

На правах рукописи

АБРОСИМОВА ЕКАТЕРИНА БОРИСОВНА

**ОСОБЕННОСТИ АММИАЧНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ РЫБ
В ИНТЕНСИВНОЙ АКВАКУЛЬТУРЕ**

Специальность 03.00.10 - Ихтиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук



Астрахань, 2009

A handwritten signature in black ink.

Работа выполнена на кафедре «Водные биоресурсы и аквакультура» филиала
ГОУВПО «Московский государственный университет технологий и
управления» в г. Ростове-на-Дону (РО ГОУВПО МГУТУ)

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Стрельников Виктор Владимирович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Пономарева Елена Николаевна

доктор биологических наук
Металлов Геннадий Федорович

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

Защита состоится «6» окт 2009 г. в _____ часов _____ минут на заседа-
нии Диссертационного Совета Д.307.001.05 при Астраханском государствен-
ном техническом университете по адресу: 414025, РФ, Астраханская область,
г. Астрахань, ул. Татищева, 16
Факс: 8 (8512) 54 91 03

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Астраханского государственного технического университета

Автореферат разослан « _____ » _____ 200 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета Д.307.001.05
к.б.н., доцент

Э.И. Мелякина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Особенностью современного интенсивного рыбоводства является высокая концентрация производства. Она обеспечивается высокой плотностью посадки, применением физиологически полноценных комбикормов и целенаправленным формированием водной среды. Однако нарушение нормальных процессов нитрификации в условиях повышенной температуры, ухудшения санитарно-гигиенических условий в рыбоводных емкостях из-за высоких плотностей посадок, снижения уровня растворимого в воде кислорода и вероятного изменения направленности обмена веществ у рыб способствует незаразному некрозу жабр, при котором гибнет до 80 % выращиваемых особей (Лопухина, 1969; Щелкунов, 1988). Доказано, что незаразный некроз жабр у рыб возникает в результате токсикоза организма аммиаком экзогенного и эндогенного происхождения (Schreckenbach, Spangenberg, 1978; Щелкунов, 1988).

Несмотря на известную природу причин возникновения незаразного некроза жабр, достаточно эффективных методов его лечения и профилактики еще не разработано. До сих пор остается нерешенной проблема, связанная с особенностями метаболизма рыб, которая усугубляется условиями при интенсивном выращивании, нестабильных климатических и гидрохимических условиях. Кроме того, на смену разработке методов лечения болезней приходит направление, предусматривающее сохранение здоровья объектов аквакультуры на протяжении всего периода выращивания путем разработки методов (или технологий), предупреждающих развитие заболеваний. В связи с этим необходимо изучение физиологических и биохимических изменений в организме рыб на тканевом и клеточном уровне при патологиях, что позволит разработать новые более эффективные подходы к выращиванию рыб.

Цель и задачи исследований. Основная цель настоящей работы заключалась в выявлении изменений физиолого-биохимического статуса и метаболизма рыб (на примере бестера) при аммиачной интоксикации и разработке рационального кормления, способствующего нивелированию неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды.

Для достижения этой цели ставились следующие задачи:

- изучить влияние аммиачной интоксикации на темп роста, выживаемость, упитанность и направленность общего обмена веществ;
- выявить изменения липидного и жирнокислотного обмена при аммиачной интоксикации;
- определить влияние аммиачной интоксикации на активность перекисного окисления липидов;
- изучить влияние аммиачной интоксикации на активность оксидегидрогеназ;
- изучить влияние аммиачной интоксикации на активность фосфатаз и липазы;
- изучить изменения состава крови при аммиачной интоксикации;
- изучить физиологическое действие кормовой липидной добавки при некрозе жабр аммиачной природы и установить оптимальное ее количество в рационе рыб.

Научная новизна. Впервые определено изменение баланса эссенциальных жирных кислот $\omega 3$ и $\omega 6$ ряда при аммиачной интоксикации молоди бес-тера. Установлено, что при данном заболевании существенно снижается уровень $\omega 3$ при активном расходовании на поддержание гомеостаза эйкозапентаеновой (20:5), докозапентаеновой (22:5) и докозагексаеновой (22:6) жирных кислот. Выявлено снижение активности витамина А с преобладанием суммы мононенасыщенных кислот 20:1 и 22:1 и уменьшением уровня полиненасыщенной кислоты 22:6. Показано, что при аммиачной интоксикации повышаются энерготраты организма и в обмен веществ включаются мембранные липиды.

Впервые определено, что при аммиачной интоксикации нарушается динамическое равновесие процессов свободнорадикального окисления, снижается активность дегидрогеназ - лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы, а также кислых и щелочных фосфатаз, липазы. Изменяется картина крови в сторону увеличения фагоцитарных клеток, а также в 2 раза уровня аммиака. Установлено, что для предотвращения аммиачной интоксикации и, как следствие, некроза жабр, целесообразно вводить в рацион рыб специальную кормовую липидную добавку в количестве 2 %, основным физиологическим действием которой является нормализация процессов метабо-

лизма рыб, в том числе уровня аммиака в крови, тем самым, устраняя причину заболевания.

Практическая значимость работы определяется возможностью повышения эффективности выращивания рыб за счет профилактики аммиачной интоксикации и поражения жабр, особенно в условиях высокой интенсификации выращивания.

Обогащение рациона рыб кормовой липидной добавкой способствует не только снижению потерь рыбоводной продукции в случае заболевания, но и их предупреждению при проведении профилактического кормления, а также хорошему физиологическому состоянию рыб. Результаты наших исследований подтверждены производственными испытаниями.

Апробация работы. Материалы диссертации представлялись, обсуждались и докладывались на Международной научной конференции «Состояние и перспективы развития фермерского рыбоводства аридной зоны» (г. Азов, 2006), IV Международной научно-практической конференции «Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития», (Астрахань, 2006), на Международной научной конференции «Наука, техника и высшее образование» (Аура, Мальта, 2007), II Международной научной конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины (Ростов-на-Дону, 2008), а также на заседаниях кафедр «Водные биоресурсы» и «Биоэкологии и ихтиологии» МГУТУ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 131 странице и состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и приложения (акты производственных испытаний). Список цитируемой литературы включает 191 работу, из которых 38 на иностранных языках. Работа иллюстрирована 24 рисунками и 20 таблицами.

1. НЕЗАРАЗНЫЙ ЖАБЕРНЫЙ НЕКРОЗ КАК СЛЕДСТВИЕ АММИАЧНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ (аналитический обзор)

В данной главе освещена история изучения незаразного некроза жабр рыб аммиачной природы, клиника и причины заболевания. Обсуждены пути

образования и экскреции аммиака в организме рыб, традиционные методы профилактики и терапии данного заболевания. Обзор литературных данных источников показал, что, несмотря на установленные факторы, провоцирующие заболевание рыб некрозом жабр, а также разработанные методы профилактики и лечения, вспышки жаберного некроза аммиачной природы происходят регулярно в различных хозяйствах. Однако вопросы, связанные с нарушением физиологического и биохимического статуса рыб при данном заболевании, имеющих существенное значение для его профилактики изучены недостаточно или совсем не затрагивались.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сбор материала, данных и опыты проводили в течение 2004-2007 гг. на Донском ОРЗ, ОНЦП «БИОС», ЗАО «Казачка» и Новочеркасском рыбокомбинате, Бессергеновском рыбоводном заводе. Объектами исследования послужили мальки и сеголетки межвидового гибрида - бестера. Данный выбор обусловлен его традиционностью в качестве объекта товарной аквакультуры в России.

Исследования проводили в условиях научно-производственного эксперимента, при которых экстремальные факторы действуют комплексно, что позволяет наиболее реально оценить изменения в организме рыб при заболеваниях и лечении. Схема и основные направления исследований приведены на рис. 1.

Выбор липидной добавки был обусловлен тем, что она оказывает антистрессовое действие и способствует стабилизации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в организме рыб (Абросимов, Абросимова, 2004; Абросимова, Абросимов, 2007).

Влияние аммиачного интоксикоза, вызывающего поражение жабр, на физиологическое состояние бестера и липидной добавки в качестве терапевтического и профилактического средства оценивали по рыбоводно-биологическим и физиолого-биохимическим показателям.

Рыбоводно-биологические исследования. Изучали весовой рост, выживаемость, упитанность по Фультону (KU_{Φ}), затраты кормов на единицу при-

Физиолого-биохимические исследования.

Общий химический анализ кормов и рыб проводили по стандартным методикам (Щербина, 1983). Для разделения липидов на классы использовали метод тонкослойной хроматографии (Шталь, 1965), с предварительным экстрагированием их по Фолчу (Folch et al., 1957).

Холестерин определяли по методу Либермана-Бурхарда в модификации С. Ильяка, эфиры холестерина - с использованием дигитонина (Иса, 1962), глицеринов - по цветной реакции с хромотроповой кислотой, НЭЖК - колориметрически (Yang Jeun-Sing, Biggs, 1971), липоидного фосфора - по Исао с соавторами (Isao et al., 1967).

Жирные кислоты определяли методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «ЦВЕТ-5».

Содержание диеновых конъюгатов (ДК) оценивали по характерному для них ультрафиолетовому спектру поглощения раствора липидов, малонового диальдегида (МДА) – по Коробейниковой (1989), основания Шиффа (ОШ) - по спектрам флуоресценции растворов липидов в хлороформе. Определение активности СОД проводили гидроксиламиновым методом (Yasuhira, 1983), α -токоферола - флуориметрическим методом (Taylor, 1980), витамина А - колориметрическим методом в тканях (Carr, Prince, 1926), витамина С – по Тильман с соавторами (Tillman et al., 1932), активность лактатдегидрогеназы - по методу Зумермана и Вестейна (Zimmerman H.I., Weistein H.J., 1966), малатдегидрогеназы - по методу Амелунга с соавторами (Amelung D et al, 1966), сукцинатдегидрогеназы - по методу Сонтула с соавторами (Sontull et al, 1968).

Активность щелочной и кислой фосфатазы определяли методом по Бессею, Лоури (Щеклик и др., 1966), липазы - по скорости гидролиза трибутирина (Yang Jeun-Sing, Biggs, 1971).

Кровь для анализа брали из хвостовой артерии. Концентрацию гемоглобина определяли по Сали, величину гематокрита – на центрифуге Шкляра. Мазки фиксировали и окрашивали по Паппенгейму. Клетки крови идентифицировали по классификации Н.Т. Ивановой (1970, 1983).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью прикладной компьютерной программы «Excel».

В рыбоводно-биологических анализах использовано 1025 рыб. Проведено 1122 биохимических определения, в том числе, общих анализов тела рыб - 352, фракционного состава липидов, в том числе фосфолипидов - 364, жирных кислот - 25, продуктов ПОЛ - 96, антиоксидантов - 64, витаминов - 62, ферментов - 159, гематологических анализов - 122. Испытано 3 варианта комбикормов, отличающихся количеством введенной липидной добавки.

В тексте, таблицах и рисунках приняты следующие обозначения:

ОЛ - общие липиды; ФЛ - фосфолипиды, ТАГ - триацилглицерины, Х - холестерин; ЭХ - эфиры холестерина; МАГ - моноацилглицерины; ДАГ - диацилглицерины; НЭЖК - незестерифицированные жирные кислоты; ИФ - инозитфосфатиды; ЛФХ - лизофосфатидилхолины; СФМ - сфингомиелины; ФХ - фосфатидилхолины; ФС - фосфатидилсерины; ФЭА - фосфатидилэтаноламины; К+ЛГФ - кардиолипиды+полиглицерофосфатиды; СОД – супероксиддисмутаза.

3. ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОГО СТАТУСА РЫБ ПРИ АММИАЧНОМ ИНТОКСИКОЗЕ

3.1. Рост и общий обмен веществ.

Сравнительная характеристика молоди бестера после 123 суток выращивания выявила достоверное отставание темпа роста больных некрозом жабр рыб в 2 раза при меньшем на 13,5% коэффициенте упитанности по сравнению со здоровыми. На метаболическом уровне значимые изменения отмечены по всем компонентам пластических веществ. Отмечено угнетение синтеза белка более чем в 2 раза, липидов - более чем в 11 раз, минеральных веществ - почти на 20%, и энергии - почти в 3 раза и повышении концентрации углеводов в 1,9 раза (рис. 2).

В стрессовых ситуациях, когда энергетические траты организма повышаются на поддержание гомеостаза, повышается интенсивность глюконеогенеза. В этот процесс вовлекаются протеины и липиды, в ходе которого они используются для синтеза углеводов (Весельский, 1976; Бурлаченко, 2007). Вероятно, подобные изменения происходят и у рыб при аммиачном токсикозе. Причем в большей степени расходуются липиды.

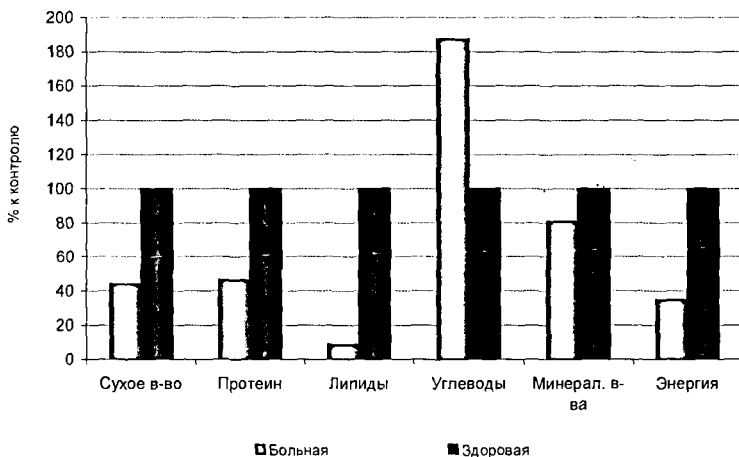


Рис. 2. Концентрация пластических веществ и энергии в единице прироста больной молодежи бестера, % от контроля (контроль принят за 100 %)

3.2. Липидный, жирнокислотный и энергетический обмен.

Известно, что при изменениях условий внешней и внутренней среды в адапционных реакциях организма существенное значение имеют липиды. При этом в обеспечении нормализации функционирования организма животных ведущими являются фосфолипиды и высшие полиненасыщенные жирные кислоты ряда $\omega 3$ и $\omega 6$, в частности, 18:3, 20:5, 22:5, 22:6, 18:2 и 20:4.

Сравнительный анализ общих липидов и фосфолипидов бестера выявил существенные различия в их количественном соотношении у больной и здоровой молодежи (табл. 1).

Таблица 1

Состав общих липидов и фосфолипидов молодежи бестера, %

Общие липиды, % липидов			Фосфолипиды, % фосфолипидов		
Показатели	Опыт	Контроль	Показатели	Опыт	Контроль
ТАГ	65,3±0,86	56,3±0,72	ИФ	1,2±0,04	3,1±0,11
ФЛ	16,1±0,37	24,6±0,41	ЛФХ	2,5±0,14	2,2±0,13
Х	7,5±0,04	8,1±0,1	СФМ	12,6±0,42	7,8±0,21
ЭХ	4,3±0,14	6,8±0,06	ФХ	42,4±4,43	54,3±0,72
МАГ	1,6±0,14	0,4±0,01	ФС	8,4±0,04	7,8±0,11
ДАГ	2,1±0,14	0,9±0,03	ФЭА	32,8±0,28	24,3±0,29
НЭЖК	3,1±0,11	2,9±0,12	К+ПГФ	0,1	0,5±0,01

У больных рыб уровень ТАГ и НЭЖК повысился почти на 15 и 7 %, МАГ - 4 раза, ДАГ - более чем 2 раза, а ФЛ и ЭХ уменьшился более чем на 34 и X - на 7,5 %. У больных рыб уровень ЛФХ почти на 14%, ФЭА - на 35%, а СФМ - на 62 % был выше по сравнению со здоровыми. Одновременно у больных рыб уменьшилось содержание ИФ почти в 2,5 раза, ФХ - на 22% и К+ПГФ на 80%. Согласно Е.Ю. Саутина (1989) и Г.Ф. Лесковой (2001) эти изменения в обмене веществ указывают на ослабление антиоксидантных систем и снижение резистентности организма в энергетическом отношении и, соответственно, об ухудшении физиологического статуса рыб при аммиачной интоксикации. Причем в энергетический обмен вовлекаются мембранные липиды, что подтверждается показателями липидного обмена - уменьшением соотношения ФЛ/ТАГ и ФХ/ФЭА более чем на 40 %, при одновременном повышении на ту же величину коэффициента Дьердии.

Существенные количественные изменения отмечены в составе жирных кислот ряда $\omega 3$ и $\omega 6$. У больной молодежи по сравнению со здоровыми рыбами повышается уровень $\omega 6$ кислот и снижается содержание $\omega 3$ кислот (рис. 3).

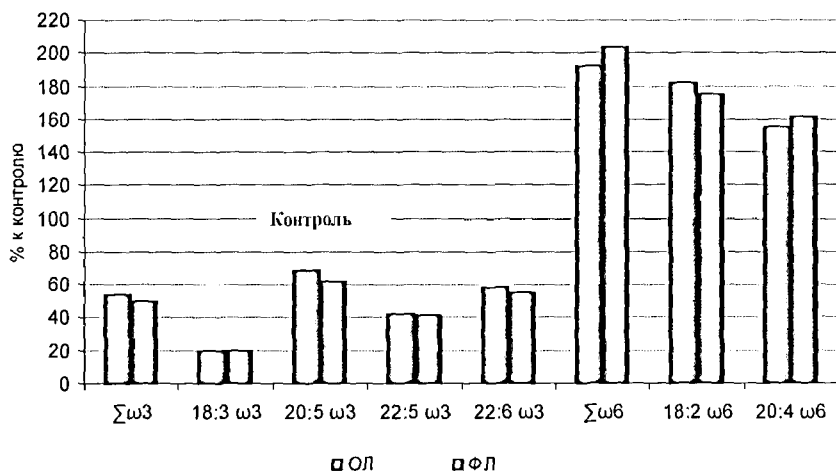


Рис. 3. Изменения содержания некоторых жирных кислот у больной молодежи бестера, % к контролю (контроль принят за 100 %): ОЛ – общие липиды, ФЛ – фосфолипиды

Так, сумма $\omega 6$ кислот в общих липидах и фосфолипидах больных рыб соответственно в 1,9 и 2,0 раза была больше, а сумма $\omega 3$ кислот - на 46 и 50 % меньше по сравнению со здоровой молодью.

Количественные изменения суммы $\omega 6$ кислот у больных рыб обусловлены в основном повышением уровня 18:2 и 20:4 жирных кислот в 1,8 и 1,5 раза в общих липидах и 1,7 и 1,6 раз в фосфолипидах.

Снижение уровня суммы $\omega 3$ кислот в общих липидах и фосфолипидах значительной степени обусловлено уменьшением содержания жирных кислот 18:3 в 5 раз, 20:5 – 1,4-1,6 раза, 22:5 - более чем в 2 раза и 22:6 - 1,7 -1,8 раза по сравнению со здоровыми рыбами. Отмеченные изменения количества жирных кислот определили и соотношение $\omega 3/\omega 6$, которое у больной молодежи более чем в 3,5 раза было меньше, чем у здоровой.

Существенное снижение у больных рыб высоконенасыщенных жирных кислот $\omega 3$ ряда, являющихся протекторами экстремального состояния, свидетельствует о повышенных их тратах в процессе обмена веществ на поддержание антиоксидантного равновесия организма (Саутин, 1989; Абросимов, 2004).

Анализ накопления отдельных липидов у больной молодежи бестера показал снижение данного показателя у них более чем в 4,5 раза. Эти изменения свидетельствуют о нарушениях в структурной организации мембран митохондрий, в частности, в регуляции активности ферментных систем дыхательной цепи (Карагезян и др., 1990).

3.3. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система.

Наряду с биохимическими изменениями, адекватно отражающими физиологическое состояние организма, важными являются показатели ПОЛ, активность антиоксидантной и ферментативной систем.

Анализ состояния ПОЛ у молодежи бестера показал повышение активности данного процесса при поражении жабр. Так, у больных рыб существенно повысился уровень гидроперекисей: ДК более чем на 37 %, МДА – на 54 % и ОШ – на 64 %. Одновременно у них понизилась активность СОД более чем на 20 %, а также содержание α -токоферола - почти на 23 %, витамина С - на 33 % и витамина А - в 2 раза (рис. 4).

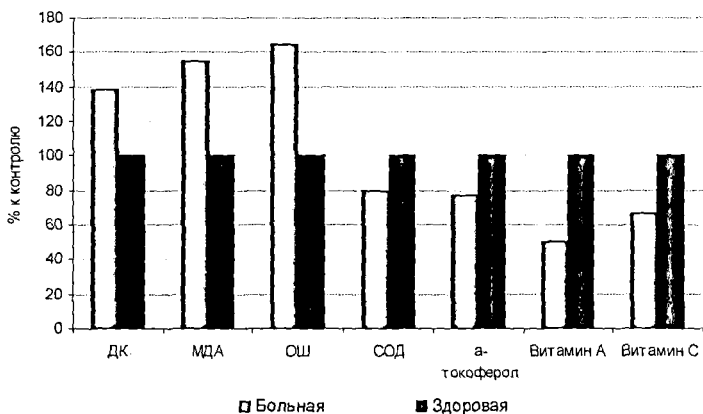


Рис. 4. Изменения уровня гидроперекисей, антиоксидантов и витаминов у больной молоди бестера, % к контролю (контроль принят за 100 %): ДК - диеновые конъюгаты, МДА - малоновый диальдегид, ОШ - основания Шиффа

Снижение содержания витамина А в 2 раза у больных рыб согласуется также с более низким у них в 1,7-1,8 раз уровнем 22:6 жирной кислоты.

Известно, что аммиачная интоксикация влияет на организм рыб на клеточном уровне, воздействуя на клеточные структуры и нарушая процессы клеточного и тканевого дыхания, т.к. аммиак при избыточном содержании связывает некоторые кислоты, являющиеся субстратами цикла Кребса. Как следствие изменяется активность оксидегидрогеназ. При некрозе жабр у молоди бестера наблюдается снижение активности: лактатдегидрогеназы в 1,8, малатдегидрогеназы в 2,3 и сукцинатдегидрогеназы в 2,8 раз (табл. 2).

Таблица 2

Активность некоторых оксидегидрогеназ у молоди бестера,
(мкМ NADH x мг белка / мин) x 10²

Ферменты	Больная	Здоровая
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	17,1±0,2	30,1±1,0
Малатдегидрогеназа	20,3±0,4	47,2±0,3
Сукцинатдегидрогеназа (СДГ)	10,1±0,4	28,6±0,8
СДГ/ЛДГ	0,6	0,9

Соответственно соотношение СДГ/ЛДГ уменьшается в 1,5 раза. Вследствие этих изменений нарушаются реакции гликолиза и глюконеогенеза, син-

тез жирных кислот, что подтверждается нашими данными снижения уровня последних, особенно полиненасыщенных жирных кислот $\omega 3$ ряда (Абросимова, Абросимова, 2006). Можно предположить, что при этом у рыб нарушается ферментно-транспортный конвейер, что подтверждается повышением активности кислой фосфатазы в печени и кишечнике в 1,5 раза, щелочной фосфатазы - соответственно в 1,9 и 1,6 раз, и снижением активности липазы в 1,8 раз.

Полученные данные об активации процессов ПОЛ, изменении уровня антиоксидантов и активности оксидегидрогеназ, фосфатаз и липазы позволяют предположить профилактику и, возможно, терапию данного заболевания за счет дополнительного введения в рацион рыб препаратов, способных сорбировать эндогенный аммиак и компенсировать повышенные энергозатраты. Важным элементом при этом является поддержание антиоксидантной системы на должном уровне.

3.4. Гематологические показатели.

По результатам наших исследований уровень аммиака в крови больных рыб более чем в 2 раза превышал данный показатель по сравнению с здоровой, при понижении содержания гемоглобина на 25,6 %, что, вероятно, связано со снижением интенсивности дыхания в связи с заболеванием жабр и, соответственно, уровня обмена веществ, что подтверждается литературными данными (Остроумова, 1957; Ассман, 1960).

Доминирующими реакциями крови рыб при аммиачной интоксикации были - снижение эритропоза на 43 %, увеличение в лейкоцитарной формуле доли нейтрофилов в 1,8 и эозинофилов в 1,5 раза, уменьшение числа лимфоцитов на 30 %, что также подтверждается литературными данными при патологии рыб (Ассман, 1960; Вихляева, 2000; Абросимова, 2006).

4. АНАЛИЗ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ АММИАЧНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Изучение процессов происходящих при развитии жаберного некроза, вызванного аммиачной интоксикацией, позволяют правильно понять молекулярный механизм возникновения и протекания патологии, и, следовательно, изыскать пути оптимизации лечебно-профилактических мероприятий. Особое вни-

мание мы уделили изменениям в содержании пластических веществ, так как они отражают степень участия в метаболизме при рассматриваемой патологии.

Отставание больных рыб в темпе роста свидетельствует о нарушении пластического обмена и, прежде всего, синтеза белка. В этом случае аминокислоты используются в липонезе, глюконеогенезе или энергетическом обмене (Coweу, 1975; Хоар и др., 1983; Щербина, Гамыгин, 2006). Поэтому увеличение содержания протеина в кормах для нормализации обменных процессов нецелесообразно, так как будет способствовать более интенсивному накоплению эндогенного аммиака в организме рыб и усиливать развитие жаберного некроза.

Повышенное содержание углеводов у больных рыб свидетельствует о незначительном их вовлечении в энергетический обмен, что подтверждается снижением активности лактатдегидрогеназы. В то же время происходит повышение интенсивности глюконеогенеза, что отражается в снижении содержания протеинов и липидов у больной молодежи. В связи с этим отсутствует возможность восполнения энергетических потребностей рыб с жаберной патологией за счет введения в корм углеводовных компонентов.

Изучение липидного статуса показало, что у больных рыб наблюдаются изменения во всех липидных фракциях, что отражает глубокие изменения в метаболизме. Анализ динамики липидного обмена молодежи бестера с поражением жабр показал следующее:

- происходит интенсивное расщепление липидов, вызванное компенсаторными реакциями организма на действие аммиака;
- в энергетический обмен включаются фракции структурных липидов, содержащие полиеновые жирные кислоты.

Рыбы обладают ограниченной способностью к синтезу жирных кислот и состав липидов в их организме определяется количеством и качеством поступающей пищи. (Гершанович и др., 1991). Доказано, что среди полиеновых кислот особую роль играет самая ненасыщенная из них - 22:6 ω 3. Недостаточность этой кислоты приводит к резкому снижению устойчивости рыб к экстремальным воздействиям (Шульман, 1990).

Важной характеристикой липидов рыб является соотношение ω 3/ ω 6 кислот. В норме этот показатель для осетровых рыб составляет 1,3-1,5 (Абросимова, 1997). Ввиду отмеченных изменений отношение ω 3/ ω 6 у рыб больных

некрозом жабр было существенно (более чем в 2 раза) ниже физиологической нормы. Полученные результаты можно рассматривать как свидетельство патофизиологических перестроек в организме больных рыб.

Таким образом, в результате реакции организма на аммиачный токсикоз и поражение жабр у больных рыб повышаются энерготраты за счет мембранных липидов. Причем наиболее уязвимыми являются фосфолипидный и жирнокислотный обмен, в частности линоленового ряда, а также антиоксидантная система. Можно предположить, что с целью профилактики и лечения незаразного некроза жабр и, соответственно, для нормализации клеточного метаболизма целесообразно обогащать рацион рыб липидами с преимущественным содержанием жирных кислот $\omega 3$ ряда и антиоксидантами. Таким компонентом, как нам представляется, является кормовая липидная добавка, содержащая до 20 % фосфолипидов, около 56 % полиеновых жирных кислот, в том числе 40 % $\omega 3$ кислот при соотношении $\omega 3/\omega 6$ равном 2,1 и 2,5 мг/кг β -каротина – антиоксиданта и предшественника витамина А.

5. ПРОФИЛАКТИКА АММИАЧНОГО ИНТОКСИКОЗА РЫБ И ЛЕЧЕНИЕ

5.1. Результаты профилактики.

Изучение возможности профилактики аммиачной интоксикации у молоди бестера проводили, используя 3 количественных уровня липидной добавки (ЛД) по следующей схеме (рис. 5).

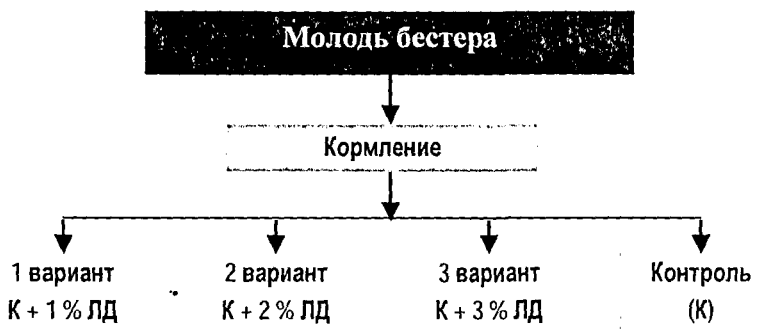


Рис. 5. Схема опыта по профилактике аммиачной интоксикации

В опытных кормах рыбий жир заменяли соответствующим количеством липидной добавки (ЛД). Экспериментальное кормление проводили в условиях по многим параметрам превышающим технологические нормы, в частности более высокой температуры и pH, повышенным уровнем NH₃ и нитритов, низким уровнем фосфатов, Cu и Mg - выше ПДК и т.д. При отборе молоди бестера мы руководствовались методом групп-аналогов, в связи с чем, различия начальной массы рыб по вариантам были незначительными (табл. 3).

Таблица 3

Рыбоводно-биологические показатели бестера при выращивании на кормах с различным содержанием липидной добавки

Показатели	Варианты кормов			
	1	2	3	Контроль
Масса, г:				
начальная	3,25±0,24	3,31±0,30	3,57±0,25	3,32±0,29
конечная	133,35±5,56	169,96±7,52	170,98±8,33	129,10±11,59
Темп роста, г/сут.	1,74	2,22	2,23	1,68
Выживаемость, %	85	87	88	79
Заболевшие рыбы, %	2	0	0	32
КУ _ф	0,57±0,01	0,59±0,01	0,60±0,01	0,53±0,02
Затраты корма, г/г прироста	1,2	1,1	1,1	1,4
ЭИП, %	32,72	35,51	33,69	26,78
ЭИЭ, %	32,37	38,35	37,98	25,59

Введение в рацион липидной добавки способствовало повышению темпа роста молоди бестера до 33 % , выживаемости - до 11,4% и упитанности - до 13,2 %. Кормовые затраты снизились на 0,2-0,3 ед., повысилась конверсия корма. Лучшие результаты были в 2 варианте, где ЭИП и ЭИЭ более чем на 33 % были выше, чем в контроле. При добавлении к корму 1 % липидной добавки количество заболевших рыб уменьшилось в 16 раз, а при 2 и 3 % - все рыбы были здоровы.

Следовательно, 2 и 3% липидного препарата в составе рациона при ухудшении условий содержания рыб оказывает профилактическое действие при аммиачной интоксикации.

5.2. Результаты лечения.

Для восполнения дефицита эссенциальных жирных ω3 кислот и стабилизации антиоксидантной защиты в рацион бестера вводили липидный препа-

рат в количестве 2 % с учетом равнозначности ее действия с вводом 3 % липидной добавки при профилактике некроза жабр. При отборе молоди бестера в данном эксперименте мы также руководствовались методом групп-аналогов. Лечебное кормление проводили по следующей схеме (рис. 6).

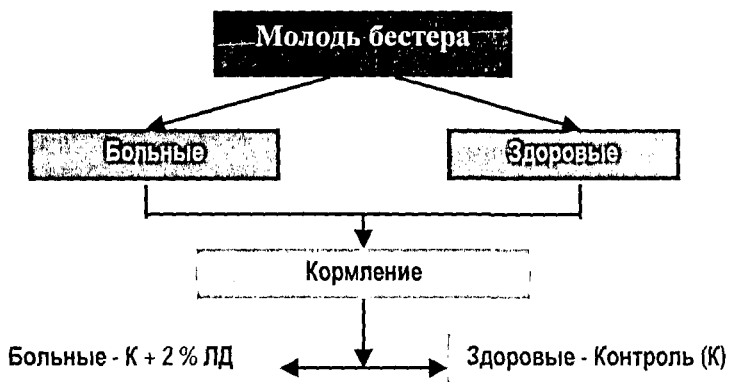


Рис. 6. Схема опыта по лечению некроза жабр молоди бестера

5.2.1. Липидный, жирнокислотный и энергетический обмен сеголеток бестера после лечения.

При визуальном осмотре через 15 суток кормления у больных рыб отмечали выздоровление жабр (жабры очистились от некротической ткани и приобрели свойственный им темно-красный цвет). В этот же период гибель больных рыб была единичной. В дальнейшем потерь молоди не наблюдали.

Как показали результаты наших исследований, через 35 суток по завершении лечебного кормления у больных сеголеток бестера существенно (от 3 до 4 раз) снижился уровень МАГ, ДАГ и НЭЖК и, в меньшей степени, ТАГ. Изменения отмечены и в фосфолипидном спектре: значительно повысился уровень ИФ и ФС (почти в 2 раза) и К+ПГФ (в 7 раз). В целом липидный состав рыб после лечебного кормления указывает на стабилизацию липидного обмена (табл. 4), что отражено и в его показателях, которые составили: ФЛ/ТАГ - 0,6, коэффициент Дьердии - 0,3 и ФХ/ФЭА - 0,4, в контроле соответственно 0,7, 0,3 и 0,5.

Состав общих липидов и фосфолипидов молоди бестера
после лечебного кормления

Общие липиды, % липидов			Фосфолипиды, % фосфолипидов		
Показатели	Опыт	Контроль	Показатели	Опыт	Контроль
ТАГ	50,4±1,5	45,1±0,6	ИФ	2,7 ±0,14	1,8±0,1
ФЛ	29,8±0,1	28,9±0,5	ЛФХ	2,2±0,04	2,5±0,1
Х	9,7±0,2	10±0,2	СФМ	9,2±0,65	7,7±0,3
ЭХ	7,9±0,3	7±0,7	ФХ	56,5±0,92	56,7±0,6
МАГ	0,7±0,04	1,7±0,2	ФС	4,4±0,14	5,1±0,3
ДАГ	0,7±0,1	2,6±0,1	ФЭА	24,3±0,71	25,4±0,4
НЭЖК	0,8±0,3	5,3±0,7	К+ПГФ	0,7±0,04	0,5±0,04

Наряду с положительной динамикой общего липидного обмена у молоди после лечебного кормления отмечилось улучшение жирнокислотного статуса. Об этом свидетельствуют хотя и небольшое, но превышающее уровень 20:5, 22:5 и 22:6 кислот в контроле на 11,6; 5,6 и 6 % соответственно (рис. 7).

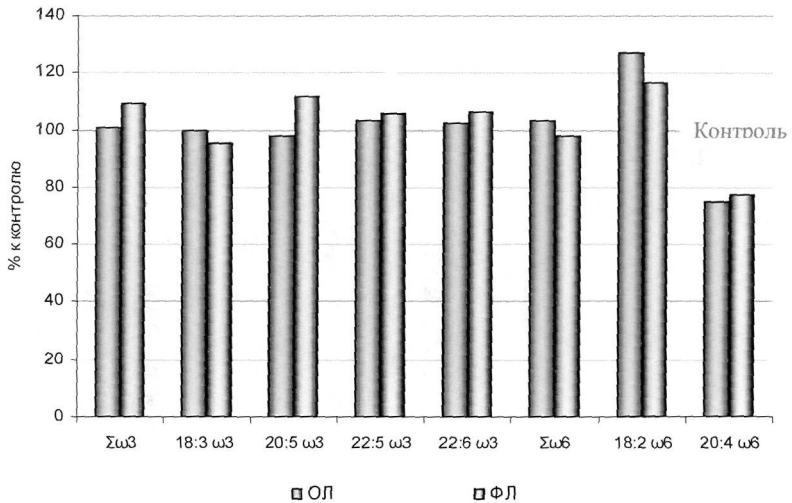


Рис. 7. Изменения содержания некоторых жирных кислот у молоди бестера после лечебного кормления, % к контролю (контроль принят за 100 %)

В положительную сторону изменился баланс между ω3 и ω6 кислотами, который после лечебного кормления был на уровне контрольных сеголеток и

составил 1,8-2,3 ед.

Полученные результаты после лечебного кормления сеголеток бестера свидетельствуют о нормальном протекании обменных процессов с преобладанием синтеза над расходом на энергетические нужды структурных липидов и эссенциальных жирных кислот $\omega 3$ и $\omega 6$, повышении устойчивости клеточных мембран и снижении уровня образования свободных радикалов и, соответственно ПОЛ.

5.2.2. Состояние процессов перекисного окисления липидов у сеголеток бестера после лечения.

Нормализация липидного и жирнокислотного обмена у сеголеток после лечебного кормления и, соответственно, улучшение их физиологического состояния может свидетельствовать о стабилизации у них процессов ПОЛ. Это подтверждается снижением активности гидроперекисей, уровень которых у сеголеток после лечебного кормления был близок контрольной молодежи. При этом активность антиоксидантов повысилась более чем: СОД - на 17 %, α -токоферола - на 38 %, витамина А - на 12 % и С - на 41 % (рис. 8).

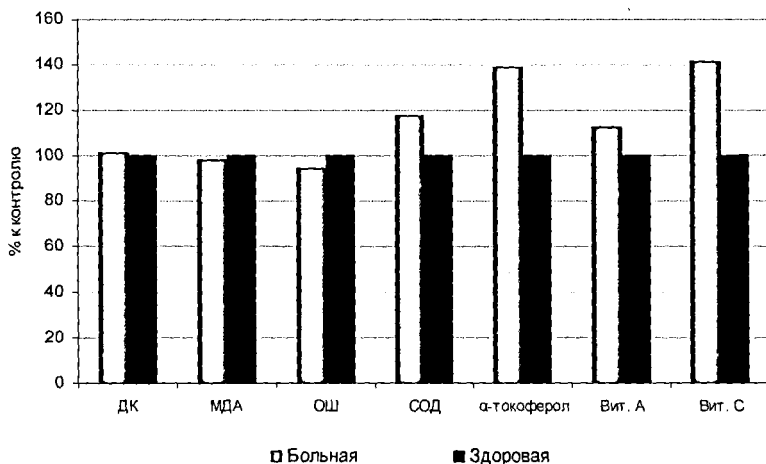


Рис. 8. Изменения уровня гидроперекисей, антиоксидантов и витаминов у молодежи бестера после лечебного кормления, % к контролю (контроль принят за 100 %):

Повышение содержания витамина А определяется введением в рацион рыб β -каротина в составе липидной добавки и повышением относительного

содержания суммы жирных кислот 20:5+22:6, а также 22:6.

Об улучшении физиологического состояния сеголеток и стабилизации ПОЛ после лечебного кормления свидетельствует также увеличение активности оксидегидрогеназ: лактатдегидрогеназы более чем в 1,6 раза, малатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы почти в 2, 5 и 3 раза, соответственно (табл. 5).

Таблица 5

Активность некоторых оксидегидрогеназ у молоди бестера после лечебного кормления, (мкМ NADH x мг белка / мин) x 10⁻²

Ферменты	Опыт	Контроль
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	28,6±0,2	30,6±1,0
Малатдегидрогеназа	49,2±0,4	* 50,6±0,3
Сукцинатдегидрогеназа (СДГ)	29,4±0,4	30,2±0,8
СДГ/ЛДГ	1,02	0,99

Соотношение СДГ/ЛДГ у опытных и контрольных рыб соответствовало физиологической норме (≈ 1), что и свидетельствует о равновесии внутреннего окислительно-восстановительного цикла гликолиза и электронотранспортной дыхательной цепи в цикле Кребса.

Приведенные данные о состоянии перекисного окисления липидов у сеголеток бестера после лечебного кормления указывают на снижение у них аммиачной интоксикации, следствием чего является улучшение их физиологического состояния и, соответственно, выздоровление.

5.2.3. Состояние крови сеголеток бестера после лечения.

После лечебного кормления у сеголеток бестера отмечены положительные изменения состава крови: содержание аммиака уменьшилось до 2,0 мг/дм³ (у здоровых - 2,2 мг/дм³), повысился уровень гемоглобина при отличиях от контроля не более чем на 3,5 %. По показателю гематокрита обе группы молоди практически не отличались. Повысилась у них интенсивность эритропоэза в 2,2 раза, отличаясь от контроля на уровне 10 %, возросло количество лейкоцитов почти на 46 % и уменьшилось в 2 раза число нейтрофилов. Несмотря на некоторые отличия, которые, по-видимому, являются следствием нарушения функции жабр в период болезни и длительного восстановительного периода, показатели красной и белой крови у обеих групп рыб соответство-

вали физиологической норме.

Таким образом, кормовая липидная добавка в количестве 2 % в составе корма способствует выздоровлению сеголеток бестера, улучшению их липидного и жирнокислотного статуса и состоянию крови. Следовательно, в соответствующих количествах она может использоваться как в профилактических целях, так и в качестве лечебного средства при поражении жабр от аммиачного токсикоза.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование физиолого-биохимического статуса молоди бестера при аммиачной интоксикации было направлено на определение наиболее значимых изменений в организме рыб с целью предупреждение и лечения этой патологии в условиях рыбоводных хозяйств.

Основные выводы диссертационной работы заключаются в следующем:

1. При аммиачной интоксикации и, как следствие, поражении жабр у молоди бестера достоверно снижается темп роста, упитанность, пластический обмен и выживаемость.

2. При некрозе жабр аммиачной природы у молоди снижается накопление и концентрация питательных веществ и энергии в теле, что указывает на дефицит энергии у больных рыб и компенсаторные реакции за счет использования липидов.

3. У больной молоди развивается дисбаланс процессов гидролиза и синтеза отдельных липидных фракций, о чем свидетельствуют основные показатели липидного обмена: соотношение фосфолипиды/триацилглицерины и фосфатидилхолины/фосфатидилэтаноламины уменьшается более чем на 40 %, коэффициент Дьердий увеличивается на 42 %.

4. У больных рыб для поддержания гомеостаза внутренней среды организма преимущественно используются высоконенасыщенные жирные кислоты линоленовая, эйкозапентаеновая, докозапентаеновая и докозагексаеновая, относительное содержание которых снижается соответственно в 5; 1,5; 2 и 1,8 раз. Нарушается баланс $\omega 3$ и $\omega 6$ кислот, соотношение которых ($\omega 3/\omega 6$) уменьшается более чем в 3 раза, составляя в общих липидах и фосфолипидах 0,4-0,5, что свидетельствует о неудовлетворительном физиологическом со-

стоянии рыб.

5. У рыб при жаберном некрозе, вызванном аммиачной интоксикацией, повышается активность перекисного окисления липидов, что подтверждается повышением уровня гидроперекисей и снижением активности антиоксидантной системы и оксидегидрогеназ, а также баланса между сукцинатдегидрогеназой и лактатдегидрогеназой, т.е. нарушениями в цикле Кребса. Понижается также активность фосфатаз и липазы.

6. Доминирующими реакциями крови при поражении жабр вследствие аммиачной интоксикации являются снижение эритропоза, увеличение в лейкоцитарной формуле доли нейтрофилов и эозинофилов, уменьшение числа лимфоцитов.

7. Для профилактики аммиачной интоксикации и лечения жабр целесообразно вводить в состав рациона 2 % липидной добавки, которая оказывает следующие биологические и физиолого-биохимические эффекты:

- выздоровление жабр - очищение от некротической ткани и восстановление свойственного им темно-красного цвета в течение 2-х недель;
- повышение темпа роста, выживаемости и упитанности, а также конверсии корма на пластический обмен;
- нормализация липидного и жирнокислотного обмена, восстановление баланса жирных кислот линоленового и линолевого рядов, соответствующего физиологической норме для осетровых рыб;
- стабилизация активности перекисного окисления липидов с тенденцией уменьшения его продуктов на фоне повышенного уровня естественных антиоксидантов и активности дегидрогеназ, фосфатаз и липазы;
- нормализация состава крови: повышение содержания гемоглобина и интенсивности эритропоза, увеличение числа лимфоцитов и снижение доли нейтрофилов и эозинофилов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для повышения результативности выращивания молоди рыб, в том числе при искусственном воспроизводстве, за счет предупреждения аммиачной интоксикации и лечения жабр рекомендуем:

- кормовую липидную добавку, содержащую до 20 % фосфолипидов, около 56 % полиеновых жирных кислот, в том числе 40 % $\omega 3$ при соотношении $\omega 3/\omega 6$ равном 2,1 и 2,5 мг/кг β -каротина, в качестве средства для профилактики аммиачной интоксикации и терапии незаразного жаберного некроза;

- в корм для молоди рыб вводить 2 % кормовой липидной добавки при замене соответствующего количества других жиров;

- для улучшения физиологического состояния рыб, повышения резистентности к заболеваниям и повышения адаптационной пластичности к неблагоприятным условиям использовать липидную добавку в качестве постоянного компонента комбикормов.

Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Абросимова Е.Б., Абросимова К.С. Диагностическое значение физиолого-биохимических показателей при некоторых заболеваниях рыб//Сб. научных тр. «Наука, техника и высшее образование: проблемы и тенденции развития»: Изд-во Ростовского ун-та, 2006.- С. 187-194.

2. Абросимова Н.А., Абросимова Е.Б. Изменение направленности липидного обмена молоди бестера при жаберном некрозе// Материалы докладов IV международной научно-практической конференции «Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития. Астрахань, 13-15 марта 2006 г.». Астрахань: изд-во ВНИРО, 2006.- С. 219-222.

3. Абросимова Е.Б. Влияние аммиака в крови бестера на ее состояние// Актуальные проблемы современной науки и образования: Межвузовский сборник научных трудов.- Ростов-на-Дону: Изд-во Рост. Ун-та, 2006.- С. 205-207.

4. Абросимова Е.Б. Профилактика жаберного некроза в условиях интенсивного рыбоводства// Состояние и перспективы развития фермерского рыбоводства аридной зоны: Тезисы докладов международной научной конференции (г. Азов, 6-8 июня 2006 г.).- Ростов-на-Дону: Изд. ЮНЦ РАН, 2006.- С. 9-11.

5. Абросимова Е.Б., Абросимова К.С. Значение питания в лечении и профилактике заболеваний, вызванных нарушением технологий и стрессами// Сб. научных тр. «Наука, техника и высшее образование: проблемы и тенден-

ции развития»/ Под ред. проф. Мозолина В.П., проф. Голубенко А.Л.- Изд-во РСЭИ, 2008.- С. 147-150.

6. Абросимова Е.Б. О некоторых проблемах фермерских рыбоводных хозяйств юга России// Труды XIII Международной научно-практической конференции «Стратегия развития пищевой промышленности», 27-28 ноября 2007 года, выпуск 12, том 2.- М.: ООО «Газета «Авоська», 2007.- С. 3-6.

7. Абросимова Е.Б., Тарасов Е.К. Особенности гемопозеза при некрозе жабр сеголеток бестера/ Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: Материалы 2-й Междунар. научн. конференции, Ростов-на-Дону, 8-10 октября 2008 г.- Ростов-на-Дону: Изд. ЮФУ, 2008.- С. 14-15.

8*. Абросимова Е.Б. Направленность обмена веществ при некрозе жабр у молоди бестера// Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. естественные науки.- 2009.- № 2.- С. 82-84.

9*. Абросимов С.С., Абросимова Е.Б. Показатели липидного и жирнокислотного обмена молоди бестера при некрозе жабр/ Труды Кубанского гос. Аграрного университета.- 2009.- № 1 (16).- С. 149-153.

10*. Абросимов С.С., Абросимова Е.Б. Физиологические и биохимические изменения у осетровых рыб при жаберном некрозе/ Труды Кубанского гос. Аграрного университета.- 2009.- № 2 (17). – С. 103-107.

11. Абросимова Е.Б. Незаразный жаберный некроз: профилактика и лечение/ Актуальные проблемы современной науки и образования: межвузовский сборник научных трудов.- Ростов н/Д: Изд-во ЮФУ, 2009.- С. 387-392.

Примечание: * - публикации в журналах, рекомендованных ВАК.

Подписано в печать 13.07.2009 г. Формат 60x84/16.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Объем 1,0 усл. печ. л.
Тираж 100. Заказ № 29/07.
Отпечатано в типографии ООО «Диапазон».
344011, г. Ростов-на-Дону, пер. Островского, 124
Лиц. ПЛД № 65-116 от 29.09.1997 г.