

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ПРУДОВОГО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА (ВНИИПРХ)

На правах рукописи

АБРОСИМОВ СЕРГЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

УДК 639.371.03: 639.3.043

РОСТ И РАЗВИТИЕ МОЛОДИ РУССКОГО ОСЕТРА  
В СВЯЗИ С ОБЕСПЕЧЕННОСТЬЮ СТАРТОВОГО КОРМА  
КАРОТИНОИДАМИ

03.00.10. ихтиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 1992

Работа выполнена в Азовском научно-исследовательском институте рыбного хозяйства (АзНИИРХ)

Научный руководитель: доктор биологических наук,  
профессор Канидеев А.Н.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Яркомбек А.А.  
кандидат биологических наук Трофимова Л.Н.

Безудная организация: Краснодарский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства (КрасНИИРХ)

Защита диссертации состоится "22" декабря 1992 г. в 11 часов на заседании специализированного совета Д. 117.04.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте прудового рыбного хозяйства (ВНИИПРХ) по адресу:  
141821 Московская обл., Дмитровский район, п.Рыбное, ВНИИПРХ

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института прудового рыбного хозяйства

Автореферат разослан "19" ноября 1992 г.

Ученый секретарь

специализированного совета, к.б.н.

Трамкина С.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В бассейне Азовского моря после зарегулирования рек Дона и Кубани при возрастающем изъятии пресного стока основным способом воспроизводства популяции осетровых рыб является заводское разведение (Баландина, 1983; Бараниникова, 1979, 1983; Горбачева и др., 1983). Поэтому на рыбоходных заводах особое внимание следует уделять не только количеству, но и качеству молоди, ее физиологической полноценности и высокой адаптационной пластичности.

В последнее время все большее значение приобретает разведение осетровых индустриальными методами с использованием различных типов бассейнов в условиях полного или частичного регулирования водной среды, количества и качества пищи. Характерной особенностью при этом является широкое применение сухих гранулированных кормов при почти полном отсутствии естественных кормовых организмов. Современные стартовые комбикорма способны заменить живой корм с момента перехода личинок осетровых на экзогенное питание (Ноякшева, Шевченко, 1982; Бондаренко и др., 1984; Шербина и др., 1985; Абросимова и др., 1989; Гамьгин и др., 1989). Вместе с тем повышение эффективности кормов и кормления, особенно на ранних этапах постэмбриогенеза, остается актуальной задачей. Это объясняется тем, что при разработке искусственных рационов главное внимание уделяли сбалансированности основных структурных элементов питания и, в меньшей степени, витаминам и минеральным веществам. Однако естественная пища содержит более широкий набор биологически активных компонентов, являющихся регуляторами многих метаболических процессов организма. Следовательно, помимо баланса основных питательных веществ в пище, важное значение имеют различные биологически активные вещества. К их числу относятся природные пигменты и, в частности, каротиноиды. Они характеризуются высокой полифункциональностью и содержатся в естественных кормах рыб (Яржомек, 1970; Бриттон, 1986; Карнаухов, 1988).

Применение каротиноидов в комбикормах затруднено ввиду ограниченности их источников. Наиболее доступным и перспективным является кормовой препарат микробиологического каротина - КПКМ, который вводят в корма некоторых сельскохозяйственных животных и птиц в качестве дополнительного источника витамина А (Агеев и др., 1987; Петрухин, 1989). Немногочисленные опыты в рыбодоводстве показали, что КПКМ может дать положительный эффект при введении в корм для годовиков и двухлеток карпа (Салюкова и др., 1989; Скид-

ров, Середа, 1989). Тем не менее остается неясным в какой мере этот препарат может обеспечивать рыб каротиноидными пигментами, каково их биологическое значение и воздействие на организм. Особую актуальность представляет изучение характера воздействия каротиноидов на рост и физиологическое состояние молоди осетра, содержащейся в специфических условиях бассейновых цехов рыбоводных заводов при повышенной плотности посадки и стрессовых нагрузках.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы являлось повышение эффективности искусственного воспроизводства осетра при выращивании молоди на рыбоводных заводах до выпуска в естественные водоемы за счет улучшения качества стартового комбикорма путем введения в рацион каротиноидных пигментов микробиаального синтета. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- изучить биологические функции каротиноидов в эмбриональном периоде развития осетра;
- определить спектр каротиноидов в КМК, используемого в качестве их источника;
- определить оптимальный способ получения и кормового использования каротиноидов;
- определить оптимальный уровень каротиноидов в рационах молоди осетра в процессе роста и развития;
- изучить воздействие каротиноидов на обмен веществ и утилизацию элементов питания молодью осетра в процессе роста и развития;
- оценить влияние каротиноидов на физиологическое состояние молоди осетра.

Научная новизна. Впервые определена функциональная связь содержания белка и различных групп липидов, в том числе жирных кислот, с концентрацией каротиноидов в эмбриональном периоде развития осетра. Показано, что одной из биологических функций каротиноидных пигментов в этот период является участие в свободно-радикальном окислении в качестве регуляторов этого окисления - структурных антиоксидантов.

Обоснована необходимость введения каротиноидов в стартовые корма для осетра и целесообразность использования кормового препарата микробного каротина - КМК в качестве источника каротиноидов, уточнен спектр каротиноидных пигментов, предложен способ обогащения комбикормов каротиноидами с сохранением их активности.

Впервые исследовано влияние каротиноидов КМК на рост, выжи-

раемость, физиологическое состояние и эффективность кормления молоди осетра от начала экзогенного питания до стандартной массы. Установлено, что характер воздействия каротиноидов зависит от дозы в рационе и массы (возраста) рыб. Определены оптимальные дозы каротиноидов для молоди различной массы. Показано, что оптимальное количество каротиноидов в рационе увеличивает темп роста и выживаемость молоди, оказывает белок- и энергосберегающий эффект, повышает продуктивное действие искусственного корма, улучшает липидный, в том числе жирнокислотный, статус осетра, способствует активации липазы и накоплению резервного жира в печени до уровня, соответственного рыбам естественных популяций.

Практическая значимость. Экспериментальным путем установлено влияние каротиноидных пигментов на рост, развитие и физиолого-биохимический статус ранней молоди осетра, определены оптимальные дозы каротиноидов в рационе в зависимости от массы (возраста) молоди, обеспечивающие максимальный рост, выживаемость и хорошее физиологическое состояние. Предложен метод обогащения комбикормов каротиноидами, при котором они сохраняют свою активность и метод контроля рекомендованных доз. Предложен КПМК - как наиболее доступный для промышленного использования источник каротиноидов.

Апробация работы. Основные материалы диссертации представлены и обсуждены на совместных заседаниях лаборатории кормов и культивирования морских рыб, Ученом Совете АЗНИИГХ, школе-семинаре рыбоводов Ростовской области, 10-й Всесоюзной конференции по газовой хроматографии (Казань, 1991 г.). Производственное испытание стартового комбикорма с добавкой каротиноидов КПМК было успешно проведено на Рогожинском рыбноводном заводе Ростовской области и Темрюкском осетровом заводе Краснодарского края.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 работ, зачислено 4 авторское свидетельство.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста, состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Текст иллюстрирован 18 таблицами и 15 рисунками. Список литературы включает 300 работ, в том числе 103 на иностранных языках.

## Глава 1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ КАРОТИНОИДОВ (аналитический обзор литературы)

В главе представлена сводка литературных данных о биологической функции каротиноидов, обсуждены их происхождение, пути метаболизма у животных, показано значение этих пигментов в жизни рыб. Даны современные представления об участии каротиноидных пигментов в окислительном и энергетическом обмене клеток. Представлены сведения о каротиноидах осетровых рыб, которые до настоящего времени ограничены перечнем пигментов и некоторыми данными о накоплении их у производителей рыб.

## Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ литературы, опытные работы и обработка материала, а также опытно-производственная проверка результатов выращивания молоди русского осетра на стартовых кормах обогащенных каротиноидами выполнены в течение 1990-1992 г.г. Экспериментальные работы проведены в бассейновом цехе Рогожинского рыбоводного завода Ростовской области.

Объектом исследований служили неоплодотворенная икра, предличинки, личинки и мальки русского осетра. Инкубирование икры осуществляли в аппаратах Юшенко. Опытное выращивание и кормление молоди проводили в пластиковых проточных бассейнах с круговым током воды в 2-кратной повторности. Технологию содержания и кормления во всех вариантах осуществляли в соответствии с инструкцией (Абросимова и др., 1989). Условия водной среды на всех этапах были близки к оптимальным.

Испытано 4 стартового комбикорма отличающихся содержанием каротиноидов в соотношении близком 1 : 2 : 3 с контролем без каротиноидов. В качестве источника каротиноидных пигментов использовали липидный экстракт КИМК. При оценке эффективности кормов с каротиноидами приняты методы М. А. Шербины (1983). Определяли скорость роста, выживаемость, упитанность, затраты корма, эффективность использования протеина (ЭИП) и энергии (ЭИЭ) на рост рыб.

Содержание основных групп органических и минеральных веществ определяли по М. А. Шербине (1983), энергии - расчетным путем с использованием энергетических эквивалентов, липиды выделяли по Фол-

чу (Folch et al., 1957) и разделяли на классы методом тонкослойной хроматографии (Шталь, 1965), используя в качестве сорбента закрепленный слой силикагеля "LS 5/40  $\mu$ " (Снепарол) с добавлением 10% гипса. Жирнокислотный спектр общих липидов и фосфолипидов определяли методом газовой хроматографии на хроматографе "Цвет-5". В качестве метчиков использовали стандартные смеси метиловых эфиров жирных кислот - "Sigma-189-1" и "Sigma-189-6". Содержание каротиноидных пигментов, а также витамина А в печени молоди осетра определяли спектрофотометрическим методом на "СФ-6" (Шварц и др., 1968; Карнаухов, 1988), состав пигментов - методом препаративной тонкослойной хроматографии на слоях силикагеля "LS 5/40  $\mu$ " с использованием в качестве развивающего растворителя смеси ацетон : гексан (3 : 7). Активность липазы определяли по скорости гидролиза трибутирина (Yang Jeun-sing, Biggs, 1971).

Определяли содержание гемоглобина, гематокрит, количество эритроцитов и лейкоцитов, содержание и концентрацию гемоглобина в эритроците, средний объем эритроцита, интенсивность эритропоза и лейкоцитарную формулу (Лиманский и др., 1986; Золотницкая, 1987; Житенева и др., 1989). Клетки крови идентифицировали по Н.Т. Ивановой (1970, 1983). Функциональное состояние печени оценивали на гистологических срезах.

В рыбоводно-биологических анализах использовано 1500 икринок, предличинки, личинок и мальков осетра, исследована кровь у 60 и морфогистологическая структура печени у 40 рыб. Выполнено 332 биохимических определения, в том числе 144 липидов и жирных кислот, 20 - активности липазы, 10 - витамина А, 50 - каротиноидов.

Статистическую обработку результатов проводили по общепринятым методикам (Дрейпер, Смит, 1987; Лажин, 1990).

### Глава 3. РОЛЬ КАРОТИНОИДОВ В ЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ ОСЕТРА

Стансовые экстракты неоплодотворенной икры, предличинки и личинки осетра имели характерные для каротиноидов спектры поглощения в видимой области света с перегибами на длинах волн 425...430, 450...455 и 480...485 нм (рис.1).

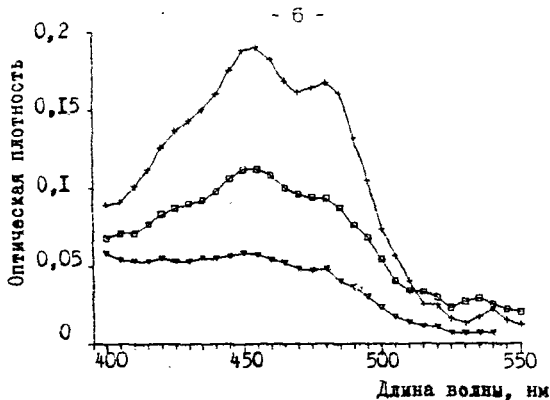


Рис. 1. Спектры поглощения этанольных экстрактов сырой ткани осетра в раннем онтогенезе

—+— неоплодотворенная икра, —⊖— предличинки (выклев),  
—▽— личинки (переход на активное питание)

Во время эмбрионального периода развития осетра наблюдается расход каротиноидов. Так, их содержание в личинках при переходе на активное питание на 85,7% (на 50,2% по сухому веществу) меньше, чем в неоплодотворенной икре. При этом большая доля каротиноидов расходуется на развитие предличинки от выклева до перехода на экзогенное питание (табл. 1).

Таблица 1

Содержания каротиноидов у осетра в эмбриональный период

Показатели	Икра	Предличинки	Личинки
Время развития, сут	0	7	12
Каротиноиды,			
мг/100 г сырой ткани	1,19±0,07	0,79±0,03	0,17±0,01
мг/100 г сухого вещества	3,25±0,19	3,24±0,18	1,62±0,08
мкг/экз.	0,181	0,140	0,064

Увеличение расхода каротиноидов при развитии предличинки обусловлено усилением интенсивности обмена и, соответственно, про-



цессов свободнорадикального окисления вследствие повышения температуры и ухудшения условий среды в скоплениях во время лежки. Выявлена высокая корреляционная зависимость статистических показателей белкового и липидного обмена с каротиноидным метаболизмом ( $r = 0,998...1$ ,  $P < 0,05...0,0001$ ). Эта зависимость для мононенасыщенных жирных кислот и насыщенных жирных кислот нейтральных липидов соответствует формуле линейной регрессии:  $Y = a + bX$ , для других групп веществ - экспоненциальной моделью:  $Y = \exp(a+bX)$ , где  $Y$  - содержание вещества в %, а  $X$  - содержание каротиноидов в мг / 100 г сырого вещества.

Икра осетровых характеризуется высокой биоокислительной защитой, снижающейся в процессе ее развития и достигающей минимума при переходе личинок на экзогенное питание (Дудкин и др., 1986; Дудкин, Гарагуля, 1988). Несмотря на это, уровень и соотношение полиеновых кислот, являющихся основными мишенями окисления, у личинок остается на достаточно стабильном уровне. На основании собственных и литературных данных следует, что одной из многочисленных биологических функций каротиноидов рыб является участие в свободнорадикальном окислении в качестве регулятора. Необходимо отметить, что липиды рыб содержат более высокое, чем наземные позвоночные, количество ненасыщенных жирных кислот. В связи с этим рыбы чувствительны к процессам перекисного окисления липидов и более зависимы от поступления биоантиоксидантов с пищей.

#### Глава 4. ХАРАКТЕРИСТИКА ИСКУССТВЕННЫХ КОРМОВ И ИСТОЧНИКА КАРОТИНОИДОВ

Основой опытных диет, а также контролем, являлся модифицированный комбикорм Ст-4Аз, содержащий рыбную муку - 35, кровяную муку - 4, сухое молоко - 5, эрлин - 16, шрот соевый - 15, шрот подсолнечный - 3, зерносмесь - 6, рыбий жир - 3, премикс витаминный ПЭ-1М - 2 и липидную добавку - 2%. Липидную добавку - смесь линетол и кубового в соотношении 2 : 1 вводили в рацион непосредственно перед кормлением. Уровень основных питательных веществ и энергии комбикормов соответствовал современным представлениям о физиологической потребности молодежи осетровых: протеин - 50,9, общие липиды - 7,6, зола - 12,5, БЭВ - 29%, энергия - 20 МДж / кг, энерго-протеиновое отношение - 38,5 МДж / кг. Опытные диеты отли-

чались от контрольной содержанием каротиноидных пигментов: 1 вариант - 2,3, 2 - 4,7 и 3 - 7 мг на 1 кг комбикорма.

В качестве источника каротиноидных пигментов использовали КЛМК. Его основной пигмент -  $\beta$  - каротин обнаружен в репродуктивных органах многих видов рыб, в том числе и стерляди (Szeczug, 1972; Schaubert, 1986). Кроме того, животные способны ресинтезировать видоспецифические каротиноиды из поступивших с пищей, используя, в том числе, в качестве промежуточного звена витамин А (Бриттон, 1986; Карнаухов, 1988).  $\beta$  - каротин является провитамином А и начальным звеном гомологичного ряда  $\beta, \beta$  - полиеновых каротинсидов, к которым относится и видоспецифический каротиноид осетра - зеаксантин. Таким образом, использование КЛМК в качестве источника каротиноидов создает предпосылку к синтезу в организме осетра функционально активных пигментов любым из предполагаемых способов метаболической реконструкции. Кроме того КЛМК выпускается в промышленных масштабах и доступен для широкого промышленного использования в производстве комбикормов.

Включение липидных экстрактов КЛМК в опытные рационы почти не повлияло на липидный состав кормов. Доля фосфолипидов от общих липидов колебалась в пределах 41,6...42,7%, сумма кислот  $\omega 5$  и  $\omega 3$  - 12...14,2 и 15,4...17,9%, соотношение кислот  $\omega 3 / \omega 6$  - 1,16...1,27, кислот 22:6 / 20:5 - 1,82...1,92.

## Глава 5. ВЛИЯНИЕ КАРОТИНОИДОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ МОЛОДИ ОСЕТРА

Результаты выращивания рассмотрены в 2 этапа: первые 12 и последующие 19 суток активного питания. Такое разделение обусловлено тем, что в возрасте 26...28 суток, в том числе 12 суток экзогенного питания, завершаются критические периоды, свойственные ранней молоди осетровых (Трифорова, 1963; Владимир, 1975).

### а) Рыбоводно - биологические особенности

Кормление осетра начато в возрасте 14 суток при переходе на активное питание и средней массе личинок 42,7...46,8 мг (табл. 2).

Таблица 2

Результаты выращивания молоди осетра (1 этап)

Показатели	Варианты опыта			Контроль
	1	2	3	
Начальная масса, мг	42,7±0,7	44,4±0,8	46,3±0,6	46,8±1,1
Конечная масса, мг	161,6±12,9	201,7±14,2	174,9±12,1	163,2±10,4
Темп роста, мг/сут	9,91	13,11	10,72	9,7
Выживаемость, %	65,1	70,35	62,9	63,6
Затраты корма на единицу прироста, ед.	1,5	1,1	1,6	1,6
ЭПД, %	8,46	11,09	7,62	8,30
ЭВЭ, %	7,12	9,09	6,57	6,98

На 1 этапе наибольшей конечной массы (201,7 мг) достигла молодь 2 варианта при достоверном ( $P < 0,05$ ) отличии от рыб 1 варианта и контроля, затем молодь 3 варианта - 174,9 мг без достоверных различий с другими рыбами. Конечная масса рыб 1 варианта была близка к контрольной - соответственно 161, и 163,2 мг. С максимальной скоростью росла молодь 2 варианта - 13,1 мг/сут, что на 35,1% выше, чем в контроле. Сравнительно высок среднесуточный прирост молоди в 3 варианте - 10,7 мг, то есть на 10,5% больше, чем в контроле. Следовательно в первые 12 суток кормления наиболее значительное положительное действие оказывала добавка в рацион каротиноидов в количестве 4,7 мг на 1 кг корма. Это подтверждается также выживаемостью рыб во 2 варианте, составившей 70,4%, что на 10,8% выше, чем в контроле. Выживаемость молоди в 1 и 3 вариантах была почти равной и мало отличалась от контроля - соответственно 65,1, 62,9 и 63,6%. Отмечены различия в затратах корма: во 2 варианте они были минимальными - 1,1, в 1 варианте - 1,5, в 3 варианте и контроле - 1,6 ед.

При введении в рацион личинок осетра 2,3 мг каротиноидов на 1 кг корма (1 вариант) эффективность использования протеина и валовой энергии на рост повысилась незначительно - соответственно на 1,9 и 2%. Заметное улучшение ретенции протеина и энергии - соответственно на 33,6 и 30,2% отмечено у молоди 2 варианта (4,7 мг/кг корма). Утя затраты корма у молоди 3 варианта (7 мг/кг корма) были на уровне контрольного, эффективность использования белка и энергии пищи была ниже соответственно на 8,2 и 5,9%.

Во 2 этапе опытов наибольшей конечной массы (3,2 г) достигла молодь 1 варианта при достоверном отличии от других рыб ( $P < 0,05$ ). Во 2 и 3 вариантах конечная масса составила 2,4 г, что на 11% ниже, чем в контроле при достоверных отличиях ( $P < 0,05$ ). Среднесуточный прирост молоди 1 варианта был равен 162,8 мг, то есть на 20,4% выше, чем в контроле. Среднесуточный прирост молоди 2 и 3 вариантов составил соответственно 115,7 и 117,9 мг, что на 14,4 и 12,7% ниже, чем в контроле. Выживаемость как в опытах, так и в контроле была высокой и почти одинаковой - 97,4...97,9. Упитанность рыб во всех вариантах опыта и контроле была достаточно высокой - 0,88...0,93, при максимальной ее величине в 1 варианте. Затраты корма в опытах и контроле не превышали 0,5 кг/кг прироста.

Эффективность использования протеина и энергии пищи на рост молоди на 2 этапе кормления возросла примерно в 3 раза по сравнению с 1. Наиболее высокая эффективность использования протеина и энергии - соответственно 52,7 и 42,0%, то есть на 19,4 и 20,1% выше, чем в контроле, отмечены на рационе с содержанием каротиноидов 2,3 мг на 1 кг корма. С дальнейшим увеличением уровня каротиноидов в 2 и 3 раза эффективность использования протеина и энергии снижалась на 11-14 и 9-14%, причем наиболее значительно - во 2 варианте с содержанием каротиноидов 4,7 мг на 1 кг корма (табл. 3).

Таблица 3  
Результаты выращивания молоди осетра (2 этап)

Показатели	Варианты опыта			Контроль
	1	2	3	
Начальная масса, мг	161,6±12,9	201,7±14,2	174,9±12,1	163,2±10,4
Конечная масса, мг	3254,3±132,9	2400,5±62,5	2415,9±91	2730,6±101,9
Темп роста, мг/сут	162,8	115,7	117,9	135,1
Выживаемость, %	97,5	97,4	97,9	97,9
Упитанность	0,93±0,02	0,88±0,02	0,89±0,02	0,91±0,02
Затраты корма на единицу прироста, ед.	0,4	0,5	0,5	0,5
ЭИП, %	52,75	37,94	39,25	44,16
ЭИЭ, %	42,02	30,25	31,71	35,00
Стандартная молодь (более 2,5 г), %	82	50	52	64

Как видно, во 2 этапе выращивания наиболее высокий результат отмечен в 1 варианте опыта с добавкой 2,3 мг каротиноидов на 1 кг корма. Это также подтверждается максимальным количеством стандартной молодки.

б) Химический состав и накопление питательных веществ в теле молодки осетра

На начальном этапе кормления (первые 12 суток) несколько повысилась влажность опытной молодки осетра. Отмечено также увеличение в теле уровня протеина. При минимальной и максимальной дозе каротиноидов повысилось содержание жира и одновременно снизилось содержание минеральных веществ (табл. 4). Выявлена отрицательная корреляция между концентрацией каротиноидов в рационе и содержанием БЗВ в теле рыб ( $r = - 0,986$ ,  $P < 0,05$ ).

Таблица 4

Химический состав молодки осетра

Варианты опыта	Влага, %	Абсолютно сухое вещество, %				Энергия, кДж/г
		протеин	жир	БЗВ	зола	
1 этап						
1	91,0	62,6	13,0	15,2	9,2	2,03
2	91,2	62,2	11,6	14,1	12,1	1,91
3	91,2	62,2	15,2	12,2	10,4	2,01
-----						
Контроль	90,3	60	11,9	16,2	11,9	2,1
-----						
2 этап						
1	86,8	70,1	11,4	5,8	12,7	2,92
2	88,2	69,8	11,7	5,3	13,2	2,60
3	87,5	68,9	12,0	6,0	13,1	2,74
-----						
Контроль	86,4	70,9	11,1	6,3	11,7	3,03

По завершении 2 этапа при увеличении дозы пигментов в рационе отмечена незначительная тенденция к последовательному снижению азотсодержащих веществ в теле молодки на 1...3%. Выявлена тесная положительная корреляция между количеством жира в теле молодки и уровнем каротиноидов в пище ( $r = 0,999$ ,  $P < 0,01$ ).

Накопление питательных веществ в теле молоди осетра в определенной степени зависело от уровня каротиноидов в корме (рис. 2).

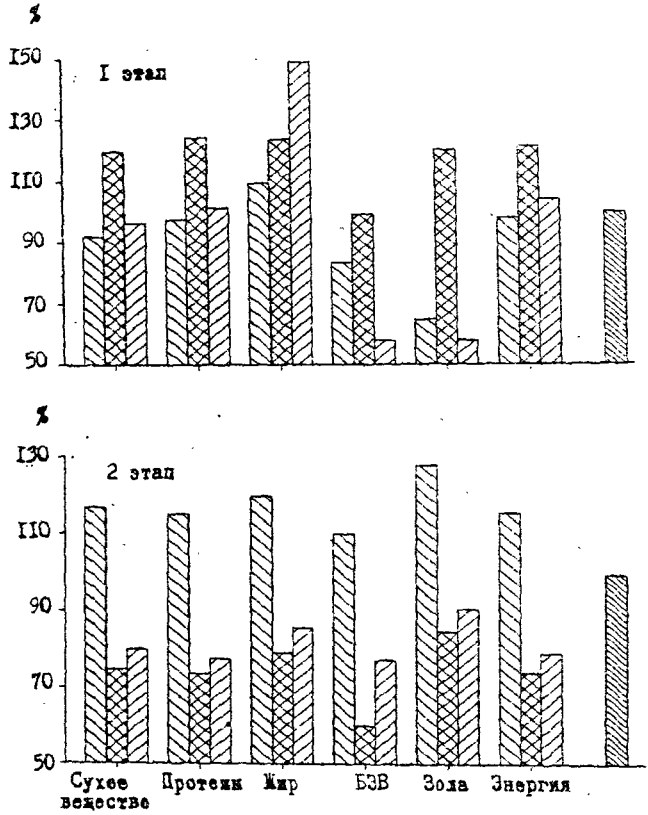


Рис. 2. Накопление органических и минеральных веществ и энергии в теле молоди осетра при разной дозе каротиноидов в рационе, % к контролю

▨ - 1 вариант, ▩ - 2 вариант, ▧ - 3 вариант, ▤ - контроль

На 1 этапе опытов наиболее активное накопление веществ и энергии происходило при дозе каротиноидов 4,7 мг/кг корма. При других дозах этот процесс происходил более медленно, особенно в накоплении БЭВ и минеральных веществ. С повышением уровня каротиноидов последовательно увеличивалось отложение жира.

На 2 этапе максимальная интенсивность накопления веществ и энергии отмечена в 1 варианте (2,3 мг каротиноидов/ кг корма). В других вариантах опыта накопление энергии, органических и минеральных веществ заметно снизилось.

Таким образом, по совокупности таких показателей, как темп роста, выживаемость и эффективность использования корма, а также накопление в теле рыб основных пластических веществ и энергии, оптимальной для начального периода выращивания до массы 200 мг является доза каротиноидных пигментов 4,7 мг/кг корма, при дальнейшем росте - 2,3 мг/кг корма.

#### Глава 6. ВЛИЯНИЕ КАРОТИНОИДОВ НА ФИЗИОЛОГО - БИОХИМИЧЕСКИЙ СТАТУС МОЛОДИ ОСЕТРА

При интенсивном заводском воспроизводстве рыб качество корма является основным лимитирующим биотическим фактором и, зачастую, определяет физиологическое состояние молоди. Поэтому при оценке эффективности каротиноидов в стартовом комбикорме для осетра исследованы не только рыбоводно-биологические особенности, но и комплекс физиолого-биохимических показателей, характеризующих физиологическую полноценность выпускаемой молоди.

##### а) Липолитическая активность молоди осетра в процессе роста и развития

Липолитическая активность личинок осетра при переходе на экзогенное питание составила 0,071 мг липазы. После 12 дней кормления (1 этап) ее активность повысилась, причем в наибольшей степени у рыб 2 варианта - на 18% выше, чем в контроле. Активность липазы у осетров 1 варианта была выше, а 3 - ниже на 4% по сравнению с контролем (рис. 3).

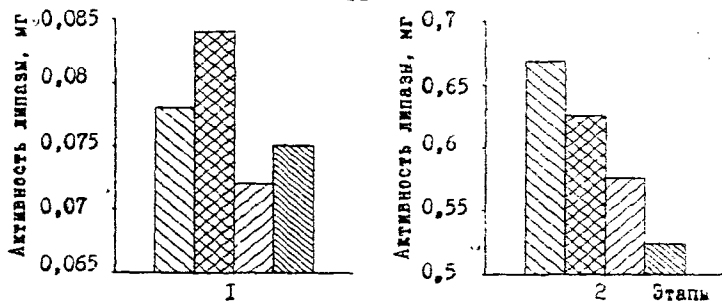


Рис. 3. Активность липазы молоди осетра в процессе роста.  
мг липазы.

▨ - 1 вариант, ▩ - 2 вариант, ▧ - 3 вариант, ▤ - контроль

К концу 2 этапа выращивания липолитическая активность желудочно-кишечного тракта у молоди возросла почти в 10 раз по сравнению с 1. При этом с увеличением дозы каротиноидов она последовательно снижалась с 0,668 до 0,576 мг, тогда как в контроле составила 0,524 мг.

Таким образом, активность липазы зависела от возраста молоди и уровня каротиноидов в рационе. Наиболее интенсивный рост рыб происходил при максимальной активности липазы: на 1 этапе - при уровне каротиноидов в рационе 4,7 мг/кг, на 2 - 2,3 мг/кг корма.

#### б) Формирование липидного и жирнокислотного статуса молоди осетра в процессе роста и развития

По завершении 1 этапа кормления произошло некоторое (не более 8%) снижение общих липидов у рыб 1 и 3 вариантов и достаточно высокое (на 18%) - во 2 варианте по сравнению с контролем. С введением в рацион каротиноидов в количестве 2,3 и 4,7 мг/кг корма (1 и 2 варианты) содержание фосфолипидов составило соответственно 66 и 64%, при уровне каротиноидов 7 мг/кг - 44%, тогда как в контроле - 47% (рис. 4).



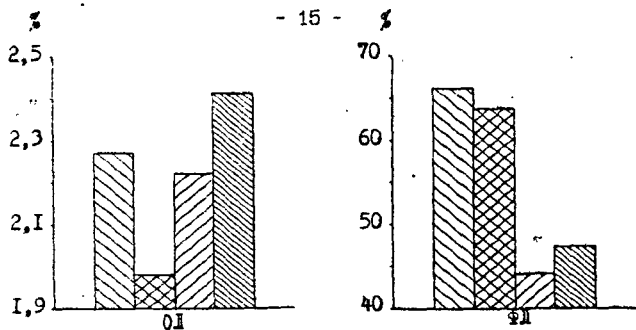


Рис. 4. Содержание общих липидов (ОЛ) и фосфолипидов (ФЛ) в теле молоди осетра (1 этап), %

ОЛ - от сырой ткани, ФЛ - от общих липидов,

▨ - 1 вариант, ▩ - 2 вариант, ▧ - 3 вариант, ▤ - контроль

Снижение общих липидов и повышение доли фосфолипидов в 1 и 2 вариантах свидетельствует об активации биологических процессов в организме и более интенсивных, чем в контроле, тратах липидов, в основном нейтральных, на энергетический обмен.

В фосфолипидах молоди выявлено 7 фракций: инозитфосфатид (ИФ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтаноламин (ФЭА) и кардиолипин (КЛ). Наиболее крупными фракциями являются ФХ и ФЭА. В опытных вариантах и контроле уровень ИФ, ФХ, ФЭА и КЛ мало отличался и составил соответственно 0,7...0,8, 64,0...68,6, 22,9...24,4 и 0,3...0,5. Однако в содержании других фосфолипидов наблюдаются заметные различия. Так, содержание СМ у опытной молоди возросло с 3,4% до 4,6...4,8%, что, возможно, обусловлено усилением клеточного эндоцитоза (Henning, Heidrick, 1974). У молоди 1 и 2 вариантов уровень ФС составил соответственно 4,2 и 5,3%, тогда как в 3 - 3,2%, а в контроле - 3,4%. Повышение доли ФС - активатора АТФ-азы и аденилатциклазы - может свидетельствовать о повышении интенсивности энергетического обмена в клетках (Штрауб, 1963; Ленинджер, 1974; Евстигнеева и др., 1976; Мецлер, 1980). Содержание ЛФХ у молоди 2 и 3 вариантов составило соответственно 0,4 и 0,5%, что в 2 раза выше, чем в 1 варианте и контроле. Необходимо отметить, что от уровня ЛФХ зависит степень лабильности

мембраны и ее проницаемости для небольших по размерам молекул (Бергельсон, 1975, 1979; Дятловицкая и др., 1976).

При введении каротиноидов в рацион ранней молоди осетра сумма кислот  $\omega 6$  в общих липидах снизилась, в основном, за счет арахидоновой кислоты. При этом наибольшие различия от контроля отмечены у рыб 1 и 2 вариантов. У молоди всех вариантов отмечен высокий уровень кислот  $\omega 3$ . В общих липидах они составили не менее 16,6% от всех жирных кислот. При введении в рацион каротиноидов содержание суммы кислот  $\omega 3$  увеличилось. В 1 варианте их уровень достиг 20%, во 2 - 18,2 и в 3 - 19,7%. Причем это увеличение обусловлено в основном за счет докозагексаеновой и, в меньшей степени, эйкозапентаеновой кислот (табл. 5).

Таблица 5  
Содержание кислот  $\omega 6$  и  $\omega 3$  в общих липидах (ОЛ) и фосфолипидах (ФЛ) молоди осетра (1 этап), % суммы жирных кислот

Жирные кислоты	Варианты опыта								Контроль	
	1		2		3				ОЛ	ФЛ
	ОЛ	ФЛ	ОЛ	ФЛ	ОЛ	ФЛ	ОЛ	ФЛ		
18:2	7,77	4,11	8,34	3,30	8,35	3,11	8,58	4,51		
18:3	0,94	0,92	1,09	1,02	1,60	2,51	1,38	1,94		
20:2	-	-	-	-	0,77	0,70	-	-		
20:4	2,79	2,51	2,18	2,10	3,18	3,02	2,72	3,02		
20:5	2,96	3,84	2,79	4,05	2,68	3,14	2,12	3,17		
22:4	-	-	-	-	-	-	1,07	0,85		
22:5	3,19	3,62	2,69	3,84	2,72	2,74	3,77	3,96		
22:6	12,96	14,42	11,63	14,50	12,72	16,30	9,36	12,83		
$\Sigma \omega 6$	10,56	6,62	10,52	5,40	12,30	6,83	13,37	8,39		
$\Sigma \omega 3$	20,05	22,80	18,20	23,41	19,72	24,69	16,63	21,90		
$\omega 6/\omega 3$	0,53	0,29	0,58	0,23	0,62	0,28	0,80	0,38		

Аналогичные изменения выявлены также в жирнокислотном составе фосфолипидов молоди при введении в рацион каротиноидов. Сумма кислот  $\omega 6$  снизилась с 8,39 до 5,4... 6,83%, а кислот  $\omega 3$  увеличилась с 21,9% до 22,8... 24,69%. Эти различия в основном обусловлены снижением уровня линолевой и повышением докозагексаеновой кислот. У рыб 1 и 2 вариантов кроме того отмечено уменьшение содержания арахидоновой кислоты, которому соответствует адекватно увеличение эйкозапентаеновой кислоты.

У молоди всех вариантов большая часть кислот  $\omega 3$  сосредоточена в фосфолипидах. Вместе с тем отмечена зависимость от состава рациона. В опытах с каротиноидами в количестве 2,3 и 4,7 мг (1 и 2 варианты), доля кислот  $\omega 3$  в фосфолипидах рыб увеличилась соответственно до 75,1 и 81,9%, при повышении дозы каротиноидов до 7 мг (3 вариант) - снизилась до 55,3%, тогда как в контроле была равна 62,3% от их абсолютного содержания в общих липидах.

Соотношение кислот  $\omega 6/\omega 3$  в общих липидах осетров снизилось по сравнению с контролем на 22,5...33,7%, однако с повышением концентрации каротиноидов - последовательно увеличивалось с 0,53 до 0,62. Соотношение кислот  $\omega 6/\omega 3$  в фосфолипидах также уменьшилось, причем в наибольшей мере - почти на 40% - во 2 варианте, несколько меньше - на 23,7 и 26,3% - соответственно в 1 и 3 вариантах.

По завершении 2 этапа кормления содержание общих липидов в теле молоди было почти одинаковым - 2,81...2,93% сырой массы. У рыб 1 и 2 вариантов отмечено увеличение доли фосфолипидов соответственно с 50,7 до 58 и 53,3%, а в 3 варианте - снижение до 45,4% (рис. 5).

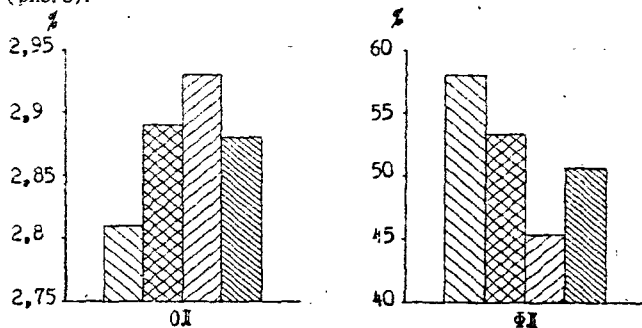


Рис. 5. Содержание общих липидов (ОЛ) и фосфолипидов (ФЛ) в теле молоди осетра (2 этап), %

ОЛ - от сырой ткани, ФЛ - от общих липидов,

▨ - 1 вариант, ▩ - 2 вариант, ▧ - 3 вариант, ▤ - контроль

Уровень ИФ, ФФА и КЛ у молоди в опыте и контроле был достаточно близок и составил соответственно 1,1...1,3, 24,1...25,1 и 0,6...0,9%. Концентрация ФХ при добавлении в корм каротиноидов

снизилась с 63,7% до 56,1...59,3%, причем уменьшение уровня  $\Sigma X$  было обратно пропорциональным дозе каротиноидов. С повышением количества каротиноидов увеличивалась доля ЛЖХ с 0,2 до 0,8%. При минимальной дозе каротиноидов (1 вариант) уровень СМ возрастал с 4,9% до 9,6%, при увеличении дозы - снижался до 8,3 и 7,4%, но оставался выше, чем у контрольных рыб. Содержание  $\Sigma C$  имело ту же направленность - его концентрация в 1, 2 и 3 вариантах составила соответственно 7,8, 7,3 и 5,5%, тогда как в контроле - 4,8%.

Сумма кислот  $\omega 6$  в общих липидах опытной молоди была ниже, чем в контроле, причем наиболее существенно - в 1,3 раза - в 1 варианте. Изменения соотношения отдельных жирных кислот ряда  $\omega 6$  у рыб в 1 варианте в значительной степени обусловлены уменьшением доли линолевой кислоты. Кроме того, в ряде вариантов опыта у рыб не выявлены эйкозодиеновая, эйкозатриеновая и докозатетраеновая кислоты. Сумма жирных кислот  $\omega 3$  в общих липидах 1, 2 варианта и контроля достаточно близок - 18,7...19,95%, однако при увеличении количества каротиноидов до 2,3 и 4,7 мг/кг корма уровень эйкозапентаеновой кислоты в общих липидах снижался соответственно с 4,02% до 3,68 и 2,79%, а линоленовой - соответственно повышался с 1,02 в контроле до 1,44 и 1,76%. У рыб 2 варианта снижению содержания 20:5  $\omega 3$  на 30,6% сопутствовало значительное (в 1,6 раза) увеличение количества докозапентаеновой кислоты. Уровень докозагексаеновой кислоты у молоди 1, 2 вариантов и в контроле достаточно близок - 10,92...11,37% от общих липидов. Содержание кислот  $\omega 3$  на рационе с высокой (7 мг/кг) концентрацией каротиноидов (3 вариант) снизилось по сравнению с контролем почти на 31%. Это в основном происходило за счет докозагексаеновой кислоты, уровень которой уменьшился на 27,5%, а также линоленовой и эйкозапентаеновой кислот (табл. 6).

Содержание суммы кислот  $\omega 6$  и  $\omega 3$  в фосфолипидах рыб различалось незначительно. Увеличение суммы кислот  $\omega 6$  в фосфолипидах рыб 2 варианта обусловлена докозатетраеновой кислотой, уменьшение их в 3 варианте - снижением содержания линолевой кислоты. Общим для опытных рыб является повышение уровня в фосфолипидах докозапентаеновой кислоты более чем на 35%. Однако с повышением дозы каротиноидов ее уровень последовательно уменьшался. Увеличение суммы кислот  $\omega 3$  в фосфолипидах молоди 1 варианта обусловлено повышением уровня докозагексаеновой кислоты с 12,51 до 14,14%, а у рыб 2 варианта - уровня линоленовой кислоты более чем в 1,5 раза.

Снижение суммы  $\omega 3$  кислот в 3 варианте вызвано уменьшением содержания линоленовой кислоты более чем в 4 раза.

Таблица 6  
Содержание кислот  $\omega 6$  и  $\omega 3$  в общих липидах (ОЛ) и фосфолипидах (ФЛ) молоди осетра (2 этап), % суммы жирных кислот

Жирные кислоты	Варианты опыта						Контроль	
	1		2		3		ОЛ	ФЛ
	ОЛ	ФЛ	ОЛ	ФЛ	ОЛ	ФЛ		
18:2	6,38	4,14	8,64	4,23	8,30	3,17	7,87	4,20
18:3	1,44	1,92	1,76	2,70	0,40	0,40	1,02	1,70
18:4	-	-	-	-	-	-	1,01	1,60
20:2	-	-	-	-	0,68	-	0,60	-
20:3	-	-	-	-	-	-	0,50	-
20:4	3,52	2,82	3,06	2,51	3,33	2,90	3,46	2,41
20:5	3,68	4,07	2,79	4,23	3,12	4,42	4,02	4,13
22:4	-	-	0,96	0,88	-	-	0,50	-
22:5	2,60	3,08	4,04	2,86	2,01	2,54	2,44	1,88
22:6	10,98	14,14	11,37	12,84	7,92	12,66	10,92	12,51
$\Sigma \omega 6$	9,90	6,96	12,66	7,62	11,71	6,07	12,93	6,61
$\Sigma \omega 3$	18,70	23,21	19,96	22,63	13,45	20,02	19,41	21,82
$\omega 6/\omega 3$	0,53	0,30	0,63	0,34	0,87	0,30	0,67	0,30

По завершении 2 этапа опытов большая часть кислот  $\omega 3$  была сосредоточена в фосфолипидах. У молоди 1 варианта доля кислот  $\omega 3$  в фосфолипидах была наибольшей - 72%, во 2 и 3 вариантах - соответственно 60,4 и 67,6%, тогда как в контроле - 57% от их абсолютного содержания в общих липидах.

По окончании кормления у молоди осетров наблюдалось перераспределение кислот  $\omega 6$  и  $\omega 3$  в общих липидах и фосфолипидах. Отношение  $\omega 6/\omega 3$  в общих липидах у молоди 1 варианта осталось на прежнем уровне - 0,53. С повышением дозы каротиноидов в 2 и 3 раза отношение  $\omega 6/\omega 3$ , по сравнению с 1 этапом, повысилось соответственно с 0,58 до 0,63 и с 0,62 до 0,87, тогда как в контроле снизилось с 0,80 до 0,67. Следует отметить, что эти изменения касаются в основном общих липидов и, что очень важно, не затрагивают фосфолипиды. Отношение  $\omega 6/\omega 3$  в фосфолипидах рыб было достаточно стабильным - 0,3...0,34.

Таким образом, результаты свидетельствуют о влиянии кароти-

ноидов на метаболизм липидов молоди осетра. В соответствующих дозах они определяют уровень фосфолипидов и соотношение их фракций, положительно воздействуют на состав жирнокислотного пула молоди. Кроме того, каротиноиды в составе рациона способствуют повышению уровня кислот  $\omega 3$  у молоди в основном за счет наиболее активных жирных кислот, в частности докозагексаеновой. Согласно литературным данным, это свидетельствует о улучшении физиологического статуса и повышении адаптационной пластичности рыб, в том числе устойчивости к экстремальным факторам. Положительное влияние каротиноидов крилевой муки в составе комбикорма на рост форели и сингеа высокомолекулярных жирных кислот отмечали Н.Т.Сергеева с соавторами (1986). Она предполагала, что эффективность рационов обусловлена ингибированием пигментами перекисного окисления высоконенасыщенных кислот как в корме, так и в печени рыб. Поскольку каротиноидные пигменты мы вводили непосредственно перед кормлением рыб, можно предположить, что они, выступая в организме в качестве антиоксидантов, способствуют синтезу высоконенасыщенных жирных кислот.

В завершение следует отметить, что по рыбоводно-биологическим показателям, наиболее благоприятное воздействие на формирование липидного и жирнокислотного статуса осетра оказывает введение в рацион каротиноидов в первые 12 суток кормления в количестве 4,7 мг, а в последующие 19 суток - 2,3 мг на 1 кг корма.

#### в) Содержание витамина А в печени молоди осетра

Каротиноидные пигменты в составе рациона молоди осетра оказывали существенное влияние на содержание витамина А в печени. Введение в рацион 2,3 мг каротиноидов на 1 кг корма (1 вариант) увеличило содержание витамина А в печени осетров до 65,8 мг/100 г сырой ткани, что соответственно на 11,6 и 18,2% выше, чем на всем корме и в контроле. При увеличении количества каротиноидов в 2 и 3 раза (2 и 3 варианты) концентрация витамина А в печени оставалась почти одинаковой - соответственно 69,0 и 70,2 мг / 100 г сырой ткани, что выше чем в контроле на 26 и 24%. Следовательно, каротиноиды способствовали накоплению витамина А в печени рыб, хотя и не пропорционально их уровню. Известно, что при избыточном поступлении отдельных элементов питания, особенно биологически активных веществ, происходит изменение обменных процессов; нап-

равненное на вывод из организма избыточных компонентов пищи для поддержания гомеостаза (Уголев, 1970; 1987). Этот процесс сопровождается повышенными энерготратами, что негативно отражается на пластическом обмене и, соответственно, скорости роста. Вероятно, содержание витамина А в печени в количестве 69 - 70 мг/100 г ткани является избыточным. Именно этой величине соответствует снижение скорости роста молоди, повышение непроизводительных затрат энергии корма и снижение накопления энергии у рыб.

Таким образом, согласно рыбоводно-биологическим показателям оптимальный уровень витамина А в печени стандартной молоди осетра массой около 3 г составляет 59 - 66 мг/100 г ткани. Этот уровень обеспечивается при введении в комбикорм каротиноидов в количестве 2,3 мг/кг корма, а также при питании естественными кормами.

#### г) Характеристика крови молоди осетра

По завершении опыта показатели периферической крови соответствовали норме, приведенной для молоди осетра отличающейся высокой жизнеспособностью (Баденко и др., 1984). Исключение составил 3 вариант, в котором отмечено снижение интенсивности эритропоза и содержания лимфоцитов, повышение количества нейтрофилов, а также слабо выраженная лейкопения. Эти изменения схожи с неспецифическими отклонениями в крови рыб, обусловленными проявлением общего адаптационного синдрома Селье. Однако указанные отклонения выражены не резко. Это свидетельствует, с одной стороны, о слабости раздражителя, с другой - о способности рыб адаптироваться к повышенной концентрации каротиноидов в корме.

Таким образом, каротиноиды в количестве 2,3 и 4,7 мг на 1 кг корма не оказывали негативного воздействия на состояние крови рыб. При дозе 7 мг/кг наблюдалось некоторое ухудшение показателей крови молоди, что, вероятно, показывает превышение допустимого уровня каротиноидов.

#### д) Гистоморфологическая характеристика печени молоди осетра

В результате опытов гистоморфологические показатели печени рыб соответствовали норме (Тренклер, Степанова, 1979; Семенкова, 1982, 1983; Гершанович и др., 1987). Следовательно, введение в рацион каротиноидных пигментов микробиального синтеза не оказыва-

ет негативного влияния на структуру печени и, вероятно, на ее функции. Наиболее значительное накопление резервных липидов отмечено у молоди 1 и 2 вариантов - соответственно 20,3 и 15,8% (в контроле - 11,6%). Минимальный уровень жировых включений в клетках печени отмечен у рыб 3 варианта - 5,9%. Это позволяет предположить, что каротиноиды в количестве 2,3 и 4,7 мг/кг рациона способствуют депонированию жира в гепатоцитах не оказывая патологического влияния на их структуру. Повышение дозы пигментов до 7 мг/кг оказывает липотропное действие, вследствие чего уменьшается количество жировых включений.

Таким образом, наиболее благоприятное воздействие на физиологический статус гепатопанкреаса осетров в возрасте 45 суток (21 сут кормления) оказывало введение в рацион каротиноидных пигментов в количестве 2,3 мг/кг. Это выразилось в накоплении резервного жира в гепатоцитах до 20,3%, что соответствует молоди из естественных водоемов (Семенкова, 1982, 1987) и свидетельствует о хорошей подготовленности к выпуску в реку и скату в море в условиях возможного временного голодания (Героильский, 1957; Калояну, 1959; Богданова, 1971).

## В В О Д Ы

1. Одной из функций каротиноидов осетра является участие в процессах свободнорадикального окисления в качестве регуляторов этого окисления - антиоксидантов.

2. В течение эмбрионального периода развития осетра происходит интенсивный расход каротиноидов, усиливающийся на этапе предличинки.

3. В процессе развития эмбрионов и предличинки существует тесная функциональная связь между содержанием белка, липидов и каротиноидов.

4. С началом экзогенного питания осетра, для пополнения истощенных в эмбриональный период развития запасов структурных антиоксидантов, необходимо обогащение стартовых комбикормов каротиноидами.

5. В качестве источника каротиноидов в комбикормах для молоди осетра целесообразно использовать кормовой препарат микробиологического каротина - КИМД.

6. Каротиноиды следует вводить в комбикорм в составе длин-



тольного экстракта непосредственно перед кормлением рыбы путем орошения гранул. Это способствует сохранению активности каротиноидов.

7. Количество каротиноидов в корме необходимо строго дозировать в зависимости от массы молоди. Передозировка рациона ухудшает результаты выращивания осетра.

8. Для молоди средней массой до 200 мг содержание каротиноидов в рационе должно составлять 4,7 мг / кг. При дальнейшем выращивании осетров до стандартной массы доза каротиноидов должна составлять 2,3 мг / кг корма.

9. Введение в рацион оптимальных доз каротиноидов способствует повышению темпа роста молоди осетра на 20-35%, эффективности использования протеина и энергии корма на 19-34%, улучшению липидного, в том числе жирнокислотного, статуса рыб, которое проявляется в повышении уровня фосфолипидов на 14-35% и снижении соотношения  $\omega 6/\omega 3$  в общих липидах на 21-28% в основном за счет увеличения содержания докозагексаеновой и эйкозапентаеновой кислот, а также активации липазы и накоплению резервного жира в печени до уровня, свойственного рыбам естественных популяций.

#### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В целях повышения жизнестойкости молоди и эффективности искусственного воспроизводства популяций осетра рекомендуется следующее:

- вводить в стартовые комбикорма для осетра каротиноиды;
- в качестве источника каротиноидов целесообразно использовать кормовой препарат микробиологического каротина- КПКМ;
- для сохранения активности каротиноидов необходимо использовать липидный экстракт КПКМ, которым орошаются гранулы перед скармливанием;
- в качестве липидных растворителей нужно использовать линетол или другие жидкие жиры;
- содержание каротиноидов в рационе необходимо строго дозировать в зависимости от массы молоди;
- контроль количества каротиноидов осуществлять в липидной добавке спектрофотометрическим методом с учетом дозы данной добавки при введении в рацион;
- на начальных этапах кормления молоди до массы 200-250 мг

- 1 . . . . .
1. . . . .
- ∴ . . . . .
- 1991.- . 4.- . 46-50.
2. . . . .
- . . . . .
3. . . . .
- ∴ . . . . .
- . 110-113.
4. . . . .
- - : , 1991.- 4 . . . . . N 706-91.-
5. . . . .
- // . . . . .
- ∴ . 1991.- . 62.- . 37-41.
6. . . . .
- OG2640. - . . . . . N 4899831 / 13 / 28.06.91.