

МОСКОВСКИЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА, ОРДЕНА ОКТЯБРЬСКОЙ РЕВОЛЮЦИИ И
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. В. ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

На правах рукописи

УДК: .639.3.03.+597-11

ЙЭНЭИ Жигмонд

ВЛИЯНИЕ СТРЕССОРНЫХ ФАКТОРОВ РЫБОВОДСТВА НА
НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАРПА

Специальность 03.00.18 - гидробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 1990

Работа выполнена в Научно-исследовательском Институте Рыбоводства, г. Сарваш (ВНР) и Институте Биологии Внутренних Вод им. И. Д. Папанина АН СССР.

Научный руководитель:
доктор биологических наук, Б. А. Флёров.

Официальные опоненты:

Ведущее учреждение:

Защита диссертации состоится " " 199 г.
в " " часов на заседании специализированного совета
при Московском Государственном Университете им. М. В. Ломоносова по адресу 119899 Биологический факультет

С ди
ческого фак

Биологи-

Автор:

Учёный секре
специализиро

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время водная среда постоянно подвергается действию различного рода загрязняющих веществ. В воду в той или иной форме попадают почти все отходы человеческой деятельности и это становится фактором, ограничивающим жизнь во многих водоёмах. У некоторых видов рыб отмечено уменьшение численности, снижение способности к воспроизводству и сопротивляемости к заболеваниям (Lindström-Seppa и Pesonen, 1986).

При введении в рыбоводство интенсивных технологий разведения допускается "запланированное" ухудшение качества воды. В целях повышения рыбопродуктивности проводят ряд специальных мероприятий: увеличивают плотности посадок, вносят органические и неорганические удобрения для увеличения естественной кормовой базы, кормят рыб комбикормами с высоким содержанием белка. Такие мероприятия приводят к накоплению продуктов обмена в воде, ухудшают качество водной среды, что способствует возникновению массовых заболеваний у рыб. В свою очередь это заставляет проводить хемотерапевтические работы для предупреждения и лечения заболеваний, хотя большинство используемых в этих целях веществ являются чужеродными для рыб. Таким образом, интенсивная технология включает в себя множество целенаправленных вмешательств, отрицательно влияющих на организм рыб.

С другой стороны в настоящее время нельзя отказаться от вышеперечисленных методов интенсификации рыбоводства. Решением проблемы является создание таких технологий, которые в меньшей степени наносят вред рыбам. Для этого необходимы зна-

ВНРО

№

Библиотека

ния физиолого-биохимического состояния рыб в условиях использования интенсивных технологий.

Цель и задачи исследования. Цель работы - изучение влияния стрессорных факторов интенсивного рыбоводства на физиолого-биохимические показатели карпа. Основное внимание было уделено решению следующих задач:

1. Изучить стрессорную реакцию карпа на уровнях первичного и вторичного ответа организма на стресс, а также на уровне целого организма.

2. Изучить влияние некоторых естественных стрессорных факторов интенсивного рыбоводства на организм карпа.

3. Изучить влияние антропогенных факторов интенсивного рыбоводства на организм карпа.

4. Разработать рекомендации по усовершенствованию технологии выращивания карпа путём снижения у него стрессорного состояния.

Теоретическое значение и научная новизна. Проведено фундаментальное изучение стрессорной реакции карпа на уровнях первичного и вторичного ответа организма на стресс, а также на уровне целого организма. В результате комплексных исследований впервые получены основные данные о системе связей между организмом карпа и водной средой обитания в условиях интенсивного рыбоводства. Впервые описаны характерные изменения уровня гормонов (адреналина, норадреналина, кортизола) карпа под воздействием естественных и антропогенных стрессорных факторов. Создана новая система клинко-диагностических параметров для карпа.

Впервые доказано негативное влияние антипаразитарного

препарата - трихлорфона - на рост карпа и его восприимчивость к инфекционному заболеванию.

Установлено *in vitro*, что продукты распада трихлорфона в течении двух недель в воде сохраняют способность ингибировать ацетилхолинэстеразы мозга и плазмы карпа.

Практическое значение. Результаты комплексных исследований имеют непосредственное значение для практики, поскольку изучавшиеся стрессорные факторы широко представлены в рыбоводстве. С помощью системы клинко-диагностических параметров возможен подбор надёжных критериев установления стрессового состояния у карпа.

Выявлен характер стрессовой реакции при резких перепадах температур. Установленное стрессорное действие аммиака свидетельствует о недопустимости появления его в высоких концентрациях в рыбоводных прудах. Негативное влияние хендлинга, пребывания на воздухе и искусственного размножения можно частично уменьшить благодаря применению анестетиков (МС-222 в концентрации 50 мг/л, пропанидид в концентрации 3 мл/л). Доказана нецелесообразность использования в рыбоводстве анестетиков ихтиокалма и 2-феноксизанола, поскольку они оказывают негативное воздействие на организм рыб.

Установлено, что высокие (2500 мг/л) и средние (50 мг/л) концентрации трихлорфона вызывают интоксикацию у рыб, угнетают рост и повышают восприимчивость к инфекционным заболеваниям. В связи с этим необходимо пересмотреть технологию применения трихлорфона в рыбоводстве.

Метод измерения у карпа чувствительности ацетилхолинэстеразы к трихлорфону *in vitro* может быть использован для обна-

ружения фосфорорганических соединений в воде.

Апробация работы. Материалы работы докладывались на международных конференциях и конгрессах: XXIth Congress of the International Union of Physiological Sciences, 25th Congress of the European Society of Toxicology, 16th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, 5th Meeting European Society for Neurochemistry, Third International Conference of European Association of Fish Pathologist, Sixth Congress of European Ichthyologists.

Публикации. Основные материалы диссертации опубликованы в 65 печатных работах.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения с литературным обзором, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 147 страницах машинописного текста, включая 51 рисунок и 9 таблиц. Библиография содержит 210 наименований, из них 12 на русском и 198 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная работа выполнена в 1980-1988 гг. в лаборатории болезней рыб Научно-исследовательского института рыбоводства (г. Сарваш, ВНР). Большая часть исследований проведена на экспериментальных установках, в которых окружающая среда контролировалась, а также в полупроизводственных и производственных условиях.

В каждом опыте рыб адаптировали к исходным условиям эксперимента по меньшей мере в течении 72 ч. Во время кратко-

срочных опытов рыб не кормили, в случае одноразового кормления пробы брали всегда перед едой, а при многократном - через 8 ч после последнего приёма пищи. Основные параметры опытных рыб и условий опыта представлены в табл. 1.

Кровь брали из хвостовых сосудов. Плазму получали центрифугированием крови (3000 обор/мин., 10 мин при +4°C). Для определения катехоламинов готовили навески (около 1 г) из почек, сердца, мозга, мышц, жабр. Ткань гомогенизировали в растворе для фиксации. Гомогенаты центрифугировали в течении 10 мин при 15000 обор/мин при +4°C. Из надосадочной жидкости экстрагировали катехоламины. Для определения активности ацетилхолинэстеразы в мозгу брали целый мозг, который гомогенизировали в физиологическом растворе (на 100 мг ткани 1 мл раствора).

Уровень кортизола в плазме определяли методом РИА (радиоимунной реакции). Определение катехоламинов проводили по методу Anton и Saure (1962). Концентрацию глюкозы в плазме определяли ферментным методом ГОД/ПОД/ПАП. Значение гематокрита определяли микрогематокритным методом, лейкоцита - на гематокритном капилляре с помощью микроскопа. Концентрацию гемоглобина определяли цианметгемоглобиновым методом. Значение содержания гемоглобина на единицу поверхности эритроцита (МСНС) вычисляли по формуле:

$$\text{МСНС} = \frac{\text{гемоглобин (ммол/л)} \times 100}{\text{гематокрит (\%)}}$$

Концентрацию общего белка в плазме определяли биуретным методом, ионов кальция и хлора - прямым колориметрическим микрометодом. Определение ацетилхолинэстеразы проводили колориметрическим методом Ellman и Courtney (1961), а белка в

Табл.1. Основные параметры рыб и экспериментальных условий.

Фактор среды	Кол-во рыб	Масса рыб г	Основная характеристика опыта	Время взятия проб (и-исходная)	Исследуемые параметры рыб
Резкое снижение (на 16°C) и повышение (на 15°C) температуры (22-6°C)	40	750-800	200 л проточные бассейны	и, 5, 30 мин 1 ч	адреналин, норадреналин глюкоза, гематокрит, гемоглобин, ион кальция
Резкое снижение и повышение температуры на 5°C (30-5°C)	185	70-100	50 л проточные бассейны, аэрация	10, 20 мин; 1, 2, 3, 6 и 24 ч	адреналин, норадреналин глюкоза
Постепенное снижение (1°C/день) температуры (24-17°C)	40	200-250	2000 л проточные бассейны	ежедневно	адреналин, норадреналин глюкоза, гематокрит, гемоглобин
Сублетальный уровень аммиака (500-2000 мг/л)	45	40-50	12 л проточные аквариумы, аэрация, 15, 18, 20°C	и, 24, 48, 72, 96 ч	адреналин, норадреналин
Пребывание на воздухе (асфиксия)	10	350-400	100 л проточные бассейны	10 мин	адреналин, норадреналин глюкоза, гематокрит, гемоглобин
Влияние трихлорфона: - в период обработки (2500 мг/л-20 мин; 50 мг/л-6 ч; 0,5 мг/л-24 ч)	40	300-350	80 л бассейны, аэрация, 24°C	и, 5, 20, 30 мин; 1, 6, 24 ч	адреналин, норадреналин глюкоза, гематокрит, гемоглобин, ацетилхолинэстераза
- на рост: 50 мг/л-6 ч	400	15-20	500 л проточные бассейны (обработка без проточности, с аэрацией), 24°C	5, 30 мин; 1, 4 ч, еже- дневно до 11 дней, еже- дневно до 6 недель	рост, ацетилхолинэстераза
0,5 мг/л-24 ч	400	5-10	такие же	ежедневно до 4 недель	рост
- в период регенерации (концентрации те же, что и в первом случае)	180	300-350	1500 л проточные бассейны (обработка без проточности, с аэрацией), 24°C	и, 5, 20, 30 мин; 1, 4, 24, 48, 72 ч	кортизол, глюкоза, ацетилхолинэстераза
- in vitro (0,0005-500 мг/л)	5	1000-1200	лабораторные условия	и, 1, 7, 14 дней	ацетилхолинэстераза
Манипуляционный стресс и анестетики (МС-222, 2-феноксиэтанол, иктиналм)	120	100-120	200 л проточные бассейны (анестезия без проточности, с аэрацией), 24°C	и, 5, 10, 30 мин; 1, 6 ч	адреналин, норадреналин глюкоза
Искусственное размножение	5	4000-4500	2000 л проточные бассейны, 23°C	перед и после (10, 30 мин; 6 ч) инъекций; перед и после (10, 30 мин; 24, 48 ч) отцеживания икры	адреналин, норадреналин глюкоза
Искусственное размножение и анестетики (МС-222, пропанидид)	15	8000-9000	такие же (анестезия без проточности)	перед и после инъекций, отцеживания икры	адреналин, норадреналин глюкоза, гематокрит, лейкоцит, гемоглобин, ионы кальция, хлора

мозгу с помощью реагента Фолина по методу Lowry и сотр. (1951).

Использовали стандартные статистические методы (Sós, 1974; Sváb, 1981).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние естественных факторов окружающей среды

Острый термальный шок (перепад температур на 15-16°C). Острый термальный шок вызвал сильный стресс-ответ организма рыб: нейроэндокринная система реагировала быстро и одинаковым путем: вначале возрос уровень адреналина в почках, а затем гормон поступил в кровяное русло. В мозгу увеличился уровень катехоламинов. При холодовом шоке он через 60 мин был меньше исходного. При резком охлаждении уровень гормонов в сердце снизился, в то время как при нагревании - повысился.

В наших опытах как позитивный, так и негативный термальный шок вызвал увеличение концентрации глюкозы в плазме. Максимальные значения отмечены на 30 мин. На 60 мин концентрация глюкозы в плазме возвратилась к исходному уровню. Ответ глюкозы напоминает ответ адреналина, смещенный во времени. Изменения температуры не отразились на концентрации гемоглобина в крови, в то же время значение гематокрита достоверно понизилось. а значение МСНС в незначительной степени повысилось. Концентрация иона кальция в плазме при термальном шоке понижалась и к концу время наблюдения (60 мин) осталась на достоверно низком уровне.

В результате внезапных изменений температур снижается приспособляемость организма рыб к различным возбудителям (Hunter и сотр., 1980). Отрицательная роль внезапных потеплений

(особенно ранней весной) в возникновении заболеваний хорошо известна и в рыбоводной практике. Условием появления у карпа весенней виремии, а также септицемии, вызванной бактериями рода *Aeromonas* и *Pseudomonas*, является стресс на внезапное потепление после периода зимовки (Wedemeyer и McLeay, 1981; Fijan и сотр., 1981).

Термальный шок (перепад температур на 5°C). Исходные значения гормонов не однозначно коррелировали с температурой адаптации. Обычно при понижении температуры на 5°C уровни адреналина и норадреналина в органах снижались, при увеличении температуры на 5°C - повышались. Из результатов видно, что увеличение температуры приводило в конце опыта к более высокому уровню катехоламинов. Реакция на охлаждение была не такой однозначной, но она в большей степени свидетельствовала о понижении уровня исследуемых катехоламинов. Это позволяет сделать вывод, что охлаждение в одной и той же температурной области более обременительно для организма, чем нагревание.

Изучение вторичного ответа организма на стресс, вызванного охлаждением, показало, что концентрация глюкозы увеличилась на 10 и 30 мин (максимальное значение), затем постепенно снижалась и к концу время наблюдений оставалась на более высоком (по сравнению с исходным) уровне. Результаты двух дополнительных опытов свидетельствуют, что острые охлаждения одинаковой величины (5°C) в температурной области 15-5°C отрицательно сказываются на функциональном состоянии организма рыб: изменение уровня глюкозы выражено более ярче, чем в предыдущих опытах и проходит медленнее. Так, при охлаждении с 15 до 10°C концентрация глюкозы в плазме снижается лишь через 6 ч, а при

10→5°C 4-кратно повышается на 10 мин и постепенно снижается до значения ниже исходного.

Позитивные или негативные изменения температуры воды не редко встречаются в рыбоводной практике, их опасность увеличивается из-за того, что они обычно сопровождаются значительным манипуляционным стрессом, обусловленным обловом и транспортировкой.

Постепенное снижение температуры воды. Под влиянием постепенного снижения температуры на 1°C/день в диапазоне 24-17°C у карпа отмечено снижение уровней адреналина и норадреналина. К концу опыта уровни катехоламинов были достоверно ниже исходных.

Концентрация глюкозы в плазме в первый день внезапно и достоверно понизилась, а затем понижалась постепенно. Это свидетельствует о том, что на уровне вторичного ответа, вызванного постепенным охлаждением воды, неблагоприятные изменения не проявились. Значение гематокрита и концентрации гемоглобина во время нашего эксперимента изменялись также незначительно.

Таким образом, постепенное понижение температуры воды в области 24-17°C не оказывает стрессорного воздействия на организм карпа. На практике, где часто невозможно изменять температуру воды со скоростью 1°C в день, необходимо стараться снижать или повышать температуру как можно медленнее, постепеннее и сводить к минимуму прочие стрессорные факторы (например манипуляционный или хемотерапевтический стресс).

Аммиак в сублетальных концентрациях. Изучалось влияние двух концентраций аммиака (1475 и 1646 мкг NH₃-N/л) в зависимости от экспозиции. При экспозиции 96 часов уровни адреналина и

норадреналина при обеих концентрациях возросли в одинаковой мере пропорционально времени воздействия. Наиболее ярко это было выражено в сердце: повышение доходило до 300-400% (например, норадреналин увеличился с 0,39 мкг/г до 1,39 мкг/г). В мышцах катехоламины повышались в более медленном темпе. Отмечалась и наибольшая разница в уровнях адреналина при разных температурах воды. При низкой (15°C) содержание адреналина в 3 раза превышало его значение при 20°C.

В жабрах отмечены наиболее низкие значения катехоламинов. Так, уровни норадреналина колебались в пределах 0,01-0,04 мкг/г независимо от количества аммиака. При 15°C уровень норадреналина с увеличением аммиака увеличился в три раза. Концентрации адреналина в жабрах изменялись в одинаковой степени при 15 и 20°C.

Экспериментально доказано, что аммиак вызывает первичный стресс-ответ. Полученное нами увеличение уровня катехоламинов с увеличением концентрации аммиака совпадает с мнением, высказанным Wedemeyer (1976) и другими авторами (Hane и сотр., 1966; Donaldson и McBride, 1967; Fagerlund, 1967; Nakano и Tomlinson, 1967; Hill и Fromm, 1968; Wedemeyer, 1969), что величина стресс-гормонов (в том числе и уровень катехоламинов) прямо пропорционально увеличивается со степенью влияния физико-химических факторов. Выявлено, что в большинстве случаев концентрации адреналина и норадреналина при 15°C превышали концентрации, определенные при 20°C. Это можно объяснить тем, что температура 20°C ближе находится к температурному рыбководному оптимуму карпа, который по мнению O.Tóth и сотр. (1981) равен 25°C.

Пребывание на воздухе. Показано, что под влиянием гипоксии в почках карпа происходит снижение, а в плазме, сердце и мозгу увеличение уровней адреналина и норадреналина. Наибольшая степень изменений наблюдалась в плазме и сердце и составляла 258-280% от контроля.

Вторичный ответ проявлялся в меньшей степени из-за короткого (10 мин), но острого воздействия. Тем не менее концентрация глюкозы в плазме достоверно возрастала. Отмеченное нами увеличение гематокрита, у рыб, пребывавших в условиях гипоксии, установлено ранее многими авторами (Holeton и Randall, 1967; Swift и Lloyd, 1974; Kirk, 1974; Swift, 1981). Концентрация гемоглобина практически не изменилась, в то время как концентрация гемоглобина в эритроцитах (МСНС) понизилась из-за увеличения гематокрита. Это также объясняется короткой экспозицией. Ни в нашем опыте, ни в опыте по исследованию гипоксии (Scott и Rogers, 1981) общий белок в плазме не претерпел существенных изменений.

Влияние антропогенных факторов окружающей среды

Влияние трихлорфена на физиологическое состояние карпа. Изменения в уровнях адреналина и норадреналина под влиянием трихлорфена в высокой концентрации (2500 мг/л, 20 мин) в почках отличались от таковых в мозгу и сердце. По всей вероятности почки являются местом ранней мобилизации катехоламинов под влиянием стрессорного фактора, что совпадает с имеющимися наблюдениями (Стабровски, 1968). Незначительные изменения в гематологических показателях объясняются коротким временем опыта. Возникшую под влиянием острого воздействия трихлорфена реакцию тревоги характеризовала гипергликемия. В этом случае

организм не смог приспособиться к воздействию и поэтому быстро наступила стадия истощения.

Обработка рыб трихлорфоном в средней концентрации (50 мг/л, 6 ч) также вызывала стресс у рыб. Повышенное содержание катехоламинов (за исключением адреналина) в сердце возвратилось к норме, что свидетельствует о частичной адаптации у рыб к хемотерапевтическому стрессу. Подобным же образом изменялся гематокрит и МСНС. Высокий уровень адреналина в сердце и гипергликемия, наблюдаемые спустя 24 ч после обработки, свидетельствуют, что адаптация не была полной.

Ингибирование ацетилхолинэстеразы на 69% через 1 ч и на 87% через 6 ч после воздействия трихлорфоном средней силы указывает на неблагоприятное состояние опытных рыб. Полученные нами результаты по влиянию на рыб трихлорфона в высокой и средней концентрациях говорят о его отрицательном воздействии и недопустимости применения таких обработок в рыбоводстве. При низкой концентрации (0,5 мг/л) мы не отмечали ингибирование активности ацетилхолинэстеразы.

Влияние трихлорфона на рост карпа. Исходные средние массы рыб (18,09±3,39 г - контроль; 17,77±3,30 г - опыт) после обработки трихлорфоном (50 мг/л, 6 ч) через неделю стали достоверно различаться в пользу контрольной группы, что сохранилось и через 6 недель: масса контрольных рыб была - 52,93±14,63 г (n = 151; p<0,05), а опытных - 48,36±14,65 г (n = 141; p<0,05). Отход рыб в результате спонтанного бактериального заболевания у опытной группы был более высок, чем в контрольной: в первой погибло 24,9%, во второй - 17,6%. Это различие указывает на снижение сопротивляемости карпов, обработанных трихлорфоном,

к инфекции. Воздействие трихлорфоном вызвало сильное (на 90%) ингибирование ацетилхолинэстеразы в мозгу рыб. Восстановление уровня фермента произошло сравнительно быстро - уже на первый день после обработки активность составляла около 90% от исходного значения. В то же время активность фермента была достоверно ниже исходной и сохранялась в течении 10 дней; на 11 день и к концу 6 недели она не отличалась от контрольного значения.

Начальные массы рыб (7,59±2,52 г - контроль и 7,41±2,52 г - опыт) уже на первой неделе после обработки трихлорфоном (0,5 мг/л, 24 ч) стали достоверно различаться друг от друга. Эта разница сохранилась до конца 4 недели: масса контрольных рыб составляла 22,92±6,04 г (n = 200; p<0,05), а опытных - 21,63±8,62 г (n = 200; p<0,05).

Нами впервые было доказано влияние обработок трихлорфоном на рост карпа. Причиной негативного влияния в обоих случаях (50 и 0,5 мг/л) является хемотерапевтический стресс, установленный нами в более ранней работе (Женеу и Женеу, 1986). Результаты по влиянию трихлорфона на сопротивляемость рыб к инфекции подтверждают мнение Mazeaud и Mazeaud (1981), согласно которому имеется взаимосвязь между первичным и вторичным стресс-ответом и показателями жизнедеятельности целого организма (например, ростом, резистентностью организма к различным факторам и т.д.).

Физиолого-биохимическое состояние карпа в период и после обработки трихлорфоном. Содержание кортизола в плазме крови рыб во время всех обработок трихлорфоном и вслед за ними достоверно возрастало и зависело от концентрации: при низкой кон-

центрации трихлорфона на 60-ой мин уровень кортизола составлял 162% от исходного значения при средней - 185%, при высокой (на 5 и 30 мин) - 220-225%. Через 1 ч после обработок во всех случаях уровень кортизола начал снижаться, но восстановление было не полным, поскольку содержание кортизола продолжало изменяться после прекращения воздействий и до конца измерений (3 дня). Особенно это проявилось на 24 и 48 ч при высокой концентрации: вначале произошёл повторный "скачок" (170%), затем - резкое снижение уровня кортизола (10-12%), свидетельствующее о полном истощении организма.

Изменения концентрации глюкозы в плазме повторяли изменения кортизола. При низкой и средней концентрациях её максимальные значения (130, 160% от контроля) наблюдались между 30 мин и 6 ч. При высокой концентрации максимум (230%) отмечен на 60 мин. Через 24 ч во всех случаях концентрация глюкозы была близкой к контрольному значению, через 48 ч снизилась. Наблюдаемые нами изменения характерны для адаптационных процессов на стадии резистентности ОАС.

Изменения в активности ацетилхолинэстеразы при низкой концентрации не были достоверными. При действии средней и высокой концентраций происходило характерное ингибирование ацетилхолинэстеразы. Через 48 и 72 ч активность фермента была достоверно низкой и составляла 50-60% от исходной.

Влияние трихлорфона и продуктов его разложения на активность ацетилхолинэстеразы мозга *in vitro*. Результаты наших опытов свидетельствуют, что свежий раствор трихлорфона в широком диапазоне концентраций (0,0005 - 500 мг/л) ингибировал активность ацетилхолинэстеразы мозга *in vitro*, а подавление актив-

ности фермента плазмы *in vitro* отмечалось при концентрациях 0,5-500 мг/л. Через 24 ч степень ингибирования фермента возрасла. Даже через 2 недели после приготовления растворов трихлорфона (выше 5 мг/л) всё ещё отмечали пониженные уровни ацетилхолинэстеразы как в плазме, так и в мозгу. Эти наблюдения показывают, что продукты разложения трихлорфона обладают большей антихолинэстеразной активностью, чем сам препарат.

Всё это указывает на необходимость соблюдения большой осторожности при использовании фосфоорганических препаратов в рыболовной практике, а также об их опасности в естественных водоёмах. Наши данные подтверждают рекомендации, что по активности ацетилхолинэстеразы *in vitro* можно обнаруживать фосфоорганические соединения в воде.

Манипуляционный стресс и применение анестетиков в рыболовстве. Манипуляционные процедуры (вылавливание сачком и 2 мин индивидуальное взвешивание на весах) в значительной степени влияли на физиологическое состояние рыб. В почках и мозгу уровень адреналина после первоначального увеличения постепенно снижался до исходного уровня. В почках степень изменения более значительна. В сердце изменения адреналина противоположны. Уровень норадреналина во всех трёх органах изменялся одинаковым образом: после первоначального увеличения постепенно снижался до уровня ниже исходного.

Обнаружены следующие изменения содержания глюкозы в плазме: после 5 мин концентрация достоверно возрасла и лишь через 30 мин стала снижаться, однако, даже к концу опыта (6 ч) уровень глюкозы оставался на более высоком (по сравнению с исходным) уровне.

При проведении различных манипуляционных работ (облов, транспортировка, инъектирование, отцеживание икры, измерение массы, взятие пробы и т.д.) часто используют анестетики. Влияние исследованных анестетиков (МС-222, 2-феноксиэтанол и ихтиокалм) проявилось одинаково. Уровень адреналина был достоверно ниже в мозгу и сердце на 30 мин. Затем следовало его повышение, которое наиболее ярко было выражено в сердце. Ихтиокалм оказался наименее эффективным: рекомендуемая дозировка вызывала у рыб лишь поверхностный наркоз. В мозгу первоначально содержание адреналина возросло, а к концу опыта (360 мин) снизилось до контрольного уровня.

Ихтиокалм и 2-феноксиэтанол на 5 мин в сердце и МС-222 и 2-феноксиэтанол в почках понижали уровни норадреналина. На 60 мин содержание адреналина резко повысилось и достигло максимума: в сердце - 180%, в мозгу - 300-360% и в почках - 400-800%. Исключение составляло его содержание в мозгу при действии ихтиокалма и в сердце - при действии 2-феноксиэтанола. На 60 мин уровень адреналина понизился в значительной степени и, за исключением почек, был равен контрольному. В почках его конечные значения были достоверно ниже, чем контрольные.

Вторичный ответ (содержание глюкозы) на стрессорное воздействие в общих чертах был сходен с первичным. Изменения, наблюдаемые нами, как в первичном, так и во вторичном ответе, по всей вероятности объясняются тем, что у интактных рыб манипуляционный стресс в начале опыта вызвал более сильный ответ. Специфическое влияние анестетиков, подавивших этот ответ, проявилось позже (через 1 ч) и их воздействие превысило эффект манипуляционного стресса. Через 6 ч организм восстанавливает

свое физиологическое состояние.

Искусственное размножение. Во время искусственного размножения к физиологической перестройке организма, вызванной гормональными инъекциями, присоединяется и эффект стресса, обусловленный цепью манипуляционных процедур.

Уровень адреналина в плазме при всех трёх вмешательствах (предварительная, основная дозы гипофиза, отцеживание) возрастал и к концу время наблюдения (через 2 дня после отцеживания) он был в три раза выше исходного значения. После очередного воздействия организм рыб пытался адаптироваться, но процесс адаптации не завершился, поскольку следовало более сильное воздействие.

Норадреналин изменялся иначе. После предварительной дозы гипофиза его концентрация повышалась, а через 6 ч возрастала ещё в большей мере (в 4 раза). В период до инъекции основной дозы гипофиза организм пытался адаптироваться: уровень норадреналина в незначительной степени понизился. После второй инъекции и, проводимого одновременно зашивания полового отверстия содержание адреналина вновь резко увеличилось. Максимум (6,5-кратное возрастание) достиг через 30 мин после воздействия. Затем уровень норадреналина сильно понизился. После отцеживания икры снова наблюдалось его понижение до значения, не отличающегося от исходного. Это свидетельствует о наступлении стадии истощения ОАС.

Концентрация глюкозы после каждого из трёх воздействий возрастала. Через 6 ч после инъекции предварительной дозы гипофиза она возвратилась на исходный уровень, а после подачи основной дозы концентрация глюкозы составляла менее, чем 40%

исходного уровня. Через 2 дня после отцеживания икры содержание глюкозы составляло 25% от исходного, что указывает на истощение энергетических запасов организма.

Из практики известно, что часть производителей после искусственного размножения болеет и гибнет. Рыбы погибают с самыми различными клиническими признаками, однако, по нашему мнению, причиной является снижение сопротивляемости организма. Об этом свидетельствуют описанные выше глубокие изменения в организме рыб. По существу мы наблюдали процесс истощения, обусловленный совместным влиянием манипуляционного стресса и стресса, вызванного взятием крови. Всё это подчёркивает важность того, что при проведении искусственного размножения необходимо снижать стрессорные состояния, обусловленные манипуляционными вмешательствами.

Искусственное размножение и анестетики. Одним из возможных путей снижения вредных физиологических изменений, происходящих в организме производителей в процессе искусственного размножения, является применение различных анестетиков. Наблюдения, проведённые нами в производственных условиях, показали эффективность двух анестетиков (МС-222 и пропанидид): рыбы быстро переходили в состояние общего наркоза. Пробуждение их также было быстрым и полным.

Уровни адреналина и норадреналина в плазме значительно увеличивались в контрольной группе после инъекции основной дозы гипофиза. Этот период - наиболее обременительный во время искусственного размножения, поскольку рыбам зашивают половое отверстие. У анестезированных рыб первичный ответ выражался слабее, чем у контрольных. Пропанидид более эффективно снижал

ответ рыб-производителей на стресс, чем МС-222.

Анестетики вызывают у многих рыб сгущение крови (Wedemeyer, 1970; Houston и сотр., 1971a; Reinitz и Rix, 1977; Soivio и сотр., 1977; Soivio и Hughes, 1978; Ferreira и сотр., 1981), что наблюдалось и в наших опытах. Причина статистически достоверного снижения значения гематокрита после инъекции предварительной дозы гипофиза неизвестна. Увеличение концентрации гемоглобина после анестезии, описанное Soivio и сотр. (1977), нами не отмечалось. Снижение в наших опытах значений лейкокрита у контрольных и анестезированных МС-222 рыб указывает на проявление стрессорного состояния. Постоянное увеличение концентрации глюкозы в плазме отражает негативное влияние ряда манипуляций, проведённых в процессе искусственного размножения. Достоверно низкая концентрация иона кальция в плазме у рыб, подвергнутых действию МС-222, указывает на неблагоприятное влияние этого анестетика.

Химические показатели воды свидетельствуют, что отрицательное физиологическое влияние МС-222 обусловлено его кислой природой, о чём указывалось в работах Marking (1967) и Wedemeyer (1970).

Экспериментально доказано, что пропанидид может быть введён в практику рыбоводства.

По результатам нашей работы составлена система клинико-диагностических параметров (табл. 2) карпа. С помощью этой системы возможно характеризовать общее физиологическое состояние карпа в условиях интенсивного рыбоводства.

ВЫВОДЫ

1. Стрессорная реакция карпа при действии изучаемых

Табл. 2. Система клинико-диагностических параметров карпа.

ФАКТОРЫ СРЕДЫ ПАРАМЕТРЫ РЫБ	Естественные							Антропогенные				
	Охлаждение на 16°C	Нагревание на 15°C	Охлаждение на 5°C	Нагревание на 5°C	Постепенное охлаждение	Сублетальный смирнок	Асфиксия	Трихлорфен	Манипуляции	Манипуляции и анестетики	Искусственное разноевание	Иск. разноевание и анестетики
АДРЕНАЛИН:												
почки	▲	▲	▼	▲	▼		▼	НТ	▲	▲		
сердце	▼	НТ	▼	▲	▼	▲	▲	▲	НТ	▲		
мозг	▲	▲	▼	▲	▼		НТ	▲	▲	НТ		
плазма	▲				▼		▲				▲	▲
мышцы						▲						
жабры						▲						
НОРАДРЕНАЛИН												
почки	▼	▲	НТ	▲	▼		▼	НТ	▲	▲		
сердце	▲	▲	▼	▲	▼	▲	▲	▲	НТ			
мозг	▲	▲	▼	▲	▼		▲	НТ	▲			
плазма	▲				▼		▲				▲	▲
мышцы						▲						
жабры						▲						
КОРТИЗОЛ								▲				
ГЛЮКОЗА	▲	▲	▲	НТ	▼	▲	▲	▲	НТ	▲	▲	
ГЕМОГЛОБИН	НТ	НТ			НТ	НТ	НТ	НТ			НТ	
ГЕМАТОКРИТ	▼	▼			НТ	▲	▲	▲			НТ	
ЛЕЙКОКРИТ												▼
ОБЩИЙ БЕЛОК							НТ	НТ				
ИОН КАЛЬЦИЯ	▼	▼										▼
ИОН ХЛОРА												▼
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА			▼	▲				▼				
РОСТ								▼				
СОПРОТИВЛЯЕМОСТЬ К БОЛЕЗНИ								▼				

НТ - нетипичные изменения

факторов интенсивного рыбоводства протекает однотипно и проявляется на уровнях как первичного и вторичного ответа организма на стресс так и на уровне целого организма. Величина стрессорного ответа зависит от качества раздражителя и его силы.

2. Особенности выявленных сдвигов на уровне первичного ответа организма при воздействии некоторых стрессовых факторов (пребывание на воздухе, хэндлинг и др.) проявляется в первую очередь в изменении концентрации катехоламинов в плазме, сердце и почках. На уровне вторичного ответа изменения концентрации глюкозы и иона кальция в плазме являлись наиболее характерными.

3. Скорость температурных изменений их направленность и величина диапазона перепада температур обуславливают характер стрессовой реакции.

4. Найден первичный и вторичный ответы организма, а также ответ целого организма на воздействие трихлорфена. Под влиянием высоких концентраций трихлорфена обнаружены необратимые изменения, понижение концентрации трихлорфена приводит к восстановлению некоторых изучаемых критериев (например, активность ацетилхолинэстеразы). Однако полной нормализации не происходит, что отрицательно сказывается на росте карпа и повышении его восприимчивости к заболеваниям. Вместе с тем токсичность низких (0,5 мг/л) концентраций трихлорфена и продуктов его распада сохраняется в окружающей среде до двух недель.

5. Изучение антистрессорного действия различных анестетиков на особенности первичного и вторичного ответов организма показало, что анестетики МС-222 и пропанидид уменьшают негативные последствия хэндлинга.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется постоянно контролировать величину pH воды и не допускать её высоких значений, приводящих к появлению токсичных концентраций свободного аммиака в воде.

2. Для антипаразитарной обработки карпа нельзя применять высокие концентрации (2500 мг/л, экспозиция 5-20 мин) трихлорфона. Использование средних (50 мг/л, экспозиция 1-6 ч) и низких (0,5 мг/л, экспозиция 6-24 ч) концентраций необходимо сокращать до минимума, поскольку препарат оказывает негативное влияние на рост карпа и увеличивает его восприимчивость к инфекционным заболеваниям.

3. Все манипуляционные процессы следует сокращать до минимума. Анестетики МС-222 (в концентрации 50 мг/л) и пропанидид (в концентрации 3 мл/л) можно использовать для снижения манипуляционного стресса во время искусственного размножения. Применение анестетиков ихтиокалм 2-феноксиэтанол нежелательно.

Список основных работ опубликованных по материалам диссертации

1. Jeney, Z., Jeney, G., Oláh, J. and Horváth, J. S., 1983. Effect of gradual decreasing of water temperature on serum glucose level in three fish species. Abstracts of 10th Sci. Session on Environmental Analysis, Szombathely, Hungary, p.23.
2. Nemcsók, J.G., Jeney, G., Jeney, Z., Vig, E., Oláh, J., Györe, K. and Boross, L., 1983. Effect of NH₃ on catecholamine level in different organs, serum GOT, GPT, LDH enzyme activity and ATP level of common carp. Proceedings of the XXIXth Congress of the International Union of Physiological Sciences., Vol. XV., p.253.
3. Jeney, Z., Jeney, G., Oláh, J., Nemcsók, J. and Horváth, J. S., 1984. Effect of thermal stress on noradrenaline level in different organs, serum glucose level and serum GOT, GPT, LDH and cholinesterase activity of common carp (*Cyprinus carpio* L.). 16th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies. Moscow, USSR, Abstracts, p.440.
4. Jeney, Z., Jeney, G., Horváth, J. S., Oláh, J., Gábor, J. and Nemcsók, J., 1984. Changes of adrenalin and noradrenalin level in different organs of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after anesthesia and handling stress. Proceedings of the 5th Meeting European Society for Neurochemistry. p. 140., Budapest, Hungary.
5. Jeney, Z., Jeney, G. and Oláh, J., 1985. Effect of lethal dose of Trichlorphon on different biochemical and physiological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Archiv für Toxicologie, 8:294.
6. Jeney, Z., Jeney, G., Oláh, J., Siwicki, A. and Dankó, I., 1986. Propanidid, a new anaesthetic for use in fish propagation. Aquaculture, 54:149-156.
7. Jeney, Z. and Jeney, G., 1986. Studies on the effect of Trichlorphon on different biochemical and physiological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquacultura Hungarica, 5:79-90.
8. Jeney, Z. and Jeney, G., 1987. A system of diagnostic parameters for detection of environmental impact on fish. Third International Conference of European Association of Fish Pathologists, Abstracts p. 45.
9. Jeney, Z. and Jeney, G., 1987. In vitro measurement of fish acetylcholinesterase activity of organophosphorus pesticides in water, Third International Conference of European Association of Fish Pathologists, Abstracts p. 46.
10. Jeney, Z. and Jeney, G., 1988. Effect of organophosphate pesticides on fishes. Sixth Congress of European Ichthyologists, Abstracts p. 118., Budapest, Hungary.