыбоводных работ и перешел на местные популяции атлантического лосося *Salmo salar* L. Благодаря наличию во фьордах обширных опресненных зон гиродактилус очень быстро расселился по 40 рекам и практически полностью погубил там популяции семги (Malmberg, 1989).

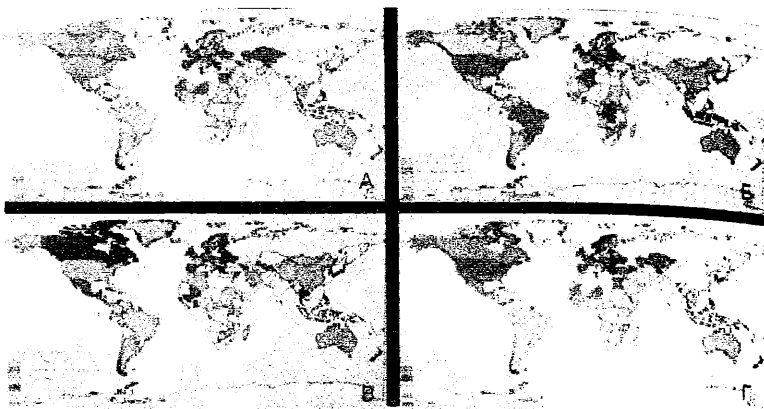


Рисунок 1. Карты распространения эпизоотически значимых болезней рыб (незакрашенные области свидетельствуют об отсутствии информации): А – инфекционный некроз гемопоэтической ткани (2010 г.); Б – осенняя вирусная геморрагическая септицемия (2005 г.); В – инфекционный некроз панкреатической ткани (2005 г.); Г – вирусная геморрагическая септицемия (2010 г.) (официальный сайт МЭБ: [www.meb.gov.ru](http://www.meb.gov.ru)).

В России отмечено два случая гиродактилеза: у атлантического лосося в р. Кереть (бассейн Белого моря) (Шульман и др., 1957) и у радужной форели в садковом хозяйстве на акватории Онежского озера. В первом случае паразит был занесен в результате рыбоводных работ, уже более 15 лет поддерживает высокую численность и отрицательно влияет на состояние популяции лосося в этой реке. Во втором случае генетические исследования показали, что паразит форели является клоном вида *G. salaricus* – *G. salaricus* RBT, появление этой формы произошло в период освоения паразитом нового хозяина – радужной форели и, следовательно, и в этом случае также можно говорить о заносе чужеродной формы гиродактилуса из финских питомников в форелевые хозяйства Карелии с посадочным материалом (Евсеева и др., 2009).

В настоящее время внушает серьезные опасения распространение по Северо-Западу России вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани (ВИНГТ или IHNV). IHNV относится к семейству *Rhabdoviridae*, в основном является причиной болезни рыб рода *Oncorhynchus*, был впервые идентифицирован на северо-западном побережье Тихого океана США в 50-х гг. XX века. Заболевание протекает по типу эпизоотии и сопровождается массовой гибелью молоди рыб. В результате бесконтрольной перевозки оплодотворенной икры и рыбы в 70-80-х гг. XX века IHNV был широко распространен по территории США, Европы и Юго-Восточной Азии.

В России IHNV впервые был выделен в 2000 г. у молоди на форелевом хозяйстве в Московской области и, вероятно, попал туда с инфицированной икрой неизвестного происхождения (Shchelkunov et al., 2001). Однако информация о данном патогене в большинстве случаев в России «засекречена», вирусологи только констатируют факт выявления этого патогена в хозяйстве «N» Ленинградской области или Карелии. Объясняется это банально: «... если мы разгласим информацию о наличии IHNV или другом патогене в конкретном хозяйстве, нас

туда просто больше не пустят и не разрешат отбирать материал на исследования».

**Парадокс.** Ведущие специалисты научно-исследовательских институтов Министерства сельского хозяйства России, в обязанности которых входит контроль эпизоотической обстановки в рыбоводных хозяйствах и водоемах, на самом деле не могут ничего контролировать и принимать действенные меры по предотвращению заноса патогенов при проведении рыбоводных работ.

Наибольшую опасность в этом плане представляют именно садковые хозяйства в силу особенностей своей технологии.

Садковые хозяйства по выращиванию товарной рыбы из рыбопосадочного материала представляют собой садковые линии, установленные непосредственно в естественном водоеме, чаще всего в озерах или в охлаждательных каналах ТЭЦ, АЭС и ГЭС. Садок выполнен из сетчатой ткани, через которую вода свободно циркулирует внутри садка и выходит из него в водоем. Водообмен в такой емкости осуществляется за счет движения рыб и естественного течения воды. В случае развития эпизоотии вирус, выделяемый в воду от больных рыб, беспрепятственно попадает в естественный водоем, заражая аборигенные чувствительные виды рыб и/или накапливаясь в органических осадках и образуя естественный резервуар.

Принимая во внимания массовое развитие садковых форелевых хозяйств на Северо-Западе России, мы можем повторить ситуацию, имевшую место в США. Там первоначально, в 50-х годах, IHNV был причиной большого отхода только нерки (*O. nerka*) на рыбоводных заводах в штатах Вашингтон и Орегон. Затем вирус распространили из этих штатов по всей территории Северной Америки за счет кормления молоди внутрениностями рыб, перевозок инфицированной икры и личинок, а также использования диких половозрелых особей, зараженных вирусом, при искусственном воспроизводстве. В 70-х годах стало развиваться садковое форелеводство, число эпизоотий IHN возросло, и болезнь распространилась на естественные популяции радужной форели, микижи (анадромный *Parasalmo mykiss*), чавычи и нерки-кокани (жилая форма *O. nerka*), а в 80-х гг XX в. IHNV был обнаружен у лосося Кларка (*Salmo clarki*), стальноголового лосося в бассейне реки Колумбия и атлантического лосося (*Salmo salar*) в штате Вашингтон. В настоящее время IHNV считается эндемичным по всему северо-западному побережью Тихого океана (рис.1). В Японию, Европу и Восточную Азию IHNV был также занесен с зараженной икрой и молодько рыб, импортированных из США (Bootland, Leong, 1999).

Товарным выращиванием в России занимаются в основном негосударственные структуры: фермеры, акционерные общества и т.д., что осложняет контроль их деятельности. Ввоз рыбы и икры для целей разведения, выращивания или акклиматизации разрешается только из благополучных в отношении IHNV рыбоводных хозяйств и рыбохозяйственных водоемов. Несмотря на это, в России до сих пор не развит ветеринарный контроль вирусных инфекций у рыб, недостаточно оборудованных вирусологических лабораторий. Действующие в настоящий момент методы профилактики и контроля IHN не соответствуют международным нормам и не препятствуют возникновению вспышек данного заболевания.

Кроме того, плотность рыб является ключевым фактором при горизонтальной передаче IHNV. Х. Огут и П. Рено (Ogut, Reno, 2004) экспериментально показали, что для передачи вируса от одной инфицированной рыбы достаточно, чтобы плотность посадки особей была 1,6 тыс. шт./кв.м. В соответствии с принятыми нормами плотность посадки личинок и молоди радужной форели составляет 9-10 тыс. шт./кв.м., что будет способствовать быстрому

распространению и развитию эпизоотии ИHNV при искусственном выращивании. Больные рыбы испускают вирусные частицы в воду садков, которые устанавливаются непосредственно в естественном водоеме (как правило, это озера), что может стать причиной болезни диких чувствительных видов рыб, например, атлантического лосося, который, по литературным данным, чувствителен к ИHNV, и морские садковые хозяйства Британской Колумбии понесли большой экономический урон в результате эпизоотий в 2000-х гг. (Saksida, 2006).

Пути решения проблемы:

1. На государственном уровне решить вопрос об эпизоотическом мониторинге болезней рыб и назначить ее исполнителем Агентство по рыболовству. Эту работу могут проводить рыбохозяйственные научно-исследовательские институты в рамках работ по мониторингу качества и безопасности ВБР. Такие разрозненные работы уже проводятся ихтиопатологами, но нет общего плана, цели и задач. Нет структуры, которая бы отвечала за своевременное поступление информации от отдельных институтов, обобщала бы ее в базе данных и представляла для массового пользования в глобальной сети Интернет, аналогично Европейской референтной лаборатории по болезням рыб (European community reference laboratory for fish diseases, [www.fishpathogens.eu](http://www.fishpathogens.eu)).

2. Предусмотреть оснащение каждой ихтиопатологической лаборатории рыбохозяйственных НИИ как минимум средствами экспресс диагностики вирусных и бактериальных заболеваний (ПЦР, ELISA и др.), утвердить единые методики для проведения эпизоотического мониторинга.

3. Разработать стандарт для аккредитации научно-исследовательских лабораторий, занимающихся изучением болезней рыб, и провести их обязательную аккредитацию.

4. Законодательно обязать рыбоводные хозяйства, независимо от формы собственности, проводить обследования хозяйств (полносистемных) в период закладки икры на воспроизводство, при продаже/закупке посадочного материала из мест, неблагополучных по эпизоотически значимым заболеваниям или не имеющим информации по ним (внести соответствующие дополнения в Закон об Аквакультуре).

5. Законодательно обязать хозяйства, независимо от формы собственности, сообщать в ближайшие ихтиопатологические лаборатории о случаях повышения ежесуточного отхода свыше 1,5% в рыбоводной емкости, появления клинических признаков болезней (внести соответствующие дополнения в Закон об Аквакультуре).

6. Разработать систему компенсации затрат рыбоводным хозяйствам за профилактику и контроль эпизоотий особо опасных заболеваний рыб (централизованная закупка лечебных и профилактических препаратов и др.) (внести соответствующие дополнения в Закон об Аквакультуре).

7. Проводить научно-просветительскую работу по болезням рыб в средствах массовой информации.

### Список литературы

1. Альтов А.В. Особенности биотехники садкового культивирования рудужной форели в прибрежных водах Белого моря // Автореферат диссер. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. Петрозаводск, 2002. - 24 с.

2. Арендаренко Г.А., Дроздова М.И., Комисарова О.П. Садковое выращивание форели в условиях Карелии // Материалы Всесоюз. совещания по выращиванию рыбы в садках, устанавливаемых в водохранилищах и озёрах. М., 1975.-С. 18-20.

3. Евсеева Н.В., Барская Ю.Ю., Лебедева Д.И. Первый случай гиродактилеза радужной форели в аквакультуре Карелии // Сб. науч. Труд. «Проблемы ихтиопатологии в начале XXI века». С.-Петербург, изд. ГосНИОРХ. 2009. С.71-77.
4. Шульман Б.С., Щуров И.Л., Иешко Е.П., Широков В.А. Влияние *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) на популяцию атлантического лосося (*Salmo salar* L.) в реке Кереть (Северная Карелия) и возможные меры борьбы с ним // Эколого-паразитологические исследования животных и растений Европейского Севера. Петрозаводск. КарНИЦ РАН. 2001. С. 40-48.
5. Bootland L.M., Leong J.C. Infectious hematopoietic necrosis virus. // Woo P.T.K. and Bruno D.W. (eds.). Fish diseases and disorders. Vol. 3: Viral, bacterial and fungal infectious CAB International. 1999. P. 57-112.
6. Malmberg G. Salmonid transports, culturing and *Gyrodactylus* infections in Scandinavia // Parasites of freshwater fishes of North-West Europe. Petrozavodsk. 1989. P. 88-104.
7. Ogut H., Reno P.W. Effects of fish density on spread of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh 56 (3), 2004. P. 218-225.
8. Saksida S.M. Infectious hematopoietic necrosis epidemic (2001 to 2003) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in British Columbia // Dis Aquat Org. Vol.72, 2006. P. 213-223.
9. Shchelkunov I.S., Shchelkunova T.I., Kupinskaya O.A., Didenko L.V., Bykovsky A.F., Olesen N.J. Infectious hematopoietic necrosis (IHNV): the first confirmed finding in Russia. 10th Intern. Conf. EAAP. Diseases of fish and shellfish. Book of abstracts. Dublin. 2001. P. 44.

#### ABOUT UNCONTROLLED TRANSPORTATIONS OF EGGS AND FRY FOR ARTIFICIAL GROWTH IN FISH FARMS OF RUSSIA

S.L. Rudakova

Aquaculture in Russia has been developed very fast and especially net-pen farms for growth rainbow trout in fresh water. But we don't have adequate low base which will be able to regulate most part of necessary questions include of epidemic monitoring of fish diseases in hatcheries and in wild resources. Main part of new net-pen farms in North-West of Russia is private and ichthyopathologists don't have possibility to do monitoring works there or present official information about events of epidemic. Transportation of eggs and fry between the farms and from different countries has been carrying out without real control for viral and bacterial diseases. This situation may be reason for distribution of dangerous pathogens into wild water reservoirs and its adaptation for new species of fish as it take place with *gyrodactylus* infections in Scandinavia and distribution of IHNV and VHSV all around the world. We suggest some ways to determine this problem: to change structure of investigation and submission monitoring data of epidemic situation among wild and hatchery fish; technical support and accreditation of Fish Disease laboratories; to add in Aquaculture Low some articles about obligatory examination of fish farms in spite of form of property under certain conditions; to develop of compensation system for fish farm for using methods for preventive measures and control for distribution of significant fish disease and.

# ВЛИЯНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ И ПРОБИОТИКОВ НА ЛЕЙКОЦИТЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ РЫБ

Т.А. Суворова\*, В.Г. Терещенко, Л.В. Балабанова, Д.В. Микряков  
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок, Россия  
\*[tanya@ibiv.yaroslavl.ru](mailto:tanya@ibiv.yaroslavl.ru)

В последнее время специалистами, работающими в сфере аквакультуры, большое внимание уделяется поиску средств, позволяющих сократить использование в рыбоводных хозяйствах антибиотиков и химиотерапевтических препаратов, применяя их только в исключительных случаях для быстрого купирования вспышки заболеваний. В качестве альтернативных препаратов всё более широко применяются пробиотические и комбинированные препараты, которые продемонстрировали хороший потенциал для профилактики и лечения бактериальных инфекций рыб, коррекции иммунодефицитных состояний, смягчения действия стрессовых факторов.

В отечественном рыбоводстве уже используются классические пробиотики — бифидо- и лактобактерии, которые являются представителями нормофлоры кишечника, и споровые бактерии рода *Bacillus* (Лукьянова, 2007; Бычкова и др., 2008; Головкин и др., 2009). Для химиотерапии бактериальных инфекций, наносящих большой экономический ущерб рыбоводным хозяйствам, в частности аэромоноза, в производственной практике успешно применяются антибактериальные препараты, особенно на основе ципрофлоксацина из группы фторхинолонов (Енгашев, 2008; Гончарова, 2009; Воробьев и др., 2008; Тищенко и др., 2008).

Цель работы – влияние антибактериальных и пробиотических препаратов на состав лейкоцитов периферической крови, интенсивность лейкопоэза и характер течения дестабилизационных и дезинтеграционных процессов, происходящих в составе клеток белой крови рыб.

Исследование проводили на годовиках карпа средней массой  $150 \pm 10$  г. Рыб содержали в 200 л аквариумах с принудительной аэрацией и механической фильтрацией воды при температуре  $18 \pm 1.5$  °С. В качестве антибактериального препарата использовали Антибак 100 для карповых рыб (ООО «НВЦ Агроветзащита», г. Москва) – опытная группа 1, а в качестве пробиотика – СУБ-ПРО (ООО «Вектор-Евро», г. Москва) на основе *Bacillus subtilis* – опытная группа 2. Лечебный корм опытные рыбы 1 и 2 групп получали в течение 5 сут, что соответствует указаниям инструкции. Сбор материала производили на 7, 10 и 14 сут после начала опыта.

Состав лейкоцитов определяли в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимза. В каждом мазке определяли относительное количество лимфоцитов, палочко- и сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, моноцитов и бластных форм клеток под тринокулярным микроскопом "Биомед-6ПР1-ФК", просчитывая по 200 клеток.

Интенсивность лейкопоэза определяли по индексу обилия лейкоцитов, или частоты встречаемости клеток белой крови в одном поле зрения (Микряков, Лапирова, 1997).

Количественная оценка интенсивности дестабилизационных процессов основана на анализе интегральных индексов структуры лейкоцитов, предложенных нами ранее и показавших их эффективность (В. Микряков и др., 2005). Для описания

изменений числа форм клеток и их относительного обилия предложен индекс биологического разнообразия Шеннона:

$$H = - \sum (p_i / N) \text{Log}_2 (p_i / N)$$

где  $p_i$  - численность  $i$ -й формы клетки белой крови,  
 $N$  - суммарная численность клеток всех форм в пробе.

Биологический смысл данного показателя заключается в оценке неопределенности структуры системы, т.е. в данном случае - неопределенности встречи конкретной формы белой крови.

При сравнительном анализе удобно использовать относительный показатель, изменяющийся от 0 до 1, который основан на функции Шеннона и называется «относительная организация». В смыслевом отношении данный показатель является индексом доминирования. Относительная организация структуры лейкоцитов определяется по формуле:

$$R = 1 - H / (\text{Log}_2 K),$$

где  $K$  - число форм клеток.

Результаты исследований подвергали статистической обработке.

Полученные результаты показали, что Антибак 100 и СУБ-ПРО вызывают изменения всех исследуемых показателей.

После кормления Антибак 100 в лейкограммах опытных карпов на 7 сут зафиксировано снижение процентного содержания лимфоцитов и увеличение остальных типов клеток, а на 10 сут – достоверное увеличение только количества палочкоядерных нейтрофилов и бластных клеток (табл. 1). На 14 сут опыта лейкоцитарные формулы опытных рыб практически не отличаются от таковых контрольных особей.

Таблица 1.

Динамика изменения лейкограммы периферической крови карпа после кормления антибаком, %.

Время, сут	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы		Базофилы	Эозинофилы	Бластные формы
			ПЯ	СЯ			
Контроль перед кормлением	92,70±0,60	0,60±0,18	0,80±0,25	0,10±0,10	0,10±0,10	1,00±0,27	4,70±0,37
7 сут	73,70±2,78*	1,70±0,20*	5,70±0,71*	1,30±0,33*	1,80±0,25*	5,10±1,41	10,70±2,83
10 сут	93,70±0,98	0,70±0,12	1,40±0,18*	0,40±0,18	0,20±0,12	1,30±0,60	2,30±0,40*
14 сут	92,50±0,40	0,75±0,14	1,62±0,51	0,50±0,20	0,25±0,14	0,37±0,12	4,00±0,70

Примечание. Здесь и в табл. 2: \* - достоверно отличается от контроля при уровне значимости  $p=0,05$ .

После кормления препаратом СУБ-ПРО достоверных изменений в лейкоцитарной формуле опытных карпов по сравнению с интактными особями не обнаружено, за исключением увеличения содержания сегментоядерных нейтрофилов и базофилов на 7 сут после начала эксперимента (табл. 2).



Таблица 2.

Динамика изменения лейкограммы периферической крови карпа после кормления Субпро, %

Время, сут	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы		Базофилы	Эозино-филы	Бластные формы
			ПЯ	СЯ			
Контроль до опыта	92,90±0,48	0,40±0,10	0,90±0,43	0,60±0,29	0,10±0,10	0,60±0,10	4,60±0,92
7 сут	89,90±1,70	0,50±0,15	1,20±0,64	1,50±0,22*	2,50±0,59*	1,80±0,51	2,60±0,18
10 сут	93,40±0,57	0,40±0,10	1,40±0,33	0,90±0,29	0,40±0,18	0,60±0,18	2,90±0,10
14 сут	89,30±1,84	0,60±0,18	2,40±0,43	0,90±0,18	1,60±0,55	1,10±0,40	2,10±0,48

Анализ лейкограмм показал, что под действием исследуемых препаратов изменяется процентное содержание лейкоцитов в периферической крови опытных рыб, однако достоверные отличия от контрольных особей отмечены в основном на 7 сут после начала курса кормления. В этот срок наблюдения более существенное изменение доли содержания лейкоцитов происходит у карпов, которым давали антибактериальный препарат. Однако этих данных не достаточно, чтобы делать какие-то выводы, кроме одного, что уже после 3-х сут после окончания кормления Антибак 100 и СУБ-ПРО не оказывают влияние на клетки белой крови и происходит стабилизация состава лейкоцитов.

Таблица 3.

Индекс обилия лейкоцитов с Антибаком и СУБ-ПРО

Время отбора проб	Антибак	Субпро
Контроль до опыта	4,98±1,27	4,96±0,47
7 сут	3,58±1,22	6,84±1,28
10 сут	5,72±1,07	9,44±2,75
14 сут	5,30±0,94	8,48±1,48

Исследование индекса обилия лейкоцитов показало, что в обеих опытных группах карпов во все сроки наблюдения возрастает частота встречаемости клеток белой крови, за исключением данных, полученных на 7 сут у рыб, которых кормили Антибаком 100 (табл. 3). После применения СУБ-ПРО, по сравнению с Антибаком 100, данный показатель значительно повышался и на 10 сут почти в 2 раза превосходил данные контрольных рыб. Однако следует отметить, что эти различия статистически не достоверны.

Результаты интегральной оценки характера течения дестабилизационных и дезинтеграционных процессов, происходящих в составе лейкоцитов после курса кормления рыб антибактериальным и пробиотическим препаратами, в целом, соответствует данным, полученным на основе применения критерия Стьюдента. Через 7 сут после начала эксперимента оба структурных индекса показывают отличие структуры лейкоцитов крови в обеих опытных группах (рис). При этом изменения в структуре лейкоцитов после кормления антибактериальным препаратом больше, чем пробиотиком. На 10-е сут исследуемые интегральные индексы

структуры лейкоцитов крови опытных групп не отличаются от контроля, а на 14 сут появляются различия с контролем при кормлении СУБ-ПРО, тогда как при кормлении Антибак 100 их нет.

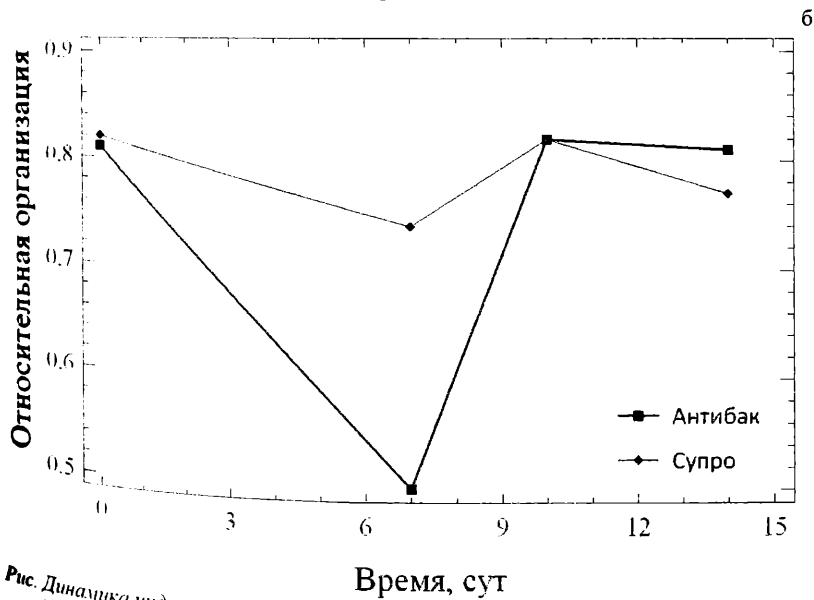
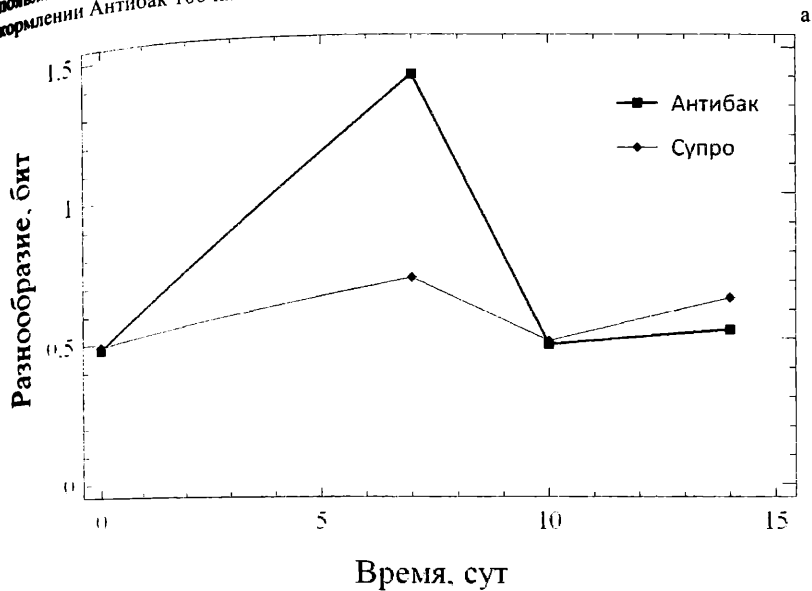


Рис. Динамика индексов разнообразия (а) и относительной организации (б) состава лейкоцитов крови карпа после курса кормления рыб Антибак 100 и СУБ-ПРО.

## Выводы:

1. Антибак 100 и СУБ-ПРО оказывают влияние на состав лейкоцитов только в первые сутки после окончания курса кормления.
2. Под действием СУБ-ПРО увеличивается индекс обилия лейкоцитов, что говорит о положительном влиянии пробиотика на лейкопоэз.
3. После кормления антибактериальным препаратом в структуре лейкоцитов происходят более значительные изменения по сравнению с пробиотиком.
4. Окончательно судить по этим данным о влиянии Антибака 100 и СУБ-ПРО на лейкоциты периферической крови рыб невозможно и для получения полной информации требуются дополнительные исследования, в частности, о влиянии исследуемых препаратов сразу после начала кормления.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н., Хомак А.Г., Скоробогатко О.С. СУБ-ПРО – путь к улучшению качества рыбной продукции // Рыбоводство и рыб. х-во. 2008. № 12. С. 33-35.
2. Воробьев Н.А., Гаврилин К.В., Енгашев В.Г. Опыт применения современных антибактериальных средств // Рыбоводство. 2008. № 2. С. 47.
3. Головкин Г.В., Чистяков В.А., Сазыкина М.А., Зипельт Л.И., Коленко М.А., Сатаров В.В., Шепило В.Ю. Использование пробиотической добавки на основе *Bacillus subtilis* "B-1895" в аквакультуре // Рыб. х-во. 2009. № 5. С. 60-64.
4. Гончарова М.Н. Антимикробный препарат для лечения бактериальных болезней рыб // Вестн. Рос. акад. с.-х. наук. 2009. № 2. С. 77-78.
5. Енгашев В.Г., Орлов В.Т., Просинюк В.И., Трифоном А.М. Новое в борьбе с "краснухой" карпов // Ветеринария. 2005. № 6. С. 18-19.
6. Лукьянова Н.А. Пробиотические препараты и микроорганизмы, обладающие пробиотическими свойствами, применяемые в рыбоводстве // Рациональное использование пресноводных экосистем перспективное направление реализации национального проекта "Развитие АПК": Международная научно-практическая конференция, Москва, 17-19 дек., 2007. М., 2007. С. 177-180.
7. Микряков В.Р., Лапирова Т.Б. Влияние солей некоторых тяжелых металлов на состав белой крови молоди ленского осетра *Acipenser baeri* // Вопр. ихтиологии, 1997. Т. 37, № 4. С. 538-542.
8. Микряков В.Р., Терещенко В.Г., Микряков Д.В. Использование индекса Шеннона для оценки последствий влияния стресс-факторов на структурную организацию состава лейкоцитов рыб // Вопросы рыбоводства. 2005. Т. 6. № 3(23). С. 518-532.
9. Тищенко Н.Н., Руденко Р.А., Пиховкина Т.Г. Применение препарата Антибак 100 в борьбе с заболеваниями рыбы // Тр. Всерос. сов. мол. учен. агра. образ. и науч. учрежд. 2008. 1. С. 179-181.

## INFLUENCE OF ANTIBACTERIAL PREPARATIONS AND PROBIOTICS ON LEUKOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD OF FISHES

T.A. Suvorova, V.G. Tereshchenko, L.V. Balabanova, D.V. Mikryakov

Character influence antibacterial preparation and probiotics on structure of leukocytes of peripheral blood, intensity leukopoiesis and character of a current destabilizations the processes occurring as a part of cages of white blood of fishes is investigated. It is established, that the Antibak 100 and SUB-PRO is caused similar, but by changes of investigated indicators different in intensity.

# ПРИМЕНЕНИЕ ПРОБИОТИКА «СУБ-ПРО» ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ МОЛОДИ КЕТЫ НА ЛОСОСЕВОМ РЫБОВОДНОМ ЗАВОДЕ (КАМЧАТКА)

Е.А. Устименко<sup>1</sup>, Н.Г. Винник<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГУП Камчатский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (КамчатНИРО), г. Петропавловск-Камчатский, Россия  
<sup>2</sup> ФГУ Севострыбвод, г. Петропавловск-Камчатский, Россия, [ustla@mail.ru](mailto:ustla@mail.ru)

При искусственном воспроизводстве тихоокеанских лососей часто складываются условия, благоприятные для проникновения и размножения патогенных бактерий из естественных водоемов на рыбоводные заводы, что приводит к заболеванию выращиваемой молоди рыб. Чаще всего болезни у рыб в аквакультуре вызывают факультативные бактериальные патогены, широко распространенные в окружающей водной среде. Это происходит в результате стрессовых факторов, снижающих резистентность организма рыбы. Применение химиопрепаратов и антибиотиков в аквакультуре часто не только не даёт ожидаемого результата, но и приводит к появлению более агрессивных бактериальных форм.

Альтернативой применению антибиотиков является использование пробиотических препаратов из бактерий, обладающих антагонистическим действием в отношении возбудителей заболевания (Смирнов и др., 1993). Механизм действия пробиотиков направлен прежде всего на вытеснение патогенной микрофлоры кишечника и, как следствие, на нормализацию обмена веществ у рыб, улучшение усвоения корма, повышение резистентности организма (Юхименко и др., 2009). Одним из первых пробиотиков в отечественном рыбоводстве стал лечебно-профилактический препарат «Субалин» («Суб-Про») на основе живых бактерий *Bacillus subtilis*. Он обладает антагонистическим действием в отношении широкого спектра патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, высокой ферментативной активностью, позволяющей регулировать и стимулировать пищеварение, противоаллергенным и антитоксическим действием (Бычкова и др., 2007).

На лосоसेвом рыбоводном заводе Кеткино (КЛРЗ) ежегодно отмечали высокую контаминацию сеголетков кеты бактериальными патогенами — *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Flavobacterium* sp. Повышенный отход, по сведениям рыбоводов, начинался через несколько дней после начала кормления.

Опыт по применению пробиотика «Суб-Про» проводили на КЛРЗ в период с 31 марта по 12 апреля 2010 г. Сеголеткам кеты массой 0,4-0,5 г препарат вводили в корм путем орошения гранул из расчета 1 доза на 50 кг биомассы рыб в течение 10 дней. Отбор проб для бактериологических исследований проводили три раза — за день до начала кормления, на третий день включения в рацион препарата и через три дня после окончания кормления. Единовременная выборка составляла 15 экз. рыб, всего обследовали 90 экз. рыб из двух бассейнов — опытного и контрольного. Температура воды при проведении опыта составляла 3,7-4,0 °С. Ежедневно во время опыта регистрировали отход и изменение массы рыб в опытном и контрольном бассейнах. Из кишечника всех обследованных рыб производили бактериологические посевы на триптоно-соевую питательную среду (TSA). Кроме того, исследовали способность микроорганизмов, содержащихся в препарате «Суб-Про», к культивированию на среде TSA при разных температурных режимах: 3, 7, 21 °С. Оценку статистической значимости полученных данных проводили с помощью критерия Стьюдента (t) при уровне достоверности  $p \leq 0,05$ .

По результатам бактериологических исследований качественный состав микрофлоры кишечника рыб не отличался у рыб из опытного и контрольного бассейнов в течение всего периода исследований и был представлен в большинстве бактериями рода *Pseudomonas*, в том числе *P. fluorescens*. Количество рыб, в кишечнике которых выявили условно-патогенные бактерии *P. fluorescens*, в опытном и контрольном бассейнах статистически значимо не различалось ( $t=1,5$ , при  $t_{кр}=2,78$ ,  $p \leq 0,05$ ) (рисунок 1).

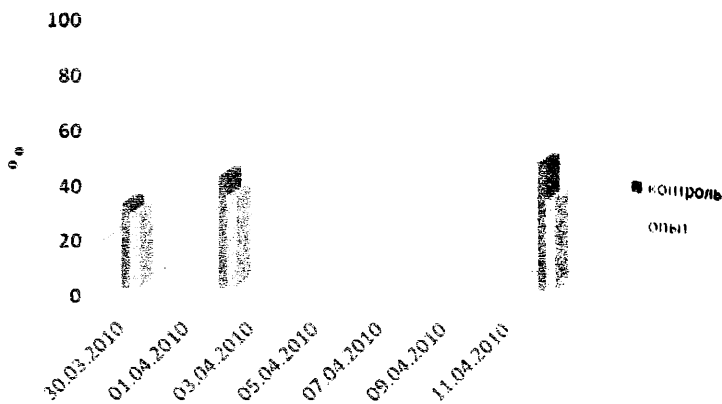


Рисунок 1. Встречаемость (%) рыб-носителей *P. fluorescens* в кишечнике рыб при трех отборах

Анализ рыбоводно-биологических показателей, полученных в ходе опыта, позволяет утверждать, что введение в корм сеголеток кеты пробиотика «Суб-Про» не повлияло статистически значимо ( $t=0,5$ , при  $t_{кр}=1,97$ ,  $p \leq 0,05$ ) на уровень выживаемости (рисунок 2) и на изменение массы ( $t=0,1$ , при  $t_{кр}=2,23$ ,  $p \leq 0,05$ ) рыб (рисунок 3).

При исследовании способности микроорганизмов, содержащихся в препарате «Суб-Про», к культивированию на питательной среде при разных температурных режимах выявили, что через 24 часа инкубации бактерии росли только при температуре 21 °С. После перемещения чашек с посевами с низких температур (3 и 7 °С) в термостат с температурой 21 °С через сутки регистрировали обильный рост колоний микроорганизмов.

Известно, что для микроорганизмов *Bacillus subtilis* оптимальная температура роста 37 °С. Возможен рост в диапазоне температур 4-60 °С. Температура воды 3,7-4,0 °С, при которой проводили опыт, далека от оптимальной. Существуют данные об отсутствии роста при 8 °С микроорганизмов из пробиотических препаратов «Субалин» и «Ветом», являющихся аналогами «Суб-Про» (Панасенко, 2006).

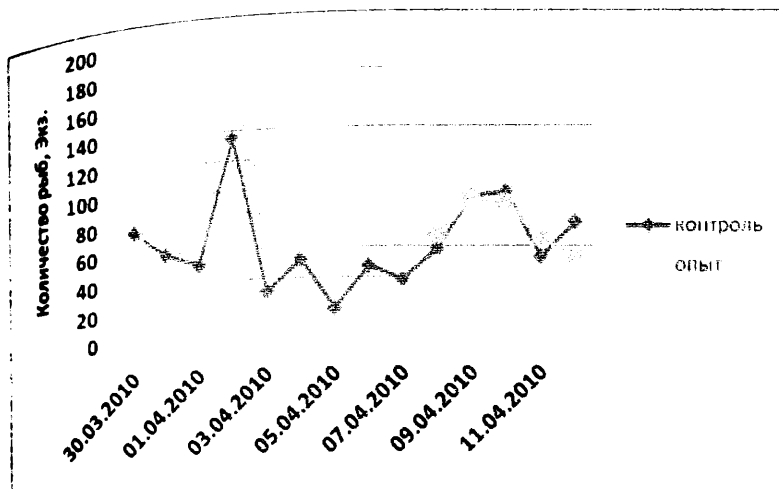


Рисунок 2. Ежедневный отход (экз.) рыб в опытном и контрольном бассейнах за период исследования

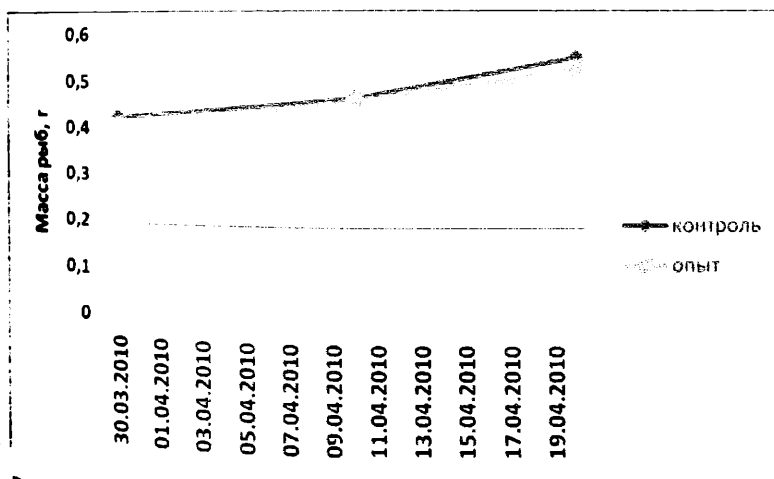


Рисунок 3. Изменение средней массы рыб в опытном и контрольном бассейнах за период исследования

Таким образом, по результатам проведённого опыта мы не выявили выраженного влияния пробиотика «Суб-Про» на состав микрофлоры кишечника, уровень выживаемости и изменение массы тела сеголетков кеты на КЛРЗ, что, возможно, объясняется подавлением активности микроорганизмов *Bacillus subtilis* за счёт низкой температуры воды в бассейнах лососёвого рыбоводного завода.

### Список литературы

1. Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н., Ходак А.Г. Пробиотический препарат «Суб-Про» (Субалин): профилактика и лечение бактериальных болезней рыб // Рыбоводство. 2007. № 2. С. 33-35.
2. Панасенко В.В. Оценка микробиологических показателей используемых в кормах при выращивании рыб (субтилис, ветом, субалин) // Сб. тез. докл. междунауч. конф. «Состояние и перспективы развития фермерского рыбоводства арктической зоны». Ростов-на-Дону: изд-во ЮНЦ РАН. 2006. 112 с.
3. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. и др. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков и бактерий рода *Bacillus* // Микробиологический журнал. 1993. Вып. 55 (4). С. 92-112.
4. Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И., Зюкин А.Н., Климов А.В. Профилактика бактериальной геморрагической септицемии с использованием «Субалина» (на примере ОАО «Бисеровский рыбокомбинат») // Рыбное хозяйство. 2009. № 1. С. 86-88.

#### UTILIZATION OF PROBIOTIC PREPARATION "SUB-PRO" FOR CHUM SALMON FRY WERE RAISING AT THE SALMON HATCHERY (KAMCHATKA)

E.A. Ustimenko, N.G. Vinnik

The results of our investigation revealed that the probiotic preparation "SUB-PRO" had no influence on the intestinal microflora, survival rate, or body weight of chum salmon fry.

# ДИЯ V. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ОСОБИ, ПОПУЛЯЦИЙ И ЭКОСИСТЕМ

## ОЦЕНКА ЭПИЗООТИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ФОРЕЛЕВОГО РЫБОВОДНОГО ХОЗЯЙСТВА «ПРИБРЕЖНОЕ» (КАЛИНИНГРАДСКАЯ ОБЛАСТЬ)

Е.В. Авдеева\*, О.В. Казимирченко

*инградский государственный технический университет, Калининград, Россия*  
\*elavd@mail.ru

На всех этапах рыбоводного процесса качество получаемой рыбопродукции от условий содержания рыбы, степени интенсификации производства, работы очистного и обеззараживающего оборудования и других факторов. Плотность этих факторов определяет формирование микробного сообщества рыбы и среды её обитания, в состав которого входят как сапрофитные, условно-патогенные группы микроорганизмов. Смена членов микробного сообщества указывает на нарушения, допущенные в технологической схеме выращивания рыбы. При этом резистентность рыбы к болезнетворным агентам повышается, и это может привести к вспышке инфекционных болезней рыб в п.с.

Мониторинг эпизоотической ситуации в отношении бактериальных заболеваний форели на форелевом рыбоводном хозяйстве «Прибрежное» Калининградской области сотрудниками ихтиопатологической лаборатории Калининградского государственного технического университета проводится на протяжении почти двадцатилетнего периода. Бактериологические исследования – плановые, по результатам которых оценивается не только благополучие по отношению к патогенным инфекциям выращиваемой на хозяйстве форели, но и санитарно-эпидемиологическое состояние воды и грунтов, которые относятся к основным путям передачи инфекционного начала.

Хозяйство расположено в водоёме, образованном после выработки песчаного карьера у посёлка Прибрежное. Карьер Прибрежный (озеро Форелевое) – искусственный солоноватоводный водоём, площадью 100 га, глубиной в среднем 12 м. Система водоснабжения озера – подземные воды и артезианский колодец, расположенный выше форелевого хозяйства. Вода из колодца проходит через ёмкости, в которых выращивается молодь, после чего сбрасывается в водоём. Какое-то количество воды приносится атмосферными осадками, стоком с окружающей заболоченной местности, водообменом с соседними карьерами.

Форелевое рыбоводное хозяйство «Прибрежное» – полносистемное хозяйство типа. Основное направление работы хозяйства – выращивание и реализация посадочного материала радужной форели, а также выращивание форели маточного стада форели. Другими объектами культивирования на хозяйстве являются русский и сибирский осетры и карпы койя.

Для санитарно-бактериологических исследований ежегодно сезонно выращивают форель разных возрастных групп, пробы воды и грунта из садков. Плановые бактериологические посева осуществляли на селективные питательные среды общего назначения. При анализе проб воды и грунтов использовали 10-кратных серийных разведений на стерильном рыбобептонном бульоне. Принадлежность выделенных бактерий устанавливали по биохимическую



совокупности культуральных, морфологических и физиолого-биохимических признаков согласно определителю бактерий Берджи (Определитель..., 1997).

В результате проведенных бактериологических исследований в составе микрофлоры форели всех возрастных групп было выявлено доминирование условно-патогенных бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*. Аэромонады чаще всего обнаруживали в посевах кожи и содержимого заднего отдела кишечника. Небольшое число штаммов бактерий рода *Aeromonas* выделяли из посевов печени, желчного пузыря и почек. В отдельные годы исследований количество аэромонад снижалось до единичной встречаемости. Бактерии рода *Pseudomonas* обсеменяли внутренние органы форели, причём было выявлено преобладание неферментирующих глюкозу псевдомонад. В осенние периоды исследований у форели постоянно регистрировали признаки септического процесса: разжиженные микробиоценозы этих органов полностью был представлен псевдомонадами.

По итогам исследований среды обитания рыбы было также установлено преобладание в микрофлоре воды и грунта условно-патогенных бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*. Следовательно, можно заключить, что вода и грунт озера Форелевого – основные пути обсеменения органов форели потенциальными возбудителями бактериальных инфекций.

Следует отметить, что в последние годы увеличился антропогенный прессинг на озеро, где расположена садковая линия. Озеро активно используется в рекреационных целях. На небольшом удалении от хозяйства организованы пляжи для отдыха людей, установлены многочисленные кафе, сброс стоков от которых осуществляется без какой-либо очистки непосредственно в озеро. Индикатором повышенной органической нагрузки на водоём и санитарного неблагополучия является частая встречаемость в микробиоценозах рыбы и среды её обитания санитарно-значимых бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. В летние сезоны из микрофлоры воды и грунта постоянно высевали бактерий родов *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*. Эти же бактерии обсеменяли кожу и желудочно-кишечный тракт форели.

Таким образом, по результатам проведённого многолетнего мониторинга эпизоотического состояния форелевого рыбоводного хозяйства «Прибрежное» Калининградской области нами не было зарегистрировано вспышек бактериальных инфекций у выращиваемой форели. Однако постоянное присутствие в микрофлоре внутренних органов рыбы и среды её обитания потенциально опасных грамотрицательных бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* определяет необходимость систематического икhtiопатологического контроля на хозяйстве. Во избежание эпизоотий следует не допускать стрессовых ситуаций в процессе выращивания форели, своевременно проводить ветеринарно-санитарные мероприятия, улучшать иммуно-физиологическое состояние рыбы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж.Хоулта и др. - М.: Мир, 1997. Т.1. - 432с.

### THE EPIZOOTIC SITUATION OF TROUT FISH FARM «PRIBREZHNOE» (KALININGRAD REGION)

E.V. Avdeeva, O.V. Kazimirchenko

Monitoring of the epizootic situation concerning the bacterial diseases of rainbow trout on the trout fish farm «Pribrezhnoe» was carried out. The predominance of gram-negative bacteria of *Aeromonas* and *Pseudomonas* genera in fish, water and soil microflora was established. The sanitary bacteria of *Enterobacteriaceae* family revealed in internal organs of rainbow trout, water and soil was the indicator of anthropogenic press on the lake used for fish farming.

Н.М. Аршаница, А.А. Стекольников

Федеральное государственное научное учреждение «Государственный научно-исследовательский институт озерного и речного рыбного хозяйства», г. Санкт-Петербург, Россия, [toxiciorh@mail.ru](mailto:toxiciorh@mail.ru)

Токсикозы рыб получили широкое распространение как в естественных водоемах, так и на предприятиях аквакультуры, вызываемое ими замедление темпа роста рыб, нарушение их воспроизводства, развитие иммунодефицита, ухудшение товарных качеств и гибель наносит большой ущерб рыбному хозяйству.

Главным условием успешной борьбы с токсикозами является правильная постановка диагноза заболевания и причины гибели рыб в рыбоводных хозяйствах и естественных водоемах, установление основного действующего фактора и источника его поступления.

В настоящее время диагностика токсикозов представляет сложную комплексную оценку состояния рыб с учётом степени выраженности патологического процесса и прогноза его исхода, включая оценку состояния иммунной системы и способности к воспроизводству. При этом большое значение приобретает дифференциальная диагностика токсикозов от инфекционных, паразитарных и алиментарных болезней. Здесь же необходимо отметить, что рыба относится к основным продуктам питания человека и при оценке её состояния необходимо учитывать требования ветеринарно-санитарной экспертизы.

Диагностика токсикозов рыб в естественных водоемах и рыбоводных хозяйствах различается ввиду ряда условий. В частности, на развитие патологического процесса в условиях аквакультуры оказывают существенное воздействие такие факторы, как монокультура, скученность, использование искусственных кормов, самозагрязнение, травматизация, стрессовые ситуации и т.д. Нередко высокий уровень фоновой загрязненности источника водоснабжения рыбоводного предприятия вносит свои трудности в дифференциальную диагностику ввиду влияния этого фактора на течение и исход других болезней. Особенно этот фактор важен в случаях, когда источником водоснабжения являются сбросные теплые воды электростанций, где поступления загрязняющих веществ носит временный характер, поэтому закономерности их воздействия на рыб существенно отличаются от тех, которые выявляются приемами классической водной токсикологии. В данной ситуации для оценки токсического воздействия загрязняющих веществ вместо традиционно используемого принципа ПДК наиболее адекватным представляется принцип ПДРК (предельно допустимой разовой концентрации).

В естественных водоемах при исследованиях токсикозов рыб также необходимо учитывать ряд специфических особенностей. Так, акватория обнаружения пораженных рыб, как правило, больше акватории токсического действия, что связано с их способностью к активному перемещению. Особо следует учитывать кормовые, сезонные, нерестовые и так называемые вынужденные миграции рыб, их видовые особенности и этапы развития, а также способность рыб при некоторых типах загрязнения покидать загрязняемые акватории. При кормовых миграциях нередко случаи захода рыб из благополучных в токсикологическом отношении участков водоема на загрязняемые акватории, особенно в случае поступления в них органических веществ и биогенных элементов, которые способствуют развитию кормовых организмов за счет видов, устойчивых к

загрязнению. Вынужденные миграции рыб обусловлены гидрохимического, гидрологического и токсикологического режимов в водоеме. Нарестовые миграции, особенно проходных или полупроходных рыб, сопровождаются проявлением токсикоза не только у маточного стада, но и у кумулятивных токсикозов при действии различных стресс-факторов способствующих переходу токсикантов из депонированного состояния и вовлечению их в обменные процессы.

Необходимо учитывать и такой фактор, особенно значимый для рек, как спонтанное поражение ослабленных рыб из зоны токсического действия на большие расстояния при действии токсикантов наркотического и нервно-паралитического действия.

Диагностика токсикозов рыб требует комплексного подхода и включает в себя такие методы оценки, как эпизоотологический, клинический, патологоанатомический, химико-аналитический, гистологический, органолептический, гематологический и другие.

Практически чаще всего используются первые четыре, а первые три из них, используемые непосредственно на водоеме и не требующие специальных условий и оборудования, являются экспресс-методами. Особенно важное практическое значение приобрел патологоанатомический метод как результативный и пригодный для обследования крупных водоемов в короткие сроки.

Важное значение в отдельных случаях имеет и эпизоотологический метод, который предусматривает сбор анамнестических данных с начала заболевания и гибели рыб, оценку видовых, возрастных и сезонных особенностей поражений.

Учитывая, что токсикозы в настоящее время стали одним из лимитирующих факторов воспроизводства рыбных запасов, патологоанатомический метод можно использовать при оценке промыслового потенциала популяций рыб, прогнозировании их запасов и уловов на перспективу. Материалы наших исследований в природных и заводских условиях показали, что токсикозы являются основной причиной нарушения процессов воспроизводства рыб с длительным инкубационным периодом, в частности, лососевых и сиговых. В естественных водоемах они вызывают существенное снижение запасов этих ценных видов рыб, на предприятиях аквакультуры создают проблемы в получении качественного посадочного материала.

Различают острое и хроническое течение токсикоза. Первое проявляется обычно при залповых поступлениях токсичных веществ, чаще всего в результате техногенных аварий, и сопровождается массовой гибелью рыб, второе связано с воздействием комплекса токсикантов в концентрациях значительно ниже летальных и типично для рыб, обитающих в водных объектах, подверженных антропогенному воздействию.

При диагностике острых токсикозов следует выяснить, что предшествовало заболеванию и гибели рыб: выпадение осадков, появление визуально наблюдаемых загрязнений (пенные образования, пленка, взвеси, запах от воды и пр.). В этом случае проводится токсикологическая оценка акватории и прилегающих к ней территорий, выявление потенциальных источников загрязнения. Особое внимание острого отравления рыб являются такие особенности, как внезапность и поражение всех видов и возрастных групп рыб независимо от сезона года. Кроме рыб поражаются и другие водные организмы.

Хронический токсикоз проявляется также у всех видов рыб, но в этом случае проявляется видовая специфичность устойчивости к токсикантам. Так, наиболее

чувствительны к воздействию большинства загрязняющих веществ (за исключением мильных) сиговые и лососевые рыбы.

Анализ эпизоотических и анатомических данных при исследовании козов помогает не только выявить источник загрязнения, но и целенаправленно поиск основных действующих токсикантов. За клиническим состоянием рыб можно проследить в рыбоводных хозяйствах, особенно при бассейновом и садковом выращивании и в естественных водоемах при действии токсикантов нервно-паралитического, наркотического действия и некоторых других. При этом обращают внимание на координацию движений и гидростатическое равновесие рыб, реакцию раздражителя.

Для объективной оценки патологоанатомических изменений в органах и тканях рыб необходимо понятие об относительной норме и её сезонных вариациях, а также представление о визуально наблюдаемых изменениях в организме рыб при остром и хроническом воздействии токсикантов разного типа действия, а также о причинах другой причины для проведения дифференциальной диагностики (Лесников, 1970, 1978).

Патологоанатомические методики до настоящего времени не разработаны и в целом недостаточно разработаны. Для ориентировочной качественной оценки результатов патологоанатомического состояния рыб нами разработана пятибалльная оценка выявленных повреждений в органах и тканях (Лесников, 1987).

Попытки унифицированных оценок состояния рыб по балльной системе принимались и другими исследователями (Решетников, 1994; Моисеенко, 1997; Лин и др., 1999). Они предложены для водоемов Заполярья, где реакция рыб на действие загрязняющих веществ обострена, и оказались достаточно эффективны и информативны, особенно в отношении чувствительных видов рыб. Была предложена балльная оценка состояния рыб: легкие, средние и тяжелые повреждения рыб с разным исходом (Кашулин и др., 1999). Ранее на основании многолетних исследований Т.И. Моисеенко (Моисеенко, 1997) была предложена и обоснована балльная оценка состояния рыб, однако ее использование связано с наличием ряда условий (Лукин и др., 2000).

Гистологический метод оценки состояния рыб давно используется в водной биологии и связан с проведением лабораторных исследований. Он показателен для выявления патологий и дисфункций органов и тканей рыб, так как морфологические изменения являются следствием нарушений деятельности организма на физиологическом и биохимическом уровне. Гистологические исследования важны для дифференциальной диагностики токсикозов рыб и заболеваний (особенно вирусных), алиментарных и иных патологий. Для качественной оценки нарушений, отмечаемых при гистологических исследованиях, выделено пять категорий (баллов) степени опасности повреждений (Лесников, Чинарева, 1987).

Для выявления веществ, вызывающих токсикозы, проводят химико-биологические исследования воды, донных отложений и рыб. Количественный и качественный анализ токсикантов, накапливающихся в тканях и внутренних органах рыб, позволяет дополнить картину, установленную другими методами диагностики токсикозов. При анализе рыб необходимо учитывать их способность к кумуляции загрязняющих веществ. При остром токсикозе наиболее показательными являются результаты анализов воды, при хроническом – рыб.

Анализ должен проводиться целенаправленно – исходя из анamnстичеcких данных, позволяющих ориентировочно предположить, к какой группе веществ, вызвавшие патологические изменения.

Для диагностики отравления рыб и токсичности водной среды важны такие органолептические исследования, так как многие токсиканты придают воде и рыбам специфический запах и привкусы. Методом дистилляции можно «сконцентрировать запахи», что повышает порог их восприятия.

Опыт показывает, что определение количественного и качественного содержания токсикантов, накопленных в органах и тканях рыб, – весьма сложная задача. Диагностика токсикозов рыб только на основании химико-аналитического исследования осложнена ещё и тем, что обычно мы имеем дело с комплексом различных токсикантов и условий среды, одновременно воздействующих на организмы рыб. Для выделения преобладающего действия какого-либо из них в каждом конкретном случае необходимо проведение всесторонних исследований с учетом результатов различных методов диагностики.

Таким образом, патологоанатомическое исследование рыб в сочетании с эпизоотологическими и химико-аналитическими данными дает возможность поставить диагноз заболевания и гибели рыб, выделить основную причину выявленной патологии, оценить состояние рыб с позиций ветеринарно-санитарной экспертизы, определить акваторию токсического действия и выявить основной источник загрязнения.

Комплексные исследования на водоемах подтвердили, что использование рыб как биоиндикаторных организмов для оценки качества среды их обитания обосновывается данными токсикологических и гидробиологических исследований (Влияние загрязнений на экосистему Ладожского озера, 1988; Аршаница и др., 2004), а сопоставление различных методов биологического анализа качества вод показало, что результаты патологоанатомического и патоморфологического исследования рыб являются наиболее адекватным показателем эколого-токсикологического состояния водоема (Макрушин и др., 1989).

В частности, использование рыб как биоиндикаторных организмов для оценки среды их обитания успешно использовано на водоемах Заполярья. Полученные результаты дали возможность оценить условия среды обитания, состояние организма рыб, органы-мишени, выявить специфические патологии, что в свою очередь позволило понять причины изменений в популяциях рыб, объективно оценить эколого-токсикологическую ситуацию в водоеме, определить основной тип загрязнения и выявить его источник. Успешное использование рыб как биоиндикаторных организмов для оценки качества вод применяется в отечественной и в зарубежной практике (Аршаница, 1990; Браун, 1997; Кашулин и др., 1999; Моисеенко, 2009; Adams, Ryon, 1994; Cash, 1995; Attrill, Depledge, 1997 и др.).

Исходя из оценки патологоанатомического состояния рыб как индикаторных организмов, полагаем, что уже сейчас в первом приближении (ориентировочно) можно характеризовать уровень загрязнения водного объекта, используя пятибалльную шкалу их поражения (Аршаница, Лесников, 1987):

- 1 балл – не отмечено загрязнения;
- 2 балла – слабо выраженный сублетальный уровень загрязнения;
- 3 балла – выраженный условно сублетальный уровень загрязнения;
- 4 балла – хронически летальный уровень загрязнения;
- 5 баллов – остро летальный уровень загрязнения.

Состояние водоема, оцениваемое 1 баллом, полагает возможным рeшить этологического характера со стороны рыб.

При загрязнении водоёма на уровне 2 баллов изменения у рыб обратимы, гибели не наблюдается.

При загрязнении на уровне 3 баллов возможно нарушение процессов воспроизводства рыб с длительным инкубационным периодом (сиговые, лососевые) и незначительная гибель наиболее пораженных особей среди чувствительных видов при действии стресс-факторов.

При загрязнении, характеризуемом 4 баллами, наблюдается нарушение воспроизводства рыб, значительная гибель рыб, приобретающая массовый характер при действии дополнительных стресс-факторов.

При остролетальном уровне загрязнения (5 баллов) наблюдается массовая гибель различных видов рыб и других водных организмов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аршаница Н.М. Методика патологоанатомического исследования в водной токсикологии // Памятная записка о симпозиуме по водной токсикологии (СЭВ) Л. 1970.; - С. 96-98.
2. Аршаница Н.М., Лесников Л.А. Патоморфологический анализ состояния рыб в полевых условиях. Методы ихтиотоксикологических исследований. - Л. 1987; - С. 7-9.
3. Аршаница Н.М. Дифференциальная диагностика некоторых инфекционных болезней и токсикозов рыб. // Тезисы докладов Всесоюзного семинара «Пути изучения состояния рыбоводных хозяйств и мероприятия по профилактике инфекционных болезней в рыбоводных хозяйствах». - Л. 1978 - С. 17-18.
4. Аршаница Н.М. Рыбы как индикаторы качества вод // Материалы Всесоюзной конференции «Методология экологического нормирования». - Харьков, 16-20 апреля 1990 г. Часть 2. Секция 3. Харьков, 1990, - С. 36-37.
5. Аршаница Н.М., Пидгайко М.Л., Соболев К.Д., Филатова Т.Н. Ихтиотоксикологическое состояние озер-охладителей АЭС как интегральная характеристика экосистемы // Доклады VI Всероссийского Гидрологического съезда. 28 сент. - 1 окт. 2004. - СПб. Секция 4. Москва гидрометиздат., - С. 86-91.
6. Браун В.М. Рыбы как индикаторы качества вод. в кн.: Научные основы контроля поверхностных вод по гидробиологическим показателям. - Л. 1977., - С. 194-206.
7. Влияние загрязнений на экосистему Ладожского озера // Сборник трудов ГосНИОРХ, вып. 285, - Л. 1988. - С. 138.
8. Кашулин Н.А., Лукин А.А., Амундсен П.А. Рыбы пресных вод Субарктики как биомониторинг техногенного загрязнения. - Апатиты, 1997, - С. 142.
9. Лесников Л.А., Чинарева И.Д. Патолого-гистологический анализ состояния рыб при полевых и экспериментальных токсикологических исследованиях. Методы ихтиотоксикологических исследований. - Л. ГосНИОРХ, НПО Промрыбвод, 1987. - С. 79-80.
10. Лукин А.А., Даувальтер В.А., Новоселов А.П. Экосистема Печеры в современных условиях. - Апатиты 2000, - С. 192.
11. Макрушин А.В., Аршаница Н.М., Моисеенко Т.К., Чинарева И.Д., Сношкина Е.В. Совокупление результатов применения разных методов биологического анализа качества вод // Сборник научных трудов ГосНИОРХ 291 «Экология и запасы рыб во внутренних водоемах РСФСР». - Л. 1989. - С. 117-123.
12. Моисеенко Т.К. Теоретические основы нормирования антропогенных нагрузок на водоемы Субарктики. - Апатиты: Кол. Науч. центр РАН, 1997, - С. 261.
13. Моисеенко Т.К. Водная токсикология. - М. Наука, 2009. - С. 399.
14. Решетников Ю.С. Методы экспертной оценки состояния особи и популяции сиговых рыб. Биология и биотехника разведения сиговых рыб. - СПб: ГосНИОРХ, 1994, - С. 115-118.
15. Adams S.M., Ryon M.G. A comparison of health assessment approaches for evaluating the effects of contaminant - related stress on fish populations // Aquatic Ecosist. Health, 1994, vol. 3. - P. 15-25.

16. Attrill M.J., Depledge M.H. Community and population indicators of Ecosystem health: targeting links between levels of biological organization // *Aquat.Toxicol*, 1997, vol. 38. - P. 183-197.
17. Cash K.J. Assessing and monitoring aquatic ecosystem health – approaches using individual, population, and community ecosystem measurements // N.O. Northern River Basins Study Project Report, 1995. - P. 68.

### **FISH TOXICOSES DIAGNOSTICS FOR ESTIMATION OF THEIR HABITAT**

**N.M. Arshanitsa, A.A. Stekolnikov**

Toxicosis fish are widespread both in natural waters, and on aquaculture. Diagnosis of toxicosis of fish is different in natural waters and fish farms. Mortem examination of fish should be carried out simultaneously with the chemical analysis of water and fish. The evaluation mortem status of fish can be roughly characterized by the level of water pollution

М.А. Банникова, А.В. Новосадова

ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного  
хозяйства и океанографии», Москва, Россия  
mailkova@yandex.ru

Показано, что некоторые биологические показатели и фенотип потомков данио рерио, модифицированного генами цветных (зеленого и красного) белков морских беспозвоночных животных Типа Кишечнополостные, отличаются от немодифицированных рыб. Вишневые, серые и розовые потомки фертильны, мутационны по окраске, демонстрируют модифицированную окраску не только в ультрафиолетовом, но и видимом диапазонах спектра, их размеры варьируют шире, чем у дикой формы. Исключение составляет тугорослый розовый вариант, утративший пигменты дикой формы. Розовые потомки достоверно мельче вишневых и серых. Все ГМ-особи устойчивы к антибиотикам.

Данио *Danio* (sin *Brachydanio*) *rerio* (рыба-зебра, зебра, "дамский чулочек", zebrafish), широко популярен не только как аквариумная рыба, но и как модельный объект биологии развития. После получения трансгенных линий (пород, вариантов) этого вида его стали активно использовать не только в эмбриологии, но и в других направлениях экспериментальной биологии и медицины: эндокринологии, канцерогенезе, фармацевтике, молекулярной и медицинской генетике, мутагенезе, биохимии, водной токсикологии, геномике, протеомике и др. (Gibbs, Peck, Thorgaard, 1994; Winn, 2006; www.zebrafish2009.org).

Цветные линии генетически модифицированного данио рерио также уже используются в аквариумном рыбоводстве с эстетическими, декоративными целями, и они являются первыми домашними животными с таким геномом. Модифицированная вначале по гену зелёного белка морской медузы *Aequorea victoria* - green fluorescent protein или GFP (Shimomura, Johnson, Saiga, 1962), эта медленно невзрачная рыбка с темно-синими продольными полосами на теле приобрела несвойственную ей зелёную окраску, вначале видимую только в ультрафиолетовом свете. После последующего внедрения в её геном другого гена, кодирующего красный флуоресцентный белок морской актинии *Discosoma sp.* - red fluorescent protein, или RFP (Matz, et al., 1999), появились красные данио, например, породы красного цвета «Почная жемчужина». Рыбы цветных ГМ-линий *Danio rerio*, окрашенные в зелёный, красный, оранжевый и другие цвета, известны под коммерческими названиями Glofish, ТК-1, ТК-2, ТК-3 и др. (www.vitawater.ru/aqua/papers/gm-fish3.shtml). В распоряжении аквариумистов России имеются ГМ-данио не только перечисленных выше окрасок, но и других цветов: желтые, розовые и вишневые, что, по-видимому, определяется специфическим типом наследования интегрированных в их хромосомы генов *gfp* и др.

Первые цветные трансгенные данио в качестве декоративных аквариумных рыб появились в продаже уже в 2003 г., вначале в стране происхождения - Тайване, затем в других азиатских государствах (Pandian, 2001), в США, а с 2005 г. - в России. Официальные производители этих рыб - тайваньская корпорация Тайконг (Taikong Corporation) и американская компания Yorktown Technologies LP (штат Техас) (www.vitawater.ru/aqua/papers/gm-fish3.shtml).



Учитывая ГМО-статус данео, в целях соблюдения экологической безопасности и сохранения биоразнообразия природных экосистем, его цветковые варианты запрещены для использования в ряде стран мира (Евросоюзе, Канаде, некоторых штатах США, например, Калифорнии), как и ряд других генетически модифицированных видов растений и животных. Невзирая на запрет, эти сорта декоративно и коммерчески привлекательные аквариумные рыбы во второй половине 2000-х годов стали обнаруживаться в зоомагазинах ряда стран Европы, например, в Нидерландах, где в 2006 г. было зафиксировано в продаже 1400 флуоресцентных особей этого вида (VROM-Inspectie..., 2008). Этот бизнес весьма выгоден: стоимость одной Glofish около пяти долларов США ([www.glofish.com](http://www.glofish.com)).

Данио рерио известен в России более века: любители дважды завозили его для аквариумного содержания, в 1905-1906 и в 1950 гг. (Ильин, 1965). Много внимания было уделено ему аквариумистами стран Европы (Sterba, 1974), так что многие черты биологии, размножение и развитие, поведение этого вида рыб были подробно изучены ещё до эпохи получения его трансгенных линий, т.е. до начала третьего тысячелетия.

Несмотря на высокую степень изученности генома и молекулярной биологии генов ГМ-особей данео рерио, особенности его биологии и свойства как новой породы рыб практически не исследованы. Полагаем, что в силу наличия в его геноме множества копий новых экспрессируемых генов и обеспечивающих экспрессию дополнительных нуклеотидных последовательностей (входящих в состав генных каскад), явления сцепленности и плейотропности генов, воздействия искусственного отбора и селекции, некоторые фенотипические показатели и свойства ГМ-данео могли видоизмениться.

Цель настоящего исследования - оценка некоторых биологических свойств, окраски и размерно-массовых показателей ГМ-данео. Объектами послужили полученные в аквариальных условиях (Ильин, 1965) потомки ГМ-данео в возрасте двух месяцев, выращенные от второго нереста ГМ-производителей. Рыб содержали в 200-литровых аквариумах с принудительной аэрацией при температуре воды 25,7°C, pH 8.0. Анализу подвергнуты особи трех цветовых вариантов (n=60), появившихся в их потомстве: близкого к "дикому" серо-синего (grey), вишневого (cherry) и розового (pink).

Результаты проведенного нами успешного нереста еще раз подтверждают, что ГМ-данео и их потомки фертильны, хотя исходно ГМ-данео были сконструированы триплоидными, т.е. бесплодными ([www.vitawater.ru/aqua/papers/gm-fish3.shtml](http://www.vitawater.ru/aqua/papers/gm-fish3.shtml)). Среди аквариумистов Украины и России - стран, где профессиональная компетентность рыбодоводов-любителей крайне высока, этот факт уже известен. Вместе с тем, по наблюдениям российских аквариумистов, производители ГМ-данео цветных линий оставляют не более двух поколений потомства. Кроме этого, по их экспертным неопубликованным данным в случае возникновения у ГМ-данео заболеваний он и не поддается лечению антибиотиками.

По нашим наблюдениям, разноцветная окраска этих ГМ-рыб, исходящая, проявляющаяся только при освещении ультрафиолетовым светом, теперь видна невооруженным глазом как при бытовом (офисном, домашнем), так и в аквариальных условиях и при природном освещении. Наибольшую часть в исследованной генерации цветных потомков ГМ-данео составляют особи вишневого окраски, меньше - серых, а розовые крайне редки.

Окраска культивируемых аквариумистами потомков дикого данео, завезённого в Россию из водоёмов восточного побережья Передней Индии, в целом

серая и прежде всего характеризуется наличием на теле чередующихся продольных полос темно-синего и желтого цветов, причем темные полосы имеются также на спинном, анальном и хвостовом плавниках, а на брюшном их нет (Ильин, 1965; Расс, 1971; Sterba, 1974), радужка глаз серебристая.

Серые потомки ГМ-данио (grey), восходящие по окраске к дикому типу, сохраняют на теле, анальном и хвостовом плавниках 5 темно-синих боковых полос с гуаниновым блеском, жаберные крышки не окрашены, также с гуаниновым блеском. По дорзальной поверхности тела проходит тонкая полоса, блестящая до начала спинного плавника и телесная до конца тела. Радужка глаз серебристая.

Вновь приобретенная окраска ГМ-cherry-особей данио сформирована окрашенными в вишневый цвет мышцами тела, однако 5 боковых полос сохраняют "дикой" синеватый цвет и гуаниновый блеск, между которыми на фоне тела вишневого цвета расположены три тонкие телесные полосы, появившиеся de novo. Жаберные крышки и радужка серебристые, плавники телесные с 5 синими блестящими полосами, как у рыб с "дикой" окраской. Дорзальная полоса окрашена как у grey-особей.

У pink-потомков ГМ-данио все тело полностью окрашено в розовый цвет, за исключением имеющих гуаниновый блеск головы, жаберной крышки и радужки, телесных боковых полос и всех плавников; темных полос и гуанинового блеска нет.

Как известно, темно-синий цвет боковых полос определяется расположенными под эпидермисом в верхнем слое собственно дермы меланофорами с пигментом зумеланином, желтый - лежащими в собственно дерме ксантофорами (с пигментом лютеином) и эритрофорами (с пигментом астаксантином), а серебристо-белый, переходящий в синевато-фиолетовый, сине-зеленый цвета - расположенными в особом нижнем слое дермы - аргентеуме, гуанофорами (иридофорами) с кристаллами гуанина (Микулин, 2000). Таким образом, окраска дикого вида сформирована только пигментами, располагающимися в покровных тканях. В формировании же окраски потомков ГМ-данио разного цвета принимают участие в разных сочетаниях как присущие дикой форме пигменты, расположенные в покровных тканях, так и локализованные, по-видимому, в мышцах зеленый и красный белки-люминофоры, синтезируемые транслоцированными генами. На основании приведенного описания можно заключить, что окраска цветковых вариантов у потомков ГМ-данио, как и некоторые другие признаки трансгенных рыб, формируется в результате мозаичного наследования (Pandian, 2001). После фиксации в 4%-ном формальдегиде особи всех цветных вариантов утрачивают окраску.

Размер диких особей *Danio rerio* и их культивируемых генетически модифицированных потомков небольшой: длина тела в половозрелом состоянии варьирует от 4 до 6 см (Ильин, 1965; Расс, 1971), т.е. различается в 1.5 раза.

Средние размеры особей разной окраски различаются и между собой. Самыми мелкими оказались ГМ-данио розового цвета (TL  $18.3 \pm 0.5$  мм, масса  $42.6 \pm 3.03$  мг), наиболее крупными - серые (TL  $21.8 \pm 0.82$  мм, масса  $80.5 \pm 10.21$  мг), вишневые по длине и массе и близки к серым особям с "дикой" окраской (TL  $21.7 \pm 0.95$  мм, масса  $75.9 \pm 8.64$  мг). Особи розовой окраски достоверно отличаются по длине и массе от серых и вишневых (табл.), тогда как между вишневыми и серыми различия не достигают уровня значимости. Это означает, что темп роста потомков ГМ-особей данио розового и в некоторой степени и вишневого цвета замедлен по сравнению с серыми.

Таблица 1.

Оценка достоверности различий по массе и длине цветковых потомков ГМ-данио

Цветовые пары	td	tst	Урове
по массе			
вишнёвые-розовые	3.63	3.6	
серые-розовые	3.56	2.7	
серые-вишнёвые	0.34	2.0	
по длине			
вишнёвые-розовые	3.18	2.7	
серые-розовые	3.65	3.6	
серые-вишнёвые	0.08	2.0	

Размеры цветковых вариантов ГМ-потомков данио встречаемости отличаются между собой (рис.). В отличие от немодифицированных длина тела самых мелких и самых крупных ГМ-рыб без учета гаммы различается в 2.5 раза. Не только длина, но и масса геномов особей более вариабельна.

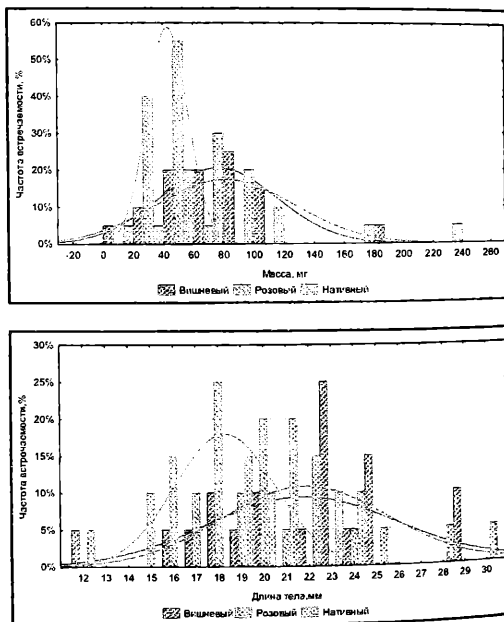


Рисунок 1. Распределение ГМ-потомков данио рерио раз а - по массе, б - по длине.

Резюмируя собственные данные и сведения из литератур можно констатировать, что некоторые биологические показатели потомков данио рерио, модифицированного генами цветных (зеленых) белков морских беспозвоночных животных типа Кишечнополостных

модифицированных рыб. Вишневые, серые и розовые потомки фертильны, демонстрируют модифицированную окраску не только в ультрафиолетовом, но и видимом диапазоне спектра, их размеры варьируют шире, чем у дикой формы. Данио серого и вишневого цвета сходны между собой по размерам, а также различны по окраске, т.е. имеют по этому фенотипическому показателю признаки дикого типа. Тугорослые розовые ГМ-данио по массе и длине достоверно меньше вишневых и серых, а кроме этого, пигменты дикой формы в их окраске не выявляются. По-видимому, их геном не экспрессирует меланиновый пигмент дикого типа. Все потомки ГМ-данио устойчивы к антибиотикам.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ильин М.Н. Аквариумное рыбоводство. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1965. С. 256-259.
2. Мякулин А.Е. Функциональное значение пигментов и пигментации в онтогенезе рыб. М.: Изд-во ВНИРО, 2000. 232 с.
3. Расс Т.С. Жизнь животных в 8 томах. Т. 4. Ч. 1. Рыбы. М.: Просвещение, 1971. С. 318.
4. Gibbs P.D.L., Peek A., Thorgaard G. An in vivo screen for the luciferase transgene in zebrafish // Mol. Mar. Biol. Biotech., 1994. N 3. P. 307-316.
5. Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A. Savitsky A.P., Zarskiy A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species // Nat. Biotechnol., 1999. V. 17 (10). P. 969-973.
6. Pandian T.J. Guidelines for research and utilization of genetically modified fish // Cur. Sci., 2001. V. 81. N 10. P. 1172-1178.
7. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. // Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa Aequorea // J. Cell. Comp. Physiol., 1962. V. 59. P. 223-239.
8. Sterba G. Aquarienfische. Urania-Verlag, 1974. 416 s.
9. Winn R.N. Transgenic Fish as Models in Environmental Toxicology // ILAR Journ., 2006. V. 42. N 4. P. 322-329.
10. VROM-Inspectie haalt ggo-glocivis uit de handel // Nieuwsbericht, 2008. N 11-12.
11. www.glofish.com
12. www.vitawater.ru/aqua/papers/gm-fish3.shtml
13. www.zcbrfish2009.org

### FOR BIOLOGY RESEARCHING OF TRANSGENIC DANIO RERIO PROGENY

M.A. Bannikova, A.V. Novosadova

Phenotype and some biological parameters of progeny Danio rerio, modified by genes color (green and red) proteins of sea backboneless animals of Phylum Coelenterates, differ from no modified fishes is shown. Cherry, grey and pink progeny are fertile, show the modified coloration not only in ultraviolet, but also in visible ranges of spectrum, their weigh and length varies more widely, than in the wild form. pink varieties slowly growing, lost pigments of the feral form. Pink progeny authentically more finely than cherry and grey ones. All GM-individual are steady against antibiotics.

# ГЕЛЬМИНТОФАУНА МОЛОДИ КАРПОВЫХ РЫБ В ДЕЛЬТЕ ВОЛГИ

Л.И.Бисерова

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО), Москва, Россия, biserova\_ludmila@mail.ru

В настоящей работе рассматривается гельминтофауна молоди карповых рыб из естественных водоемов дельты Волги. Материал отбирался в средней и нижней зонах дельты в летний и ранне-осенний периоды 2006-2008 и 2010 годов. Методом полного паразитологического вскрытия обработано 1192 экз. молоди рыб следующих видов: вобла, густера, укляка, лещ и красноперка.

У молоди карповых рыб в исследуемый период обнаружено 19 видов гельминтов, большая часть которых метацеркарии трематод. Но большая часть этих гельминтов отмечается у молоди в конце лета - начале осени, у ранней молоди представлено лишь 6 видов метацеркарий трематод.

В настоящее время в гельминтофауне молоди карповых доминирует *Aphophallus muehlingi* – вид трематод, метацеркарии которых при высокой интенсивности патогенны для молоди рыб. Это сравнительно новый для дельты Волги паразит рыб, прошедший типичный для вселенцев путь: от первого появления и существования в небольших количествах к вспышке численности и к последующему снижению количества и стабилизации численности на более высоком уровне. К настоящему времени *A. muehlingi* (продолжая оставаться самым распространенным гельминтом молоди карповых) находится на третьей стадии развития вселенцев, т.е. он полностью приспособился к экосистеме дельты Волги. Период вспышки – это 80-90-е годы прошлого века, когда интенсивность инвазии молоди карповых рыб достигала 1500 экз. В конце 80-х годов апофаллюс стал причиной отхода 80% молоди в рукавах Гандуринского банка дельты Волги (Курочкин, Бисерова, 1990). В последние годы интенсивность инвазии молоди не превышает 280 экз., а в пересчете на массу рыбы приблизительно 300 метацеркарий, в то время как летальная доза метацеркарий апофаллюса составляет 1300-1800 экземпляров на грамм массы рыбы. Индекс обилия в период наибольшего заражения составляет 54 экз. Но экстенсивность инвазии продолжает оставаться высокой – в июне 35,9%, в июле 90,9%, в августе-сентябре 100%. Моллюск-вселенец *Lithoglyphus naticoides*, являющийся единственным промежуточным хозяином апофаллюса, заняв в дельте Волги свободную экологическую нишу заиленных песков, также продолжает оставаться одним из самых распространенных моллюсков дельты.

Широко распространены у молоди карповых рыб дельты Волги метацеркарии трематод рода *Diplostomum*. Встречаются они у молоди только с середины лета, что связано с особенностями жизненного цикла этих трематод. Экстенсивность инвазии достигает 61,9%, интенсивность – 1-7 экз. Метацеркарии рода *Diplostomum* известны как патогенные паразиты рыб, особенно молоди при интенсивности инвазии 10-15 экз. Даже незначительная инвазия ими влияет на поведение рыб, на темп роста, на упитанность, приводит к болезням глаз, вплоть до слепоты. Патогенность диплостоматид хорошо изучена, известны летальные дозы при остром и хроническом заболевании, разработаны методы борьбы (Шигин, 1982, 1986). Но для естественных водоемов не характерно проявлений патогенных свойств диплостоматид, это актуально для нерестово-выростных хозяйств.

Метацеркарии *Posthodiplostomum cuticola*, одни из возбудителей так называемого черно-пятнистого заболевания рыб, ранее широко распространенные в дельте Волги и приносящие значительный ущерб (Астахова, 1967), в настоящее

встречаются у молоди карповых рыб редко. Экстенсивность инвазии складывается на уровне 4% при интенсивности инвазии 1-3 экз.

В предыдущие годы нами было отмечено появление в дельте Волги нового для рыб этого региона гельминта – кишечной трематоды *Nicolla skrjabini*, описанной тогда у молоди карповых (до 6%) и осетровых рыб (Бисерова, 1996). К настоящему времени зарегистрировано увеличение зараженности молоди рыб этим паразитом. К концу лета экстенсивность инвазии достигает 52% при интенсивности 1-11 экз. (индекс обилия 2,0). Для этой трематоды промежуточным хозяином служит *L. naticoides*, как и для апофаллюса, но рыбы являются дефинитивными хозяевами. Патогенность этого гельминта для рыб не изучена.

Патогенными паразитами молоди рыб являются метацеркарии трематод рода *Lithyosotylulus* и *Apharyngosrtigea corni*, в незначительных количествах зарегистрированные нами у молоди в позднелетний период.

У молоди карповых рыб в единичных экземплярах регистрируются опасные для человека виды гельминтов: метацеркарии *Pseudamphistomum truncatum*, *Metorchis xantosomus*, личинки нематоды *Porrocaecum reticulatum*. К опасным для здоровья человека относятся и метацеркарии *A. muehlingi*.

Сравнение современных данных с собственными же данными 80-90-х годов прошлого века показывают, что изменения произошли только в гельминтофауне новых для дельты Волги паразитов: стабилизировалась численность *A. muehlingi*, выросла зараженность молоди рыб *N. skrjabini*.

В многолетней динамике изменения гельминтофауны молоди карповых рыб естественных водоемов дельты Волги значительно более существенные: практически исчезли моногеней, увеличилось число видов трематод, появились новые для дельты виды, иногда заменившие старые (сравнение проводилось с данными Дубинина, 1952; Астаховой, 1967). Исчезновение моногеней, возможно, связано с загрязнением Волги, к чему эктопаразиты наиболее чувствительны (Курочкин, Бисерова, 1989).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Астахова Т.В. 1967. Паразиты и болезни молоди промысловых рыб дельты Волги и Северного Каспия // Труды КаспНИРХа. – Т.23. – С. 181-226.
2. Бисерова Л.И. 1996. Паразиты моллюска-вселенца *Lithoglyphus naticoides* // Тез. докл. между. конф. «Проблемы гидробиологии континентальных вод и их малакофауна». – С.-П. – С. 12-13.
3. Дубинин В.В. 1952. Фауна личинок паразитических червей позвоночных животных реки Волги // Паразитол. сб. ЗИН АН СССР. – Т. 14. – М. – Л. – С. 213-265.
4. Курочкин Ю.В., Бисерова Л.И. 1989. О паразитологических последствиях загрязнения среды в Волго-Каспийском бассейне // Тез. докл. конф. «Экологические проблемы Волги». – Ч. 2. – Саратов. – С. 48-50.
5. Курочкин Ю.В., Бисерова Л.И. 1990. Об основных механизмах, обусловивших всплеску численности трематод *Aphallus muehlingi* и *Rossicotrema donicum* в дельте Волги // Тез. докл. симпозиума «Факторы регуляции популяционных процессов у животных». – М. – С. 17-18.
6. Шитин А.А. 1982. Изучение приживаемости церкарий *Diplostomum spathaceum* (Трематода, Diplostomatidae) у рыб // Тр. ГЕЛАН СССР. – Т. 31. – С. 150-181.
7. Шитин А.А. 1986. Трематоды фауны СССР. Род *Diplostomum*. Метацеркарии. – М.: Наука. – 254 с.

## HELMINTHOFAUNA JUVENILES OF CYPRINIDAE FISH IN THE VOLGA DELTA

L.I. Biserova

Helminthofauna juveniles of Cyprinidae fish in the Volga delta and its change in time is discussed. 19 species of helminths are registered.

Т.Е. Буторина, О.Ю. Гороява

Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет  
(Дальрыбвтуз), Владивосток, Россия, [boutorina@mail.ru](mailto:boutorina@mail.ru)

Цестодозы являются наиболее частыми заболеваниями гольцов *Salvelinus alpinus* L. в горных озерах Забайкалья, что обусловлено максимальным развитием в них планктонных сообществ благодаря высокому уровню инсоляции (Алексеев и др., 2000). Нами зарегистрированы такие болезни гольцов, как триенофороз, дифиллоботриоз, протеоцефалез и зуботриоз. Триенофороз известен как опасное заболевание молоди лососевых и сиговых рыб в прудовых и садковых хозяйствах, проявляющееся в разрушении печени рыб, в естественных водоемах вызывает гибель молоди окуня, налима и др. (Пронина, Пронин, 1988; Ихтиопатология, 2003). Один из возбудителей болезни *Trienocephorus nodulosus* (Pallas, 1860; Rudolphi, 1819) широко распространен в Европе, Азии и Северной Америке в пределах ареала definitive хозяина - щуки. Дифиллоботриоз, вызываемый малым лентецом *Diphyllobothrium ditremum* (Streplin, 1825), встречается в северных водоемах Евразии от Великобритании до Чукотки в местах гнездования рыбоядных птиц (гагар, поганок, крохалей, цапель) и отмечен у рыб-планктофагов (Делямуре и др., 1985). Протеоцефалез, возбудителем которого является *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800), характерен для лососеобразных, особенно сиговых рыб (Пронина, Пронин, 1988). *Eubothrium salvelini* (Schrank, 1890), распространен по всему ареалу гольцов и вызывает у лососевых рыб заболевание, проявляющееся в закупоривании просвета кишечника и пилорических придатков и нарушении пищеварения.

Обследованные нами гольцы из оз. Фролиха имели длину по Смитту (АС) 315-354 мм, из оз. Большое Леприндо - 134-174 мм, из озер Леша и Камканда - 124-142 мм. Рыбы были пойманы и любезно предоставлены в наше распоряжение А.Н. Матвеевым и В.П. Самусенком (Иркутский государственный университет).

Озеро Фролиха расположено в бассейне Байкала в 8 км к северо-востоку от него на высоте 60 м выше его уровня, длина озера - 8 км, максимальная ширина - 2,5 км, максимальная глубина - 80 м. Большая часть озера (около 80% площади) занята глубоководной зоной. Озеро Большое Леприндо находится в бассейне р. Чары (приток р. Олекмы, бассейн р. Лены) на высоте 984 м над уровнем моря, его длина - 11,5 км, ширина - 2,8 км, максимальная глубина - 64,5 м. Озеро Леша расположено в бассейне р. Олондо (приток р. Хани, бассейн р. Олекмы) на высоте 1300 м над уровнем моря, имеет длину 0,25 м, ширину - 0,15 м, максимальную глубину - 11 м (Распространение арктического гольца..., 1999).

Во всех исследованных озерах гольцы занимают глубоководную зону (Алексеев и др., 2000). В оз. Фролиха они поднимаются в верховья р. Левая Фролиха и, возможно, других рек только на нерест (Савванитова и др., 1977). Кроме гольца, ихтиофауна оз. Фролиха представлена острорылым ленокм *Brachymystax lenae* (Pallas), обыкновенным тайменем *Hucho taimen* (Pallas), байкалоленским хариусом *Thymallus arcticus baikalolensis* Matveev, Samusenok, Pronin et Tel'pukhovskiy, обыкновенной щукой *Esox lucius* L., плотвой *Rutilus rutilus* (L.), обыкновенным гольяном *Phoxinus phoxinus* (L.), озерным гольяном *P. perenurus* (Pallas), сибирской шиповкой *Cobitis melanoleuca* Nichols, сибирским гольцом *Barbatula toni* (Dybowski), налимом *Lota lota* (L.), речным окунем *Perca fluviatilis* L., каменной широколобкой *Paracottus knerii* (Dybowski), песчаной широколобкой *Leocottus kesslerii* (Dybowski) и их возможны находки сибирского ельца *Leuciscus leuciscus baikalensis* (Dybowski) и сига *L. idus* (L.). В оз. Большое Леприндо встречаются ленок, сиг-пыжьян *Colegionus lavaretus pidschian*, байкалоленский хариус, обыкновенный гольян, гольцы

Ляговского *Phoxinus lagowskii* Dybowski, сибирская щиповка *Cobitis melanoleuca* Nichols, сибирский голец *Barbatula toni* (Dybowski), налим, речной окунь, пестроногий подкаменщик *Cottus poecilopus* Heckel, возможно, таймень и плотва. В оз. Леша и, возможно, Камканда, кроме гольца, отмечен только байкалоленский карлигус (Распространение арктического гольца.... 1999).

Цестодами *T. nodulosus* оказались заражены 4 из 5 обследованных экз. гольцов оз. Фролиха с интенсивностью 2-18, в среднем 11 экз. При этом у средне- и сильно зараженных гольцов (более 11 паразитов) печень была светлой с участками некроза и разрушения, что характерно для протекания данного заболевания у вторых промежуточных хозяев (Ихтиопатология, 2003). *T. nodulosus* распространен во всех водоемах бассейна оз. Байкал и Забайкалья, где обитает его дефинитивный хозяин щука (Пронина, Пронин, 1988). По данным этих авторов, в Байкальском регионе жизненный цикл этих цестод имеет свои особенности: песчаная широколобка служит основным вторым промежуточным хозяином этих гельминтов в тех озерах, где она является массовым видом (Пронина, Пронин, 1988). Этот вид широколобок обитает как в самом озере Байкал, так и в водоемах его водосбора (Пронин и др., 1999). По-видимому, основным путем инвазии гольцов этими цестодами в оз. Фролиха является их питание молодью песчаной широколобки (Самусенок, 2000), которая в свою очередь получает паразитов от ракообразных. Возможен и альтернативный, более редкий путь заражения гольцов - в результате пассивного заглатывания планктонных ракообразных при ихтиофагии, что отмечается для амурского сома и других хищников (устное сообщение А.В. Ермоленко). Ранее (Пронин, 1966) эти гельминты были отмечены в оз. Большое Леприндо у крупной формы гольцов (встречаемость составляла до 93%) и щуки (81%), но к настоящему времени эти гольцы здесь уничтожены, а находки щуки, по наблюдениям В.П. Самусенка, маловероятны.

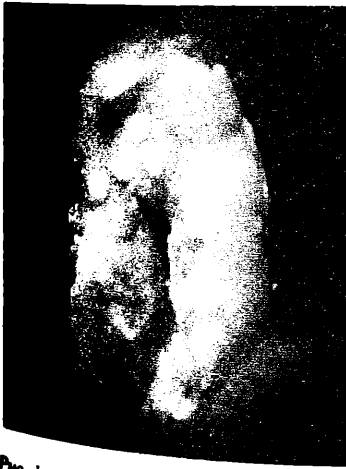


Рис. 1. Дифиллоботриоз карликовой формы гольца оз. Большое Леприндо

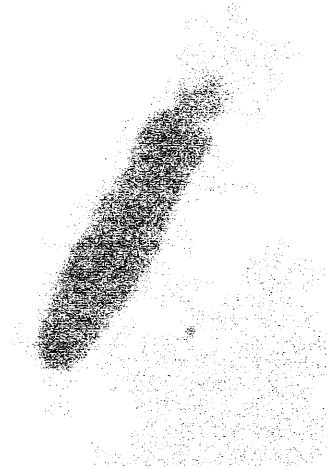


Рис. 2. *Proteocephalus longicollis* из гольца оз. Большое Леприндо

С другой стороны, в этом озере нами отмечен дифиллоботриоз карликовой формы гольцов, вызванный ленточными червями *Diphyllobothrium ditremum* (Streplin, 1825). На поверхности желудка гольцов располагались крупные сформированные



капсулы, содержащие спороцистоиды (рис. 1). Интенсивность заражения *инвазии рыб* достигала 43 экз., средняя - 24,5 экз. Источником заражения - гагары и другие

рыбоядные птицы (Десямуре и др., 1985). Протеоцефалез и зуботриоз отмечены у гольцов во всех исследованных озерах. *Proteocephalus longicollis* - доминирующий вид цестод у гольцов исследованных озер. Наиболее сильно заражены им (до 584 экз.) самые малые гольцы высокогорных озер, где они питаются почти исключительно планктоном. Планктофагия подтверждается тем, что более 60% цестод находились на ранних стадиях формирования стробилы (рис. 2). Это самый распространенный вид цестод Байкальского региона, основным дефинитивным хозяином которого служит байкальский омуль *Coregonus autumnalis* (Pallas). Интенсивность инвазии *служит* *Eubothrium salvelini* была значительной (до 46 экз., в среднем - 24 экз.) только в оз. Фролиха, где заражение им возможно и через ихтио-, и через планктофагию. О питании рыб планктоном свидетельствуют находки ювенильных и молодых неполовозрелых форм цестод. Приведенные данные показывают, что широкое распространение цестодозов у гольцов Забайкалья связано с тем, что они заняли нишу рыб-планктофагов, которую в других озерных системах обычно занимают сиговые рыбы (Аникиева, 2000).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев С.С., Бульдуров В.В., Пичугин М.Ю., Самусёнок В.П. Распространение арктического гольца *Salvelinus alpinus* (Salmonidae) в Забайкалье // *Вопр. ихтиол.* - 1999. - Т. 39. - №1. - С. 48-56.
2. Алексеев С.С., Пичугин М.Ю., Самусенко В.П. Разнообразие арктических гольцов Забайкалья по меристическим признакам, их положение в комплексе *Salvelinus alpinus* и проблема происхождения симпатрических форм // *Вопр. ихтиол.* - 2000. - Т. 40. - №3. - С. 293-311.
3. Аникиева Л.В. Популяционная морфология цестод рыб: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. - М., 2000. - 73 с.
4. Десямуре С.Л., Скрыбин А.С., Сердюков А.М. Основы цестодологии. Дифиллоботриозы - ленточные гельминты человека, млекопитающих и птиц. - М.: Наука, 1985. - Т. XI. - 200 с.
5. Ихтиопатология / Н.А. Головина, Ю.А. Стрелков, В.Н. Воронин и др. - М.: Мир, 2003. - 448 с.
6. Куперман Б.И. Ленточные черви рода *Triacnophorus* - паразиты рыб. - Л.: Наука, 1973. - 207 с.
7. Пронин Н.М. Паразитофауна рыб водоёмов Чарской котловины // *Вопросы географии и биологии.* - Чита: Читин. кн. изд-во, 1966. - С. 120-159.
8. Пронин Н.М., Кильдюшкин В.А., Сокольников Ю.А. Рыбы Бурятии: систематический состав и распределение по бассейнам // Биоразнообразие Байкальской Сибири / В.М. Корсунов, Н.М. Пронин, Г.Г. Гончиков и др. - Новосибирск: Наука. Сибирская изд. фирма РАН, 1999. - С. 88-99.
9. Пронина С.В., Пронин Н.М. Взаимоотношения в системах гельминты-рыбы (на тканевом, органном и организменном уровнях). - М.: Наука, 1988. - 176 с.
10. Саввантова К.А., Максимов В.А., Медведева Е.Д. Даватчан *Salvelinus alpinus erythrinus* (Georgi) // *Вопр. ихтиол.* - 1977. - Т. 17. - Вып. 2 (103). - С. 203-219.
11. Самусёнок В.П. Экология арктического гольца высокогорных водоёмов Северного Забайкалья: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Иркутск, 2000. - 24 с.

### CESTODOSES OF CHARs FROM THE TRANsBAIKALIA

T.E. Boutorina, O.Yu. Gorovaya

The main helminthoses of the charns from Transbaikalia are cestodoses caused *Proteocephalus longicollis* *Diphyllobothrium ditremum*, *Triacnophorus nodulosus*, and *Eubothrium salvelini*. Charns occupy in these lakes a niche of deep-water planktophages, instead of coregonids in other lakes. Charns show typical for triacnophorosis and diphyllobothriosis symptoms of diseases.

# ВЛИЯНИЕ ОПРЕСНЕНИЯ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ МОРСКОГО ЕРША *SCORPAENA PORCUS L.*

А.И. Василенко<sup>1</sup>, Н.С. Кузьмина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Малая Академия Наук, Севастополь, Украина

<sup>2</sup> Институт биологии южных морей, Севастополь, Украина  
kunast@rambler.ru

В последнее время, несмотря на улучшение состояния рыб и других гидробионтов Черного моря, все еще наблюдаются эффекты негативного их статуса. По-прежнему существуют экологические проблемы, в частности загрязнение вод токсикантами (пестициды, тяжелые металлы, моющие средства), глобальное изменение климата, а также опреснение.

Известно, что в Черное море впадает более 300 малых и больших рек (Зайцев, 2006), производится сброс больших количеств хозяйственно-бытовых вод, что вызывает сильное опреснение акваторий, особенно ощутимое в прибрежной зоне (Кузьмина, 2006).

Для оценки здоровья рыб прежде всего используют популяционные параметры, физиологические, а также биохимические (Кузьмина, 2006).

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование влияния опреснения на морского ерша.

Для решения этой цели были поставлены следующие задачи:

- определить размерно-массовые и морфофизиологические (индекс печени, гонадосоматический индекс) характеристики морского ерша в экспериментальных условиях при воздействии опреснения;
- оценить указанные параметры у ерша, обитающего в акваториях с различной соленостью.

Объектом экспериментальных исследований служил морской ерш *Scorpaena porcus* (L.) – массовый донный черноморский вид.

В экспериментальных условиях оценивали воздействие опреснения (разбавления - 3 части морской воды: 1 часть пресной воды, 1 часть морской воды: 3 части пресной воды и полное опреснение) на некоторые физиологические параметры скорпены.

В первом случае соленость составляла 12,61 ‰, во втором – 10,57 ‰, в третьем 0,11 ‰, в то время как в контроле (вода из севастопольского «Аквариума») соленость была 16,42 ‰. Морской ерш был отловлен с помощью донных ловушек в период сентябрь-октябрь 2010 г. в бухте Карантинная (г. Севастополь, Черное море). Экспозиция составляла в контроле и при минимальном разбавлении 6 и 30 часов, а в остальных вариантах – 6 часов. Физиологическими критериями состояния морского ерша служили: масса рыб, тушки и внутренних органов (печени и гонад), объем брюшной жидкости.

Биологический анализ рыб и расчет индекса печени и гонадосоматического индекса проводили по известным методам (Правдин, 1966; Шварц, 1968). Для эксперимента отбирали особей близкого размера.

Вторая часть работы состояла в исследовании скорпены, обитающей в бухтах с разной соленостью: б. Карантинная (17,12 ‰), б. Севастопольская (17,63 ‰), б. Стрелецкая (18,14 ‰) (Куфтаркова и др., 2008). В этой части работы анализировали ерша, отловленного в весенний период года.

Было установлено, что при опреснении масса рыбы и тушки достоверно увеличивались. Несмотря на значительный разброс значений объема накапливаемой

брюшной жидкости при различном опреснении, этот показатель возрастает по сравнению с контролем (рис. 1).

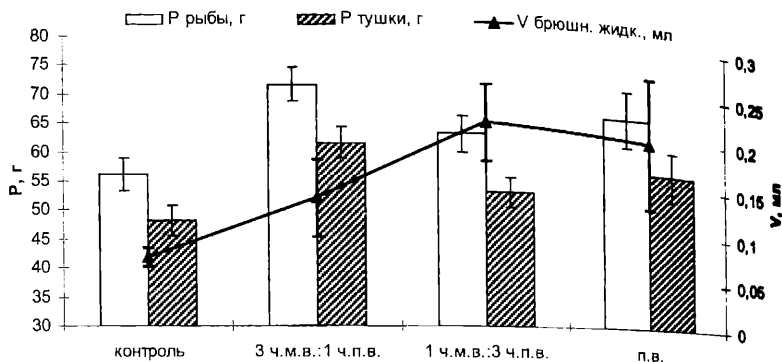


Рисунок 1. Накопление жидкости у морского ерша при влиянии различных концентраций пресной воды: ч.м.в. — часть морской воды, ч.п.в. — часть пресной воды, п.в. — пресная вода.

Отмечено, что при увеличении концентрации пресной воды исследуемые морфофизиологические параметры рыб увеличивались (рис. 2). Такая реакция вполне закономерна, так как излишнее количество пресной воды поступает посредством дыхания в организм рыбы.

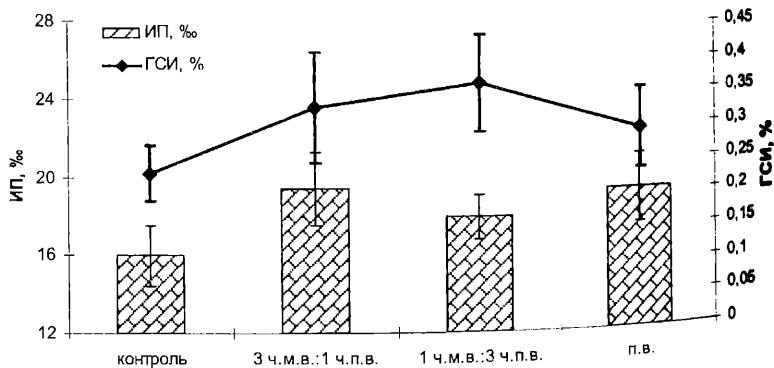


Рисунок 2. Влияние различных концентраций пресной воды на морфофизиологические показатели морского ерша.

Известно, что в обратном случае, то есть при попадании пресноводных рыб в среду с повышенной соленостью, происходят противоположные процессы: потери веса (на примере карпа) за счет потери воды тканями рыб (Привольнев, 1966).

Более многочисленны исследования, касающиеся изучения физиологических отклонений у морских рыб, содержащихся в условиях пониженной солености. У миксины *Eptatretus cirrhatus* при уменьшении солености в воде устанавливается

снижение давления и сердечного ритма рыб (Foster, Forster, 2007). У охотской сельди, нормально развивающейся в морской воде, прочность яичевых оболочек резко снижается при понижении солености (Галкина, 1957). По литературным данным, соленостная резистентность и активность сперматозоидов изменяется у морских рыб при снижении солености неоднозначно (Галкина, 1957; Хлебович, 1974).

Установленные нами данные подчеркивают достаточно высокую адаптивную способность типичного представителя морской ихтиофауны, *S. porcus*, по отношению к опреснению, так как почти все исследованные параметры (кроме объема брюшной жидкости) изменялись менее чем на 50 % в течение 1-2 дней. Даже при содержании в пресной воде скорпена жила в течение 7-8 часов.

Во второй части работы мы установили, что в б. Карантинная вес всей рыбы и тушки *S. porcus* был наибольшим, а в Стрелецкой бухте – наименьшим (рис. 3). Индекс печени и гонадосоматический индекс были минимальными у рыб из б. Карантинная, а максимальные величины – у рыб из б. Стрелецкая (рис. 4).

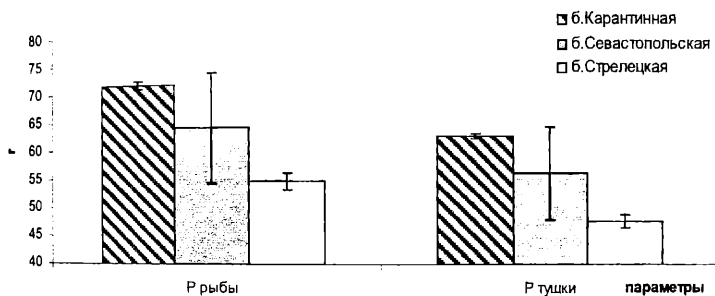


Рисунок 3. Вес рыбы и тушки морского ерша, обитающего в бухтах с различной соленостью.

Такие отличия в природных условиях, на наш взгляд, хоть и совпадают некоторым образом с результатами эксперимента, не связаны с соленостным режимом, а зависят главным образом от уровня загрязнения. Ранее было показано, что величина массы скорпены снижается, а ИП возрастает по мере увеличения загрязненности севавтопольских бухт (Кузьминова, 2006; Овен и др., 2001). В нашей работе (данные за 2010 г.) эта тенденция в популяции ерша из бухт, отличающихся уровнем загрязнения (б. Карантинная – наиболее чистая, б. Севастопольская – менее, б. Стрелецкая – самая загрязненная) (Кузьминова, 2006), продолжает сохраняться.

Выводы:

1. При экспериментальном содержании морского ерша в среде с пониженной соленостью (0,11; 10,57 и 12,61 ‰) происходит увеличение веса рыбы за счет накопления воды в мышцах, органах и в большей степени в брюшной полости. При солености 10,57 ‰ и полном опреснении (0,11 ‰) *Scorpaena porcus* живет не более 7-8 часов.
2. Отличия в величинах изучаемых параметров скорпены, обитающей в бухтах с различной соленостью, не имеют первостепенной зависимости от этого фактора.

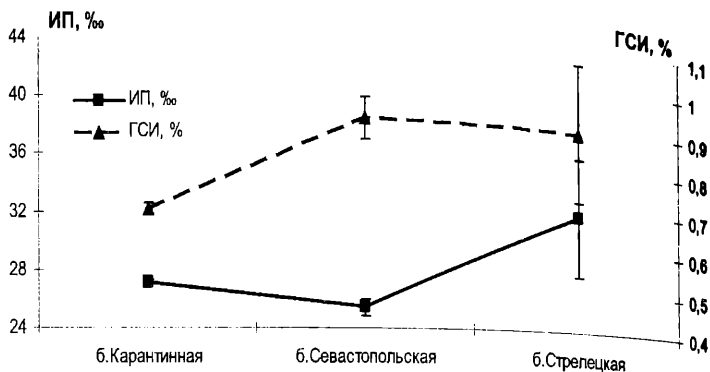


Рисунок 4. Морфофизиологические показатели морского ерша, обитающего в бухтах с различной соленостью.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Галкина Л.А. Влияние солености на сперму, икру и личинок охотской сельди. *Изв. Тихоокеанск. науч. ин-та рыбн. хоз-ва и океаногр.* – 1957. – Т. 45. – С. 37-50.
2. Зайцев Ю.П. Введение в экологию Черного моря. – Одесса: Изд-во: «Эвем», 2006. – 224 с.
3. Кузьмина Н.С. Оценка токсического действия хозяйственно-бытовых сточных вод на морские организмы: Дис. канд. биол. наук: 03.00.16 / МГУ. – М., 2006. – 168 с.
4. Гидрохимическая характеристика отдельных бухт севастопольского взморья / Е.А. Куфтаркова, Н.Ю. Родионова, В.И. Губанов, Н.И. Бобко // Основные результаты комплексных исследований в Азово-Черноморском бассейне и Мировом океане (юбилейный выпуск): Тр. южного научно-исследовательского института морского рыбного хозяйства и океанографии. – 2008. – С. 110-117.
5. Овен Л.С., Руднева И.И., Шевченко Н.Ф. Сравнительный анализ популяционных показателей некоторых черноморских видов рыб, обитающих в бухтах района Севастополя // Естественно-биологические и экологические проблемы Восточного Крыма. – Керчь: ТНУ, 2001. – С. 55 – 60.
6. Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. – М.: Пищ. пром., 1966. – 376 с.
7. Привольнев Т.И. Водный обмен при осморегуляции рыб // Тез. докл. Всесоюз. совещ. по экологической физиологии рыб (январь 1966 г.). – М., 1966. – С. 51-53.
8. Хлебович В.В. Критическая соленость биологических процессов. Л.: Изд-во «Наука», 1974. – 236 с.
9. Шварц С.С., Смирнов В.С., Добринский Л.Н. Метод морфофизиологических индикаторов в экологии наземных позвоночных // Тр. Ин-та экологии растений и животных. – 1968. – Вып. 58. – 386 с.
10. Foster J.M., Forster M.E. Effects of salinity manipulations on blood pressures in an osmoconforming chordate, the hagfish, *Eptatretus cirrhatu* // *J. Comp. Physiol. B.* – 2007. – Vol. 177, №1. – P. 31-39.

### THE INFLUENCE OF DESALINATION ON PHYSIOLOGICAL INDICES OF BLACK SCORPIONFISH *SCORPAENA PORCUS* L.

A.I. Vasilenko, N.S. Kuz'minova

The experimental influence of desalination on black scorpionfish *Scorpaena porcus* L. was studied. It was obtained that at low salinity the weight is increased because of water absorption by tissues, organs and abdominal cavity. The differences in the values of investigated parameters of *S. porcus* inhabited bays with different salinity does not depend (in our opinion) mainly on salinity.

# ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ПРЕСНЫХ ВОДОЕМОВ ГОРОДА ОМСКА С ПОМОЩЬЮ БИОИНДИКАТОРОВ

В.В. Гуляева

*Омский государственный педагогический университет, Омск, Россия  
guljaeva@inbox.ru*

В современных условиях растущего антропогенного загрязнения простейшие – одно из первых звеньев цепи организмов водной экосистемы, подверженные воздействию различных токсических веществ. Способность инфузорий быстро реагировать на изменения условий среды делает их весьма ценными объектами при исследовании санитарного состояния воды. (Бараусова, 1990). Разработка биологических методов оценки степени загрязнения природных вод связан с именами немецких исследователей Р. Кольквитца и М. Марссона (R. Kolkwitz, M. Marsson, 1902). Важнейшей комплексной характеристикой состояния водной экосистемы является уровень ее сапробности. Сапробность (термин Кольквитца и Марссона) – характеристика водоема, показывающая уровень его загрязнения органическими веществами и продуктами их распада. По нарастанию количества органических веществ различают водоемы олигосапробные (практически не загрязненные), мезосапробные (слабо или умеренно загрязненные), б-мезосапробные (загрязненные) и полисапробные – сильно загрязненные органикой. В каждой из зон сапробности развивается присущий ей комплекс животных и растительных организмов, способных существовать в данных условиях, которые были названы авторами этой системы сапробными организмами. В последние годы наиболее широкое распространение получили классификации зон сапробности водоемов, а также списки индикаторных организмов, предложенные чешским гидробиологом В. Сладечком (Sládeček, 1963, 1973, 1975 и др.). Биоиндикаторы – это живые организмы, по присутствию, количеству и особенностям развития которых судят о степени изменения окружающей среды. Для определения степени загрязнения воды различные виды ресничных инфузорий используются в качестве тест-объектов (Гейспиз, 1990 и др.). Основным преимуществом инфузорий является то, что они первые в трофической цепи реагируют на загрязнители. Реакцией на изменения условий среды является изменение видового состава, причем смена происходит за очень короткое время. Поэтому в природе каждая из зон сапробности характеризуется биоценозом более или менее типичных видов для данных условий. Особенно ценное значение приобретают стенобитные виды, с узкой экологической валентностью, способные нормально существовать лишь в строго определенных условиях. По составу организмов в естественных местах обитания можно достаточно точно судить о степени органического загрязнения того или иного водоема. В природных водоемах в результате деятельности бактерий, растительных и животных организмов непрерывно протекают процессы биологического самоочищения воды. Каждой фазе естественного самоочищения воды соответствует комплекс организмов, которые приспособлены к определенным условиям обитания, к определенному физико-химическому режиму среды, свойственному именно данной фазе разложения органических загрязнений (Банина, 1990 и др.). Отсюда вытекает возможность использования комплексов организмов для определения степени чистоты водоема. Как уже было указано выше, качество вод можно оценивать не только по количественной и качественной структуре ценозов-индикаторов, но и по изменениям физиологических и биохимических реакций гидробионтов. О.М. Бараусовой изучена морфофизиологическая изменчивость

*Vorticella microstoma* и *V. convallaria* в различных по степени органических загрязнений и содержанию кислорода зонах сооружений биологической очистки сточных вод (Бараусова, 1983, 1998). В зонах от полисапробной до б-мезосапробной у инфузорий обоих видов уменьшаются размеры, индивидуальная масса, число пищеварительных вакуолей, меняется форма зоитов от округлой до вытянутой, увеличивается ширина перистомы. Относительная поверхность зоитов больше в условиях дефицита кислорода.

Целью нашего исследования явилась оценка состояния некоторых водоемов крупного промышленного центра России - г. Омска.

Материалом для исследования послужили гидробиологические пробы, взятые из некоторых водоемов г. Омска (озера: Чердовое, парк Победы, Озерки, ТЭЦ-5). Обработка материала проводилась с применением стандартных методов сбора протистологических и гидробиологических проб. Определение видовой принадлежности найденных форм проводилось как на живых, так и на фиксированных объектах по описаниям, содержащимся в литературе (Лихачев, 1996 и др.). Индикаторная значимость видов и сапробность водоемов определялись по определителю водных беспозвоночных (Фауна аэротенков, 1984).

Всего обнаружено 29 видов ресничных инфузорий, относящихся к 11 родам. Для озера Чердовое отмечено 27 видов, относящихся к 11 родам, или 93,1% от общего числа найденных в водоемах видов. Доминирующими являются *Vorticella* - 8 видов, или 29,6%, *Paramecium* - 5 вида, или 18,5%. Роды *Colpoda*, *Stylonychia* представлены каждый по 3 вида, или 11,1%. Род *Epistylis* представлен 2 видами, или 7,4% от общего числа видов. Роды *Euplotes*, *Litonotus*, *Prorodon*, *Hemiphrys*, *Spathidium*, *Carchesium* представлены одним видом каждый, или по 3,7%.

Для озера парк Победы отмечено 23 вида из 8 родов, или 79,3% от общего видового состава. Лидерами по числу видов являются роды: *Vorticella* - 8 видов, или 34,8%, *Paramecium* - 5 вида, или 21,7%. Род *Colpoda* представлен 3 видами, что составило 13,0%, *Euplotes*, *Stylonychia* представлен 2 вида каждый - 8,7%. *Litonotus*, *Prorodon*, *Epistylis* отмечены по одному виду - 4,3%.

Для водоема Озерки отмечено 16 видов инфузорий, относящихся к 7 родам, или 55,2%. Наибольшее видовое разнообразие имеют роды: *Vorticella*, *Paramecium* по 4 вида каждый, или 25,0%, *Colpoda* представлен 3 видами, или 18,8%. *Stylonychia* - 2 вида, или 12,5%. Роды *Euplotes*, *Epistylis*, *Prorodon* по одному виду каждый, или 6,3%.

Для водоема вблизи ТЭЦ-5 обнаружено 27 видов из 11 родов. По видовому разнообразию лидируют: *Vorticella* - 8 видов, или 29,6%, *Paramecium* - 5 вида, или 18,5%. Роды *Colpoda*, *Stylonychia*, представлены каждый по 3 вида, или 11,1%. *Euplotes*, *Hemiphrys* по 2 вида, что составляет 7,4% от видового состава. Виды *Litonotus*, *Prorodon*, *Carchesium*, *Epistylis* отмечены по одному виду, или по 3,7%.

Практически все водоемы, расположены в черте г. Омска и испытывают антропогенное воздействие. Водоемы Озерки и Чердовое чрезвычайно активно используются человеком и характеризуются высоким уровнем загрязнения вод и прилегающих территорий. Индекс сапробности в Чердовом составил 2,9, а в Озерках 2,7, что характеризует оба водоема как б-мезосапробные. Озеро парк Победы также относится к б-мезосапробной зоне, несмотря на то, что находится под охраной. Индекс сапробности составил 2,9. Озеро рядом с ТЭЦ-5 относится к б-мезосапробной зоне, сапробность водоема составила 2,7.

Таким образом, анализируя данные о видовом составе и индикаторных способностях инфузорий, обследуемые водоемы по видовому составу, встречаемости и численности доминирующих видов, относятся к б-мезосапробной

зоне. Они непригодны в качестве питьевой воды, хозяйственно-бытовых нужд и промышленного использования и только после соответственной очистки становятся пригодными для питья и промышленного использования. В связи с этим, необходимо проводить постоянный мониторинг загрязнения данных водоемов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Банина Н.Н. Тип Инфузории // Фауна аэротенков. – Л.: Наука, 1984. – С.136-186.
2. Банина Н.Н., Суханова К.М., Колесников С.Г., Таразанов В.В. Самоочищение водоемов и биологическая очистка сточных вод // Протозоология: Сб. статей. – Л. Наука, 1983. С.5-24.
3. Бараусова О.М. Адаптивная изменчивость инфузорий рода *Vorticella* (*Peritricha Sessilina*) // Экология морских и пресноводных свободноживущих простейших: Сб. науч. трудов. - Л.: Наука, 1990. - С.93-97.
4. Гейслиц К.Ф., Никифорова Л.Ф., Богданов В.Е. Экологические особенности инфузорий *Sarcosium polyurium* как тест-объекта для определения степени загрязнения воды // Экология морских и пресноводных свободноживущих простейших: Сб. науч. трудов. - Л.: Наука, 1990. - С. 154-161.
5. Лихачев С.Ф. Инфузории водоемов Омской области. - Омск, 1996. - 102 с.
6. Kahl, A. *Urtiere oder Protozoa. I: Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria [Text] / A. Kahl // Die Tierwelt Deutschlands / Jena, 1930, part 18; 1931, 21; 1932, 25; 1935, 30. -860 s.*
7. Sládek, V. *Biologische Toxizitätsteste des Wassers für Bewässerungszwecke nach der Klimung [Text] / V. Sládek // Vodni hospodarstvi. 1961. - Vol. 11. - P. 415-417.*

#### ESTIMATION OF A CONDITION OF FRESH RESERVOIRS OF A CITY OF OMSK BY MEANS OF BIOINDICATORS

V.V. Gulyaeva

The given article contains the results of serious investigation of various types of Ciliata and saprobity of water-basin in Omsk.



# СОДЕРЖАНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ОРГАНИЗМЕ ГОЛЫЯНА *RHOXINUS RHOXINUS* (L.) В БАССЕЙНАХ РЕК ПЕЧОРА И ВЫЧЕГДА

Г.Н. Доровских\*, В.В. Мазур, А.П. Петраков

*Сыктывкарский государственный университет, Сыктывкар, Россия*

\**dorovsk@syktsu.ru*

Тяжелые металлы (ТМ) являются для гидробионтов одной из наиболее опасных групп загрязняющих веществ, действие которых на отдельные стороны метаболизма рыб и беспозвоночных остаются мало изученными. Некоторые из них обладают канцерогенными и мутагенными свойствами, накапливаясь в тканях гидробионтов в концентрациях, в сотни и тысячи раз превышающих их содержание в воде (Перевозников, Богданова, 1999). Токсичность ТМ зависит не только от их общего содержания в воде, но в еще большей степени от соотношения их гидратированных ионов и ионов, связанных в комплексы с растворенными органическими веществами или адсорбированных на взвешенных частицах. Эти факторы особо следует учитывать при исследовании влияния повышенных доз металлов на водную флору и фауну на Европейском Севере, где в водоемах содержится большое количество гуминовых кислот, образующих с металлами растворимые комплексные соединения, легко усвояемые гидробионтами (Папина, 2001; Кондратьева и др., 2006). Кроме того, информация о локальных концентрациях ТМ в конкретных экосистемах различных регионов, имеющих свою геохимическую и промышленную специфику (Гладышев и др., 2001), а также данные о биогенной миграции металлов являются необходимыми составляющими для формирования научных основ борьбы с загрязнением природной среды и устойчивого развития регионов (Баскунова, Аминева, 2009).

Исследования по загрязнению водоемов в Республике Коми в основном проведены в районах расположения объектов добывающей промышленности (Walker et al., 2009). Однако водотоки в пределах водосборного бассейна, где нет крупных промышленных предприятий, также подвержены процессу токсификации. Токсиканты в такие водоемы поступают с атмосферными осадками. При этом большая часть ТМ привносится в период весеннего половодья, когда основным источником питания рек являются талые воды (Борисов, 2008). В связи с этим представляет интерес сравнение концентраций металлов в воде и тканях рыбы из экологически благополучного и загрязненного водотоков. В качестве таковых выбраны р. Б. Шайтановка (правый приток р. Печоры), протекающая по территории Печоро-Ильчского государственного природного заповедника, и р. Човью (левый приток р. Вычегды), текущая в черте г. Сыктывкара и принимающая в себя коммунальные стоки, талые и дождевые воды, стекающие с прилегающих сельскохозяйственных полей и площадей вдоль автострადы. В гидрохимическом отношении участок верхней Печоры, куда впадает р. Б. Шайтановка, впервые обследован в августе 2002 г. (Хохлова, 2003), а левый приток р. Вычегды – р. Човью в мае-октябре 2000 г. (Ланицкая, 2002).

Р. Човью имеет длину 60 км, ширина русла 2–10 м; глубина 0.5–1.0 м, на плесах до 3 м, на перекатах до 0.15 м. Русло захламлено бытовым и строительным мусором. Грунт песчаный, местами с наилком. В воде зафиксированы микроорганизмы тифо-паратифозной группы и кишечная палочка. Вода р. Човью характеризуется как грязная и очень грязная.

Р. Б. Шайтановка относится к малым рекам. Ширина ее русла до 10–12 м; глубина на плесах около 3–3.5 м, на перекатах 0.15–1.0 м. Русло свободно даже от

уваших стволов деревьев. Грунт каменистый, местами перемежается с торфом, песком и глиной.

Цель работы – дополнить гидрохимическое описание рек Б. Шайтановка и Човью; провести сравнительный анализ содержания металлов (Ca, Zn, Cu) в организме рыбы из этих водотоков; сравнить концентрации металлов (Fe, Cu, Zn, Pb) в разных органах (мышцы, печень, почки) гольяна.

Определение pH воды, содержания в ней растворенного кислорода, температуры и электропроводности, из рек Човью (апрель–ноябрь 2008 г., начало сентября 2010 г.) и Б. Шайтановка (июнь–июль 2010 г.), осуществлено портативным анализатором Анион – 7051 фирмы ИНФРА СПАК – АНАЛИТ (г. Новосибирск). Ошибка измерения pH  $\pm 0.02$ , содержания растворенного в воде кислорода от 0 до 10 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>  $\pm 0.1$ , от 10 до 20 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>  $\pm 0.2$ , температуры воды  $\pm 0.1^\circ$ , электропроводности до 20 мСм/см  $\pm 2\%$ , более 20 мСм/см  $\pm 4\%$ .

Гольяна *Phoxinus phoxinus* (L.) для определения содержания в его организме металлов отлавливали сачком из р. Човью (61°44.855' с.ш.; 50°42.541' в.д.) в мае–июне 2008 г. (12 проб по 10 экз. рыб в каждой), из р. Б. Шайтановка (62°01.641' с.ш.; 58°10.512' в.д.) в конце июня–начале июля 2009 г. (12 проб по 10 экз. рыб в каждой).

Пробы гольяна высушивали в полевых условиях (Ходулов, 2006), затем помещали в стерильные пробирки без консервантов и доставляли в лабораторию, где их предварительно обугливали минимальным количеством концентрированной серной кислоты, с последующим высушиванием минерализата при 120°...150° С. Далее образцы подвергали озолению в муфельной печи при постепенном нагреве от 0° до 400° 450° С до достижения образцом постоянной массы (Отмахов, Петрова, 2004). Каждая проба содержала материал от десяти особей гольяна. Для перерасчета концентрации металла от сухой (минерализованной) к сырой массе проб использовали коэффициент усушки ( $K=23.7\pm 0.2$ ), полученный экспериментально. Коэффициент вычисляли как отношение сырой массы пробы к ее сухой массе.

Количественное содержание металлов (Ca, Cu, Zn) в рыбе определено на сканирующем электронном микроскопе JSM–6380 LV фирмы JEOL, позволяющем получить массовую и атомную долю исследуемых элементов. Ошибка измерения – 0.1%.

Содержание металлов (Fe, Cu, Zn, Pb) в органах и тканях гольяна (7 проб по 10 экз. рыб в каждой) проведено на анализаторе рентгеновском бездифракционном «БАРС–3» фирмы ОАО «Краб» (г. Одесса). Результаты представлены в виде процентного превышения интенсивностей пиков импульсов ТМ по сравнению с фоном, в качестве которого использовали подложку. Ошибка измерения – 10%.

Воды р. Човью весной и осенью характеризуются низкой кислотностью (рН 6.8–6.9), летом и в начале сентября – низкой щелочностью (рН 7.6–7.9), высокой жесткостью (57–80 град.), повышенным содержанием органических веществ, железа и марганца, низкого – фтора. В воде р. Човью повышено содержание ионов NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и органики, эпизодически – Pb<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup>, фенолов, нефтепродуктов. Содержание NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в воде, особенно в мае–июне, повышается до 1.9–2.7 мг/л (Далицкая, 2002).

Воды р. Б. Шайтановка в начале июля прозрачны, желтоватого оттенка, слабощелочной реакции (рН 8.7), низкой минерализации, с малым содержанием органики. В воде р. Печоры в районе устья р. Б. Шайтановки незначительна концентрация соединений азота в аммонийной форме (0.18–0.48 мг/дм<sup>3</sup>), фосфора (0.027–0.038 мг/дм<sup>3</sup>) и железа (0.10–0.31 мг/дм<sup>3</sup>). Нитриты и нитраты, как правило, отсутствуют. Цветность составляет 8–22 град., бихроматная окисляемость 9.3 (Власова, 1988).

В тканях голяна из р. Човью отмечены ТМ, такие как Fe, Pb, Zn и Cu. Превышение фона для Fe составило 47%, Pb – 27%, Zn – 14%, Cu – 7%. Полученные данные указывают на загрязнение р. Човью соединениями Pb, который в отличие от Fe и Zn, относящихся к биогенным металлам и характерных для «чистых водоемов», имеет антропогенное происхождение и относится к загрязняющим веществам (Папина, 2001; Голованова, 2008).

Накопление металлов (Fe, Cu, Zn, Pb) в органах голяна из р. Човью представлено в виде процентного превышения интенсивностей пиков импульсов ТМ по сравнению с фоном, в качестве которого использовали подложку. Количество Fe в органах и тканях голяна статистически достоверно ( $t=15.3-18.1$ ;  $P>99.9\%$ ) убывает в ряду печень>почки>мышцы, что соответствует известным данным (Noye et al., 1990; Ходулов, 2006; Has-Schon et al., 2006). Концентрация Cu статистически значимо ( $t=2.3-7.1$ ;  $P>98.1-99.9\%$ ) снижается в последовательности почки>печень>мышцы. Содержание Pb ( $t=0.31$ ;  $P=24.3\%$ ) и Zn ( $t=1.41$ ;  $P=84.1\%$ ) одинаково в печени и почках, и несколько меньше, хотя и достоверно ( $t=7.3$  и  $5.3$  соответственно;  $P>99.9\%$ ), в мышцах. Поскольку вес мышц больше, чем вес почек и печени, то и свинца в них накапливается значительно больше, чем в других органах рыбы. Результаты, полученные в отношении накопления Zn и Pb в органах голяна, не совпадают с опубликованными сведениями для карповых рыб (Ходулов, 2006; Борисов, 2008).

Ранжирование металлов по степени их убывания в печени и почках голяна из р. Човью выглядит как следующий ряд: Fe>Pb>Zn>Cu. Распределение металлов в мышцах образует последовательность в виде Pb>Fe>Zn>Cu.

Для определения соответствия содержания Cu и Zn в рыбе ПДК для рыбных продуктов питания произведен перерасчет количества металлов в сухих пробах на их сырую массу. ПДК для рыбных продуктов по меди составляет 10, по цинку – 40 мкг/г сырой массы (Санитарные..., 2001). В организме голяна из р. Б. Шайтановка концентрации Cu и Zn составляют 0.8–0.9 ПДК, у голяна из р. Човью 2.5 и 1.8 ПДК соответственно.

В организм рыбы ионы Cu и Zn поступают преимущественно с пищей, однако поступление с водой также играет значительную роль (Голованова, 2008). В связи с этим интересно сравнить концентрации металлов в воде рассматриваемых водоемов и в организме голяна.

Концентрации Zn и Cu в воде рассматриваемых водотоков различаются на 14% и 15% соответственно, тогда как накопление этих металлов в организме рыбы отличается на 113% и 199%.

Содержание Са в воде р. Човью выше в 6 раз, чем в воде р. Б. Шайтановка, но его концентрация в организме голяна из р. Човью в 1.5 раза ниже, чем у рыбы из притока р. Печора.

Воды исследуемых водотоков имеют преимущественно гидрокарбонатно-кальциевый состав (Власова, 1988; Лапицкая, 2002). По щелочно-кислотным условиям воды р. Б. Шайтановки и р. Човью являются слабокислыми, нейтральными и слабощелочными. Концентрация растворенного в воде кислорода в исследуемых реках соответствует аэробным условиям. Величины удельной электропроводности, служащие приблизительным показателем суммарной концентрации электролитов, главным образом неорганических, довольно близки в рассматриваемых водотоках. Это класс вод, к которому относится большинство природных вод суши.

Воды р. Човью загрязнены свинцом, концентрация которого в воде, особенно весной и осенью, превышает ПДК. Свинец, видимо, поступает с выхлопными газами

автомобилей, проезжающих по автомагистрали, расположенной рядом с речкой, зимой талыми и дождевыми водами смывается в водоток.

Содержание в тканях гольяна из р. Човью Fe, Pb, Zn и Cu согласуется с известными данными (Лапицкая, 2002) и указывает на стабильность в последние 10 лет ситуации по загрязнению вод этого водотока указанными металлами.

Распределение металлов Fe, Pb, Zn и Cu в организме гольяна характеризуется неоднородностью, вероятно, зависящей от физико-химических свойств самих элементов и функциональных особенностей органов и тканей (Глазунова, 2005; Борисов, 2008). Как и в других случаях (Перевозников, Богданова, 1999), самые высокие их концентрации отмечены в печени и почках рыб. Однако ранжированные ряды металлов (Fe, Pb, Zn и Cu) по убыванию их в печени и почках гольяна не совпадают с опубликованными данными для карповых рыб (Глазунова, 2005; Ходулов, 2006). В описываемом случае у гольяна в органах и тканях менее всего накапливается медь, затем цинк. Более всего в его печени и почках концентрируется железо, в мышцах -- свинец, проникающий в организм рыб через пищу (бентос) и минуя печеночный барьер, накапливающийся в мышечной ткани (Степанова, Литыпова, 2005).

Сравнительный анализ содержания Zn и Cu в рыбе из рек Б. Шайтановка и Човью показал, что у гольяна из первого водоема их концентрация 2–3 раза меньше, чем из второго. Значения коэффициентов концентрации указанных металлов в организме рыб из этих водотоков разнятся в 2.4 и 2.6 раза соответственно. Величина коэффициента накопления Са в рыбе из Печорского бассейна выше такового для бассейна Вычегды в 9.2 раза.

Известно (Немова, Высоцкая, 2004), что введение Fe повышает всасывание Zn в кишечнике. Учитывая, что в воде р. Човью Fe содержится в 11.5–26.7 раз больше, чем в воде р. Б. Шайтановка, то этим, возможно, и объясняется большее накопление Zn в организме гольяна из р. Човью.

Воды р. Човью загрязнены свинцом, концентрация которого в воде, особенно весной и осенью, превышает ПДК. Ситуация по загрязнению вод р. Човью Fe, Pb, Zn и Cu в последние 10 лет стабильна. У гольяна из р. Б. Шайтановка концентрация Zn и Cu в 2–3 раза меньше, чем у рыбы из р. Човью.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борисов М.Я. Накопление тяжелых металлов в тканях и органах рыб озера Воже // Водные экосистемы: трофические уровни и проблемы поддержания биоразнообразия. Матер. Всерос. конф. «Водные и наземные экосистемы: проблемы и перспективы исследований». – Вологда, 2008. – С. 254–258.
2. Бускунова Г.Г., Аминова А.А. Проблема загрязнения медью растений на металлогенном поясе Южного Урала // Сб. науч. статей 4-й Всерос. науч.-практич. конф. «Экологические проблемы промышленных городов». – Саратов, 2009. – С. 42–43.
3. Власова Г.А. Гидрохимия главных рек Коми АССР. – Сыктывкар: Коми науч. центр УрО АН СССР, 1988. – 152 с.
4. Гладышев М.И., Грибовская И.В., Иванова Е.А., Москвичева А.В., Мучкина Е.Я., Чупров С.М. Содержание металлов в экосистеме и окрестностях рекреационного и рыболовного пруда Бугач // Водные ресурсы. – 2001. – Т. 28. – № 3. – С. 320–328.
5. Глазунова И.А. Содержание и особенности распределения тяжелых металлов в рыбах верховьев Оби: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Барнаул, 2005. – 19 с.
6. Голованова И.Л. Влияние тяжелых металлов на физиолого-биохимический статус рыб и водных беспозвоночных // Биология внутр. вод. – 2008. – № 1. – С. 99–108.
7. Кондратьева Л.М., Канцыбер В.С., Зазулина В.Е., Боковенко Л.С. Влияние крупных притоков на содержание тяжелых металлов в воде и донных отложениях реки Амур // Тихоокеанская геология. – 2006. – Т. 25. – № 6. – С. 103–114.

8. Лапидская В.Ф. Мониторинг поверхностных вод // Экологический мониторинг. – Сыктывкар: Сыктывкар. ун-т, 2002. – С. 38–49.
9. Немова Н.Н., Высоцкая Р.У. Биохимическая индикация состояния рыб. – М.: Наука, 2004. – 215 с.
10. Отмахов В.И., Петрова Е.В. Атомно-эмиссионный анализ биологических объектов с целью проведения экомониторинга районов Томской области и горного Алтая // Изв. Томск. политех. ун-та. – 2004. – Т. 307. – № 1. – С. 73–76.
11. Папина Т.С. Транспорт и особенности распределения тяжелых металлов в ряду: вода – взвешенное вещество – донные отложения речных экосистем: Аналитический обзор / ГПНТБ СО РАН; ИВЭП СО РАН. – Новосибирск, 2001. – Сер. Экология. – Вып. 3. – 58 с.
12. Первозников М.А., Богданова Е.А. Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах. – СПб.: ГосНИОРХ, 1999. – 228 с.
13. Санитарные правила и нормы: "Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов" (утв. постановлением Госкомсанэпиднадзора РФ от 24 октября 1996 г. № 27) (с изменениями от 11 октября 1998 г., 21 марта 2000 г., 13 января 2001 г.). – М., 2001. – 44 с.
14. Степанова Н.Ю., Латыпова В.З. Механизмы детоксикации тяжелых металлов в компонентах водной экосистемы Куйбышевского водохранилища // Уч. зап. Казан. гос. ун-та. Сер. Естественные науки. – 2005. – Т. 147. – № 3. – С. 18–26.
15. Ходулов В.В. Оценка влияния загрязнения рек западной Якутии алмазодобывающей промышленностью и урбанизированными территориями на экологию рыб: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Якутск, 2006. – 20 с.
16. Хохлова Л.Г. Гидрохимический режим реки Печора // Вестн. Ин-та биол. Коми науч. центра УрО РАН. – 2003. – № 12. – С. 8–11.
17. Has-Schon E., Bogut I., Strelec I. Heavy Metal Profile in Five Fish Species Included in Human in Diet, Domiciled in the End Flow of River Neretva (Croatia) // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 2006. – № 50. – P. 545–551.
18. Norey A., Cryer R., Kay S. Toxicity of cadmium, cobalt, uranium and zinc to *Zoogloea ramigera* // Water Res. – 1990. – V. 17. – P. 1252–1264.
19. Walker T.R., Crittenden P.D., Dauvalter V.A., Jones V., Kuhry P., Loskutova O., Mikkola K., Nikula A., Patova E., Ponomarev V.I., Pystina T., Ratti O., Solovieva N., Stenina A., Virtanen T., Young S.D. Multiple indicators of human impacts on the environment in the Pechora Basin, north-eastern European Russia // Ecological indicators. – 2009. – № 9. – P. 765–779.

**THE CONTENT OF HEAVY METALS IN THE ORGANISM OF MINNOW PHOXINUS PHOXINUS (L.) FROM THE PECHORA AND VYCHEGDA RIVER BASINS**

**G.N. Dorovskikh, V.V. Mazur, A.P. Petrakov**

During research the supplemental hydrochemical description of Chovju river and B. Shaitanovka river was made; comparative analysis of metals concentration (Ca, Zn, Cu) in species of fish from Chovju river and B. Shaitanovka river was done; metals concentration (Fe, Cu, Zn, Pb) in various organs (muscles, liver, kidney) of minnow was determined.

И.А. Ерохина

Учреждение Российской академии наук Мурманский морской биологический  
институт Кольского научного центра РАН, Мурманск, Россия  
erohina@mmbi.info

Гаптоглобин – один из компонентов активной фазы реактивных белков. Специфическое свойство гаптоглобина заключается в его способности быстро и прочно связывать гемоглобин, и этим частично объясняют участие данного белка в защитно-приспособительных реакциях организма позвоночных животных. Подобно антителам, гаптоглобин может агглютинировать некоторые стрептококки. Этот белок реагирует на патологию изменением своей концентрации, на основании чего рассматривается в качестве чувствительного теста в оценке физиологического состояния организма. При различных заболеваниях изменения содержания гаптоглобина в крови неоднозначны. Так, при атеросклерозе, гемолитических анемиях, интраваскулярном гемолизе, гепатоцеллюлярных расстройствах уровень гаптоглобина снижается до нерегистрируемых величин, а при воспалительных процессах, лимфогрануломатозе, травмах, инфекционных заболеваниях, лучевой болезни резко возрастает (Бейсембаева, 1984; Алешкин и др., 1988).

Несмотря на отсутствие специфичности изменений концентрации гаптоглобина в отношении конкретных заболеваний, измерение его содержания в крови используется для диагностики патологии человека и сельскохозяйственных животных (Solter et al., 1991; Gruys et al., 1994). Однако существуют ограничения, связанные с видовыми особенностями уровня и степени выраженности ответной реакции гаптоглобина (Murata et al., 2004). В связи с этим рекомендуется определять диапазон изменчивости данного показателя конкретно для разных видов животных. Для морских млекопитающих подобные сведения единичны (Zenteno-Savin et al., 1997; Kraft et al., 2006; Thomson, Melish, 2007). Показательно, что даже в настольной книге исследователя морских млекопитающих (Handbook..., 2001), посвященной медицинским аспектам, отсутствуют данные о гаптоглобине в крови этих животных в связи с оценкой состояния здоровья, за исключением ссылки на статью, упоминающуюся и в данной работе (Zenteno-Savin et al., 1997), об ответных реакциях животных на хронический стресс в деградирующих популяциях, подверженных инфекциям, воспалениям, влиянию поллютантов.

На основании вышеизложенного мы сочли своевременным представить собственные данные по содержанию гаптоглобина в плазме крови двух видов арктических ластоногих – гренландского и серого тюленей.

Объектами исследования были гренландский (*Pagophilus groenlandicus* Eriksen, 1777) и серый (*Halichoerus grypus* Fabricius, 1791) тюлени. Животных изучали в природных условиях во время экспедиций на зверобойный промысел (гренландский тюлень, n=87) и на ценные залежки (серый тюлень, n=36), а также при содержании на экспериментальной базе Мурманского морского биологического института КНЦ РАН в губе Сайда Кольского залива Баренцева моря (n=4). Кровь для исследования брали из экстрадуральной вены, как описано в работе (Geraci, Smith, 1975). Плазму отделяли центрифугированием. Гаптоглобин в плазме крови определяли методом, основанным на осаждении риванолом комплекса гаптоглобин-гемоглобин. По уровню оставшегося в растворе гемоглобина

рассчитывали содержание гаптоглобина (Справочник..., 2003). Цифровой материал обработан статистически с использованием критерия Стьюдента (Кокунин, 1975).

Данные о содержании гаптоглобина в крови ластоногих в литературе немногочисленны. У кольчатой нерпы (*Pusa hispida*) этот показатель составляет в среднем  $0.26 \pm 0.02$  г/л (пределы колебаний 0.0-1.5 г/л) и существенно зависит от возраста, пола, упитанности животных (Krafft et al., 2006). У сивучей (*Eumetopias jubatus*), содержащихся в неволе, среднее значение концентрации гаптоглобина  $1.33 \pm 0.17$  г/л (Thomton, Melish, 2007). При этом авторы упомянутого гаптоглобина утверждают, что уровень гаптоглобина не зависит от возраста, сезона и наличия паразитарной инвазии. В то же время он существенно возрастал (до 10.06 г/л) у большого животного с обширным абсцессом, возвращаясь к нормальным значениям после лечения. Опубликованные данные по содержанию гаптоглобина в крови северного морского котика (*Callorhinus ursinus*) (Mazarro et al., 2004 – цит. по: Thomton, Melish, 2007) близки к таковым у кольчатой нерпы – 0.35-1.14 г/л.

Наши многолетние исследования биохимических показателей крови гренландских тюленей беломорской популяции позволили определить нормальные значения концентрации гаптоглобина в плазме крови, составляющие 1.1-1.5 г/л (Кавцевич, Ерохина, 1996). Установлено также, что уровень этого показателя у взрослых животных статистически достоверно выше, чем у щенков. Так, у новорожденных тюленей содержание гаптоглобина составляет  $1.26 \pm 0.18$  г/л, у 1.5-2-месячных щенков –  $1.44 \pm 0.008$  г/л, у взрослых (старше 6 лет) –  $2.00 \pm 0.17$  г/л. Мы имели также возможность исследовать зависимость концентрации гаптоглобина в плазме крови от физиологического состояния животных, изучив состав крови особой группы животных – так называемых заморышей. Заморыши – это недокормленные щенки, по разным причинам оставленные матерью. Они выделяются среди остальных низкой упитанностью (вес 10-15 кг против 30-35 кг у нормальных щенков) и характерными внешними признаками (выступающие лопатки и кости таза, обозначенная шея, аномалии линьки). Доля заморышей в приплоде невелика. Тем не менее нельзя не учитывать роль таких особей в популяции, так как они появляются каждый год, часть из них выживает. Следовательно, в популяции всегда имеется группа животных с разного рода отклонениями от нормального состояния. Характер и число таких отклонений могут в определенной степени влиять на состояние популяции и перспективы ее развития. Аномальное состояние заморышей на уровне обмена веществ подтверждается и нашими исследованиями гематологических и биохимических параметров крови (Кавцевич, Ерохина, 1996).

Результаты сравнительного исследования нормальных щенков и заморышей по содержанию гаптоглобина в плазме крови представлены на рисунке 1. Установлено, что во все годы наблюдений уровень гаптоглобина в крови нормальных щенков находился в пределах нормы, хотя и на уровне верхней границы нормальных значений. В это же время у заморышей содержание гаптоглобина в плазме крови статистически достоверно превышало показатели нормальных щенков, за исключением данных 1994 года, когда по данному показателю не обнаружено достоверных различий между изучаемыми группами животных. На наш взгляд, этот факт свидетельствует о том, что изучаемый показатель неспецифически отражает состояние неблагополучия в организме обследованных животных. Можно предположить, что в данной популяции растет число особей с негативными изменениями метаболизма и через какое-то время это должно неизбежно отразиться на состоянии популяции. В пользу этого свидетельствуют и данные по другим изученным параметрам крови. Следует отметить, что в 1991 году различия были

значительнее, чем в 1994 году. Можно говорить о том, что внешне нормальные щенки

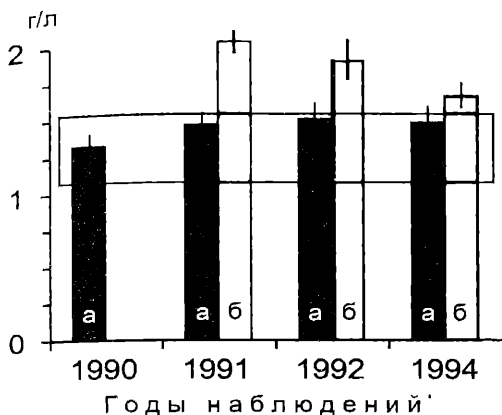


Рис. 1. Содержание гемоглобина в плазме крови нормальных щенков (а) и заморышей (б) гренландского тюленя беломорской популяции. В рамке – значения нормы для данного показателя

1994 года рождения в своем состоянии, по данным биохимического исследования крови, приближаются к заморышам. Заметим, что на неблагоприятные тенденции в развитии беломорской популяции гренландского тюленя указывали и данные других исследователей, в частности СевПИНРО (Архангельск), располагающих многолетними наблюдениями биологии этого вида (Потелов, 1994; Timoshenko, 1995).

У новорожденных серых тюленей содержание гемоглобина в плазме крови статистически достоверно меньше, чем у одновозрастных гренландских тюленей, и составляет  $0.85 \pm 0.10$  г/л (данные 1991г.) и  $0.74 \pm 0.11$  г/л (данные 1994г.). Можно объяснить этот факт видовыми особенностями, что еще раз подтверждает приведенное выше мнение (Murata et al., 2004) о необходимости определения диапазона изменчивости уровня гемоглобина крови различных животных с тем, чтобы можно было использовать этот показатель в диагностических и прогностических целях. С другой стороны, можно предположить, что столь различающиеся значения свидетельствуют о неодинаковом состоянии животных в популяциях. Как уже отмечалось выше, в беломорской популяции гренландского тюленя с 90-х годов прошлого века наблюдается неблагоприятная ситуация, проявляющаяся, в частности, в увеличении количества старых самок, участвующих в размножении, и ухудшении качества потомства (Потелов, 1994; Timoshenko, 1995). В противоположность этому состояние мурманских колоний восточно-атлантической популяции серого тюленя не вызывало серьезных опасений. Во многом такая ситуация объясняется тем, что этот вид в России охраняется законом, а места размножения серого тюленя Мурманского побережья располагаются на территории заповедника.

Исследования содержания гемоглобина в плазме крови щенков гренландского тюленя, помещенных в океанариум, позволили проследить динамику этого показателя в период адаптации животных к условиям неволи. Анализировали



кровь 4-х гренландских тюленей, привезенных из Кандалакшского залива в возрасте 3-х месяцев. Сроки наблюдения для отдельных особей составили: №1 - с 26 июня 2001г. по настоящее время; №2 - с 26 июня 2001г. по настоящее время; №3 - с 26 июня 2001г. по 22 апреля 2002 г.; №4 - с 26 июня 2001г. по 13 апреля 2004г. Животные №3 и №4 погибли, прожив в неволе 18 и 34 месяца соответственно. В начале наблюдения состояние животных отличалось от нормы, об этом свидетельствовали данные общего анализа крови (скорость оседания эритроцитов, концентрация гемоглобина, число эритроцитов и лейкоцитов, лейкоцитарная формула) и показатели естественной резистентности животных (сорбционная способность эритроцитов, содержание в плазме крови гаптоглобина и лизоцима).

В течение месяца наблюдений у всех экспериментальных животных отмечены резкие колебания уровня гаптоглобина в плазме крови (рис.2).

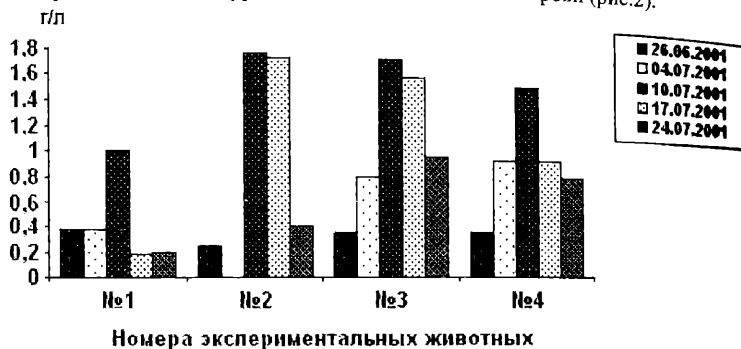


Рис. 2. Содержание гаптоглобина в плазме крови щенков гренландского тюленя в начальный период содержания в неволе

Характер динамики показателя сходен, при этом степень выраженности изменений различается у отдельных животных. При первом обследовании содержание гаптоглобина было очень низким – не выше 0.4 г/л. Через две недели этот показатель вырос в несколько раз – максимально до 1.8 г/л, а затем стал снижаться. Следует отметить, что к концу периода наблюдения, который совпал с завершением процессов адаптации животных к содержанию в неволе, уровень гаптоглобина резко различался у обследованных животных: у тюленей №1 и №2 он не превышал величины 0.4 г/л, тогда как у тюленей №3 и №4 достигал значения 1 г/л. Как отмечалось выше, из данной группы животных до настоящего времени дожили тюлени №1 и №2, тогда как №3 и №4 погибли через определенное время содержания в неволе. Не исключено, что отмеченные особенности динамики содержания гаптоглобина у них в крови в начальный период адаптации к новым условиям жизни связаны с особенностями их физиологического состояния в этот период, определившего их дальнейшую жизнеспособность. В пользу этого предположения свидетельствуют и другие показатели, по которым резко различались выделенные нами мини-группы - №1 + №2 и №3 + №4. В частности, таким показателем относится лейкоцитарная формула, которая, как известно, широко используется в медицинской и ветеринарной практике с диагностическими целями. Выделенные группы резко различались по соотношению уровня лимфоцитов и нейтрофилов (Кавцевич и др., 2007). Так, у погибших в разное время тюленей №3 и №4 не наблюдался физиологический перекрест, являющийся характерной возрастной особенностью клеточного состава крови млекопитающих.

Этот факт позволил предположить, что утрата характерных возрастных особенностей может рассматриваться как снижение уровня жизнеспособности, приводящее к гибели животных.

Таким образом, результаты исследований показывают, что гаптоглобин является лабильным показателем, содержание которого в крови тюленей зависит от физиологического состояния животных. На этом основании показатель уровня гаптоглобина в плазме крови ластоногих может использоваться для оценки состояния популяции в биомониторинге, а также для характеристики физиологического состояния животных в условиях океанариума.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешкин В.А., Новикова Л.И., Лютов А.Г., Алешкина Т.Н. Белки острой фазы и их клиническое значение // *Клин. мед.* - 1988. - Т.66, №8. - С.39-48.
2. Бейсембаева Р.У. Гаптоглобин: структура, свойства и роль в организме позвоночных // *Усп. соврем. биол.* - 1984. - Т.98, вып. 3(6). - С.409-425.
3. Кавцевич Н.Н., Ерохина И.А. Биохимические и цитологические исследования морских млекопитающих в Арктике. - Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 1996. - 169с.
4. Кавцевич Н.Н., Ерохина И.А., Войнов В.Б. Оценка и контроль физиологических и функциональных параметров ластоногих // *Экспериментальные исследования морских млекопитающих в условиях Кольского залива.* - Апатиты: Изд. КНЦ РАН, 2007. - С.125-161.
5. Кокунин В.А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов // *Укр. биохим. журн.* - 1975. - Т.47, №6. - С.776-790.
6. Потелов В.А. Перспективные для промысла виды морских млекопитающих в прибрежной зоне Баренцева моря // *Развитие прибрежного промысла и аквакультуры в Баренцевом море.* - Мурманск, 1994. - С.65-67.
7. Справочник по лабораторным методам исследования / Под ред. Л.А.Даниловой. - СПб: Питер, 2003. - 736с.
8. Geraci J.R., Smith T.G. Functional hematology of ringed seals (*Phoca hispida*) in the Canadian Arctic // *J. Fish. Res. Board. Can.* - 1975. - V.32, N 12. - P.2559-2564.
9. Gruys E., Obwolo M.J., Toussaint J.M. Diagnostic significance of the major acute-phase proteins in veterinary clinical chemistry: A review // *Vet. Bull.* 1994. - V.64. - P.1009-1018.
10. Handbook of marine mammal medicine / Ed. by L.A. Dierauf and F.M.D. Gulland. - CRC Press, Boca Raton, Florida, 2001. - 1063p.
11. Kraft B.A., Lydersen C., Kovacs K.M. Serum haptoglobin concentrations in ringed seals from Svalbard, Norway // *J. Wildlife Diseases.* - 2006. - V.42, N 2. - P.442-446.
12. Murata H., Shimada N., Yoshioka M. Current research on acute-phase proteins in veterinary diagnosis: An overview // *Vet. J.* - 2004. - V.168. - P.28-40.
13. Solter P.F., Hoffman W.E., Hungerford L.L. et. al. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs // *Am. J. Vet. Res.* - 1991. - V.52. - P.1738-1742.
14. Thomson J.D., Mellish J.-A.E. Haptoglobin concentrations in free-range and temporarily captive juvenile Steller sea lions // *J. Wildlife Diseases.* - 2007. - V.43, N 2. - P.258-261.
15. Timoshenko Yu.K. Harp seals as indicators of the Barents Sea ecosystem//Whales, seals, fish and man: Proc. Int. Symp. Biol. of Mar. Mamm. in the North East Atlantic, 29 nov.-1 dec.1994, Tromso, Norway / Ed. A.S. Blix, L. Walloe, O. Ultang.-Amsterdam: Elsevier Sci.B.V., 1995. - P.509-522.
16. Zenteno-Savin T., Castellini M.A., Rea L.D., Fadely B.S. Plasma haptoglobin levels in threatened Alaskan pinniped populations // *J. Wildlife Diseases.* - 1997. - V.33. - P.64-71.

### HAPTOGLOBIN AS THE INDICATOR OF MARINE MAMMALS PHYSIOLOGICAL STATE

I.A. Yerokhina

The results of investigation of the haptoglobin in a blood plasma of two species of pinnipeds - harp (*Pagophilus groenlandicus* Erxleben, 1777) and grey (*Halichoerus grypus* Fabricius, 1791) seals - are submitted. It is concluded that the parameter of a haptoglobin level in a blood plasma of pinnipeds can be used for the evaluation of the population state in biomonitoring, and also for the characteristic of the animal physiological state in captivity.

# ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ РЫБ ПО ИОННОМУ СОСТАВУ ЭРИТРОЦИТОВ

Р.А. Запруднова

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия  
rimma@ibiw.yaroslavl.ru

Исследовали концентрацию ионов магния, натрия и калия в эритроцитах шести видов рыб Рыбинского водохранилища в норме и при стрессе. Установлено, что эритроцитарные ионы главным образом связаны с дыхательной функцией, красных кровяных клеток. Так, виды рыб, устойчивые к гипоксии (карась, линь) имели более высокое содержание ионов магния и калия в эритроцитах и более низкое – натрия, чем виды, менее устойчивые к недостатку кислорода в воде (лещ, плотва, окунь, щука).

Выявлена зависимость концентрации магния в эритроцитах от интенсивности стрессовой нагрузки разной природы. Слабые воздействия различных стрессоров увеличивали концентрацию этого иона, а те же факторы, но в более высоких дозах, а также комплексные воздействия сильных стрессоров снижали содержание магния в эритроцитах. Проведенные исследования позволяют рассматривать эритроцитарные ионы магния (которые являются положительными модуляторами сродства гемоглобина к кислороду) как один из молекулярных механизмов уменьшения интенсивности газообмена при слабых стрессовых воздействиях и увеличения – при сильных и, следовательно, регуляции обмена веществ, роста и развития рыб. Таким образом, высокое содержание магния в эритроцитах является показателем физиологического стресса у рыб, а крайне низкие значения эритроцитарного магния характерны для сильного острого (патологического) стресса.

Установлено, что повышение содержания катехоламинов (адреналина и норадrenalина) в плазме крови сопровождалось увеличением уровня натрия в эритроцитах. Поэтому концентрация натрия в эритроцитах может служить косвенным показателем содержания катехоламинов в крови и унифицированным индикатором глубины развития острого стресса. Кроме того, по концентрации натрия в красных кровяных клетках мы судили об интенсивности  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена через мембрану эритроцитов, т.е. о буферных свойствах организма. Установлено, что сильнее всего защелачивается внутриэритроцитарная среда у наиболее кислотоустойчивых рыб: щуки и окуня.

Уменьшение содержания кислорода в воде и выдерживание рыб на воздухе всегда сопровождалось повышением концентрации калия в эритроцитах. И, напротив, самое большое падение уровня этого иона в красных кровяных клетках наблюдали при гипероксии крови, как, например, это имело место у щуки, обладающей самой большой площадью жаберных клеток для обмена газами. Таким образом, концентрация калия в эритроцитах может служить показателем уровня насыщения организма кислородом.

В настоящей работе также предлагается простой и информативный экспресс-метод определения состояния рыб по интенсивности активного транспорта ионов калия в эритроциты в опытах *in vitro*. Об активном транспорте судили по уменьшению концентрации калия в плазме при инкубации крови. Установлено, что интенсивность активного транспорта снижалась при ухудшении состояния рыб, вызываемом разными причинами, и достигала нулевых значений перед гибелью.

## DIAGNOSIS OF FISH CONDITION ON THE IONIC CONSTITUTION OF ERYTHROCYTES

R.A. Zaprudnova

The concentration of magnesium, sodium and potassium ions in erythrocytes of fresh-water fish in normal conditions and under stress are investigated.

# РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕРПЕСВИРУСА СИБИРСКОГО ОСЕТРА В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

**И.М. Калабеков, Ф.С. Калабекова, Т.И. Щелкунова, И.С. Щелкунов, Д.В. Колбасов**  
ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии  
и микробиологии Россельхозакадемии, г. Покров, Россия, [ismil@yandex.ru](mailto:ismil@yandex.ru)

Герпесвирусы являются одной из наиболее многочисленных групп вирусов, вызывающих экономически значимые инфекции у рыб (Щелкунов, 2000).

Пионером изучения вирусных болезней осетровых рыб является профессор Рональд Хедрик (США), в лаборатории которого получены первые линии клеток белого осетра *Acipenser transmontanus* и впервые выделены вирусы от осетровых рыб. В настоящее время у североамериканских осетровых обнаружено 10 разных вирусов, из которых два различающихся между собой агента относятся к группе герпесвирусов сем. *Alloherpesviridae* порядка *Herpesvirales* (Hedrick et al., 2001).

Герпесвирусы выделены также от тупорылового осетра *A. brevirostrum* в Канаде, а в 2006 г. от сибирского осетра в России (Щелкунов и др., 2007; Shchelkunov et al., 2009).

Экспресс-диагностикумы на основе ПЦР на герпесвирусы осетровых не разработаны, а традиционные лабораторные методы являются трудоёмкими, длительными (до месяца и более) и не всегда отвечают запросам современной аквакультуры. Целью нашей работы было определение возможности и эффективности применения полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продукта в режиме «реального времени» для выявления генома герпесвируса сибирского осетра (SbSHV) в зараженной культуре клеток и клиническом материале от рыб.

Клинический материал отбирали от сеголетков стерляди, экспериментально инфицированных герпесвирусом сибирского осетра методом ванн, и от годовиков сибирского осетра при естественной вспышке болезни.

Методом ПЦР исследовали пробы органов сердце, печень, почки, селезенку, задний отдел кишечника, плавательный пузырь, рот, плавники, а также слизь кожного покрова.

Подбор праймеров и олигонуклеотидного зонда (табл. 1) осуществляли с помощью программы Oligo 4.0 на основе представленной в Генбанке нуклеотидной последовательности [NCBI GI:288975339] (Doszpoly, Shchelkunov, 2010). Синтез праймеров и зонда осуществляли на базе НПФ «Литех» (г. Москва).

Таблица 1.

Последовательности использованных праймеров и ДНК-зонда

Обозначение	5' - 3' последовательность
SbSHV 1-F	gCAACAAGgCTCggTTAgATg
SbSHV 1-R	gCgTCgAggAATTgTTTCTgg
SbSHV 1-Z	[FAM]-TgTgTTggCggTTggCAACTTACA-[BHQ1]

Постановку ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» проводили на приборе RotorGene-6000 («CorbettResearch», Австралия). Полученные в ходе экспериментов данные анализировали с помощью

программного обеспечения, входящего в комплект прибора. Специфичность данного метода подтверждали секвенированием продуктов амплификации. Параллельно в клетках линии SSO-2 пула внутренних органов сибирского осетра определяли титр вируса в исследуемых образцах. Оптимальный температурный профиль амплификации и компоненты реакционной смеси приведены в табл. 2.

Таблица 2.

Параметры постановки ПЦР

Ингредиенты реакционной смеси		Объем, $\mu$ л
H <sub>2</sub> O		9
Буфер 5 $\times$ PCR (Qiagen)		5
dNTPs (10 mMol)		1
Праймеры (10 pMol/ $\mu$ л) + зонд (5 pMol/ $\mu$ л)		1+1+0,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mMol)		2,5
Taq Pol (5 u/ $\mu$ л)		0,15
DNA		5
Температурный профиль амплификации		
95 $^{\circ}$ C – 3 мин		1 цикл 45 циклов
94 $^{\circ}$ C – 10 с, 65 $^{\circ}$ C – 16 с, 72 $^{\circ}$ C – 13 с		

На рис. 1 представлены результаты амплификации серийных разведений ДНК герпесвируса сибирского осетра, выделенной из зараженной культуры клеток SSO-2. Чем больше ДНК-мишени в пробе, тем на более раннем цикле (Ct) прибор детектирует превышающую пороговое значение флуоресценцию зонда интенсивность свечения которого, выдаваемая для каждого образца в виде кривых S образной формы, пропорциональна концентрации накапливающегося продукта амплификации.

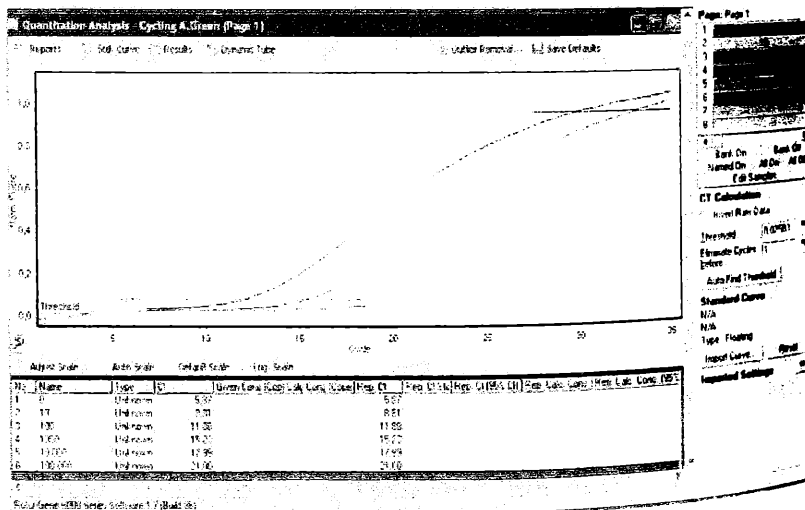


Рис. 1. Результаты постановки ПЦР в «реальном времени»

При ПЦР-исследовании патматериала от инфицированных рыб получены следующие результаты:

- 1) геном герпесвируса сибирского осетра выявляли как в разгар заболевания, так и на стадии завершения эпизоотии;
- 2) по диагностической чувствительности выявления вируса метод ПЦР уступал вирусовыделению в острой фазе заболевания, но превосходил его на стадии завершения болезни.

Разработанные олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентный зонд позволяют обнаруживать ДНК герпесвируса сибирского осетра в клиническом материале от рыб и могут быть использованы для лабораторной диагностики герпесвирусной болезни. Для повышения диагностической эффективности метода необходима его дальнейшая оптимизация.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Щелкунов И.С. Вирусные инфекции у осетровых рыб // Рыбное хоз-во. Аналит. и реферат. информация. Серия: Болезни гидробионтов в аквакультуре. ВНИЭРХ, 2000. - Вып. 1. - С. 3-16.
2. Щелкунов И.С., Щелкунова Т.И., Щелкунов А.И., Колбасова Ю.П., Диденко Л.В., Быковский А.Ф. Герпесвирусная болезнь у осетровых рыб в России // Российский ветеринарный журнал (Сельскохозяйственные животные). - 2007. - № 1. - С. 10-12.
3. Щелкунов А.И., Щелкунов И.С. Герпесвирусная болезнь сибирского осетра // Ветеринария. - 2010. - №1. - С. 18-21.
4. Doszpoly A., Shchelkunov I.S. Partial genome analysis of Siberian sturgeon *alloherpesvirus* suggests its close relation to *AciHV-2* // Acta Veterinaria Hungarica. - V.58. - 269-274.
5. Hedrick R., LaPatra S., McDowell T., MacConnell B. A workshop on sturgeon diseases. // Conducted at the 4th Int. Symposium on Sturgeon. Oshkosh, Wisconsin, USA, 8 - 13 July 2001. - 25p.
6. Shchelkunov I.S., Shchelkunova T.I. Shchelkunov A.I., Kolbassova Y.P., Didenko L.V., Bykovsky A. Ph. First detection of a viral agent causing disease in farmed sturgeon in Russia // Diseases of Aquatic Organisms. - 2009. - 86. - 193-203.

### DEVELOPMENT OF A REAL-TIME PCR FOR THE DETECTION OF SIBERIAN STURGEON HERPESVIRUS IN FISH CLINICAL SAMPLES

I. Kalabekov, F. Kalabekova, T. Shchelkunova, I. Shchelkunov, D. Kolbasov

The aim of the present study was to develop a real-time PCR based method for detection of Siberian sturgeon herpesvirus (SbSHV) and to evaluate the applicability of its use on cell culture grown virus and fish clinical samples. Compared with classical virus isolation technique in cell culture, the developed RT-PCR method showed lower diagnostic sensitivity at the acute stage of disease. However, it provided higher sensitivity at the recovery stage.

# ОЦЕНКА ЭПИЗООТИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ВОДОЁМОВ КАК ВАЖНАЯ ЗАДАЧА РАЗВИТИЯ АКВАКУЛЬТУРЫ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

М.Л. Калайда\*, Л.К. Говоркова

Казанский Государственный Энергетический Университет, Казань, РТ  
\*kalayda@mi.ru

Для решения задач аквакультуры региона Средней Волги важна оценка эпизоотического состояния. Паразитофауна рыб Волги до образования Куйбышевского водохранилища исследовалась многими специалистами (Измюмова, 1958). После образования Куйбышевского водохранилища начались и продолжаются исследования паразитофауны вновь созданного водоема, характеризующегося отличными от реки гидрологическими и биотическими условиями (Калайда, 2000, 2004; Козлова, 2001; Любарская, 2009, 2001).

При исследовании различных видов рыб: стерлядь, щука, синец, красноперка, плотва, серушка, язь, жерех, линь, укляк, густера, лещ, белоглазка, чехонь, сазан, карась, сом, налим, судак, берш, окунь, ерш было идентифицировано 170 видов паразитов. Доминирующими видами оказались представители лимнофильного комплекса, которые получили широкое распространение в результате общего процесса формирования всей экосистемы водоема. В Куйбышевском водохранилище за последние 50 лет наиболее распространенными были заболевания дифиллоботриоз, описторхоз и лигулез (Любарская, 2009; Любарская, 2001; Салихова, 1970).

В структуре заболеваемости населения по данным государственных докладов «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Республике Татарстан» за последний период среди биогельминтозов наиболее распространенными остаются гельминтозы, передающиеся через рыбу и рыбопродукцию, на их долю приходится 71,2- 91,1% всех случаев биогельминтозов. При этом в структуре паразитарной заболеваемости доля биогельминтозов несколько возрастает: 2007 г.- 0,9%; 2008 и 2009 г.- 1,3%.

В 40-х годах заболеваемость дифиллоботриозом в республике носила спорадический характер, к 60-м годам число заболеваний стало возрастать и достигло своего максимума. В 50-60-х создались благоприятные условия для воспроизводства первых и вторых промежуточных хозяев лентеца широкого в акватории вновь созданного Куйбышевского водохранилища. К 90-м годам прошлого столетия произошло снижение заболеваемости дифиллоботриозом.

В 60-е годы процент инвазированности плероцеркоидами щуки и окуня составлял 82,4 и 28,9% соответственно, а в период с 70-х по 90-е годы инвазированность щуки достоверно снизилась в 1,8 раза, а окуня почти в 9 раз (Козлова, 2001).

В последние 20 лет заболеваемость дифиллоботриозом продолжает снижаться. Если в 1996-1997 г. отмечалось 10,3 случая заболевания на 100 тыс. населения, то в 2007-2008 г. заболеваемость снизилась соответственно до 1,2-1,5.

Заболеваемость дифиллоботриозом в 2005 г. регистрировалась в 18 районах и городах республики. Наиболее высокий уровень заболеваемости, в 2-3 раза превышающий среднереспубликанский, был отмечен в Зеленодольском, Менделеевском, Мензелинском, Мамадышском, Нижнекамском, Тукаевском, Чистопольском районах и г. Набережные Челны. В 2007 г. возбудитель дифиллоботриоза был выявлен у 17 человек (в 2006 г. - 31 чел.) в 8 районах республики. В 2008 г. возбудитель дифиллоботриоза был выявлен у 20 человек из 9

районов республики. Ежегодно максимальное число заболевших отмечается в Зеленодольском районе.

Распределение паразитов у различных видов рыб по отдельным участкам водохранилища неравномерно. Многие паразиты встречаются единично, многие имеют такой цикл развития, при котором значительное время года рыбы остаются незараженными. Наряду с этим имеются паразиты, которые вызывают серьезные заболевания рыб и человека и имеют важное эпидемиологическое значение. Волжско-Камский бассейн, включая территорию Республики Татарстан, относится к территории, занимающей второе место в России по распространению описторхоза (Любарская, 2009; Любарская, 2001). Природные очаги описторхоза в Татарстане были выявлены еще в начале 50-х годов XX века. В 1957 г. зараженность жителей 6 районов РТ описторхозом составила 80-90% (Салихова, 1970). Во второй половине 60-х годов описторхозную инвазию, с пораженностью до 81% у жителей 8 районов РТ выявила Р.У. Салихова (Салихова, 1970).

В конце XX столетия в группе антропогенных гельминтозов описторхоз сохранял 4-е место (Любарская, 2009; Любарская, 2001) в структуре заболеваемости. Отмечалась определенная тенденция к росту инвазированности населения описторхозом. В 1985-89 гг. описторхоз регистрировали в 14, в 1990-94 гг. – в 17, а в 1995-99 гг. – в 22 районах республики (Любарская, 2001). В основном это регионы, прилегающие к акваториям Куйбышевского и Нижнекамского водохранилищ, а также в юго-восточных (нефтеносных) районах республики. В 2005 г. произошел рост заболеваемости описторхозом на 21% по сравнению с 2004 г. Было отмечено 62 случая описторхоза. Наиболее высокий уровень заболеваемости, от 2 до 6 раз превышающий среднереспубликанский, отмечается в Бавлинском, Елабужском, Зеленодольском, Кукморском районах.

С 2006 г. уровень заболеваемости описторхозом колеблется: в 2006 г. - он выявлен у 8 чел., в 2007 г. - у 18 , в 2008 г. - у 15, в 2009 г. - у 17 чел. В 2009 г. отмечен рост заболеваемости населения республики описторхозом на 6,8%. Следует отметить, что заболеваемость описторхозом держится на стабильно низком уровне - от 1,2 до 1,8 на 100 тысяч населения. Показатели заболеваемости в Республике Татарстан (в 20 раз и более) ниже показателей Российской Федерации.

Случаи описторхоза отмечались в Мамадышском, Зеленодольском, Чистопольском, Бавлинском районах, в г. Набережные Челны.

По результатам обследования 13 видов карповых рыб на 18 участках акваторий Куйбышевского и Нижнекамского водохранилищ у 25 экз. рыб (0,86%) 4-х видов (плотва, густера, язь, чехонь) обнаружены личинки описторхид родов *Pseudophistomum*, *Metorchis*, *Opistorchis*. По итогам комплексных работ выявилось, что в экологических системах интразональных ландшафтов республики сохранились практически все звенья паразитарного комплекса природного очага описторхоза, но его эпидемиологическая валентность в сравнении с таковой в 50-60-х годах существенно снизилась (Любарская, 2009; Любарская, 2001; Салихова, 1970).

В связи с сохранением заболеваемости по дифиллоботриозу и описторхозу нами были проведены исследования в летний период 2008-2009 г в районах у г. Зеленодольска (Зеленодольский район), в районе устья р. Меши (Лаишевский район), в районе н.п. Ташевка (Верхнеуслонский район), у н.п. Камское устье (Камско-Устьинский район) и в районе г. Тетюши (Тетюшский район). Была исследована паразитарная инвазированность 120 особей рыб, относящихся к 10 видам, представляющим семейство карповых (лещ, густера, плотва, синец, язь, белоглазка, чехонь), а также другие семейства (стерлядь, берш, судак, щука).



Учитывалось, что инвазированными дифиллоботриозом могут быть также хищные рыбы, как щука, налим, сом, а по описторхозу – карповые рыбы: лещ, язь, плотва, синец, белоглазка, чехонь, жерех, линь.

Обследование особей рыб, выловленных в Волжском плесе выше г. Казань, районе устья Камы и ниже Камского устья в Куйбышевском водохранилище в пределах Республики Татарстан выявило наличие инвазированности их личинками паразитов *Opisthorchis felineus*, *Paracoenogonimus ovatus*.

В мышечной ткани исследованных особей рыб не удалось обнаружить личинки *Diphyllobotrium latum*, что, вероятно, связано с отсутствием в составе улова видов – дополнительных хозяев данного паразита: окуня, ёрша, а в щуке он не был обнаружен.

Обращает на себя внимание высокая степень инвазированности рыб Куйбышевского водохранилища в пределах вод Республики Татарстан личинками *Paracoenogonimus ovatus*. Данный паразит был встречен в леще, густере, плотве, синце, язе и берше (Табл. 1).

Таблица 1.

Зараженность (%) личинками *Paracoenogonimus ovatus* рыб на различных участках Куйбышевского водохранилища

Вид рыбы	Участок водохранилища				
	Район у г. Зеленодольска	Район устья р. Мёши	Район н.п. Ташевка	Район н.п. Камское Устье	Район г. Тетюши
	Административный район РТ				
	Зеленодольский	Ланьевский	Верхнеуслонский	Камско-Устьинский	Тетюшский
Густера	92,7	-	0	87,9	0
Лещ	60,3	40	50	0	0
Синец	50,4	67,1	92,5	97,0	0
Белоглазка	0	-	100	0	-
Плотва	-	-	100	-	-
Чехонь	-	-	0	-	0
Язь	-	0	0	37,2	-
Берш	-	-	88,2	0	-
Судак	0	-	-	0	0
Стерлядь	-	-	0	-	-
Щука	-	0	0	-	-

Интересно отметить, что данный паразит не отмечен ни в одном экземпляре обследованных судаков, но встречен в бершах. Вероятно, это связано с тем, что в последний период для берша в питании характерны моллюски, включая живородок (Калайда, 2004), которые являются первыми промежуточными хозяевами. *Paracoenogonimus ovatus* является паразитом мышц, жабр, мозга, печени, почек, гонад карповых, окуневых, щуки и осетровых рыб. Паразит имеет широкое распространение и характерен для Каспийского бассейна. В наших материалах (Табл. 1, 2) он представлен по результатам обследования мышечной ткани рыб.

Изменения в составе паразитофауны рыб происходят как в результате прямого влияния меняющихся условий обитания, так и из-за косвенного их влияния

через изменение плотности популяции видов (Калайда, 2000; Калайда, 2004), являющихся промежуточными и окончательными хозяевами паразитов. К таким условиям прежде всего относятся наличие мелководных зон, скорость течения, температура воды, характер грунта. Чаще всего наибольшее эпидемиологическое значение имеют стоячие и малопроточные участки водоемов.

Таблица 2.  
Зараженность промысловых рыб *Paracoenogonimus ovatus* p. Камы, 2000 г.

Виды рыб	Куйбышевское водохранилище, Республика Татарстан, 2008 г.		р. Кама, Удмуртия 2000 г. (Соколов, 2001)	
	Инвазировано			
	ед.	%	ед.	%
Густера	16	66,7	17	34,7
Плотва	16	100,0	28	90,3
Лещ	28	35,0	11	84,6
Красноперка	0	0	9	75,0
Чехонь	0	0	6	42,9
Синец	28	70,0	6	16,2
Белоглазка	0	0	3	16,7
Язь	8	28,6		
Берш	4	50,0		

Сравнивая зараженность промысловых рыб личинками *Paracoenogonimus ovatus* в Куйбышевском водохранилище в пределах Республик Татарстан и в р. Каме (Табл.2), можно отметить, что наиболее зараженными являются особи плотвы. В водах Татарстана высокая степень зараженности отмечается у густеры и синца, в Удмуртии – у леща и красноперки.

Необходимо отметить, что в обследованных рыбах метацеркарии *Opisthorchis felineus* были встречены только в белоглазке, которая встречалась в уловах на трех участках исследования из пяти. Во всех обследованных белоглазках (25 экз.) были обнаружены метацеркарии в мышцах.

Таблица 3. Зараженность (%) личинками *Opisthorchis felineus* рыб на различных участках Куйбышевского водохранилища

Вид рыбы	Участок водохранилища				
	Район у г. Зеленодольска	Район устья р. Мёши	Район н.п. Ташевка	Район н.п. Камское Устье	Район г. Тетюши
	Административный район РТ				
	Зеленодольский	Лашевский	Верхнеуслонский	Камско-Устьинский	Тетюшский
Густера					
Лещ	0	0	0	0	0
Синец	0	0	0	0	0
Белоглазка	0	0	0	0	0
Чехонь	100	-	100	100	-
Судак	-	-	-	0	0
	0	0	0	0	0

Обращает на себя внимание то, что ежегодно максимальное количество заболевших описторхозом отмечаются в Зеленодольском районе (2-8 чел.) и Мамадышском (4-8 чел.). Эти районы соответствуют верхним участкам течения характерна меньшая плотность моллюска *Bythinia leachi*. Одновременно эти участки являются наилучшими с позиций воспроизводства и обитания белоглазки, у которой в Алексеевском районе (выше устья Камы) сохранились нерестовые участки. Это, вероятно, приводит к тому, что инвазированность метациеркариями *Opisthorchis felineus* большинства видов - потенциальных носителей - не отмечается (Табл.3). А картина территориального распространения заболевания связана не с распределением моллюска, а с наличием вида - потребителя моллюска - белоглазки, численность которой мала, а ценность в виде вяленой рыбы - велика. В годовых уловах она составила в последнее десятилетие в Нижнекамском водохранилище 0,1-3,9 т, а в Куйбышевском водохранилище соответственно 5,4-23,4 т. Таким образом, состояние водной экосистемы региона влияет на распространение трематодозов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Изюмова Н.А., Шагин А.А. Паразитофауна рыб Волги в районах Горьковского и Куйбышевского водохранилищ до их заливия. -- Тр.Биол. ст. «Борок», 1958, вып. 3, с. 364-383.
2. Калайда М.Л. Любарская О.Д. К вопросу о зараженности паразитами сига в Куйбышевском водохранилище // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре. - М., 2000. - С.69-70.
3. Калайда М.Л. Роль экологических факторов в заболеваемости судака и борма. // Проблемы патологии и охраны здоровья рыб. - М., 2004. - С. 477-485.
4. Козлова Е.Г., Грачева О.К., Закисва С.Ю. и др. Дифиллоботриоз. // Бойко В.А. Природные очаги зооантропонозов трансформированных ландшафтов РТ во 2-й половине XX века. - Казань, 2001. - С.85-90.
5. Любарская О.Д., Козлова Е.Д. Ситуация с дифиллоботриозом и описторхозом в Татарстане. - Казань: КГУ, 2009. - С. 100-102.
6. Любарская Л.Д., Козлова Е.Г., Грачева О.К. и др. Описторхоз. // Бойко В.А. Природные очаги зооантропонозов трансформированных ландшафтов РТ во 2-й половине XX века. - Казань, 2001. - С.90-98.
7. Салихова Р.У. Эпидемиология описторхоза в приречных районах ТАССР и некоторые мероприятия по борьбе с ним: Автореф. дисс.... канд. мед. наук. - Казань, 1970. - 16с.
8. Соколов В.В., Кубашев И.Г., Тепляков А.В. Рыбный промысел Удмуртской республики. - Ижевск: Изд-во ИЖГТУ, 2001. - 128 с.

### THE ESTIMATION OF THE EPIZOOTIC CONDITION OF RESERVOIRS AS THE IMPORTANT PROBLEM OF DEVELOPMENT OF THE TATARSTAN REPUBLIC AQUACULTURE

M.L. Kalaida, L.K. Govorkova

The current state of parasites causing diseases at the fishes of the Kuibyshev reservoir are considered. The infestations of fishes by parasite ichthofrises of *Opisthorchis felineus*, *Paracoenogonimus ovatus* and *Diphyllobothrium latum* are discussed. The decreasing of incidence rate on diphyllobotriasis and opisthorchosis are shown. It is noted that people incidence rate by opisthorchosis is connected with the regions of bream reproduction and feeding. Significant representation of *Paracoenogonimus ovatus* ichthofrises in cyprinid fish are diagnosed. It was drawn conclusion about bursch infestations in conjunction with changes of his nutrition character.

# ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ ПЕСКАРЯ (*GOBIO GOBIO*) В АНТРОПОГЕННО ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ВОДОЕМАХ ПРИКАМЬЯ

Н.В. Костицына, Т.А. Гилёва

Пермский государственный университет, Пермь, Россия  
minimax@psu.ru

В течение последних лет на кафедре зоологии позвоночных и экологии Пермского госуниверситета исследуют содержание тяжелых металлов в органах и тканях рыб из различных водоемов Пермского края. Эти исследования показали, что содержание металлов в организме рыб не является стабильным, в ряде проб биологического материала оно приближается к уровню допустимых остаточных концентраций (ДОК) или превышает их, хотя в мышцах рыб концентрация этих элементов обычно не велика и не превышает ДОК (Гилёва и др., 2010). Несмотря на то, что содержание отдельных элементов не представляет опасности для жизнедеятельности рыб, эти элементы могут одинаково действовать на организм рыб, усиливая эффекты друг друга, многие тяжелые металлы в комплексе с органическими веществами становятся более опасными для живых организмов даже в незначительных концентрациях (Аршаница, Гулюкин, 2000). В качестве теста, позволяющего оценить общее состояние рыб, был выбран анализ крови, показатель, который чутко реагирует на все изменения, происходящие в организме рыб. Содержание тяжелых металлов определяли в печени. Также в качестве параметров, характеризующих состояние дыхательной системы, связанной с системой красной крови, исследовали показатели респираторного эпителия. У рыб во всех пробах измерена длина тела, определен возраст и пол, осмотрены покровы, плавники, жабры, полость тела, плавательный пузырь, гонады, позвоночник, желудочно-кишечный тракт и его содержимое. При внешнем осмотре и вскрытии не были обнаружены паразиты и нарушения в строении упомянутых выше органов.

Для проведения гематологического анализа, а также определения содержания тяжелых металлов в теле рыб сбор материала осуществляли на 4 водоёмах с конца июня до начала июля 2008г. Мотовилихинский пруд находится в черте города Перми, в воде отмечено превышение ПДК по аммонийному азоту, нитратам, сульфатам (Экологическое обследование малых рек г. Перми, 1999). Верхнезырянское водохранилище расположено около города Березники, в основном оно загрязнено органическими веществами (Отчёт по НИР..., 2007). Участок реки Бабки в районе села Жилино загрязняется стоками промышленных отходов с птицефабрики «Платошино» (Холостов, Вертгейм, 2008). Перечисленные водоёмы испытывают сильную антропогенную нагрузку. Участок реки Сылвы в пределах учебно-научной базы Пермского госуниверситета (ПГУ) «Предуралье» начинается в 12 км выше города Кунгура и имеет менее значительное загрязнение (Холостов, Вертгейм, 2008). Данный участок рассматривается нами в качестве контрольного.

Гематологические характеристики исследованы у 117 рыб. Возраст рыб в разных пробах достоверно не различался, во всех случаях исследовали двух- и трёхлетних особей. Кровь брали из хвостовой артерии. Подсчет эритроцитов и лейкоцитов проводили с помощью счетной камеры Горяева. Для подсчета лейкоцитарной и эритроцитарной формул делали мазки крови. Мазки фиксировали смесью Никифорова и затем окрашивали по Романовскому. Статистический анализ результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Анализ тяжелых металлов осуществляли в обобщенных пробах, для получения достаточной по массе

пробы объединяли печень 30-32 особей. Пробоподготовку проводили в лаборатории Экологии леса ЕНИ ПГУ, анализ химического состава зольного остатка проводили в Аналитическом испытательном центре ОАО «Уральская Центральная Лаборатория» (г. Екатеринбург).

В июне и июле 2010 году в Мотовилихинском пруду и реке Сылве получены выборки обыкновенного пескаря по 50 особей из каждого водоема, для которых определили площадь жаберного эпителия. Ее рассчитывали согласно методике, разработанной Д.М. Хьюзом с сотрудниками (Muir, 1969; Hughes, 1972). Подсчет площади дыхательной поверхности проводили на левой стороне с 1 по 4 жаберные дуги, считали количество жаберных лепестков, число вторичных жаберных пластинок, измеряли абсолютные параметры этих структур. Обработку полученных результатов провели с помощью стандартного пакета программ «Excel».

Показатели белой и красной крови обыкновенного пескаря приведены в табл.1.

Как показали наши исследования, кровь имеет достаточно сложную морфологическую картину. Большинство гематологических показателей пескаря, обитающего в Мотовилихинском пруду, Верхнезырянском водохранилище и реке Бабке отличается от показателей крови пескаря из реки Сылвы. Во всех трёх загрязненных водоёмах выявлены следующие закономерности: количество эритроцитов у пескаря достоверно ниже, а количество лейкоцитов – выше, чем у рыб из реки Сылвы. Сравнение эритроцитов разной степени дифференцированности выявило следующую картину: скорость эритропоэза выше у пескаря из Верхнезырянского водохранилища, Мотовилихинского пруда и реки Бабки. Это выражено в том, что количество незрелых форм эритроцитов достоверно выше, а зрелых, наоборот, ниже, чем у рыб из реки Сылвы.

Наибольшее число лейкоцитов в крови пескаря из всех исследованных водоёмов составляют лимфоциты: 52,5% от клеток белой крови у пескаря из реки Сылвы, 42,4% – из Мотовилихинского пруда, 51,0% – из Верхнезырянского водохранилища и 48,5% – из реки Бабки. Абсолютное количество лейкоцитов достоверно ниже у пескаря из реки Сылвы, чем у пескаря из других водоёмов, что обусловлено большим количеством клеток лейкопоэтического ряда у пескарей из водоёмов со значительной антропогенной нагрузкой –  $7,54 \pm 0,482$  тыс/мкл крови у пескаря из реки Сылвы,  $16,29 \pm 0,634$  тыс/мкл у пескаря из Мотовилихинского пруда,  $11,22 \pm 0,409$  тыс/мкл у рыб из Верхнезырянского водохранилища и  $14,58 \pm 0,660$  тыс/мкл у пескаря из реки Бабки. Сходная картина наблюдается при подсчете моноцитов – их абсолютное количество составило  $2,13 \pm 0,228$  тыс/мкл крови (пескарь из реки Сылвы),  $4,16 \pm 0,479$  тыс/мкл (пескарь из Мотовилихинского пруда),  $2,88 \pm 0,284$  тыс/мкл (пескарь из Верхнезырянского водохранилища),  $6,76 \pm 1,203$  тыс/мкл (пескарь из реки Бабки). В крови рыб из Мотовилихинского пруда содержание нейтрофилов и эозинофилов превышает подобные показатели пескаря, обитающего в реке Сылве. У пескаря из реки Бабки сходная картина наблюдается при подсчете лимфоцитов. Таким образом, мы можем констатировать, что у рыб из водоёмов, имеющих значительную антропогенную нагрузку, ниже количество клеток красной крови, заметно выражен лейкоцитоз при высоких темпах гемопоэза в целом.

Считается (Крылов, 1980; Иванова, 1983), что начальные стадии токсикоза у рыб сопровождаются мобилизацией резервных функций организма: в русло крови выбрасываются резервные и молодые эритроциты и лейкоциты, общая концентрация гемоглобина возрастает, увеличивается также содержание лейкоцитов. Затем постепенно происходит деградация клеток, продуцируются патологические формы.

Таблица 1.  
Гематологические показатели периферической крови обыкновенного пескаря  
*Gobio gobio* из водоемов Прикамья

Показатель		р. Сытва	Мотовили- хинский пруд	Верхнезы- рянское в-ще	р. Бабка
Количество клеток в 1 мкл	Эритроцитов, млн / 1мкл	2,03±0,120	1,52±0,143*	1,65±0,143*	1,32±0,125*
	Лейкоцитов, тыс / 1мкл	51,03±1,460	67,63±1,441*	61,70±1,825*	72,50±1,602*
Молодые эритроциты	Относительные показатели %	6,3±0,36	16,7±0,66*	14,0±1,54*	16,2±0,99*
	Абсолютные млн/ 1мкл	0,13±0,011	0,25±0,023*	0,23±0,039*	0,21±0,023*
Зрелые эритроциты	Относительные показатели %	93,7±0,36	83,3±0,66*	86,0±1,54*	84,2±1,00*
	Абсолютные млн / 1мкл	1,91±0,113	1,26±0,121*	1,42±0,117*	1,12±0,108*
Клетки -- предшестве- нники лейкоцитов	Относительные показатели %	14,7±0,88	24,3±1,18*	18,0±1,42	19,6±0,97*
	Абсолютные тыс / 1мкл	7,54±0,482	16,29±0,634*	11,22±0,409*	14,58±0,660*
Базофилы	Относительные показатели %	2,6±0,23	2,1±0,60	1,9±0,33	2,0±0,25
	Абсолютные тыс / 1мкл	1,34±0,146	1,45±0,409	1,26±0,276	1,41±0,165
Нейтрофилы	Относительные показатели %	4,7±0,30	6,2±0,40*	3,6±0,60	3,7±0,26*
	Абсолютные тыс / 1мкл	2,41±0,211	4,16±0,330*	2,24±0,438	2,65±0,204
Эозинофилы	Относительные показатели %	21,3±0,60	18,8±0,75*	21,0±0,93	16,3±1,27*
	абсолютные тыс / 1мкл	10,90±0,602	12,61±0,438*	12,80±0,799	11,56±0,803
Моноциты	Относительные показатели %	4,2±0,40	6,2±0,64*	4,6±0,36	9,4±1,55*
	Абсолютные тыс / 1мкл	2,13±0,228	4,16±0,479*	2,88±0,284*	6,76±1,203*
Лимфоциты	Относительные показатели %	52,5±1,33	42,4±1,75*	51,0±1,83	48,5±1,25
	Абсолютные тыс / 1мкл	26,72±1,439	28,97±1,084	31,30±0,996	35,55±1,201*

\* - достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) по t-критерию Стьюдента в сравнении с гематологическими показателями пескаря из реки Сытвы

Определение стадии токсикоза по состоянию системы крови может иметь большое значение не только при оценке физиологического состояния организма рыб, но и для оценки степени загрязненности водоема (Крылов, 1980). Полученная нами картина крови пескаря, обитающего в водоемах, значительно

трансформированных человеком, соответствует переходу от первой ко второй стадии токсикоза у рыб. Тем не менее разные авторы по-разному трактуют сходные изменения крови, соглашаясь в том, что антропогенный пресс может вызывать как угнетение, так и стимуляцию системы кроветворения (Мазур и др., 2007).

Чтобы получить дополнительные данные по токсической нагрузке на обитателей исследуемых водоемов, нами было определено содержание в печени рыб таких элементов, как никель, кобальт, хром, марганец, ванадий, титан, медь, цинк, свинец и стронций, большинство из которых относят к приоритетным загрязнителям поверхностных вод. Результаты представлены в табл. 2.

Как видно из таблицы, в печени рыб из Мотовилихинского пруда, Верхнезырянского водохранилища и реки Бабки наблюдается превышение ДОК по 4 показателям: содержанию хрома, марганца, меди, свинца, а у пескаря из Верхнезырянского водохранилища еще и никеля. Несмотря на условность данного показателя – допустимые остаточные концентрации веществ в пищевых продуктах, он позволяет оценить сравнительное поступление тяжелых металлов в организм рыб и их выведение печенью. В печени рыб из реки Сылвы обнаружено превышение ДОК только по содержанию марганца.

Таблица 2.

Содержание тяжелых металлов в печени обыкновенного пескаря (мг/кг сухой массы)

Химический элемент (ДОК)	р. Сылва	Мотовилихинский пруд	Верхнезырянское водохранилище	р. Бабка
Ni (0,5)	0,11	0,41	<b>0,65</b>	0,31
Co (0,5)	0	0	0,39	0,18
Cr (0,5)	0,37	<b>1,01</b>	<b>3,87</b>	<b>1,31</b>
Mn (10)	<b>10,63</b>	<b>10,14</b>	<b>23,23</b>	<b>21,85</b>
V	0,53	1,01	2,32	0,66
Ti	21,27	60,81	387,20	21,85
Cu (10)	9,57	<b>15,20</b>	<b>19,36</b>	<b>13,11</b>
Zn (40)	9,57	18,24	12,91	13,11
Pb (1,0)	0,21	<b>30,41</b>	<b>1,29</b>	<b>26,22</b>
Sr (100)	53,17	30,41	38,72	8,74

Жирным шрифтом – превышение ДОК

Еще один исследованный нами параметр – площадь респираторного эпителия пескаря, который позволяет судить о состоянии дыхательной системы, возможных механизмах компенсации сниженного содержания эритроцитов в крови рыб, а также о токсическом действии окружающей среды на рыб в целом (Селюков, 2010). Пескарь, выловленный в реке Сылве, характеризуется большей абсолютной и относительно такой же относительной площадью респираторного эпителия (по отношению к массе тела), что и обыкновенный пескарь из Мотовилихинского пруда, имея при этом большую массу тела: при средней массе 8,4 г он имеет средние показатели абсолютной площади дыхательной поверхности жабр 160,0 см<sup>2</sup> и относительной площади дыхательной поверхности – 20,4 см<sup>2</sup>/г массы тела, эти же параметры пескаря из Мотовилихинского пруда следующие: масса – 6,8 г, абсолютная площадь дыхательной поверхности жабр – 127,1 см<sup>2</sup>, относительная площадь – 20,2 см<sup>2</sup>/г. Поскольку площадь дыхательной поверхности жабр напрямую связана с уровнем обмена веществ рыб, мы можем говорить о более низком, чем у рыб из реки Сылвы, уровне обмена у пескаря из Мотовилихинского пруда.

Возможно, относительно низкое содержание эритроцитов в крови этих рыб отражает именно эту особенность их физиологии.

Представленные нами данные свидетельствуют об усилении клеточного иммунитета у рыб, обитающих в загрязненных водоемах - Мотовилихинском пруду, Верхнезырянском водохранилище и реке Бабке, так как у них достоверно увеличено абсолютное количество незрелых форм клеток белой крови, а также моноцитов. Хотя исследованные водоёмы загрязняются различными веществами и в различной степени - приоритетными загрязнителями реки Бабки и Мотовилихинского пруда являются органические вещества (Холостов, Вертгейм, 2008; Экологическое обследование..., 1999), а Верхнезырянского водохранилища - сильноминерализованные подземные воды и органические вещества (Отчет по НИР..., 2007) – тяжелые металлы оказывают влияние на общую токсическую нагрузку на эти водоемы. Тем не менее мы считаем, что обнаруженные нами изменения физиологических параметров пескаря не являются необратимыми, поскольку полученная картина не свидетельствует о переходе токсикоза рыб к стадии деградаци.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аршаница Н.М., Гулюкин В.Ю. Рыбы как индикаторы загрязнения донных отложений рыбохозяйственных водоемов: Науч. – техн. симпозиум «Современные средства воспроизводства и использования водных биоресурсов»: Тез. Докл. Т. 4. – СПб, 2000. С. 46–48.
2. Гилёва Т.А., Костицына Н.В., Зиновьев Е.А., Бакланов М.А. К содержанию тяжелых металлов в органах и тканях ряда популяций пескаря *Godio godio* (L.) бассейна р. Камы // Вестник Пермского университета. Серия БИОЛОГИЯ. 2010. Вып.2. С. 31–36.
3. Иванова Н. Т. Атлас клеток крови рыб. М.: Лег. и пищ. пром., 1983. 110 с.
4. Крылов О. Н. Пособие по профилактике и диагностике отравлений рыб вредными веществами. М.: ЦНИИТЭИРХ, 1980. 116 с.
5. Мазур О.Е., Гармаева С.Г., Пронин Н.М. Некоторые иммунобиологические показатели карповых рыб (*Rutilus rutilus lacustris* и *Leuciscus leuciscus baicalensis*) в различных районах оз. Байкал и р. Селенга. // Исследования по ихтиологии и смежным дисциплинам на внутренних водоемах в начале XXI века (к 80-летию профессора Л.А. Кудерского) / Под общ. Ред. Д.И. Иванова. Сборник научных трудов. Вып. 337. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. С. 453–462.
6. Отчёт по НИР «Оценка экологического последствия снижения уровня воды Нижнезырянского водохранилища в рамках реализации мероприятий по организации жизнедеятельности г. Березники». (Науч. рук. Н.Г. Максимович). Пермь. 2007. 231 с.
7. Селюков А.Г. Изменение морфофункциональных параметров рыб Обь-Иртышского бассейна в условиях возрастающего антропогенного влияния / Автореф. дисс. на соис. уч. степ. докт. биол. наук. М., 2010. 51 с.
8. Холостов С.Б., Вертгейм А.Г. Ранжирование муниципальных образований края по уровню антропогенной нагрузки // Состояние окружающей среды Пермского края в 2007 году. Пермь, 2008. 112 с.
9. Экологическое обследование малых рек г. Перми. Р. Б. Мотовилиха. Пермгипроводхоз. Пермь. 1999. 51 с.
10. Hughes G. M. Morphometrics of fish gills // *Respir. Physiol.* 1972. Vol. 14. P. 1–26.
11. Muir B.S. Gill deminsions as a function on fish size // *J. Fish. Res. Board, Can.* 1969. Vol. 26, № 1. P. 165–170.

### EVALUATION OF GUDGEON (*GOBIO GOBIO*) BLOOD PARAMETERS FROM ANTHROPOGENICALLY TRANSFORMED PRIKAMYE RESERVOIRS

N.V. Kostitsyna, T.A. Gileva

It is considered gudgeon hematological parameters from the water bodies with different anthropogenic load. In fish from contaminated waters observed reduction of red blood cells, increasing the concentration of leukocytes and stimulation of hematopoietic in general. In these fish the concentration of heavy metals in the liver is higher and the relative area of the respiratory epithelium is lower.



# НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ О СОСТОЯНИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ КАЛУГИ *HUSO DAURICUS* (GEORGI, 1775)

В.Н. Кошелев, Т.В. Евтешина

Хабаровский филиал «Тихоокеанского научно-исследовательского  
рыбохозяйственного центра» (ФГУП "ХФТИНРО"), Хабаровск, Россия  
scn74@mail.ru

В бассейне реки Амур, где проживает 70 млн. человек, отмечено длительное антропогенное воздействие. Ухудшение условий обитания стало причиной изменений в репродуктивной системе калуги *Huso dauricus*, обнаруженных в 2007–2008 гг. (Кошелев и др., 2009). В 2009 г. мониторинг состояния репродуктивной системы калуги был продолжен. Целью работы по-прежнему являлась оценка состояния гонад калуги с использованием гистологических показателей. Основной задачей было нахождение, описание спектра и частоты гистоморфологических изменений в развитии и функционировании воспроизводительной системы. Всего гистологическими методами исследованы фрагменты гонад от 31 особи (16 самок, 15 самцов) калуги. Обработку материала проводили по общепринятым методикам (Ромейс, 1954; Меркулов, 1969).

Согласно результатам гистологического исследования состояния гонад калуги, у значительной части исследованных рыб выявлены нарушения в строении оболочек ооцитов. Отмечены изменения в состоянии вителлогенных ооцитов на III, III–IV, IV стадиях зрелости. У 18,7% самок калуги выявлены изменения толщины яйцевых оболочек, выраженное в утолщении студенистой оболочки из-за ее набухания. Наряду с утолщением студенистой оболочки, у некоторых ооцитов отмечено истончение и даже прерывистость оболочек (43,7%). На некоторых гистологических препаратах (6,2%) отмечены деформированные ооциты. Впервые ооциты неправильной формы, названные "деформированными", были обнаружены у русского осетра *Acipenser guldendstaedti* Brandt и северюги *Acipenser stellatus* (Pallas) (Шевелева, 1990). У 3 самок (18,7%) отмечена массовая дегенерация ооцитов протоплазматического роста на различных этапах этого процесса.

У самцов, как и у самок, установлены различные гистоморфологические изменения в воспроизводительной системе. При исследовании семенников у 6 самцов калуги (40%) отмечено утолщение оболочки семенника и прорастание соединительной ткани внутрь с замещением семенных канальцев. Наблюдается одновременное замещение генеративной ткани семенника как соединительной тканью, так и жировой. У этих особей в семенных канальцах на участках, граничащих с местами такого замещения, значительно сокращен объем зрелой спермы. В некоторых из них она полностью отсутствует. Там видны только сперматогонии и клетки фолликулярного эпителия. На наш взгляд, данное состояние сходно с картиной, описываемой рядом авторов для самцов русского осетра Волго-Каспийского бассейна, используемых для рыбоводных целей (Тренклер и др., 2008). Кроме перечисленных нарушений, у самцов калуги в семенниках отмечены: воспалительные инфильтраты, являющиеся проявлением воспалительной реакции (33%), фиброзы (13,3%), полости (13,3%) а также дегенерация спермиев (13,3%).

Нарушения в воспроизводительной системе калуги сходны с обнаруженными ранее у осетровых из других водных бассейнов. Как и ранее (Кошелев и др., 2009), полагаем, что обнаруженные нами отклонения в строении репродуктивной системы калуги – следствие загрязнения среды обитания, как это установлено у других видов (Рубан, 1999). Выявленные нарушения в

воспроизводительной системе калуги не могут препятствовать нересту, однако их наличие снижает эффективность его естественного воспроизводства.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кошелев В.Н., Евтешина Т.В., Литовченко Ж.С., Хлопова А.В. Гистоморфологические нарушения репродуктивной системы амурских осетровых // Амурский зоол. журн. - 2009. Т 1 (3). - С. 258–264.
2. Ромейс Б. Микроскопическая техника. - М.: Изд-во Иностран. лит-ра, 1954. - 648 с.
3. Рубан Г.И. Сибирский осетр *Acipenser baeri* Brandt (структура вида и экология). - М.: Изд-во «Геос», 1999. - 236 с.
4. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. - Л.: Медицина, 1969. - 423 с.
5. Тренклер И.В., Груслова А.Б., Мочарук О.Г. Анализ состояния репродуктивной системы используемых для рыбоводства самцов Волго-каспийского осетра // Комплексный подход к проблеме сохранения и восстановления биоресурсов Каспийского бассейна. Мат. межд. науч.-практ. конф. Астрахань: Изд-во КаспНИРХ, - 2008. - С. 399–404.
6. Шевелева Н.Н. О нарушении гаметогенеза каспийских осетровых в современных условиях // Экологические и морфофункциональные основы адаптации гидробионтов. Тезисы докл. симп. посвящ. 90-летию со дня рождения проф. Н.Л. Гербильского (1900-1990). - Л.: ЛГУ, 1990. - С. 107–108.

### SOME DATA ON REPRODUCTIVE SYSTEM STATUS OF KALUGA HUSO DAURICUS (GEORGI, 1775)

V.N. Koshelev, T.V. Evteshina

Results of a histological study of kaluga *Huso Dauricus* gonads are presented. Histomorphological deviations, - abnormalities in female and male gonads development, - were revealed. Frequency of the most typical deviations of gameto- and gonadogenesis was defined. It was determined that these deviations do not have a negative influence on spawning process, but may decrease its efficiency.

# КОНТРОЛЬ ВЛИЯНИЯ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ НА ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В РЫБОХОЗЯЙСТВЕННОМ ВОДОЕМЕ

А.М. Наумова, А.Ю. Наумова, Л.В. Домбровская

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт аквакультуры  
рыбоводства, пос. им. Воровского, Россия, LJB@flexuser.ru

Экосистема рыбохозяйственного водоема, расположенного в зоне сельскохозяйственного и промышленного производства, подвержена загрязнению в связи с возможным попаданием в водоем различных стоков. Исследования показали наличие тяжелых металлов (в пределах ПДК) в пробах рыб (карп, щука, растительноядные): ртути – 0,11; 0,13; 0,003; свинца – 0,45; 0,4; 0,005-0,3; кадмия – 0,003; 0,002; 0,002-0,04 мг/кг соответственно, а также в воде и донных отложениях. В очищении водоема значительную роль играет высшая водная растительность. В этой связи нами были проведены экспериментальные исследования по контролю влияния водных растений на экологические факторы в рыбохозяйственном водоеме, в прибрежной зоне которого выращивали водоплавающую птицу.

*Материал и методы исследований.* Влияние водных растений на качество воды и илов по бактериологическим и химическим показателям было изучено в аквариальных условиях с использованием различных водных макрофитов: водный гиацинт, ряска, частуха ланцетная, белокрыльник болотный, а также в участках опытного рыбоводного пруда - с высшей водной растительностью (в основном тростником).

При бактериологических исследованиях воды и донных отложений определяли общее микробное число, учитывали структуру бактериоценоза иловых отложений (Сб. инстр. ч.2, 1999). Химические исследования, включающие показатели гидрохимического режима, биогенных элементов, проводили по общепринятым методам, учитывали наличие солей тяжелых металлов в донных отложениях по ГОСТу (ГН 2.1.7.2042-06).

*Аквариальные опыты*

*Очищение воды. Водный гиацинт (эйхорния.)*

Опыт по влиянию водного гиацинта на качество воды был поставлен в трех аквариумах емкостью 20 л каждый, заполненных прудовой водой. В два аквариума вносили гусиный помет в количестве 60 г (варианты 1 и 2), в первый из них была помещена эйхорния. Третий аквариум служил контролем. В июле месяце изучали изменения бактериологического и химического режима воды.

В начале опыта бактериологическая обсемененность воды в аквариумах с пометом выше ( $1,7 \times 10^5$  -  $2 \times 10^5$  КОЕ/мл) в сравнении с контрольным ( $2,9 \times 10^3$  КОЕ/мл). Со временем она существенно снизилась до уровня контроля ( $1,8 \times 10^3$  КОЕ/мл против  $1,2 \times 10^3$  КОЕ/мл). Дальнейшие наблюдения подтвердили улучшение качества воды при внесенном помете и наличии эйхорнии.

Под влиянием растений в аквариуме, содержащем птичий помет, уже через несколько дней улучшились гидрохимические показатели: нормализовалась pH – 8,3-8,5 до 7,6, уменьшилось содержание аммонийного азота в 1,5 раза и более - с 14 до 8 мг/л, оптимизировались показатели нитритного азота - с 0,7 до 0,15 мг/л, существенно снизились показатели окисляемости - с 46 до 27 мг О<sub>2</sub>/л, соответствующая показателям в контроле, что свидетельствовало о снижении органического загрязнения.

*Ряска малая.* Подтверждением положительной роли водных макрофитов (эйхорнии) в очищении воды от загрязнения было использование в качестве

биотестирования ряски малой. В опытных аквариумах (2 опытных, 1 контрольный) было проведено определение роста ряски. Процент листецов оказался наибольшим в аквариуме с водным гиацинтом. В условиях этого аквариума листецы расположились по всей поверхности акватория аквариума, вода в нем была чистая, прозрачная, в то время как в двух других аквариумах на поверхности воды аквариума появилась бактериальная пленка и листецы, большинство из которых имели бурю окраску, были сконцентрированы на ограниченном участке. Определение общего микробного числа воды в аквариумах подтвердило наименьшую обсемененность воды в опыте с эйхорнией (3,5 КОЕ/мл против 12 КОЕ/мл в другом опытном и 7 КОЕ/мл в контрольном аквариумах).

#### ***Очищение донных отложений.***

##### ***Частуха ланцетная, белокрыльник болотный.***

Влияние водных растений на самоочищение - качество донных отложений по химическим показателям (соли тяжелых металлов) - было изучено в аквариальных условиях с использованием различных водных макрофитов: частуха ланцетная, белокрыльник болотный.

В два аквариума были взяты в равных количествах донные отложения из рыбохозяйственного водоема, содержащие соли тяжелых металлов. Донные отложения были залиты артезианской водой в количестве по 10 л. Для выяснения роли растений в изъятии солей химических элементов из донных отложений в опытный аквариум были посажены водные растения - макрофиты (частуха ланцетная, белокрыльник болотный). Контрольный аквариум не содержал растений. Через месяц по завершении опыта были проведены исследования почвы на содержание солей тяжелых металлов.

Результаты исследований показали, что водный режим в вариантах опыта с растениями и без растений способствовал изъятию солей тяжелых металлов из донных отложений. Но в большей степени снижение загрязнения солями тяжелых металлов было отмечено при наличии растений (по свинцу на 25%, по кадмию - на 15%).

**Влияние водных макрофитов на самоочищение участков пруда при интегрированной технологии.** Кроме того, было изучено влияние высшей водной растительности (в основном тростника) на микробоценоз и химические показатели воды и илов участков опытного пруда. Микробиологические исследования показали, что в зарослях тростника система микробоценоза более устойчива и сбалансирована. Одним из показателей степени минерализации органического вещества является количество актиномицетов в почве. Исследования показали, что именно в зарослях тростника оно выше в 5 раз, чем в контрольном участке пруда. Наибольшим является содержание под тростником азотобактера, являющегося фиксатором азота в почве. Одним из показателей участия микроорганизмов в цикле азота является нитратредуктазная активность, в наибольшей степени отмеченная в почве под тростником. В птичьем водном вольере в донных отложениях под тростником существенно снизилось количество условно патогенных аэромонад -  $1,0 \times 10^3$  (КОЕ/г), хотя ОМЧ оставалось более высоким ( $6,5 \times 10^6$  против  $1,7 \times 10^6$  КОЕ/г).

Химический анализ донных отложений в зоне произрастания высшей водной растительности (тростника) показал положительное влияние растительности на содержание азота и фосфора (увеличено на 27% и 20% соответственно) и самоочищение от органического загрязнения: содержание  $C_{орг.}$  (%) снизилось в 2 раза.

В связи с расположением рыбохозяйственного водоема в зоне промышленных предприятий проводили исследования по влиянию водных макрофитов (тростника) на содержание тяжелых металлов в воде и донных отложениях.

Для уточнения роли водных растений в элиминации солей тяжелых металлов из донных отложений в рыбохозяйственном пруду был проведен эксперимент. Были выбраны два участка – участок с растениями (тростником) и без растений. Исследования проводили в начале и конце вегетационного периода. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Содержание солей тяжелых металлов в донных отложениях и водных макрофитах рыбохозяйственного водоема

Пробы/Хим. эл., мг/кг	Ртуть	Свинец	Кадмий
Грунт из участка пруда с растениями	0,027/0,008	6,65/0,6	0,14/0,14
Грунт из участка пруда без растений	0,012/0,006	6,29/0,2	0,11/0,05
Водные растения	/0,004	/0,2	/0,02
ГН 2.1.7.2042-06	2,1	32-130	0,5-2,0

Примечание: апрель /октябрь

Как видно из таблицы, в процессе вегетационного периода содержание солей тяжелых металлов в донных отложениях снижалось. При этом в большей степени эта тенденция отмечена в грунтах при отсутствии водной растительности. Это позволяет сделать вывод о том, что усиление проточности в водоеме может служить способом улучшения его экологического состояния. Кроме того, водные растения (макрофиты), поглощая в незначительной степени соли тяжелых металлов, а также задерживая их в грунтах, обеспечивают меньший риск загрязнения естественных кормов для рыб (донных гидробионтов в свободной от растений акватории), что позволяет использовать водные растения в качестве защитной санитарной зоны и способствует выращиванию экологически чистой рыбопродукции в интегрированной технологии.

Использование фитосанитарной зоны в опытном пруду показало её положительное влияние на уменьшение содержания тяжелых металлов в пробах рыб (карпа) (табл.2).

Таблица 2.

Содержание тяжелых металлов в пробах карпа, мг/кг

Пробы	Ртуть	Свинец	Кадмий
Карп	0,11/0,002-0,005	0,45/0,005-0,2	0,03/0,011-0,03
СанПиН 2.3.2.1078-01 (норматив)	0,5	1,0	0,2

Таким образом, водная растительность, оказывая благоприятное воздействие на экосистему пруда, поддерживает её устойчивость и создает оптимальные условия для выращивания и получения экологически безопасной рыбопродукции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бессонов Н.М., Привезенцев Ю.А. Рыбохозяйственная гидрохимия // М.: Агропромиздат, 1987 – 159 с.
2. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Практическое руководство // М.: МГУ, 1990 – 400 с.
3. Методические указания по санитарно-бактериологической оценке рыбохозяйственных водоёмов. Сборник инстр. по борьбе с болезнями рыб // М.: АМБ-Агро, 1999 – С. 127-141.
4. Обухов А.И., Плеханова И.О. Атомно-абсорбционный анализ в почвенно-биологических исследованиях // М.: МГУ, 1991 – 184 с.

### CONTROL EFFECTS OF AQUATIC PLANTS ON ECOLOGICAL FACTORS IN THE FISHERY RESERVOIR

A.M. Naumova, A.Y. Naumova, L.V. Dombrovskaya

The results of pilot studies on the impact of aquatic vegetation on the purification (water and sediment) of fisheries pond from biological and chemical contamination.

# ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ГИБРИДОВ ОСЕТРОВЫХ РЫБ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В ИНДУСТРИАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Н.Н. Романова<sup>1</sup>, Н.А. Головина<sup>2</sup>, П.П. Головин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГУП "Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства" Московская обл., Дмитровский район, пос. Рыбное

<sup>2</sup> ФГ ОУВПО Дмитровский филиал «Астраханский Государственный технический университет» Московская обл., Дмитровский район, пос. Рыбное  
<sup>1</sup>vnp1rh@mail.ru, <sup>2</sup>kafvba@mail.ru

Экологические изменения в среде обитания осетровых (Acipenseridae) привели к резкому снижению численности естественных популяций. Это также отразилось на воспроизводительной способности, качестве потомства и жизнестойкости самих рыб. В связи с этим в товарной аквакультуре возникла необходимость проведения селекционно-племенных работ, направленных на повышение продуктивности осетровых. Это стало возможным благодаря совершенствованию объектов разведения посредством изменения их наследственности в нужном направлении, в том числе и выведением гибридных форм.

Наибольший интерес представляет выращивание гибридов в установках замкнутого водоснабжения, что исключает попадание выращиваемых рыб в естественную среду обитания и тем самым позволяет сохранить чистоту генофонда естественных популяций. Этому же способствует и стерильность некоторых осетровых гибридов (Морфология..., 1989). В осетроводстве гибридизация получила широкое применение, т.к. все осетровые являются полиплоидами (4n-8n-16n) и обладают большим (120-500) числом хромосом. Вероятно, этот феномен явился причиной относительно простой межвидовой и межродовой гибридизации (Рожкован, 2008), что позволяет получать гибридов в массовом количестве. В настоящее время разведением гибридов осетровых рыб занимаются не только в России, но и в США, Франции, Италии, Германии, Болгарии, Венгрии, Польше и Китае.

Основой для использования гибридов в промышленном осетроводстве служат их высокие гастрономические качества, стерильность, способствующая сохранению высокого темпа роста в течение длительного периода, приспособленность к выращиванию в промышленных хозяйствах и высокая жизнестойкость. Все эти качества в значительной мере обусловлены эффектом гетерозиса (Черфас, 1969), т.е. способностью гибридов первого поколения превосходить по жизнестойкости, плодовитости и другим признакам лучшие из родительских форм. В проблеме гетерозиса наиболее сложны и наименее разработаны вопросы, связанные с изучением механизма его возникновения. В большинстве случаев биохимическое обогащение гибридов связывается с изменением свойств белков, синтезируемых гибридной зиготой.

Кроме очевидной практической значимости, исследования гибридов интересны в различных отношениях с научной точки зрения. Полученные результаты обсуждаются в эволюционном аспекте, при решении таксономических задач и попытках установить степень родства между различными видами и другими таксонами.

Задача настоящего исследования заключалась в оценке иммуно-физиологического статуса промышленных гибридов осетровых рыб при индустриальном выращивании в сравнении с их родственными исходными видами.

Оценку физиологического состояния гибридов проводили по гематологическим показателям в соответствии с общепринятыми в аквакультуре методами (Сборник инструкций..., 1999). Из физиолого-биохимических показателей определяли: концентрацию гемоглобина (цианметгемоглобиновым методом); число эритроцитов (пробирочным методом с подсчетом в камере Горяева); уровень эритропоэза, количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу учитывали на окрашенных (по Паппенгейму) мазках крови, идентификацию форменных элементов проводили по классификации Н.Т. Ивановой (Иванова, 1983).

Материал собирали в течение 6 месяцев (август-декабрь) у сеголеток двух видов возвратных гибридов осетровых рыб: стерлядь х бестера х стерлядь (СхБхС) (полученные в феврале) и русский х ленский х ленский (РхЛхЛ) (полученные в апреле) при выращивании в условиях УЗВ при стабильной температуре воды (от 18 до 20°C). Уровень кислорода составлял от 8 до 10 мг/л, рН 7,2-7,5. Рыбу кормили осетровыми комбикормами фирмы Биомар.

Для оценки физиологического состояния кровь отбирали только от особей без клинических признаков какого-либо заболевания. Для сравнения физиологических показателей негибридных форм осетровых были взяты собственные материалы, полученные ранее (Иванов, Головин и др., 2009) по ленскому осетру и литературные данные по стерляди (Кортунова, Наумова, 2003; Серпунин и др., 2006).

У сеголеток гибрида СхБхС было отмечено увеличение уровня гемоглобина по сравнению с негибридной формой – стерлядью. Этот показатель в течение периода наблюдений изменялся от  $63,3 \pm 3,3$  до  $106 \pm 5,1$  г/л. При этом количество эритроцитов оказалось значительно ниже (на 40-50%) (рис. 1). Выявили, что оснащенность эритроцитов гемоглобином у них в 3 раза выше, чем у стерляди. Возможно, такое изменение связано с размерами эритроцитов, т.к. они более крупные. Интенсивный эритропоэз был отмечен только у рыб массой 100 г ( $13,5 \pm 3,0\%$ ), а затем число молодых эритроцитов резко снизилось до  $3,4 \pm 0,9\%$  (у молоди массой 300 г), у более крупных гибридов (массой 450 г) до  $2,7 \pm 1,1\%$ .

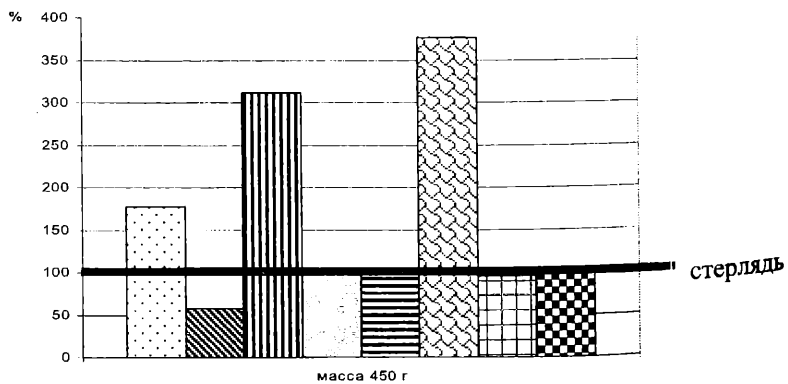
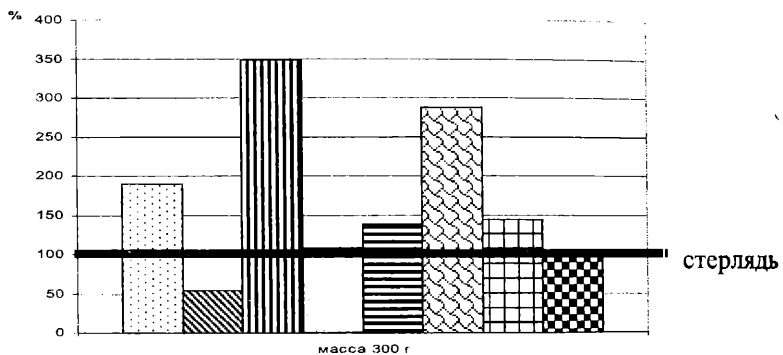
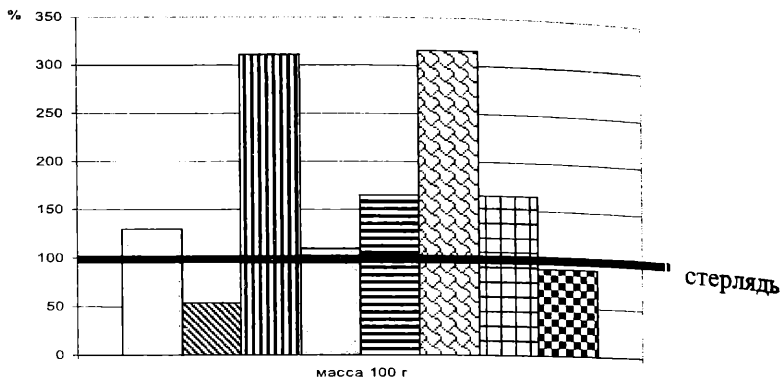
Количество лейкоцитов у гибрида СхБхС близко к таковому показателю у стерляди (рис. 1) и за период наблюдения практически не изменялось и составляло  $64,1 \pm 7,2$ ,  $63,0 \pm 3,5$  и  $59,5 \pm 5,5$  тыс./мкл, соответственно у рыб массой 100, 300 и 450 г.

Наиболее значимые изменения выявлены в лейкоцитарной формуле. У гибридов массой 100 и 300 г отмечено увеличение доли нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов, у рыб массой 450 г - только эозинофилов, остальные группы лейкоцитов были близки к таковым у стерляди (рис. 1).

Анализ результатов показал, что у сеголеток РхЛхЛ массой 20 и 90 г концентрация гемоглобина находилась в пределах от  $51,6 \pm 1,7$  и  $66,0 \pm 2,7$  г/л соответственно. Этот показатель близок к норме сеголеток ленского осетра и характеризует хорошее физиологическое состояние для осетровых рыб при индустриальном выращивании (рис. 2).

Количество эритроцитов и содержание гемоглобина в эритроците (СГЭ) у гибридов массой 20 г практически не имели отличий от ленского осетра и составляли соответственно  $564,0 \pm 28,2$  тыс./мкл и  $92,2 \pm 4,5$  пг. У более крупной молоди (массой 250 г) концентрация гемоглобина увеличилась до  $87,3 \pm 2,0$  г/л на фоне снижения числа эритроцитов до  $583,0 \pm 53,4$  тыс./мкл, при этом оснащенность эритроцитов гемоглобином (СГЭ) возросла (рис.2). Интенсивный эритропоэз был отмечен только у рыб массой 20 г ( $20,9 \pm 2,6\%$ ), а затем число молодых эритроцитов резко снизилось и составило  $2,9 \pm 1,1\%$  и  $1,9 \pm 0,8\%$  (соответственно для молоди 90 и 250 г).





□ Гемоглобин    ■ Эритроциты    ■ СГЭ    □ Лейкоциты  
 ■ Нейтрофилы    □ Эозинофилы    □ Моноциты    ■ Лимфоциты

Рисунок 1. Показатели крови СхБхС в сравнении со стерлядью, %

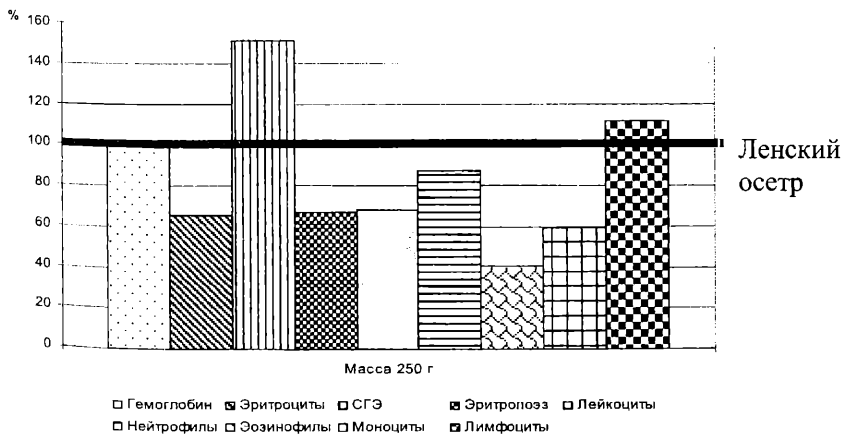
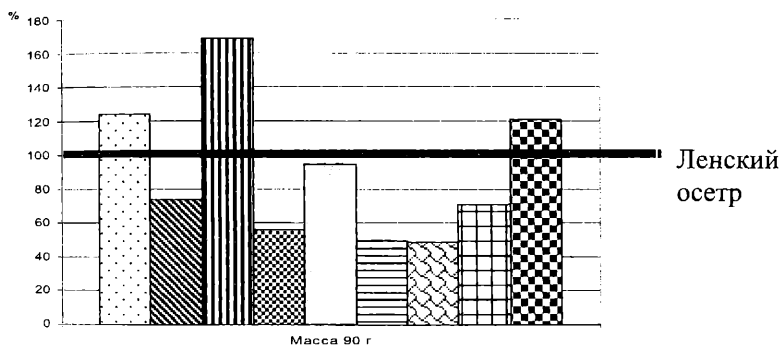
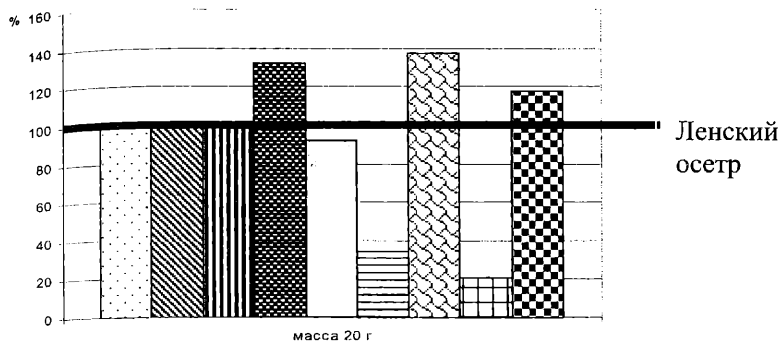


Рисунок 2. Показатели крови РхЛхЛ в сравнении с ленским осетром, %

Лейкоцитарная картина у гибрида РхЛхЛ отличалась от таковой у ленского осетра в том же возрасте (рис. 2). У рыб массой 20 и 90 г общее количество лейкоцитов было близко к физиологической норме для ленского осетра и составляло  $32,4 \pm 5,7$  и  $38,4 \pm 6,7$  тыс./мкл соответственно. При этом между группами лейкоцитов (нейтрофилами, эозинофилами и лимфоцитами) наблюдается перераспределение. У гибридов массой 20 г ещё очень низкий процент нейтрофилов ( $7,5 \pm 1,8\%$ ) и моноцитов ( $1,0 \pm 0,3\%$ ), тогда как у такой же молодежи ленского осетра они составляют  $24,1 \pm 2,8$  и  $3,9 \pm 0,6\%$  соответственно. На фоне снижения активных фагоцитарных групп клеток увеличивается количество эозинофилов ( $11,0 \pm 3,0\%$ ) и лимфоцитов ( $80,5 \pm 4,5\%$ ).

При увеличении массы до 90 г возрастало и число нейтрофилов и моноцитов, но оно ещё в 2 раза меньше, чем у ленского осетра. Резко уменьшалось количество эозинофилов – до  $4,7 \pm 1,9\%$ , доля лимфоцитов не изменилась и составляла  $79,6 \pm 3,2\%$ .

У годовиков гибрида РхЛхЛ (массой 250 г) на фоне снижения общего количества лейкоцитов (до  $24,8 \pm 2,1$  тыс./мкл), процент нейтрофилов уже составлял  $21,0 \pm 5,3$ , что близко к таковому показателю для ленского осетра (рис.1). По моноцитам, эозинофилам и лимфоцитам отмечали ту же тенденцию, что и для молодежи массой 90 г.

Выявленные нейтропения и моноцитопения, особенно у сеголетков (при массе 20 – 90 г), свидетельствует о снижении клеточного звена иммунитета, т.к. именно эти группы клеток являются активными фагоцитами. Возможно, для этой гибридной формы данные показатели являются характерными. При этом иммунологической компенсаторной реакцией этого гибрида можно считать увеличение лимфоцитов, активно участвующих в механизме иммунного ответа, в частности при антителообразовании.

Таким образом, гематологический анализ двух видов возвратных гибридов РхЛхЛ и СхБхС, показал, что межвидовая гибридизация приводит к изменениям иммуно-физиологического статуса рыб. Полугодовое наблюдение за этими гибридными формами осетровых в условиях стабильной температуры, кислородного режима, рН и без замены комбикорма позволило сделать следующие выводы:

- уровень гемоглобина у гибридных форм имел тенденцию к увеличению, тогда как количество эритроцитов к снижению, что привело к увеличению оснащённости их гемоглобином. Не исключено, что это связано с размерами эритроцитов, т.к. они более крупные;

- в лейкоцитарной картине отмечали перераспределение групп лейкоцитов: У РхЛхЛ в сторону увеличения антителообразующих клеток (лимфоцитов) и снижения фагоцитарного звена (нейтрофилов и моноцитов), а у СхБхС - увеличение фагоцитарных клеток.

Все выявленные изменения в крови гибридов носят компенсаторный характер. При такой картине крови у них должен быть достаточно высокий иммунный статус, который позволяет им обеспечивать высокую выживаемость и меньшую подверженность заболеваниям.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Генетика, селекция и гибридизация рыб. Под ред. Б.И. Черфас. - М.: Наука, 1969. - 310 с.
2. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. - М.: Легкая и пищ. пром-сть, 1983. - 184 с.

3. Иванов А.А., Головин П.П., Романова Н.Н., Корабельникова О.В. Оценка физиологического состояния ленского осетра при выращивании в условиях промышленных хозяйств // Известия ТСХА, 2008. - Вып. 4. - С.81-85.
4. Кортунова Л.Г., Наумова А.М. Контроль физиологического состояния молоди осетровых рыб при формировании маточных стад // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: Тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф., 16-18 июля 2003 г.- М.: Россельхозакадемия, 2003.- С. 60-61.
5. Морфология, экология и поведение осетровых. М., 1989. -151 с.
6. Рожков К.В. Молекулярная эволюция 18S рДНК и генетическое разнообразие осетров Амура *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 и *Huso dauricus* (Georgii, 1775): Автореф. канд. биол. наук. – Владивосток, 2008. - 21 с.
7. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. Ч. 2.- М.: Отдел маркетинга АМБ-агро, 1999.– 235 с.
8. Серпунин Г.Г., Савина Л.В., Хрусталеv Е.И., Величко М.С. Гематологические показатели сеголетков стерляди при выращивании в бассейнах и садках на корме "ALLER FUTURA" в Калининградской области // Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития: Мат-лы. докл. IV междунар. науч.-практ. конф. г. Астрахань 13-15 марта 2006 г. - М.: ВНИРО, 2006.- С. 270-272.

#### ESTIMATION OF PHYSIOLOGICAL STATE FOR STURGEON HYBRIDS REARED UNDER INDUSTRIAL CONDITIONS

N.N. Romanova, N.A. Golovina, P.P. Golovin

Characteristics of the immunophysiological state for two commercial industrial reared sturgeon hybrids (sterlet x bester x sterlet and Russian x Lena sturgeon x Lena sturgeon) have been given in comparison with their relative parent species. On the results of the hematological analysis it has been revealed that all changes in the hybrids' blood are of the compensatory character. At such a blood picture, they must have a high enough immune state which allows them to provide a high viability and a low susceptibility to diseases.

# КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА РОЛИ МОЛЛЮСКОВ СЕМЕЙСТВА BITHYNIIDAE (GASTROPODA: PROSOBRANCHIA) В ЭКОСИСТЕМАХ ЮГА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Е.А. Сербина

Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия  
serbina\_elena\_an@mail.ru

Брюхоногие моллюски (Gastropoda) широко распространены в водоемах юга Западной Сибири (Долгин, 2001; Сербина, 2010 а). Они составляют важный компонент бентоса и участвуют в многочисленных трофических связях. Очень важна их роль как промежуточных хозяев трематод, мариты которых паразитируют у домашних и промысловых животных, а иногда и человека (Карпенко и др. 2008; Сербина, 2010 б, в; 2011). Однако количественные сведения, характеризующие их роль в экосистеме, разрозненны и фрагментарны.

Цель настоящего исследования оценить роль моллюсков семейства Bithyniidae в экосистемах юга Западной Сибири на примере реки Карасук и озера Кротово (Кротовая Ляга). В связи с этим были поставлены следующие задачи: показать долю битиннид среди брюхоногих моллюсков по видовому составу (1), по численности (2), по биомассе (3), а также охарактеризовать их роль как хозяев трематод (4).

Изучение видового состава, численности и сырой биомассы брюхоногих моллюсков проведено в р. Карасук (на 4-х участках: от верхнего до нижнего течения реки) и в оз. Кротово (Карасукский, район, Новосибирская область) в августе 2009 г. Для количественной оценки моллюсков собирали вручную с 2-4 площадок 0,25 м<sup>2</sup> (обычно 50x50 см). Контрольные участки располагались как на открытых участках, так и в зарослях макрофитов (по возможности разных видов) на глубине 0,1 - 1,1 м, удаленных на разные расстояния от уреза воды. Собранных моллюсков доставляли в лабораторию, где определяли их видовую принадлежность (Старобогатов и др. 2004), измеряли высоту раковины (или диаметр у катушек) с точностью до 0,1 мм и взвешивали, предварительно обсушив на фильтровальной бумаге не менее 1 минуты. Роль битиннид как хозяев трематод оценена на основе материалов, собранных в июле 1994-95 гг., в июне 2006-07 гг. и августе 2009 г. Битинниды из оз. Кротово обследованы во все годы, а из р. Карасук только в 2009 г. При оценке биоразнообразия экосистемы использовали индекс К. Шеннона - У. Уивера. Расчеты выполнены с использованием программы EXCEL 2003.

Всего в р. Карасук и в оз. Кротово выявлено 18 видов брюхоногих моллюсков *L. (Lymnaea) stagnalis* (L., 1758), *L. (L.) fragilis* (L., 1758), *L. (Radix) auricularia* (L., 1758), *L. (Peregriana) balthica* (L., 1758); *L. (P.) fontinalis* (Studer, 1820), *L. (Peregriana) ovata* (Drap., 1805), *L. (P.) tumida* (Held, 1836) и *Lymnaea (Stagnicola) saridalensis* (Mozley, 1934) [Семейство Lymnaeidae], *Planorbis planorbis* (L., 1758), *Anisus vortex* (L., 1758), *A. contortus* (L., 1758), *Segmentina nitida* (Mull., 1774) [Planorbidae], *Planorbarius corneus* (L., 1758) [Bulinidae], *Physa fontinalis* (L., 1758) [Physidae], *Succinea sp.* [Succineidae], *Zonitoides sp.* [Zonitidae], *Bithynia tentaculata* (Linne, 1758) и *B. troscheli* (Paasch, 1842) [Bithyniidae]. В реке обнаружено 16, а в озере 12 видов брюхоногих моллюсков. Из них 10 видов обнаружены и в реке, и в озере. Катушки *S. nitida* и *P. corneus* обнаружены только в озере, а шесть видов (*L. fragilis*, *L. auricularia*, *L. ovata*, *L. tumida*, *A. contortus*, *Zonitoides sp.*) только в реке. На обследованных участках р. Карасук и оз. Кротово доля моллюсков

семейства Bithyniidae составляла 10-20% от общего видового состава брюхоногих моллюсков.

Численность моллюсков в реке варьировала от 10 до 123 экз./м<sup>2</sup>. Доминировали представители семейства Lymnaeidae, а в качестве субдоминанта отмечены представители семейства Bithyniidae. Индекс Шеннона, рассчитанный по плотности гастропод, показал, что видовое разнообразие увеличивалось от 1,4-1,5 бит/экз. в верхнем течении реки до 1,8-1,9 бит/экз. в нижнем, что может свидетельствовать о повышении трофического статуса реки. В озерной экосистеме численность брюхоногих на разных участках изменялась почти на порядок – от 16 до 124 экз./м<sup>2</sup>. Доминировали представители семейства Planorbidae, а моллюски семейства Lymnaeidae перешли в субдоминанты. По биомассе и в реке, и в озере доминировали представители семейства Lymnaeidae. Оценивая роль моллюсков семейства Bithyniidae в реке, следует отметить, что их доля среди гастропод варьировала по численности от 7,6% до 37,6%. Биомасса битинид в реке снижалась от верхнего к нижнему течению (от 1,51 г/м<sup>2</sup> к 0,25 г/м<sup>2</sup>), составляя 16,77-0,54% от суммарной биомассы моллюсков. В озере их доля составила 4,28 % по численности и 1,15% по биомассе.

Битиниды характеризуемого района отмечены как в качестве первых промежуточных (Сербина, 2010 в), так и качестве вторых промежуточных хозяев трематод (Сербина, 2011). Многолетняя экстенсивность инвазии битинид из реки и озера (партенитами и метацеркариями трематод) показана на рисунке.

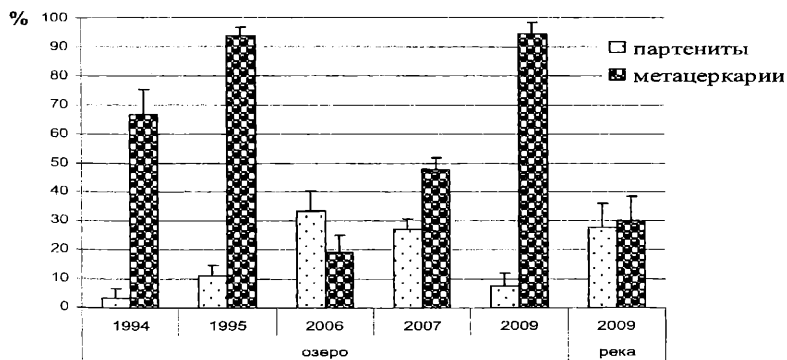


Рис. 1 Многолетняя динамика уровня зараженности партенитами и метацеркариями трематод моллюсков семейства Bithyniidae из реки Карасук и озера Кротово.

Видовой состав трематод, выявленных на стадии партенит представлен 12 видами 8 семейств и на стадии метацеркарии - 12 видами 7 семейств. Все обнаруженные виды трематод ранее зарегистрированы нами у битинид юга Западной Сибири (Сербина, 2010 б) и составляют 36,4% и 60% от общего списка видов (партенит и метацеркарий соответственно). Индекс видового разнообразия партенит трематод, обнаруженных у битинид из реки составлял 1,20 бит/экз и 0,63-2,25 бит/экз. у битинид из озера (в разные годы). Индекс Шеннона трематод на стадии метацеркарии, обнаруженных у битинид из озера, составлял 0,13 - 1,39 бит/экз. и 1,31 бит/экз. у битинид из реки. Показано, что моллюски семейства

Bithyniidae из р. Карасук и оз. Кроотово участвуют в жизненных циклах трематод 20 видов, относящихся к 11 семействам: Monorchidae (2 вида), Opescoelidae (1), Echinostomatidae (5), Echinochasmidae (1), Cyclocoelidae (1), Notocotylidae (1), Syathocotylidae (2), Strigeidae (1), Prosthogonimidae (3), Lecithodendriidae (2); Pleurogenetidae (1). Из них 3 вида завершают свой жизненный цикл у рыб, 1 вид – у земноводных, 16 видов – у птиц. Роль вторых промежуточных хозяев исполняют моллюски (для 12 видов), пиявки (для 3 видов), насекомые (для 9 видов), ракообразные (для 3 видов), рыбы (для 1 вида).

Представленные количественные данные свидетельствуют, что моллюски семейства Bithyniidae занимают значительное место в экосистемах юга Западной Сибири как хозяева трематод, не доминируя по видовому составу, биомассе и численности.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгин В.Н. Эколого-фаунистическая характеристика пресноводных моллюсков Сибири: Автореф. докт. дис. Томск, изд-во Том. ун-та, 2001.
2. Карпенко С.В., Чечулин А.И., Юрлова Н.И., Сербина Е.А., Водяницкая С.Н., Кривопалов А.В., Федоров К.П. Характеристика очагов описторхоза юга Западной Сибири // Сиб. экол. журн. 2008. №5. С. 675-680.
3. Сербина Е.А. Количественная оценка видового состава и биомассы брюхоногих моллюсков в озере Кривое (юг Западной Сибири, Россия) // Биологические науки Казахстана. 2010 а. № 3. С. 46-53.
4. Сербина Е.А. О коэволюции системы Хозяин-Паразит на примере Битинииды-Трематоды // Биоразнообразия и экология паразитов М.: Труды ГЕЛАН, 2010 б. Т. 46. С. 239-259.
5. Сербина Е.А. Роль битинiid (Gastropoda: Prosobranchia: Bithyniidae) как первого промежуточного хозяина трематод в реке Карасук и озере Кроотово (юг Западной Сибири, Россия) // Биологические науки Казахстана. 2010 в. №2. С. 132-144.
6. Сербина Е.А. Роль битинiid (Gastropoda: Prosobranchia: Bithyniidae) как второго промежуточного хозяина трематод в реке Карасук и озере Кроотово (юг Западной Сибири, Россия) // Биологические науки Казахстана. 2011 (в печати).
7. Старобогатов Я.И., Прозорова Л.А., Богатов В.В. Саенко Е.М. // Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. СПб: Наука, 2004. Т. 6 С. 6-491.

### QUANTITATIVE ESTIMATION OF A ROLE OF BITHYNIIDAE SNAILS (GASTROPODA: PROSOBRANCHIA) IN THE ECOSYSTEMS OF THE SOUTH OF WESTERN SIBERIA (RUSSIA)

E.A. Serbina

The results of investigations species composition, abundance and a biomass Gastropoda from the ecosystems of the south of Western Siberia, on example, Krotovo lake and the Karasuk river (the south of Western Siberia, Karasuksy area, Novosibirsk region, Russia) have been studied. We discovered of 18 species of 7 families: Lymnaeidae, Planorbidae, Bulinidae, Bithyniidae, Physidae, Succinidae, Zonitidae. Parts Bithyniidae snails among Gastropoda on species composition, abundance and a biomass are shown. Their role as host for 20 trematodes species 11 families are revealed. Species rich of Gastropoda and trematodes Shennona's indexes are calculated.

# НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ О СОСТОЯНИИ ЗДОРОВЬЯ ЩУКИ АМУРСКОЙ *ESOX REICHERTII* DYBOWSKI, 1869

А.В. Хлопова

Хабаровский филиал ФГУП «Тихоокеанского научно-исследовательского  
рыбохозяйственного центра», Хабаровск, Россия, [khloпова82@mail.ru](mailto:khloпова82@mail.ru)

Амур – одна из крупнейших рек в мире, крупнейшая трансграничная река Евразии. Водно-биологические ресурсы бассейна Амура очень важны для экопомики Хабаровского края. В основном это касается коренного населения Приамурья, жизнь которого традиционно связана с рыбными ресурсами. Для оценки качества водной среды и мониторинга загрязнения был выбран вид-индикатор, который удовлетворяет определенным требованиям: массовый, устойчивый к загрязнению, доступный (простота отлова), присутствует во всех районах исследования. Таким требованиям полностью соответствует щука амурская *Esox reichertii* Dybowski, 1869. Отлов рыб произведен ставной, сплавной сетями с ячейей диаметром 20–60 мм с июня по июль 2010 г. в районах бассейна нижнего (протоки Синдинская и Актар) и среднего Амура (основное русло реки около острова Большой Уссурийский). Для гистологического анализа отбирались органы самок и самцов. Отобранные органы сразу же фиксировались для того, чтобы задержать изменения, происходящие в тканях, изолированных от организма, и сохранить картину тканевой структуры, соответствующую исходному состоянию. Толщина фиксируемого фрагмента жабр, печени, почки и гонад не превышала 1–1,5 см. Пробы фиксировали жидкостью Буэна, заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилином-эозином. Гистологическими методами исследованы органы 20 рыб (80 проб), у которых выявлены и идентифицированы основные типы патологических изменений в клетках и тканях, определена частота встречаемости наиболее характерных типов гистоморфологических изменений (%) в жабрах, печени, почках, гонадах. При сборе и обработке материала были использованы общепринятые в ихтиологии методики исследования, а при обработке гистологического материала – общепринятые технические рекомендации (Правдин, 1966; Меркулов, 1969). Длину тела по Смитту (АС) и АД измеряли с точностью до 0,5 мм. Возраст рыб определяли по чешуе. Препараты просматривали на световом тринокулярном микроскопе Oritech XSP-128-301, оборудованным цифровой камерой. Пойманные экземпляры представлены двумя возрастными группами: 3+ (четырёхлетки) и 4+ (пятiletки). Длина тела АС варьировала от 46 до 58 см, а АД от 42,8 до 54 см соответственно. Масса тела варьировала от 584 до 1350 г.

В интерламеллярной зоне и на концах ламелл жабр отмечено три степени выраженности гиперплазии респираторного эпителия: слабая – 5–30% жабрных ламелл подверглись изменению; умеренная – 30–50% ламелл подверглись изменению; сильная – эпителий изменился более чем на 50%. Гиперплазия респираторного эпителия выявлена у всех исследованных рыб – от слабой до сильной. Гиперплазия представляет собой защитную реакцию организма на тканевом уровне, направленную на компенсацию и восстановление функций органа. Это наиболее часто встречаемое патологическое изменение морфологии жабр из загрязненных районов, а также рассматривается как обычная реакция после экспозиции с токсическими веществами (Khan et al., 1994; Khan, 1995 – цит. по: Ясына и др., 2001). При слабой выраженности гиперплазия является адаптационным изменением, при котором увеличивается поверхность, через



которую осуществляется газообмен, или, в случае образования булавовидных ламелл, затрудняется доступ загрязненной воды в жабры (Laurent, Dunel, 1980). У 50 % особей была отмечена гипертрофия клеток респираторного эпителия, это выразилось в утолщении жаберных филламентов и уменьшении пространства между ними. Некоторые авторы полагают, что развитие гипертрофии объясняется необходимостью усиленной секреции слизи, а также компенсацией недостаточного развития других механизмов защиты от попадания в организм ксенобактериальных агентов (Луккин и др., 2010). У 1 особи (5 %) в жабрах отмечено наличие анэвризм – скопление большого количества эритроцитов в ламеллах, вероятно, это связано с прямым действием на жаберный аппарат токсических веществ. Застой крови привёл к образованию телеангиэктазий – чрезмерному расширению просвета капилляров на концах ламелл и избыточному накоплению в них крови, которые обуславливают укорочение и деформацию жаберных ламелл, данная патология отмечена всего у нескольких особей.

По физиологическому и гистологическому состоянию печени можно успешно и относительно точно судить о состоянии внешних условий среды обитания той или иной особи (Минеев, 2011). Этот орган быстрее других органов реагирует на изменение условий внешней среды. При этом наблюдаются различного рода патологические изменения, которые характеризуются определенными гистологическими изменениями. К основным типам гистопатологических нарушений печени исследуемого вида следует отнести: паренхиматозные дистрофические изменения – диффузная вакуолизация, расстройства кровообращения (гиперемия и наличие мелких точечных кровоизлияний в окружающую ткань), наличие ММЦ (меланомакрофаговых центров), некрозы. Нарушение кровообращения было выражено в гиперемии (у 50 % особей). Сосуды печени при этом переполнены пигментированной кровью, в единичных случаях наблюдался процесс гемолиза. Большая часть гепатоцитов содержала крупные оптически пустые вакуоли, являющиеся местами отложения жировых включений. Материал для исследования был собран в летний период, когда щука уже отнерестилась, гонады находились на II стадии зрелости, начинался процесс накопления питательных веществ для последующего развития гонад. Данное количество жировых вакуолей явно свидетельствует о четкой связи функционального состояния печени с процессом размножения (у самок это особенно связано с процессом вителлогенеза). Такое депонирование жировых включений отмечено также у карася китайского и указывает на расширение функций печени и имеет, по-видимому, приспособительное значение, свидетельствующее о широких адаптивных возможностях этих видов рыб (Таликина, 1985). При диффузном некрозе гибнут отдельные гепатоциты, определяемые по наличию пикнотизированного ядра (Сяпина, Соколовский, 2001). У 2 особей (10 %) щуки амурской отмечены гепатоциты с пикнотизированными ядрами (они имеют темный цвет из-за сморщивания клеточного ядра и впоследствии конденсации хроматина), потом наступает некроз. Некроз гепатоцитов установлен у 3 особей (15 %) из протока Синдинская и Актар и у 3 (15 %) – из основного русла реки Амур около острова Большой Уссурийский. Наличие некротических изменений в паренхиматозной ткани печени позволяет говорить об интенсивном воздействии стрессовых факторов на исследованные организмы. Увеличение количества ММЦ в клетках печени также является индикатором состояния стресса окружающей среды (Hartley et al., 1996). В печени 1 особи (5 %) отмечено накопление зерен темно-желтого пигмента (гемосидерин) в ММЦ. Избыточное отложение гемосидерина в тканях органа приводит к развитию такого заболевания, как хронический гемосидероз.

Почки рыб способны выполнять многообразные функции: они регулируют водный обмен, количество и состав электролитов, поддерживают кислотно-щелочное, солевое равновесие в крови и тканевой жидкости (Beuchat, Braun, 1988; Sallin et al., 1994 – цит. по: Романов и др., 2006). У всех особей щуки амурской были обнаружены многочисленные ММЦ в строме почки. Некоторые авторы полагают, что при патологических состояниях или голодании у рыб усиливаются процессы отложения окиси железа в ММЦ селезенки и печени. Сходное распределение гемосидерина наблюдалось у рыб, собранных в районах комплексного загрязнения (Agius, 1979; Myers et al., 1987; Khan et al., 1994 – цит. по: Сяпина и др., 2001). В составе эпителия почечных канальцев отмечены немногочисленные клетки со светло-желтым пигментом – пигментированные макрофаги: у 20 % – из БУО, у 70 % – из проток Синдинская и Актар. Ранее было установлено, что большинство особей данного вида из реки Тугур (Тугуро-Чумиканский район Хабаровского края) также содержали пигментированные макрофаги в почечных канальцах. В гонадах патологических изменений не обнаружено.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лукин А.А., Шарова Ю.Н., Беличева Л.А. Оценка состояния организма рыб при загрязнении водных экосистем нефтепродуктами и отходами целлюлозно-бумажного производства // Рыбное хозяйство. - 2010. - № 6. - С. 47–52.
2. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. - Л.: Медицина, 1969. - 423 с.
3. Минсеев А.К. Некоторые гистологические патологии печени и сердца у головешки-ротана (*PERCCOTTUS GLENII DYBOWSKI, 1877*) и бычка-кругляка (*NEOGOBIOUS MELANOSTOMUS PALLAS, 1814*) Саратовского водохранилища // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - 2011. - Т. 13. - № 1. - С. 203–206.
4. Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. - М.: Пищ. пром-сть, 1966. - 376 с.
5. Романов Ал.А., Лепилина И.Н., Романов Ан.А. Морфофункциональные нарушения почек осетровых и костистых рыб Волго-Каспия в современных условиях // Цитология. - 2006. - Т. 48. - № 1. - С. 5–8.
6. Сяпина И.Г., Соколовский А.С. Оценка состояния камбал из бухты Сивучья залива Петра Великого Японского моря по гистопатологическим показателям // Биология моря. - 2001. - Т. 27. - № 2. - С. 102–109.
7. Сяпина И.Г., Соколовский А.С., Соколовская Т.Г. Патология рыб из устья реки Туманной и прилегающей морской акватории // Экологическое состояние и биота юго-западной части залива Петра Великого и устья реки Туманной. - Владивосток: Дальнаука, 2001. - Т. 2. - С. 138–175.
8. Таликина М.Г. Гистофизиологическое исследование печени леща *Abramis brama* (L.) и серебряного карася *Carassius auratus gibelio* (Bloch) (Cyprinidae) Кучурганского лимана-охладителя Молдавской ГРЭС // Вопросы ихтиологии. - 1985. - Т. 25. - Вып. 2. - С. 283–292.
9. Hartley W.R., Thiyagarajah A., Treinies A.M. Liver lesions in the gar fish (*Lepisosteidae*) as biomarkers of exposure // Mar. Environ. Res. - 1996. - V. 42. - № 1–4. - P. 217–221.
10. Laurent P., Dunel S. Morphology of gill epithelia in fish // Am. J. Physiol. - 1980. - V. 238. - P. 147–159.

### THE SOME DATA ABOUT STATE HEALTH OF AMUR PIKE *ESOX REICHERTII DYBOWSKI, 1969*

A. V. Khlopova

The Amur pike is a perspective species for monitoring. As a result of the histological analysis it is established that in a pike internal numerous pathological changes develop. The revealed spectrum histomorphological changes in organs testify to strengthening protectively-kompensatory processes.

# ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ РЫБ РЕКИ АМУР

Л.М. Чухлєбова

Хабаровский филиал ФГУП «ТИНРО-Центр», Хабаровск, Россия

*Ljubovchu@mail.ru*

Антропогенное загрязнение приводит к нарушению экологических условий в водоемах, снижению качества рыбных продуктов при накоплении в них вредных химических веществ. Пищевая ценность рыбы по микробиологическим и экотоксикологическим исследованием включает анализ воды как среды обитания, самой рыбы и накопленных в ней химических элементов. Живая рыба может заражаться условно-патогенными и безвредными микроорганизмами в местах естественного обитания в экологически неблагополучных районах, где сточные воды содержат патогенные формы бактерий (Константинова, Дубровин, 2005).

Качество рыбной продукции должно гарантировать ее безопасность для здоровья потребителя и соответствовать требованиям безопасности по микробиологическим показателям и по содержанию в ней допустимых уровней (ДУ) контаминантов (Экспертиза..., 2007). Наряду с определением в рыбе микробиологических показателей, содержания тяжелых металлов, пестицидов, полихлорированных бифенилов, для ее безопасности необходима оценка уровня содержания биогенных аминов: гистамина, нитрозоаминов, общего азота летучих оснований.

Для жителей Приамурья чрезвычайно актуальна оценка риска использования загрязненной воды и рыбы, особенно в зимнее время. Для многих коренных жителей рыба не только исторически обусловленный источник питания, но и единственное средство для существования и сохранения национального генофонда. Исследования качества рыбы в бассейне р. Амур по ДУ контаминантов проводятся с 1998 г., по микробиологическим критериям безопасности с 2002 г. по настоящее время.

Объектами исследования служили вода и мышечные ткани промысловых рыб из различных водоемов Амурского бассейна (оз. Петропавловское, проток Талга и Мальшевская) и основного русла (пос. Амурзет, г. Хабаровск, Комсомольск-на-Амуре, Николаевск-на-Амуре).

Наиболее адекватно судить об экологическом состоянии водной экосистемы позволяет изучение общего количества мезофильных аэробов и факультативных анаэробов (КМАФАнМ), способных образовывать на питательном агаре колонии, и определение санитарно-показательных бактерий группы кишечной палочки (БГКП) (Санитарно-микробиологический..., 2005).

Отбор, подготовку к анализу проб, приготовление инокулята проводили согласно утвержденным инструкциям по санитарно-микробиологическому контролю производства продукции из рыбы (Инструкция, 1991). В качестве показателей безопасности рыбы использовали допустимые уровни (ДУ) контаминантов для рыбы (Экспертиза..., 2007).

Для исследования отбирали 3-5 половозрелых одноразмерных особей. Содержание металлов в рыбных пробах определяли согласно ГОСТ 30178-96; определение ртути методом атомной абсорбции на ААС-30 согласно ГОСТ 26927-86; содержание хлороорганических пестицидов согласно МУК 1792-77 методом ГЖХ на хроматографе «Кристалл-2000 М»; содержание нитрозоаминов в соответствии с МУК 4.4.1.011-93 методом ТСХ на жидкостном хроматографе «Орлант-122», колонка: диасфер-110-С16 с использованием флуориметрического детектора;

определение содержания бифенилов согласно МУК 4.1.1023-01 методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «Орлант-122».

Река Амур — водоем с высоким уровнем уже существующего фонового загрязнения, а вновь поступающие токсичные соединения вызывают серьезные нарушения в функционировании всех водных биоценозов.

Основные гидрохимические характеристики показывают, что воды Амура содержат большое количество органических веществ аллохтонного происхождения, главным образом гумусной природы. Об этом свидетельствует цветность воды в данном водоеме (Погадаев, 1988). В зависимости от сезона она колеблется от 64 до 140 град. Растворенный кислород является одним из главных показателей качества речных вод. При его дефиците (<4,0 мг/дм<sup>3</sup>) возникают заморы, резко снижается качество воды (Шестеркин, 2007). Ухудшение кислородного режима Амура в зимний период связано не только со снижением его водности, но и с поступлением в его воды больших количеств загрязняющих веществ. Годовая динамика содержания органического вещества (ОВ) в воде Амура характеризуется увеличением их количества за счет аллохтонной составляющей, особенно после летне-осенних паводков. Зимой общее содержание ОВ уменьшается за счет автохтонной органики, однако вклад аллохтонного органического вещества остается существенным (Левшина, 2006) (табл. 1).

Таблица 1.

Интегральные показатели сезонного содержания ОВ в воде р. Амур

Время отбора	Цветность, град.	C <sub>орг.</sub> , мг С/дм <sup>3</sup>	ПО, мг О/дм <sup>3</sup>	ХПК, мг О/дм <sup>3</sup>
Лето	125,0-140,0 (130,0)	9,9-12,2 (10,6)	6,9-20,0 (14,0)	20,0-32,0 (24,0)
Осень	110,0-125,0 (122,0)	6,7-12,3 (8,4)	5,9-12,0 (8,7)	16,0-24,0 (20,0)
Зима	64,0-91,0 (84,0)	2,4-7,5 (6,4)	5,4-6,0 (7,2)	18,0-30,0 (18,0)

Примечание: C<sub>орг.</sub> — концентрация органического углерода; ПО — перманганатная окисляемость; ХПК — химическое потребление кислорода; в скобках — средние значения

Сравнительный анализ качества воды по численности аэробных сапрофитных микроорганизмов в периоды зимней межени показал, что в 2002 году воды Амура были отнесены к категории "грязные", в 2003-2005 гг. как "очень грязные", в периоды открытой воды 2002-2004 гг. как «загрязненные», в 2005 году как «очень грязные» (Чухлебова, 2005). По данным ежегодного государственного санитарного надзора качество речной воды в районе г. Хабаровска в 40% исследуемых проб не соответствовало санитарно-гигиеническим нормативам по химическим и в 42% по микробиологическим показателям, а в районе г. Комсомольска-на-Амуре — 21,9% и 24% соответственно (Плющенко, 2008).

Под влиянием условий среды численность бактерий в воде и организме рыбы может возрастать, при этом происходит изменение биологических свойств бактерий, и они приобретают вирулентность. Сброс сточных вод может привести к размножению в речной воде болезнетворных бактерий. Предполагается, что проникновение бактерий в организм рыб возможно через кожу или жабры (Рудиков, Грищенко, 1985). Возможен и другой путь инфицирования: первоначально патогенные микроорганизмы усиленно размножаются в кишечнике, затем по кровеносным сосудам, проницаемость которых увеличивается под действием

эндотоксинов, разрушающихся бактерий, с кровью попадают во все ткани организма (Takahashi, 1984).

Одним из критериев качества рыбы и влияния ее на здоровье человека может быть уровень накопления различных токсикантов (табл. 2).

В 1998 г. из 18 проанализированных проб рыбы в 11 наблюдалось превышение допустимых уровней по ртути (карась, желтощек), а по содержанию свинца и кадмия (карась) на пределе ДУ (Водно-экол..., 2003). Исследованиями, проведенными в 2002 г., установлено, что амурская рыба на участке от г. Хабаровска до г. Комсомольска-на-Амуре содержит пестициды и тяжелые металлы. В мышечной ткани сома обнаружены высокие концентрации ртути. В рыбе (конец пестрый, чебак, налим) с интенсивным «химическим», не специфичным для рыбы запахом, обнаружен триметиламин, содержание которого в зимний период было выше, чем в летний, и составило от 2,4 до 6,2 мг/кг (Чухлебова, 2004). Триметиламин является не только источником резкого запаха, он служит предшественником канцерогенных нитрозоаминов, особенно при избытке нитритов в водной среде.

В 2006 г. высокие концентрации свинца и мышьяка в мышечных тканях рыб свидетельствуют о постоянном или периодическом присутствии их в речной воде, что делает рыбу непригодной для употребления в пищу (Мустафин и др., 2007).

Таблица 2. Показатели безопасности амурской рыбы по допустимому уровню (ДУ) контаминантов

Показатель	ДУ*, мг/кг, не более	Период зимней межени (год)		
		1998	2002	2006
Токсичные элементы:				
свинец	1,00	0,037-0,813	0-0,130	0,350-0,620
кадмий	0,30	0,082-0,256	0-0,050	0,006-0,097
мышьяк	0,20	0,010-0,030	0-0,070	0,080-0,340
ртуть	0,30	0,060-0,650	0,040-0,720	0,030-0,090
медь	10,0	0,050-2,320	0,250-1,410	-
цинк	40,0	5,670-30,60	1,940-11,16	-
Гистамин	100,0	Нет данных	19,70-22,00	Нет данных
Нитрозоамины	0,003	Нет данных	ТМА: 2,4-6,2	Нет данных
Пестициды:				
гексахлорциклогексан (ГХЦГ α, β, γ-изомеры)	0,03	0,00002-	γ — изомер (линдан): 0,023-0,025	Не обнаружено 0,0004-0,0029
ДДТ и его метаболиты	0,30	0,006- 0,0009- 0,0301	0,062-0,075	
Полихлорированные бифенилы (ПХБ)	2,00	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Бактериальное обсеменение МАФАНМ, КОЕ/г	50000	Нет данных	2000-6000	2000-38000

Примечание: ДУ\* — Экспертиза..., 2007; прочерк — не нормируется; ТМА — триметиламин

В период открытого русла реки в 2008 г. было проведено обследование 48 проб амурской рыбы из различных водоемов бассейна р. Амур на присутствие в них сапрофитных и патогенных микроорганизмов.

Результаты показали, что наибольшее количество МАФАНМ было обнаружено в рыбе, отловленной из основного русла Амура (р-оны гг. Хабаровска, Комсомольска-на-Амуре, Николаевска-на-Амуре), среднее — из проточного озера Петропавловское, устья р. Добрай и наименьшее — проток Талга и Малышевская. Наличие в организме рыб некоторых бактерий, широко распространенных в природе, таких как условно-патогенные бактерии *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* и др., при определенных условиях может стать причиной заболевания. Для этих возбудителей характерно интенсивное размножение и накопление в пищевом продукте. В амурских рыбах (карась, сазан, толстолоб, амурский сом, белый амурский лещ) из основного русла Амура (пос. Амурзет, Хабаровский, Комсомольский, Николаевский районы) обнаружена сапрофитная и условно-патогенная микрофлора (высокая численность МАФАНМ, БГКП, энтеробактерий). В рыбах (карась, белый лещ, сазан) из проток Талга и Малышевская количество МАФАНМ в мышечных тканях составило более 50000 КОЕ/г, там же обнаружены БГКП. Возбудителей таких заболеваний, как сальмонеллез, стафилококк, галофилез, в исследованных рыбах не обнаружено.

Способность токсичных веществ циркулировать по трофическим цепям представляет большую опасность для человека, употребляющего в пищу гидробионтов, в частности рыб из загрязненных водоемов (Матей, 1996). В настоящее время появляется все больше доказательств, что стресс, вызванный различными факторами среды и антропогенным загрязнением, в частности, может привести к истощению и заболеваниям многих животных, включая рыб. Независимо от того, является ли заболевание инфекционным или неинфекционным, стресс может быть основной причиной заболеваемости у рыб в деградированной среде обитания, а хроническое загрязнение может влиять на развитие и интенсивность паразитарных инвазий рыб (Khan, 1991; Исаева, Козиненко, 1999).

Проведенные исследования по содержанию в рыбе различных токсикантов выявили локальные места загрязнения в бассейне р. Амур, в основном это основное русло (гг. Хабаровск, Комсомольск-на-Амуре, Николаевск-на-Амуре). Неблагоприятные экологические условия водной среды Амура значительно повышают опасность накопления и, как следствие, отравления рыб различного рода токсикантами, снижению резистентности рыб к возбудителям разных заболеваний. Накопление в рыбе частиковых пород большого количества токсикантов свидетельствует о постоянном или периодическом присутствии их в речной воде в концентрациях, превышающих ПДК для воды рыбохозяйственных водоемов, что делает рыбу непригодной для употребления в пищу. Ослабление иммунной системы рыбы вследствие поступления в организм низких концентраций поллютантов (нитрозоаминов, нефтепродуктов, ТМ) способно вызвать нарушение в обмене веществ, снижение защитных функций и, как следствие, способствовать проникновению как сапрофитных, так и патогенных микроорганизмов в мышечные ткани.

Уменьшение антропогенных нарушений необходимо не только для нормального функционирования водных экосистем, но и является главным фактором предотвращения образования канцерогенных нитрозосоединений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Водно-экологические проблемы бассейна реки Амур. - Владивосток: ДВО РАН, 2003. - 187 с.
2. Инструкция по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции из рыбы и морских беспозвоночных № 5319-91. - Л.: Гиппрорыбфлот, 1991. - 94 с.
3. Исаева Н.М., Козиненко И.И. Иммуномоделирующее действие бактерий (их продуктов) на рыб // Вопросы ихтиологии. - 1999. - Т. 39. - № 39-С. 527-534.
4. Константинова Л.Л., Дубровин С.Ю. Сырье рыбной промышленности: Учебное пособие. - СПб.: ГИОРД, 2005. - 240 с.
5. Левшина С.И. Содержание и динамика органического вещества поверхностных вод бассейна р. Амур и его геоэкологическое значение: Автореф. дис... канд. геогр. наук. - Владивосток, 2006. - 23 с.
6. Матей В.Е. Жабры пресноводных костистых рыб. - СПб.: Наука, 1996. -С. 336-348.
7. Мустафин С.К., Сафарова В.И., Шайдуллина Г.Ф. Проблемы загрязнения гидросферы промышленных регионов // Регионы нового освоения: экологические проблемы, пути решения: Материалы межрег. науч.-практ. конф. - Хабаровск: ДВО РАН, 2008. - Кн. 2 -С. 597-600.
8. Плющенко В.Н. Оценка химического загрязнения атмосферного воздуха и питьевой воды в гг. Хабаровске и Комсомольске-на-Амуре в 1999 и 2006 годах на основе методологии оценки риска // Дальневосточная весна - 2008: Материалы междуна. научно-практ. конф. в об-ти экологии и безопасности жизнедеятельности. -Комсомольск-на-Амуре: ГОУВПО «КНАГУ», 2008. -С. 350-353.
9. Погадаев Г.И. Содержание биогенных и органических элементов в речных водах бассейна р. Амур // Формирование вод суши юга Дальнего Востока. - Владивосток: Изд-во ДВО РАН СССР, 1988. -С. 127-140.
10. Рудиков Н.И., Грищенко Л.И. Микрофлора и бактериальные болезни рыб // Итоги науки и техники ВИНИТИ. Сер. Ихтиология. -М.: ВИНИТИ. -Т.1. -С. 93-160.
11. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ поверхностных водных объектов: Методические указания. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2005. - 75 с.
12. Чухлебова Л.М. Экотоксикологическая оценка состояния рыб экосистемы реки Амур: Автореф. дис... канд. биол. наук. - Владивосток, 2004. - 22 с.
13. Чухлебова Л.М. Оценка экологического состояния качества воды в основном русле реки Амур ниже г. Хабаровска в период ледостава // Фундаментальные проблемы изучения и использования воды и водных ресурсов: Мат. науч. конф. - Иркутск: Изд-во Института географии СО РАН, 2005. - С. 322-324.
14. Шестеркин В.П. Зимний гидрохимический режим Амура // Вестник ДВО РАН.- 2007. - № 4 - С. 35-43.
15. Экспертиза рыбы, рыбопродуктов и нерыбных объектов водного промысла. Качество и безопасность: учеб.-справ. пособие / Под общ. ред. В.М. Поздняковского. 2-е изд. - Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007. - 311 с.
16. Khan R.A., Thulin J. Influence of pollution on parasites of aquatic animals // Adv. Parasitol.-1991. - Vol. 30. - P. 201-238.
17. Takahashi Y. Механизм появления симптомов аэромоноза у карпов // J. Shimonoseki Univ. Fish. - 1984. - Vol. 32. -№ 1-2 - P. 41-48.

### ASSESSMENT OF THE ENVIRONMENTAL SAFETY OF FISHES AMUR RIVER

L.M. Chukhlebova

For residents of the Amur Region is extremely urgent assessment of water quality and fish. Studies on the content in different fish toxicants identified local places of pollution in the Amur basin, this is the main River channel (Khabarovsk, Komsomolsk-on-Amur, Nikolaevsk-on-Amur). The paper shows that the adverse environmental conditions of the aquatic environment of the Amur significantly increase the risk of accumulation of toxic compounds that help reduce resistance of fish to various diseases, making it unfit for human consumption.

## ТРЕМАТОДОЗЫ ПРОМЫСЛОВЫХ РЫБ ВНУТРЕННИХ ВОДОЕМОВ ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

А.Н. Шинкаренко, С.Н. Федоткина, А.В. Дубинин

ФГБОУ ВПО «Волгоградская государственная сельскохозяйственная академия»,  
г. Волгоград, Россия, dyshanbesveta@mail.ru

Трематодозы - инвазионные болезни, возбудителями которых являются различные виды червей, относящиеся к классу Trematoda, или дигенетических сосальщиков (Васильков, 1983).

У рыб пресноводных водоемов трематодозы чаще вызывают личиночные стадии гельминтов - церкарии и метацеркарии. Лишь небольшое количество сосальщиков в половозрелой стадии паразитирует у рыб.

Класс Trematoda включает сотни видов сосальщиков, паразитирующих у рыб, однако не все из них имеют патогенное значение (Грищенко, 1999).

Речная сеть Волгоградской области принадлежит бассейнам рек Волги и Дона, самых крупных, полноводных и судоходных рек на ее территории.

В Волгоградской области всего построено 1587 прудов (из них 1467 или 92 % в бассейне Дона), 115 водохранилищ (95 или 83 % в бассейне Дона), крупными водохранилищами являются Цимлянское и Волгоградское (Мусаелян, 2003).

Ихтиофауна водохранилищ области представлена 39 видами рыб. Основу рыбных запасов составляют лещ, сазан, щука, синец и густера. Второстепенное значение имеют судак, окунь, берш, плотва, чехонь, язь, жерех, карась, сом; малочисленные виды рыб: налим, подуст, елец, тарань, красноперка, линь; одиночные белуга, черноморская сельдь, азовский пузанок, рыбец, вырезуб, стерлядь.

По данным собственных исследований и исследований, проводимых государственной ветеринарной службой Волгоградской области, область является неблагоприятной по инвазионным заболеваниям рыб (Федоткина, Шинкаренко, 2007).

В таблице 1 представлены результаты ихтиопатологических исследований рыб в бассейне р. Волга и Волгоградского водохранилища за 2010г.

В таблице 2 представлены результаты ихтиопатологических исследований рыб в бассейне р. Дон и Цимлянского водохранилища за 2010г.

В результате систематических паразитологических вскрытий 9378 различных видов рыб в условиях бассейна р. Волга и Волгоградского водохранилища, а также р. Дон и Цимлянского водохранилища мы выявили 5 видов паразитирующих трематод.

*Diplostomum spathaceum* паразитирует преимущественно у видов рыб синец и лещ (ЭИ до 42,1%). *Postodiplostomum citicola* паразитирует преимущественно у рыб плотва и густера (ЭИ до 24,8%). Трематоды из рода *Tetracotyle* регистрировали у судака и берша с ЭИ 50,0%. *Opisthorchis felineus* паразитирует у леща и плотвы (ЭИ 0,61%). *Pseudamphistomum truncatum* наиболее чаще встречается у плотвы и густеры (ЭИ 1,5%).

Таким образом, необходимо отметить, что в Волгоградской области наиболее распространены следующие трематодозы рыб: диплостомоз, постодиплостомоз. Причем данные трематодозы поражают большое разнообразие видов рыб, имеющих промысловое значение, и экстенсивность инвазии по трематодозам может достигать до 50,0% в условиях бассейна рек и водохранилищ Волгоградской области.



Таблица 1.

Результаты ихтиопатологических исследований рыб в бассейне р. Волга и Волгоградского водохранилища за 2010г.

Возбудители трематодозов рыб		Виды рыб											
		Карп	Толстолобик	Сазан	Лещ	Плотва	Густера	Белый амур	Синец	Чехонь	Шука	Судак	Берш
Diplostomum spathaceum	Кол-во исслед.	522	490	117	265	327	299	500	19	127	80	267	265
	Кол-во положит.	25	75	6	62	71	60	42	8	27	5	-	-
	ЭИ	4.7	15.3	5.12	23.3	19.0	20.0	8.4	42.1	21.2	6.25	-	-
Postdiplostomum citicola	Кол-во исслед.	522	490	117	265	327	299	500	19	127	80	267	265
	Кол-во положит.	-	-	-	10	10	61	-	-	7	-	-	-
	ЭИ	-	-	-	3.7	3.7	20.4	-	-	5.5	-	-	-
Tetracotyle spp.	Кол-во исслед.	522	490	117	265	327	299	500	19	127	80	267	265
	Кол-во положит.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	124	81
	ЭИ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46.4	30.5
Opisthorchis felincus	Кол-во исслед.	522	490	117	265	327	299	500	19	127	80	267	265
	Кол-во положит.	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-
	ЭИ	-	-	-	0,4	0,61	-	-	-	-	-	-	-
Pseudamphistomum truncatum	Кол-во исслед.	522	490	117	265	327	299	500	19	127	80	267	265
	Кол-во положит.	-	-	1	2	5	4	-	-	-	-	-	-
	ЭИ	-	-	0,85	0,75	1,5	1,3	-	-	-	-	-	-

Таблица 2.

Результаты ихтиопатологических исследований рыб в бассейне р. Дон и Цимлянского водохранилища за 2010г.

Возбудители трематодозов рыб		Виды рыб										
		Карп	Голотолобик	Лещ	Плотва	Густера	Белый амур	Синец	Чехонь	Щука	Судак	Берш
Diplostomum spathaceum.	Кол-во исслед.	492	714	490	455	430	456	32	212	236	236	36
	Кол-во положит.	19	90	78	66	62	72	9	17	12	-	-
	ЭИ	3.8	12.6	15.9	14.5	14.4	15.7	28.1	8.0	5.0	-	-
Postodiplostomum citicola	Кол-во исслед.	492	714	490	455	430	456	32	212	236	236	36
	Кол-во положит.	-	92	41	93	107	-	-	25	-	-	-
	ЭИ	-	12.8	8.3	20.4	24.8	-	-	11.7	-	-	-
Tetracotyle spp.	Кол-во исслед.	492	714	490	455	430	456	32	212	236	236	36
	Кол-во положит.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	118	14
	ЭИ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	38.8
Opisthorchis felineus	Кол-во исслед.	492	714	490	455	430	456	32	212	236	236	36
	Кол-во положит.	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
	ЭИ	-	-	-	0,2	0,23	-	-	-	-	-	-
Pseudamphistomum truncatum	Кол-во исслед.	492	714	490	455	430	456	32	212	236	236	36
	Кол-во положит.	-	-	2	3	2	-	-	-	-	-	-
	ЭИ	-	-	0,4	0,66	0,46	-	-	-	-	-	-

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильков Г.В. Гельминтозы рыб - М.: Колос, 1983 - 208 с.
2. Грищенко Л.И. Болезни рыб и основы рыбоводства - М.: Колос, 1999. - 278 с.
3. Мусаелян С.М. Поверхностные водные ресурсы Волгоградской области - Волгогр. гос. с.-х. акад. - Волгоград, 2003. - 92с.
4. Федоткина С.Н., Шинкаренко А.Н. Паразитофауна рыб в естественных и искусственных водоемах Волгоградской области // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса. - Волгоград, 2007. - №4. - С. 98-100.

### TREMATODOSEA COMMERCIAL FISH OF RESERVOIRS OF THE VOLGOGRAD REGION

A.N. Shinkarenko, S.N. Fedotkina, A.V. Dubinin

Trematodosea - invasive disease, pathogens which are various kinds of worms belonging to the class Trematoda. The fish freshwater trematodoses often cause larval stages of helminthes - cercaria and metacercaria. Only a small number of trematodes in mature stage parasites in fish. As a result of systematic parasitological examinations 9378 different species of fish in the Volga river basin and the Volgograd reservoir, as well as the don river and of tsimlyansk reservoir, we have identified five species of parasitic trematodes. Thus, it is necessary to note, that in the Volgograd region, the most common are the following trematodoses fish: Diplostomoses, Poshhodiplostomosis. The data trematodoses affect a large variety of fish species with commercial value and extensity of the invasion on trematodoses can reach up to 50.0% in the basin of the rivers and reservoirs of the Volgograd region.

## СЕКЦИЯ ПЛЕНАРНАЯ.

	4
Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н. Экологический подход к эпизоотологии бактериальных болезней рыб.....	4
Высоцкая Р.У., Немова Н.Н., Владиченко Е.А. Лизосомальные гликозидазы в защитных и приспособительных реакциях водных организмов.....	9
Голованова И.Л. Влияние органических загрязнителей на пищеварение у рыб.....	14
Головин П.П., Романова Н.Н., Юхименко Л.Н. «Дезавид» - новое дезинфицирующее средство для аквакультуры.....	19
Гудимов А.В. Разделение нормы и патологии - основа технологий он-лайн биомониторинга и контроля токсичности вод в реальном времени.....	24
Денисова Т.П. Влияние техногенных загрязнителей на гидробионтов.....	26
Ерохина И.А., Кавцевич Н.Н. Проблема охраны здоровья морских млекопитающих.....	31
Изымов Ю.Г., Касьянов А.Н. Оценка антропогенной нагрузки на популяции рыб по закономерностям географической изменчивости морфологических признаков.....	35
Калайда М.Л., Синютин Т.П., Гавшина Т.С. Нанобиоциды как фактор влияния на гидробионтов.....	37
Кузьмина В.В., Гарина Д.В., Семенова Е.М., Докучаева А.В., Русанова П.В., Куливатская Е.В. Влияние серотонина и холинергического агониста на процессы экзотрофии у карпа <i>Cyprinus Carpio</i> .....	42
Мартемьянов В.И. Оценка физиологического состояния рыб (нормы, острого и хронического стресса) по показателям водно-солевого обмена.....	47
Микряков В.Р. Основные итоги и направления иммунологических исследований на гидробионтах.....	52
Руднева И.И., Шайда В.Г. Особенности метаболизма гидробионтов при токсических воздействиях.....	57
Скуратовская Е.Н., Юрахов В.М., Завьялов А.В., Шеметова Е.А. Влияние комплексной зараженности на морфофизиологические и биохимические показатели черноморского мерланга.....	62
Слышко Ю.В., Микряков В.Р., Лапирова Т.Б. Устойчивость к аэромоназу генотипически различных по допуску пероксидазы сердечной мышцы групп сеголток леща.....	66
Субботкин М.Ф., Субботкина Т.А. Изменчивость иммунокомпетентных органов и содержания люцифера при созревании гонад у щуки <i>Esox Lucius</i> L. Рыбинского водохранилища.....	70
Юнчик О.Н. Особенности ихтиопатологических работ в условиях декоративного рыбоводства.....	75
Ignazow G., Adamek M., Rakus K., Steinhagen D., Aoki T. Immune Response of Common Carp Against Cyprinid Herpesvirus 3 (Cyhv-3).....	77
Van Muiswinkel Willem B. A Short History of Fish Immunology and Vaccination.....	80

## СЕКЦИЯ I. АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ОБЩЕЙ И ЧАСТНОЙ ИММУНОЛОГИИ И ПАТОЛОГИИ

	81
Андреева А.М., Дмитриева А.Э. Организация тяжелых цепей иммуноглобулинов скорпены <i>Scorpaena Porcus</i> L.....	81
Бочкова Е.В., Гаврюсова Т.В., Овчаренко Л.В., Жукова Л.А. Комплексные исследования состояния здоровья двух промысловых видов камбал Берингова моря.....	85
Ганжа Е.В. Некоторые показатели иммунитета триплоидной радужной форели <i>Oncorhynchus Mykiss</i> при ее культивировании в условиях южного Вьетнама.....	90
Голованов В.К., Микряков В.Р. Модифицирующее влияние температуры на иммунитет рыб к инфекционным болезням.....	95
Грушко М.П. Морфология тимуса представителей земноводных.....	100
Давыдов О.Н., Куровская Л.Я., Темниханов Ю.Д. Сравнительная морфофизиологическая и биохимическая оценка рыб-вослицев, зараженных эктопаразитами.....	103
Жигилева О.Н., Ожирельев В.В., Степанова Т.Ф., Козак Т.Э. Генетическая структура популяций двух видов карповых рыб и их паразита – <i>Opisthorchis Felineus</i> в Обь-Иртышском очаге описторхоза.....	107
Завьялова Е.А., Кандряна Н.Ю., Ломакина Н.Ф., Гулюкин М.И. Индикация и идентификация некоторых особо опасных вирусов рыб методом ПЦР.....	112
Зверева Л.В., Ушева Л.Н., Борзых О.Г. Условно-патогенные мицелиальные грибы – ассоцианты двусторчатых моллюсков с патологиями внутренних органов.....	116
Кавцевич Н.Н., Минзюк Т.В. Возрастные особенности клеточного состава крови щенков серого тюленя.....	121

Камшилова Т.Б., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Частота встречаемости микроядер в эритроцитах периферической крови стерляди <i>Acipenser Ruthenus</i> после воздействия аналога кортизола и хендлинга. ....	125
Кочелев В.Н. Гистопатологический анализ состояния мышечной ткани амурского осстра <i>Acipenser Schrencki</i> Brandt, 1869. ....	128
Кузьмина В.В., Шалыгин М.В., Микряков Д.В. Влияние антибактериальных препаратов и пробиотиков на активность гликозидаз и протеиназ слизистой оболочки кишечника карпа <i>Cyprinus Carpio</i> . ....	129
Лапкина Л.Н. К вопросу о паразито-хозяйниных отношениях в системах пиявки-рыба. ....	134
Ларцева Л.В., Обухова О.В. Современные проблемы природной очаговости сапронозов в гидросистеме Волго-Каспийского бассейна. ....	140
Макрушин А.В., Асанова Т.А., Голубков С.М. Токсикозы водных беспозвоночных и их роль в современной эволюции этих животных. ....	144
Пронина Г.И. Иммунофизиологическая оценка селекционных групп карпа в прудовых хозяйствах. ....	146
Сергеевко Н.В., Овчаренко Л.В., Гаврюсова Т.В., Жукова Л.А. Патогены различной этиологии у горбуши Камчатки. ....	150
Скальская И.А. Результаты и перспективы использования метода искусственных субстратов при изучении ответных реакций сообществ обрастателей на изменение условий обитания в естественной и антропогенно нарушенной водной среде. ....	154
Ушева Л.Н., Зверева Л.В. Гистопатологические и гистохимические методы идентификации грибных структур в тканях двусторчатых моллюсков. ....	159
Федорова Н.Н., Джуматова А.А. Патология печени у некоторых волжских рыб. ....	163
Флёрова (Назарова) Е.А., Заботкина Е.А. Ультраструктура лейкоцитов окунеобразных рыб европейской части России. ....	165
Чернявских С.Д., Федорова М.З. Фагоцитная активность эритроцитов и лейкоцитов крови рыб. ....	170

## СЕКЦИЯ II. ИММУНИТЕТ РЫБ И ДРУГИХ ГИДРОБИОНТОВ К ПАЗАРИТАМ 175

Кондратенко Я.В., Папазян Ю.А. Иммунопрофилактика лососевых рыб в ФГУП ПФЗ «АДЛЕР». ....	175
Кутырев И.А., Пронин Н.М., Дугаров Ж.Н. Изменение лейкоцитарного состава головного отдела почки караса серебряного при диграмозе. ....	177
Лапирова Т.Б., Микряков В.Р. Формирование иммунитета леща <i>Abramis Brama</i> L. к аэромонадной инфекции на ранних этапах онтогенеза. ....	179
Пигалева Т.А., Присный А.А. Структурные и функциональные свойства гемоцитов медицинской пиявки. ....	184
Прокаева И.Б. Особенности течения герпесвирусной болезни у стерляди и гуморального иммунного ответа рыб на инфекцию. ....	188
Силкина Н.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Показатели гуморального иммунитета у карпа <i>Cyprinus Carpio</i> при заражении оспой. ....	193
Федоров Р.А., Микряков Д.В., Шаранова О.А., Слынько О.Ю., Андреева А.М. Особенности транскапиллярного обмена иммуноглобулинов у карпа <i>Cyprinus Carpio</i> L. при аэромозе. ....	196

## СЕКЦИЯ III. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ К АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ 201

Голованов В.К., Микряков Д.В. Терморегуляционное поведение и температурные границы жизнедеятельности у инфидированной молодежи некоторых видов пресноводных рыб. ....	201
Гудков Д.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р., Поморцева Н.А., Балабанова Л.В., Родионова Н.К. Особенности состава лейкоцитов периферической крови караса обыкновенного <i>carassius carassius</i> из водосемов чернойбильской зоны отчуждения и Рыбинского водохранилища. ....	205
Дорохова И.И. Влияние возраста, пола и антропогенной нагрузки на уровень эндогенной интоксикации в крови морского ерша. ....	209
Заботкина Е.А., Чуйко Г.М. Патологические изменения в структуре тканей и клеток иммунокомпетентных органов сеголеток плотвы <i>Rutilus rutilus</i> L. при действии хлорорганических загрязнителей (ХОЗ). ....	213
Лапирова Т.Б. Реакция антибактериальных факторов неспецифической гуморальной защиты гидробионтов на ксенобиотки. ....	217
Макарская Г.В., Тарских С.В. Изменение кинетики продукции АФК фагоцитирующими клетками крови рыб в условиях загрязнения среды радионуклидами. ....	222
Пронина С.В., Батуева М.Д.-Д. Мелано-макрофагальные центры органов плотвы <i>Rutilus Rutilus</i> в период массовой гибели рыб в оз. Котокельское (2008-2009 гг.). ....	227

Силкина Н.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние антропогенного загрязнения на иммуно-биохимические показатели моллюска <i>Rapana thomasiana</i> Crossse. ....	230
Силкина Н.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние антропогенного загрязнения на гуморальный иммунитет катрана <i>Squalus acanthias</i> . ....	234
<b>СЕКЦИЯ IV. ПРОБЛЕМЫ ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ОБЪЕКТОВ АКВАКУЛЬТУРЫ</b>	<b>237</b>
Балабанова Л.В., Суворова Т.А., Микряков Д.В. Влияние тестостерона на состав лейкоцитов периферической крови стерляди <i>acipenser ruthenus</i> . ....	237
Барбухо Е.В. Влияние пробиотического препарата БПС-44 на гематологические показатели двухлеток карпа в условиях гербицидной нагрузки. ....	240
Гаврилин К.В. Новый метод обработки прудовых рыб против лереней и аргулюсов. ....	243
Жиденко А.А., Бибчук Е.В., Кривошица В.В. Использование пробиотика БПС-44 с целью предупреждения токсического влияния гербицидов на рыб. ....	246
Мишанина Л.А. Аминокислотный состав белков мышечной ткани дикой и заводской молоди атлантического лосося Кольского полуострова. ....	251
Рудакова С.Л. К вопросу о бесконтрольных перевозках икры и личинок для выращивания рыб в рыбоводных хозяйствах России. ....	253
Суворова Т.А., Терешенко В.Г., Балабанова Л.В., Микряков Д.В. Влияние антибактериальных препаратов и пробиотиков на лейкоциты периферической крови рыб. ....	258
Устименко Е.А., Винник Н.Г. Применение пробиотика «СУБ-ПРО» при выращивании молоди ксты на лососевом рыбоводном заводе (Камчатка). ....	263
<b>СЕКЦИЯ V. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ОСОБИ, ПОПУЛЯЦИЙ И ЭКОСИСТЕМ</b>	<b>267</b>
Авдеева Е.В., Казимирченко О.В. Оценка эпизоотического состояния форелевого рыбоводного хозяйства «Прибрежное» (Калининградская область). ....	267
Аршаница Н.М., Стекольников А.А. Диагностика токсокозов рыб и оценка среды их обитания. ....	269
Банникова М.А., Новосадова А.В. К исследованию биологии потомства трансгенных <i>Danio Rerio</i> . ....	275
Бисерова Л.И. Гельминтофауна молоди карповых рыб в дельте Волги. ....	280
Буторипа Т.Е., Горвая О.Ю. Цестодозы голецов <i>Salvelinus alpinus</i> L. Забайкалья. ....	282
Василенко А.И., Кузьмина Н.С. Влияние опреснения на физиологические параметры морского сриша <i>Scorpaena Porcus</i> L. ....	285
Гуляева В.В. Оценка состояния пресных водоемов города Омска с помощью биоиндикаторов. ...	289
Доровских Г.Н., Мазур В.В., Петраков А.П. Содержание тяжелых металлов в организме голяна <i>Phoxinus Phoxinus</i> (L.) в бассейнах рек Печора и Вычегда. ....	292
Ерохина И.А. Галтоглобин как индикатор физиологического состояния морских млекопитающих. ....	297
Запрудова Р.А. Оценка состояния рыб по ионному составу эритроцитов. ....	302
Калабеков И.М., Калабекова Ф.С., Щелкунова Т.И., Щелкунов И.С., Колбасов Д.В. Разработка технологии ПЩР в реальном времени для выявления герпесвируса сибирского осетра в клиническом материале. ....	303
Калайда М.Л., Говоркова Л.К. Оценка эпизоотического состояния водоемов как важная задача развития аквакультуры республики Татарстан. ....	306
Костицына Н.В., Гилёва Т.А. Оценка показателей крови пескаря ( <i>Gobio Gobio</i> ) в антропогенно трансформированных водоемах Прикамья. ....	311
Кوشелев В.Н., Евгешина Т.В. Некоторые данные о состоянии репродуктивной системы Калуги <i>Huso Danricus</i> (Georgi, 1775). ....	316
Наумова А.М., Наумова А.Ю., Домбровская Л.В. Контроль влияния водных растений на экологические факторы в рыбохозяйственном водоеме. ....	318
Романова Н.Н., Головина Н.А., Головин П.П. Оценка физиологического статуса гибридов островных рыб при выращивании в промышленных условиях. ....	322
Сербина Е.А. Количественная оценка роли моллюсков семейства Bithyniidae (Gastropoda: Prosobranchia) в экосистемах юга западной Сибири. ....	328
Хлопова А.В. Некоторые данные о состоянии здоровья щуки амурской <i>Esox Reichertii</i> Dybowski, 1869. ....	331
Чухлובהва Л.М. Оценка экологической безопасности рыб реки Амур. ....	334
Шанкаренок А.Н., Федоткина С.Н., Дубинин А.В. Трематодозы промысловых рыб внутренних водоемов Волгоградской области. ....	339

# ПРОБЛЕМЫ ИММУНОЛОГИИ, ПАТОЛОГИИ И ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ РЫБ

Расширенные материалы III Международной конференции

Под ред. *В.Р. Микрякова, А.М. Наумовой,  
А.Л. Никифорова-Никишина,  
Л.В. Балабановой, Д.В. Микрякова*

Издано в авторской редакции

Корректурa авторов

Подписано в печать 04.07.2011 г. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>  
Усл. печ. л. 20,23. Уч.-изд. л. 20,76. Усл. кр.-отг. 20,71.  
Тираж 200 экз. Изд. № 71. Зак. 309.

Издательство РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева  
127550, Москва, Тимирязевская ул., 44  
Тел.: 977-00-12, 977-26-90, 977-40-64