



На правах рукописи

Ю.В. Корягина

КОРЯГИНА Наталья Юрьевна

**«ФИЗИОЛОГО - БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЧНЫХ
РАКОВ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В ИСКУССТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ»**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

21 ОКТ 2010

Москва – 2010

Работа выполнена на кафедре физиологии и биохимии животных
Российского государственного аграрного университета - МСХА имени
К.А.Тимирязева и в лаборатории разведения речных раков ГНУ ВНИИР

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Иванов Алексей Алексеевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Маннапов Альфир Габдуллович

доктор сельскохозяйственных наук,
Жигин Алексей Васильевич

Ведущая организация: ФГОУ ВПО Российский государственный
аграрный заочный университет

Защита диссертации состоится «08» ноября 2010 года в 14. 30 часов на
заседании диссертационного совета Д 220.043.09 при Российском
государственном аграрном университете МСХА имени К.А. Тимирязева по
адресу: 127550, Москва, Тимирязевская ул., д.49, ученый совет РГАУ –
МСХА имени К.А. Тимирязева, тел. (факс): (495)976-24-92.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНБ им. Железнова ФГОУ
ВПО РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева.

Автореферат разослан «10» 09 2010 г. и размещен в сети
Интернет на сайте университета www.timacad.ru

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А.А. Ксенофонтова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы Речные раки относятся к царству животных, типу членистоногих (*Arthropoda*), подтипу жабродышащих (*Branchiata*), классу ракообразных (*Grustacea*), подклассу высшие раки (*Malocostraca*), надотряду эвкариды (*Eucarida*), отряду десятиногие ракообразные (*Decapoda*), инфраотряду *Astacidea*.

Являясь ценным объектом промысла благодаря высоким качествам и питательности мяса, речной рак пользуется большим спросом, как на внутреннем, так и на внешнем рынке России. Выращивание речного рака в рыболовческих хозяйствах позволяет повысить на 10-20 % их продуктивность. По оценкам экспертов, мировой объем производства раков составляет от 120 до 150 тыс. тонн. Основными поставщиками товарных раков являются США, Турция (7 тыс. тонн в год), Испания (3,5 тыс. т), Китай (1 тыс. т). В то же время Финляндия и Россия из основных экспортеров речных раков превратились в импортеров. В Российской Федерации промысел раков поставлен не на должный уровень, нет хорошо налаженного промысла раков, добыча происходит стихийно.

Чтобы повысить запасы речного рака в естественных водоемах, необходимо проведение биотехнических мероприятий в реках и водохранилищах и искусственное разведение в прудах. Технология искусственного разведения речных раков сдерживается недостаточным уровнем изученности биологии и адаптивных возможностей этих гидробионтов. Для ракообразных определены следующие стресс – факторы: колебания температуры, недостаток кислорода, плотность посадки и другие (Newsom J. E.; Davis K. B., 1994; Mannonen A. et al, 1998; Ковалёва Е.С., Ковалёв В.Б., 2004; Борисов Р.Р. и др., 2005; May H.Y., Mercier A.J., 2006; Москалюк Т.А., 2009). Эти факторы, прежде всего, вызывают изменения внутренней среды организма животных. Однако механизм воздействия этих факторов на организм речных раков остается неизученным. Пределы референтных значений констант гомеостаза раков не определены, не известны особенности метаболизма раков разных видов, не установлены показатели, позволяющие контролировать их физиологическое состояние, в целом не разработано понятие «физиологическая норма».

Согласно исследованиям отечественных авторов (Алякринская И.О., 1972; Житенева Л.Д. и др, 1989; Черкашина Н.Я., 1989; Александрова Е.Н. и др., 2004; 2005) объективным методом контроля физиологического состояния гидробионтов является общий и дифференциальный подсчет клеток гемолимфы. Биохимические показатели дополняют общую характеристику физиологического состояния речных раков (Huiqun C. et al, 2004).

Цель работы - изучить влияние факторов среды на физиологическое состояние речных раков.

Для достижения поставленной цели решались **следующие задачи**:

1. Выделить наиболее информативные физиолого-биохимические показатели, отражающие физиологическое состояние речных раков.
2. Дать оценку изменению состава гемолимфы в процессе онтогенеза.
3. Определить минеральный состав разных тканей у речных раков.
4. Изучить видовые особенности гомеостаза широкопалого, длиннопалого и сухопалого речного рака в искусственных условиях.
5. Изучить влияние факторов искусственной среды обитания на основной обмен и состав гемолимфы речных раков разных видов.
6. Оценить состояние гомеостаза раков под влиянием транспортировки и уплотненных посадок в искусственных водоемах.

Научная новизна. Впервые в искусственных условиях содержания определены референтные значения ряда физиолого-биохимических показателей речных раков трех видов - перспективных объектов искусственного разведения.

Практическая значимость. Установленные оптимальные параметры среды и показатели гомеостаза речных раков могут быть использованы при их разведении в искусственных условиях, а также при разработке технологии искусственного воспроизводства, доместикиции и селекции. Материалы диссертации представляют интерес для учебного процесса при подготовке специалистов в области аквакультуры и зоотехнии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Референтные значения констант гомеостаза речных раков.
2. Физиолого-биохимические изменения речных раков под влиянием абиотических и биотических факторов.
3. Онтогенетические изменения констант гомеостаза речных раков.
4. Видовые различия физиолого-биохимических свойств гемолимфы широкопалого, длиннопалого и сухопалого речных раков.
5. **Апробация результатов исследований.** Материалы диссертационной работы доложены на расширенном заседании кафедры физиологии животных РГАУ МСХА им. К.А. Тимирязева в 2010 году, заседаниях ученого совета ВНИИР 2006-2010 гг., на Международной научно-практической конференции «Стратегия развития аквакультуры в условиях XXI века» 23-27 августа 2004 г. в Минске, Международной научно-практической конференции «Рациональное использование пресноводных экосистем – перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК»» 2007 г., на Международной научно-практической конференции РУП

"Институт рыбного хозяйства» 2008 г в Минске, на 1-й Всероссийской научно-практической конференции в г. Волгограде в 2008 г.; на 2-й Всероссийской научно-практической конференции в г.Волгограде, 2010. Материалы диссертации включены в рекомендации «Технология культивирования речных раков в неспускных водоемах по пастбищному типу».

Публикации материалов работы. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 151 страницах компьютерного набора, содержит 52 таблицы, 12 рисунков, 15 фотографий. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждений, заключения, выводов, предложений производству, результатов производственных испытаний, списка литературы, включающего 177 источника, в том числе 70 на иностранных языках и приложения.

Благодарности. Автор выражает благодарность д.с./х.н Серветнику Г.Е., директору ГНУ ВНИИР за помощь в организации и проведении экспериментов; к.б.н. Александровой Е.Н., заведующей лабораторией разведения речных раков ВНИИР за методологическую помощь и научное консультирование по проблемным вопросам; к.б.н Новоженину Н. П., зам.директора по науке ГНУ ВНИИР, за консультирование по вопросам работы; д.б.н. Масловой Неониле Ивановне, зав.лаборатории воспроизводства и селекции рыб к.б.н Ревякину А. О., зав. лабораторией фармако моделирования ГУНЦБМТ РАМН за методическую помощь в проведении биохимических анализов; к.в.н. Прониной Г.И., зав. сектором иммунологии ВНИИР, за помощь в проведении экспериментов.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная часть работы выполнена в период с 2006г. по 2010г. на базе ГНУ ВНИИР (пос. Воровского, Московская область) в рамках программы «Зоотехния» темы 06.01.02 и в условиях лаборатории кафедры физиологии и биохимия животных РГАУ - МСХА им. К. А.Тимирязева.

Схема эксперимента представлена на рисунке 1.

В качестве объектов исследования использовались представители рода *Astacus Fabricius* - типичного широкопалого рака *Astacus astacus* и два вида pontичных раков (род *Pontastacus*) - типичного длиннопалого рака *Pontastacus leptodactylus* и сухопалого рака *Pontastacus* (Фомичев Н.И., 1986; Старобогатов Я.И., 1995), отличающихся рядом биологических характеристик,

из водоемов бассейна р. Великой Псковской области и теплых озер Электрогорска Московской области.



Рисунок 1 – Схема эксперимента

Физиология речных раков в онтогенезе изучалась на животных обоего пола: личинках (7- 10 стадии), годовиках и взрослых особях (3- 4 года).

Раки содержались в аэрируемых аквариумах объемом 54 л, 80 и 180л, с оборотной водоочисткой. В качестве корма ракам в аквариумах давали хиронамиду (мотыля). Освещение – естественное и искусственное.

Условным контролем служили раки, с нормальной плотностью посадки, температурой воды + 18 - + 20 °С и содержанием кислорода в воде 8,8 - 10,0 мг/л.

Параметры среды определялись общепринятыми гидрохимическими методами и во всех экспериментальных группах.

Для определения **влияния температурного фактора** формировались группы раков, содержащихся в течение месяца в воде с определенной температурой (от +8 до +24°С). Дополнительно были сформированы группы раков, которых оставляли вне воды на 2-4 часа при температуре воздуха +10 и +20°С.

Для определения **влияния низкого уровня кислорода** в воде речных раков помещали в аквариумы с разной температурой без аэрации на 2 и 25 часов. Интенсивность кислородного обмена определяли методом «замкнутых сосудов» в модификации Винберга Г.Г (Строганов Н.С., 1962) в 3-х и 110-ти литровых (заполненных на 30 см) сосудах, а содержание кислорода в воде - по Winkler (1988).

Влияние минерального состава воды проводилось на группах речных раков при пониженном (56-66мг/л) и повышенном (136-164мг/л) содержании кальция в воде.

Воздействие азотсодержащих соединений на речных раков оценивалось при содержании в воде нитратов 4мг/л и нитритов 25мг/л.

В качестве **биотического фактора** рассматривалась плотность посадки широкопалых и длинопалых раков: нормальная - 10 экз/м² и высокая - 28 экз/м².

Рост, развитие и физиологическое состояние раков оценивалось по линейно-весовому приросту, морфометрическому индексу, гематологическим (скорости агглютинации, рН гемолимфы, общему числу гемоцитов, гемоцитарной формуле, буферной емкости) и биохимическим показателям.

Отбор гемолимфы проводился *in vivo* по рекомендациям Soderhall K., Johansson V.W., Smith V.J (1988), Черкашиной Н.Я.(1989), из вентрального синуса речных раков при сохранении их жизни и здоровья, с соблюдением правил асептики и антисептики.

pH гемолимфы и среды определяли с помощью тест полосок (лакмусового индикатора) и на pH-метре. Время свертываемости гемолимфы определяли по Моравицу (Годоров И., 1966). Общий и дифференциальный подсчет гемоцитов проводился сразу же после отбора гемолимфы *in vitro* в камере Горяева. Гемодитарная формула оценивалась по дифференциальному подсчету 4-х типов клеток (Рис.2):

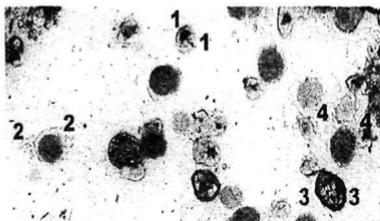


Рисунок 2 - Мазок гемолимфы речного рака *Pontastacus leptoactylus*

1-агранулоцит, диаметром 10 микрон (ГЦ 1), 2-полугранулоцит (ГЦ 11), 3- гранулоцит (ГЦ 111), 4-прозрачная клетка. Буферные свойства гемолимфы изучали путем потенциометрического титрования (Алякринская И.О., 1972).

Биохимические показатели гемолимфы определяли с помощью приборов: Chem Well Awareness Technology и Reflotron (Курилова С.А. и др., 1984; Muller G., 1993; Thomas L., 1995; Жуковский Ю.Г. и др., 1997; Дубовская Л.В., 1998; Хейль В. и др., 2001; Танюхина О.Н. и др., 2005).

Минеральные вещества в биологических средах определялись методом атомной абсорбции (Георгиевский В.И., Полякова Е.П., 1977).

Для оценки состояния иммунитета речных раков использовались цитохимические показатели фагоцитарной активности. Содержание неферментного катионного белка в цитоплазме фагоцитов гемолимфы речных раков определяли методом Шубича с бромфеноловым синим, индекс активности фагоцитов (ИАФ) с помощью НСТ – теста: спонтанного и индуцированного, 0,1% зимозаном (Пронина Г.И., 2008; Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., 2009).

Статистическую обработку полученных результатов (малая выборка: от 4 до 10 особей в каждой группе) проводили методом вариационной статистики с использованием программы «Microsoft Excel 2000». Использовался критерий t по Стьюденту, достоверными считались различия показателей при $P < 0,05$.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Физиологические особенности речных раков

3.1.1 Изменение состава гемолимфы в процессе онтогенеза

Личинка раков от выхода из икры до года проходит ряд преобразований. Не дифференцированные гемоциты у икры и личинок 1-3 стадии к 10 стадии имеют полную дифференцировку (Рис.3). В процессе онтогенеза

наблюдалась тенденция к повышению в 1,4 раза общего числа гемоцитов у половозрелых 3-4-х годовалых особей по сравнению с личинкой, рост доли содержания гранулоцитов: у взрослых 32.1%, у годовиков – 19,4 ($P < 0,05$).

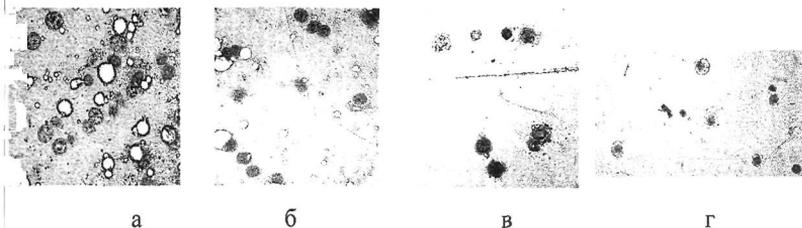


Рисунок 3 – Гемоциты рака: а) икры; б) личинки 2-3 стадии; в) 10 стадия

Прозрачных клеток на личиночных стадиях было значительно больше (14.3%), чем у других возрастных групп (1,4 – 3,4%).

Перед гибелью у речных раков наблюдалось повышение ОЧГ в 2,6 раза, рост числа гранулированных клеток с 18,5 до 26,7% при снижении количества полугранулированных гемоцитов с 33 до 22% и снижении буферной емкости гемолимфы (табл.1).

Таблица 1 - Буферная емкость гемолимфы речных раков *Astacus astacus* в активном состоянии и перед гибелью

Показатели	Контроль	Раки перед гибелью	P
Значение рН гемолимфы	6,2	6,6	>0,05
	5,5-6,5	6,5-7,0	
Буферная емкость гемолимфы, dA/dpH	11,5	10,5	>0,05
	9,6-15,3	9,2-14,0	

3.1.2 Гематологические показатели разноразмерных речных раков

При исследовании гемолимфы широкопалого и длиннопалого речных раков обоих полов разных размеров, прослеживалась прямая корреляция между размерными показателями и общим числом гемоцитов ($r = +0,78$), а также весовыми показателями и ОЧГ ($r = +0,80$).

3.1.3 Зависимость физиологических показателей от половой принадлежности

В ходе физиологических исследований было установлено: рН гемолимфы самок (5,5-5,9) смещена в кислую сторону по сравнению с самцами (6,5). Интенсивность потребления кислорода самцами в 1,8 раз выше, чем самок. Однако, с повышением температуры воды самки быстрее отвечают усилением кислородного обмена на 60%. При оптимальных условиях содержания ОЧГ в гемолимфе самцов выше, чем самок. Буферные

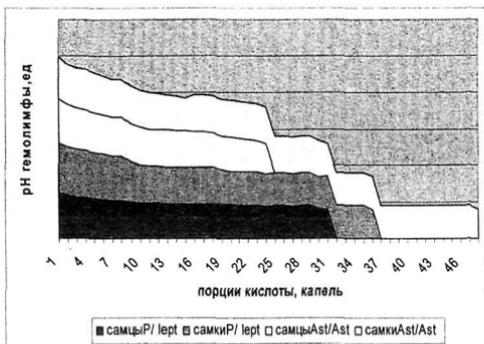


Рисунок 4 – Сравнительная оценка буферных свойств гемолимфы самцов и самок длиннопалого и широкопалого речных раков

свойства гемолимфы самок, особенно широкопалого рака, выше, чем самцов (рис.4). При проведении биохимических исследований гемолимфы самцов и самок половозрелых широкопалого и длиннопалого речных раков установлено, что содержание глюкозы в гемолимфе самцов (2,16 ммоль/л) достоверно ($< 0,05$) находилось на

гораздо более высоком уровне, чем у самок (0,50 ммоль/л). У самцов имелась тенденция к более высокому содержанию лактата в гемолимфе (62,7 мг/дл против 48,4 мг/дл), а у самок - триглицеридов (24,5 мг/дл, у самцов 9,4 мг/дл) и активности АЛТ (54,2 U/L, у самцов - 42,7).

Прослеживается достоверная прямая корреляция между содержанием в гемолимфе альбуминов и полугранулоцитов как самцов ($r=+0,64$), так и самок ($r=+0,75$); у самцов – полугранулоцитов с общим белком ($r=+0,79$) и активностью АЛТ: +0,71; у самок - активностью щелочной фосфатазы и количеством гранулоцитов ($r=+0,95$).

3.1.4 Видовые особенности речных раков

Гемоциты разных видов раков различаются внешне (рис. 5).

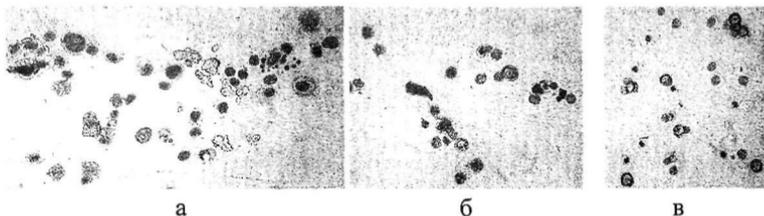


Рисунок 5 – Фото: гемоциты речного рака, окрашенные по методу Паппенгейма: а – сухопалого, б – широкопалого, в- длиннопалого

Сравнительная характеристика физиологических показателей трех видов раков указала на существенные межвидовые различия.

Для сухоплого рака характерна высокая скорость агглютинации гемолимфы (среднее 3,0сек), высокое общее число гемоцитов (1232), сравнительно низкое содержание полугранулированных клеток в гемолимфе (17,3%).

У *Pontastacus leptodactylus* рН гемолимфы сдвинута в щелочную сторону (6,5 против 5,9), выше общее число гемоцитов (911шт/мкл), содержание альбумина (10,3 г/дл) и меди (322,0 мкг/дл), повышенная фагоцитарная активность по сравнению с широкопалым.

При понижении температуры воды у речных раков по-разному изменялось содержание прозрачных клеток в гемолимфе: у длиннопалых увеличивалось, а у широкопалых – снижалось.

У широкопалого речного рака рН гемолимфы ниже, чем у *Pontastacus leptodactylus*. При этом у этого вида зафиксирован более высокий уровень глюкозы в гемолимфе (2,63 ммоль/л) и пониженная активность ЩФ (< 20,0 U/L). Гемолимфа *Astacus astacus* обладает лучшими буферными свойствами (табл.2) по сравнению с понтическими (*Pontastacus*) речными раками.

Таблица 2 – Показатели буферной емкости и активной реакции гемолимфы разнополых широкопалых и длиннопалых раков в оптимальных условиях содержания

Показатели	<i>Pontastacus leptodactylus</i>		<i>Astacus astacus</i>		P *
	♂	♀	♂	♀	
рН, ед	$6,8 \pm 0,12$ 6.5-7.0	$6,8 \pm 0,35$ 6.5-7.0	$6,2 \pm 0,41$ 5,5-6,5	$5,5 \pm 0,24$ 5,0- 6,5	< 0,05
Буферная емкость (кислотная)	$9,8 \pm 0,65$ 7.6-12,0	$12,2 \pm 3,11$ 10,0-14,4	$12,3 \pm 2,04$ 9,6-15,3	$17,0 \pm 9,90$ 10,0-24,0	> 0,05

Примечание-Р*- достоверность отличий самок разных видов

При определении фагоцитарной активности установлено, что катионный белок присутствовал в агранулоцитах, полугранулоцитах и даже иногда в небольшом количестве в прозрачных клетках речных раков.

3.1.5 Химический анализ тела рака

Химический состав разных органов раков неодинаков. Жабры содержат наименьшее количество сухого вещества (самцов-13,3%, самок-9,1%в СВ) по сравнению с другими органами и тканями. Причем у самок данный показатель значительно меньше, чем у самцов. Больше всего сухого вещества находится в панцире (самцов - 41,82, самок – 28,1 мг%в СВ). Медь в основном откладывается в гемолимфе (самцов - 26,98, самок – 112,95 мг% в СВ) и внутренних органах (самцов - 28,80 , самок – 34,46 мг% в СВ), что

особенно проявляется у самок. Марганец больше всего откладывается во внутренних органах (самцов - 4,60, самок - 12,22 мг% в СВ), а у самок и в мышцах (12,02 мг% в СВ). Максимальный уровень железа зафиксирован в гемолимфе (самцов - 38,55, самок - 46,71 мг% в СВ), а также во внутренних органах (самцов - 14,38, самок - 16,84 мг%). Цинк равномерно распределен по всем органам и тканям.

3.2 Влияние абиотических факторов на интерьерные показатели

3.2.1 Температура окружающей среды

Понижение температуры воды или воздуха приводило к понижению потребления раками кислорода в 1,7 раза, смещению рН гемолимфы на 7% в кислую сторону, повышению ОЧГ: у широкопалых на 36%, длиннопалых - примерно в 2 раза. Снижалась доля фагоцитирующих полугранулоцитов на 33-44%. При этом возрастало содержание прозрачных клеток на 4-5%.

Повышение температуры воды или воздуха (при транспортировке в обсушенном виде) в условиях нормальной посадки приводило к понижению потребления кислорода широкопалыми речными раками на 24-27%, длиннопалыми - на 15%. При высокой плотности посадки интенсивность потребления кислорода раками обоих видов возрастала на 6-12%, а скорость обмена увеличивалась в несколько раз. рН гемолимфы сдвигалась в кислую сторону. Доля гранулоцитов повышалась в среднем на 10%, а прозрачных клеток - в 1,2 раза не зависимо от вида и пола. Изменения температуры

среды обитания вызывали повышение скорости агглютинации гемолимфы в среднем на 20%.

При транспортировке в обсушенном виде раков *Pontastacus leptodactylus*, установлено, что охлаждение воздуха в емкости, где содержались раки, вызывало замедление агглютинации в 1,7 раза. При этом (рис. 6), в гемолимфе повышалось количество

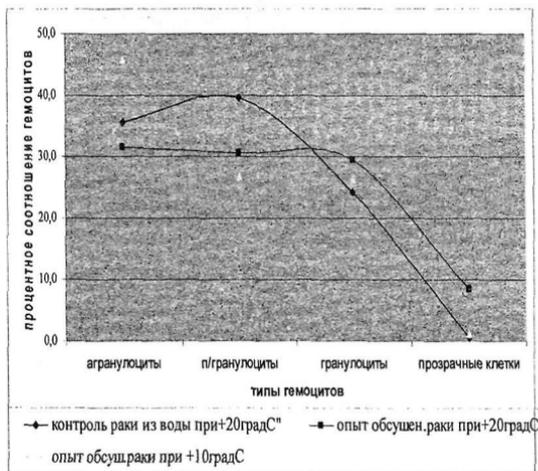


Рисунок 6 – Изменение гемоглобиновой формулы длиннопалого рака в зависимости от условий окружающей среды

агранулоцитов на 10% при снижении доли полугранулоцитов в 1,5 раза. При транспортировке раков этого вида при повышенных температурах воздуха рН гемолимфы сдвигалось на 10% в кислую сторону и наблюдалось сокращение количества агранулоцитов на 12% и полугранулоцитов на 23%, при одновременном повышении доли гранулированных на 22% и прозрачных клеток в 17 раз.

При сухой транспортировке раков в гемолимфе животных прослеживается тенденция к повышению общего числа гемоцитов на 30-45%.

3.2.2 Влияние концентрации кислорода в водной среде на физиологию раков

При содержании раков, особенно длительном, в воде с пониженным содержанием кислорода снижалось его потребление в среднем на 70%. В этих условиях доля полугранулированных гемоцитов гемолимфы у широкопалых и длиннопалых раков сокращалась в 1,4 - 1,7 раза (рис.7). На

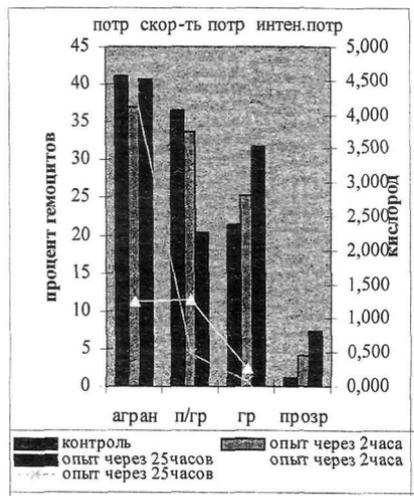


Рисунок 7 – Изменение потребления кислорода и гемоформулы длиннопалого рака при длительном содержании в воде с недостатком O₂

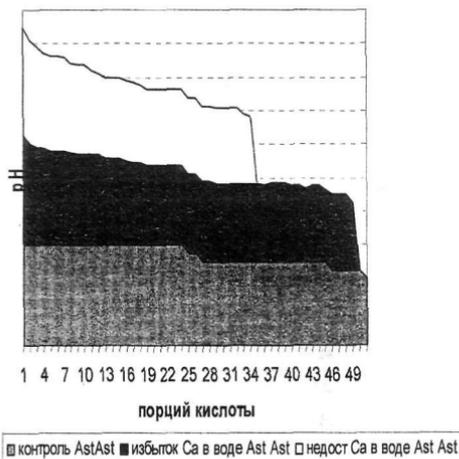


Рисунок 8 – Изменение буферных свойств гемолимфы широкопалого рака в зависимости от содержания в воде ионов кальция

уровне тенденции увеличивалось количество прозрачных гемоцитов как у широкопалых, так и у длиннопалых раков на 30-70%.

При одновременном снижении в жизненной среде уровня кислорода и температуры у широкопалых раков падала интенсивность потребления кислорода, повышалось на 19% общее число гемоцитов. Доля

полугранулоцитов в гемолимфе этих раков повышалась на 27% при снижении количества гранулоцитов на 13%.

3.2.3 Влияние минерального состава воды на физиологию рака

Понижение до 56 мг/л концентрации кальция в воде, провоцировало синхронную линьку у длиннопалого речного рака, понижение ОЧГ в гемолимфе почти в 2 раза. У широкопалого рака в воде с низкой концентрацией кальция изменялась направленность морфогенеза, в частности снижалось значение морфометрического индекса (длина клешни в отношении к длине карапакса). Прослеживалась тенденция к увеличению процентного содержания агранулоцитов на 10% и доли прозрачных клеток, снижению в 1,2 - 1,4 раза количества гранулоцитов у обоих видов раков.

Повышение содержания кальция в воде до 122-164 мг/л сопровождалось ростом на 3-5% морфометрического индекса. Буферная емкость гемолимфы широкопалых раков снижалась, а у длиннопалых повышалась (рис.8). Зафиксирован более низкий уровень альбуминов (3,1 г/дл) по сравнению с контролем (9 г/дл). В этих условиях снижалось содержание железа в гемолимфе до 25,3 мкг/дл, на треть замедлялась агглютинация гемолимфы.

Однако как при низкой концентрации кальция в воде, так и при ее повышенных значениях у всех речных раков прослеживается тенденция усиления фагоцитарной активности по НСТ-тесту. Например, у *Astacus astacus* при повышенном уровне кальция в воде НСТ при индуцировании зимозаном составил $2,52 \pm 0,063$ против $2,22 \pm 0,085$ контрольной группы ($P < 0,05$).

3.2.4 Загрязнение водоемов азотсодержащими соединениями

Накопление в водной среде соединений азота отрицательно воздействовало на речных раков. В опытной группе наблюдалась гибель 60% особей, в то время как в контроле ни один рак не погиб.

У раков, находящихся в воде с повышенным содержанием нитритов, рН гемолимфы смещался в щелочную сторону (с 7,0 до 7,9). Достоверно по сравнению с контрольной группой снижалась доля гранулоцитов на 21,5% при параллельном росте количества агранулоцитов с 25,8 до 39,8% и прозрачных клеток с 7,0 до 14,0%.

3.3 Влияние плотности посадки на физиологические показатели речных раков

Плотная посадка угнетала основной обмен раков. Если при нормальной посадке потребление кислорода составляло 3,99 г O_2 /экз*час (0,078 мл

O₂/г*час), то при плотной посадке только 0,50 гO₂/экз*час или 0,013 мл O₂/г*час.

При плотной посадке раков активная реакция гемолимфы сдвигалась в кислую сторону у широкопалого с 6,3 до 5,4 у длиннопалого с 7,0 до 6,3. У *Astacus astacus* и *Pontastacus leptodactylus* наблюдалось понижение общего числа гемоцитов и доли полугранулоцитов. Содержание прозрачных клеток с повышением плотности посадки раков возрастало с 4,5 до 8,3% у широкопалого и с 5,0 до 8,2 % у длиннопалого рака.

При плотной посадке у *Astacus astacus* наблюдалось повышение фагоцитарной активности. В частности, имело место увеличение СЦК на 6%, лизосомального катионного белка на 11% и показателей спонтанного и индуцированного НСТ - теста на 14 %.

3.4 Референтные значения констант внутренней среды речных раков при оптимальных условиях среды

При шадящих условиях искусственной среды, то есть плотности посадки не более 10 экз/м², температуре воды +17 - +21°C, содержании кислорода в воде от 8,2 до 10,6 мг/л. определены значения констант гомеостаза, которые можно принимать за физиологическую норму речных раков. Выявлены видовые особенности референтных диапазонов констант гемолимфы раков.

Для широкопалого рака характерны значения рН в пределах от 5 до 6. Для самцов референтные значения рН составили 5,4 - 6,1, для самок - 5,1 - 5,9. Буферная емкость гемолимфы широкопалого рака изменяется в пределах в пределах 9,6 - 15,3 у самцов и 10,0 - 24,0 у самок. Биохимический профиль гемолимфы этого вида характеризуют следующие цифры. Содержание глюкозы 2,16 - 3,46 ммоль/л, АЛТ -38,2 - 123,1U/L, содержание лактата 62,0-314,4 мг/дл, активность амилазы 1,4 - 7,8 ед/л, содержание магния 7,2 - 7,9 мг/дл, цинка 64,7 - 77,3 мкг/дл.

У длиннопалого рака выше, чем у широкопалого показатель ОЧГ (в пределах 787 - 1126 шт/мкл), выше процентное содержание агранулоцитов (у самцов -32,3 - 37,3, у самок - 31,0 - 38,9%), меньше доля прозрачных гемоцитов (у самцов - 3,4 - 9,0, у самок - 0 до 3,5%).

У сухопалого рака выше скорость агглютинации в пределах 2,7 - 3,3 сек и общее число гемоцитов (1146 - 1318 шт/мкл), низкое содержание полугранулоцитов (13,4 - 21,2%), по сравнению с длиннопалым и широкопалым речными раками.

ВЫВОДЫ

1. Уровень адаптированности раков по отношению к абиотическим и биотическим факторам отражают следующие показатели гемолимфы: время агглютинации, активная реакция среды, общее число гемоцитов, гемоцитарная формула, буферная емкость.

2. Существуют межвидовые различия у раков *Pontastacus Salenus*, *Pontastacus leptodactylus*, *Astacus astacus* по составу и свойствам гемолимфы. Так, у сухопалого речного рака выявлены наиболее высокая скорость агглютинации (среднее 3,0 с), высокое ОЧГ (среднее 1232), низкое содержание полугранулированных гемоцитов (17,3%). У длинопалого рака выше содержание альбумина и меди в гемолимфе. У этого же вида обнаружена повышенная фагоцитарная активность клеточных элементов гемолимфы по сравнению с широкопалым раком. Гемолимфа широкопалого рака обладает высокими буферными свойствами, высоким содержанием глюкозы (2,63 ммоль/л), самым низким значением рН (5,5-5,9) и активности щелочной фосфатазы (20U/L при 37°C).

3. Минеральные элементы неравномерно распределяются по органам речных раков. Наиболее высока концентрация сухого вещества в панцире, минимальна – в жабрах. Больше всего меди, марганца, железа откладывается во внутренних органах. Гемолимфа речных раков богата медью (у самцов в сухом веществе 26,98 мг%, у самок – 112,95 мг%) и железом (38,55 и 46,71 мг % соответственно).

4. На протяжении онтогенеза речных раков наблюдались закономерные изменения в составе гемолимфы: повышалось ОЧГ, возрастало количество гранулоцитов. Доля прозрачных клеток уменьшалась с 14,3% у личинок до 3,4% у взрослых особей. Перед гибелью раков повышается ОЧГ, понижаются количество полугранулоцитов и буферная емкость гемолимфы.

5. Раки чувствительны к температуре среды и реагируют:

- на снижение температуры воды или воздуха понижением потребления кислорода (30-40%), сдвигом в кислую сторону активной реакции гемолимфы, повышением ОЧГ (в 1.5 раза), снижением количества полугранулированных гемоцитов (на 33-44%) и прозрачных, ростом числа гранулированных клеток;

- на повышение температуры среды обитания при нормальной посадке снижением потребления кислорода (в среднем на 22%), ростом доли гранулоцитов (30-40%), а при плотной посадке повышением потребления кислорода на 6-12%;

- на любые изменения температуры среды повышением скорости агглютинации гемолимфы.

6. Снижение уровня кислорода в воде приводит к понижению его потребления раками на 70%, к повышению доли гранулоцитов на 11% в гемолимфе и прозрачных клеток на 50%. При этом, рН гемолимфы сдвигается в щелочную сторону. При одновременном понижении концентрации кислорода и температуры воды у речных раков в гемолимфе повышается ОЧГ, удельный вес полугранулоцитов и прозрачных клеток на фоне снижения доли гранулоцитов.

7. Концентрация кальция в воде выступает существенным абиотическим фактором. При изменениях концентрации кальция в воде рН гемолимфы раков сдвигается в щелочную сторону, замедляется агглютинация гемолимфы, снижается ОЧГ, содержание агранулоцитов, альбуминов и железа. Изменение концентрации кальция в воде:

- снижение до 56 мг/л провоцирует линьку у длиннопалого речного рака и приводит к снижению морфометрического индекса у широкопалого рака.

- повышение сопровождается ростом морфометрического индекса, а следовательно и продуктивности, на 3-5%.

8. Накопление в водной среде соединений азота отрицательно воздействует на речных раков, может приводить к их гибели. При этом у раков рН гемолимфы смещается в щелочную сторону (с 7,0 до 7,9), понижается содержание гранулоцитов на 21,5% при параллельном росте количества агранулоцитов и прозрачных клеток.

9. Высокие плотности посадки (20-30 экз/м²) раков приводят к понижению потребления кислорода в среднем на 15%, сдвигу рН гемолимфы в кислую сторону, снижению в ней общего числа гемоцитов в среднем на 40% и полугранулоцитов в 1,7раза, увеличению доли прозрачных клеток.

10. Транспортировка раков оказывает влияние на клеточный состав и физико-химические свойства гемолимфы раков. В гемолимфе раков прослеживается тенденция к повышению общего числа гемоцитов на 30-45%. При транспортировке раков:

- с охлаждением в 1,7 раза замедляется агглютинация гемолимфы, повышается количество агранулоцитов (на 10%) при снижении доли полугранулоцитов (с 39,6 до 26,7%).

- с повышением температуры сдвигается в кислую сторону рН гемолимфы, понижается количество агранулоцитов на 12% и полугранулоцитов на 23% при одновременном повышении доли гранулированных и прозрачных клеток.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

1. При искусственном разведении речных раков следует учитывать их видовую и половую принадлежность, и считать для длиннопалого речного

рака оптимальной температуры 18-23°C, для широкопалого – 16-22°C содержание кислорода 8,8 – 10 мг/л, нитритов до 0,02 мг/л, нитратов до 20 мг/л, кальция для широкопалых раков 60 -124 мг/л, для понтичных раков – 70 – 124 мг/л.

2. При выращивании длиннопалого рака в бассейнах с целью ускорения и синхронизации линьки рекомендуется использовать воду с пониженным (на уровне 56 мг/л) содержанием кальция.

ВНЕДРЕНИЕ

Результаты диссертационной работы внедрены в производственном процессе ООО «Флора» Среднеахтубинского района Волгоградской области; включены в рекомендации «Технологии культивирования речных раков в неспускных водоемах по пастбищному типу», а также использованы в «Методике тестирования речных раков на выживаемость, продуктивность, реакцию на стресс», в учебном процессе при подготовке магистров по программе «Физиолого-биохимический контроль здоровья животных и качества продукции» в учебном процессе ФГОУ ВПОМГАВМиБ им. К.И. Скрябина.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Александрова Е.Н. Микологическое исследование поражений внешних покровов речных раков.-// Александрова Е.Н., Пронина Г.И., Корягина Н.Ю. / ГНУ ВНИИ ирригационного рыбоводства, посёлок им. Воровского, Ногинский район, Московская область, Россия. Материалы международной научно-практической конференции «Стратегия развития аквакультуры в условиях XXI века» 23-27 августа 2004 г., Минск. ОДО «Тонпик»-2004.- С.266-268.
2. Александрова Е.Н. О числе гемоцитов и некоторых других свойствах гемолимфы речных раков (Decapoda, Astacinae).-// Александрова Е.Н., Пронина Г.И., Корягина Н.Ю..- Аквакультура и интегрированные технологии: проблемы и возможности - М.: Россельхозакадемия, 2005, С.362-372.
3. Александрова Е.Н. Культивирование речных раков в неспускных водоемах по пастбищному типу.-// Александрова Е.Н., Белякова В.И., Борисов Р.Р., Комарова Е.А., Корягина Н.Ю., Пронина Г.И. /.- Аквакультура и интегрированные технологии: проблемы и возможности - М.: Россельхозакадемия, 2005, С.86-96.
4. Александрова Е.Н. Технология культивирования речных раков в неспускных водоемах по пастбищному типу. -// Александрова Е.Н., Белякова

В.И., Борисов Р.Р., Комарова Е.А., Корягина Н.Ю., Пронина Г.И., Суханов В.В. /- Россельхозакадемия, ГНУ ВНИИР, 2005, 23с.

5. Пронина Г.И. Повышение иммунофизиологического статуса ракообразных – основа эффективности раководства.- // Пронина Г.И., Корягина Н.Ю./- Рациональное использование пресноводных экосистем – перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК»//Международная научно-практическая конференция.- М., 2007, 418-421.,

6. Александрова Е.Н. О типах гемоцитов российских речных раков (Decapoda, Astacinae). / Александрова Е. Н., Пронина Г. И., Корягина Н. Ю. // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси : сборник научных трудов / РУП "Институт рыбного хозяйства", РУП "Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству", Белорусский государственный университет. - Минск, 2008. - Вып. 24. - . 237-240.

7. Пронина Г.И. Некоторые видовые особенности состава форменных элементов крови гидробионтов / Г. И. Пронина, Корягина Н. Ю.// Вопросы рыбного хозяйства Беларуси: сборник научных трудов / РУП "Институт рыбного хозяйства", РУП "Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству", Белорусский государственный университет. - Минск, 2008. - Вып. 24. - . 465-470.

8. Пронина Г.И. Биохимические показатели гемолимфы речных раков как отражение их обмена веществ.-// Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Ревакин А.О. /- Физиология адаптации: Материалы 1-й Всероссийской научно-практической конференции, г. Волгоград, 7-10 октября 2008 г.-С. 97-99.

9. Пронина Г.И. Некоторые видовые особенности физиологической и иммунной системы речных раков.-// Пронина Г.И., Корягина Н.Ю. /- Физиология адаптации: Материалы 1-й Всероссийской научно-практической конференции, г. Волгоград, 7-10 октября 2008.- С. 99-103.

10. Пронина Г.И. Влияние жесткости среды на состояние клеточного иммунитета речных раков.-// Пронина Г.И., Корягина Н.Ю./- Экология. Природные ресурсы. Рациональное природопользование. Охрана окружающей среды. Бюллетень Московского общества испытателей природы.- т.114,вып.3.Приложение 1.Часть 2.МГУ-М.-2009.

11. Пронина Г.И. Сравнительная оценка речных раков разных видов по биохимическим и гематологическим показателям.-// Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Ревакин А.О./- Известия ОГАУ, Оренбург, 2009, №4 - С. 186-189

12. Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Смолин В.В. Опыт выращивания речных раков в Волгоградской области.//Зоотехния.- 2010.-№ 6.-С.25-27.
13. Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Меньшиков И.Ю. О некоторых адаптационных особенностях речных раков.// Физиология адаптации: Материалы 2-й Всероссийской научно-практической конференции / Науч. ред. А.Б. Мулик. – Волгоград: Волгоградское научное издательство, 2010. - С.138 – 141.

Примечание: жирным шрифтом выделены статьи, опубликованные в литературных источниках по списку ВАК.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АЛТ - аланинаминотрансфераза	мг %- миллиграммов в 100 г
АСТ - аспаратаминотрансфераза	pH - активная реакция среды
ГЦ - гемоциты	ОЧГ - общее число гемоцитов
ИАФ -индекс активности фагоцитов	O ₂ - кислород
Ca ²⁺ - ионы кальция	СВ - сухое вещество
L - длина тела	СЦК - средний цитохимический коэффициент
Δ L - прирост	ЩФ - щелочная фосфатаза

Отпечатано с готового оригинал-макета

Формат 60x84¹/₁₆. Усл. печ. л. 1,16. Тираж 100 экз. Заказ 480.

Издательство РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева
127550, Москва, ул. Тимирязевская, 44