

На правах рукописи

КОВАЛЕВА АНЖЕЛИКА ВЯЧИСЛАВОВНА

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ЦИАНОКОБАЛАМИНА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОБЪЕКТОВ АКВАКУЛЬТУРЫ НА
РАЗНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА**

специальность 03.00.10 – ихтиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**



Астрахань 2006

Работа выполнена в Астраханском государственном
техническом университете

Научный руководитель:
доктор биологических наук Пономарева Елена Николаевна

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук Металлов Геннадий Федорович

доктор биологических наук Крючков Виктор Николаевич

Ведущая организация: Институт Проблем Экологии и Эволюции
имени А.Н. Северцова РАН

Защита диссертации состоится « _____ » _____ 2006 г. в _____
часов на заседании диссертационного совета К.307.001.01 при Аст-
раханском государственном техническом университете по адресу:
414025, г.Астрахань, ул. Татищева, 16, АГТУ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Астраханского
государственного технического университета

Автореферат разослан « _____ » _____ 2006 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат биологических наук



Мелякина Э.И.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Одним из перспективных направлений повышения качества производителей и их потомства на рыбоводных предприятиях является использование биологически активных веществ как естественного, так и искусственного происхождения, обладающих токсикопротекторным и иммуномодулирующим действием на животные организмы, в частности на рыб на различных стадиях развития (Егоров, 1998). К таким веществам относятся витамины.

Некоторые витамины не синтезируются в организме или синтезируются в недостаточных количествах и должны поступать извне. Таким является цианокобаламин, или витамин В₁₂. Его основное значение – в антианемическом действии, оказании влияния на процессы обмена веществ, он необходим для нормального пищеварения, синтеза белка, метаболизма углеводов и жиров, обеспечения нормального роста и развития организма. Ранее проводились опыты по его использованию для повышения жизнеспособности эмбрионов и молоди лососевых и карповых рыб, повышения их токсикорезистентности (Глубоков, 1986, 1988; Духовенко, Сергеева, 1996).

Применение витамина В₁₂ в качестве сильного биостимулятора позволит улучшить физиологические и рыбоводно-биологические показатели производителей рыб, повысить выживаемость и устойчивость потомства на ранних этапах онтогенеза.

Цель и задачи исследований. Целью данной работы явилась оценка действия цианокобаламина на репродуктивные качества производителей осетровых рыб в период нереста, его влияния на жизнестойкость потомства, а также на усиление криопротекторного действия при криоконсервации половых клеток различных видов рыб.

Поставленная цель определила следующие задачи:

- определить оптимальную норму введения цианокобаламина в виде инъекций самкам осетровых рыб в преднерестовый период;
- определить концентрации цианокобаламина для повышения жизнеспособности эмбрионов при обработке икры осетровых рыб;
- исследовать влияние цианокобаламина на резистентность осетровых рыб в период эмбрионального развития;
- оценить физиологическое состояние молоди осетровых рыб, полученной от икры, обработанной витамином;
- изучить влияние комплекса витаминов С, Е и В₁₂ на производителей осетровых рыб разных биологических групп;

- оценить криопротекторный эффект при добавлении цианокобаламина в среды для криоконсервации половых клеток различных видов рыб.

Научная новизна. Впервые научно обоснована целесообразность и эффективность использования цианокобаламина для инъецирования осетровых рыб в преднерестовый период, повышения жизнеспособности икры осетровых при ее обработке, а также в качестве криопротектора в средах при криоконсервации спермы различных видов рыб. Впервые определены нормы введения цианокобаламина в виде инъекций в период преднерестового содержания производителей русского осетра, севрюги и стерляди. Установлено, что введение витамина позволяет повысить процент созревания самок, оплодотворения икры, выход свободных эмбрионов. Впервые показано положительное влияние обработки икры цианокобаламином на резистентность личинок и молоди осетровых рыб.

Практическая значимость. Предложено использовать препарат цианокобаламина в рыбоводстве при инъецировании производителей во время подготовки к нересту. Даны рекомендации по обработке икры осетровых рыб с целью повышения выживаемости потомства на ранних этапах развития. Разработана методика использования цианокобаламина для усиления криопротекторного действия криосред при криоконсервации половых клеток осетровых, карповых и окуневых рыб.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Нормы введения витамина В₁₂ производителям осетровых рыб.
2. Методы обработки икры осетровых рыб цианокобаламином.
3. Нормы введения В₁₂ для усиления криопротекторного действия.

Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы докладывались на научно-технической конференции профессорско-преподавательского состава АГТУ, 2004; Международной научной конференции АГТУ-75, 2005; Международном Семинаре «Современные технологии мониторинга и освоение природных ресурсов южных морей России», г. Ростов-на-Дону, 2005; Международной научно-практической конференции, посвященной 60-летию Московской рыбоводно-мелиоративной опытной станции и 25-летию ее реорганизации в ГНУ ВНИИР, Москва, 2005; Международной научно-практической конференции «Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов Мирового океана», Москва, 2005; Первой и второй научной конференции студентов и аспирантов базовых кафедр ЮНЦ РАН, Ростов-на-Дону, 2005; 2006гг. Международной научной конференции «Состояние и перспективы развития фермерского рыбоводства аридной зоны», г. Азов, 2006.

Диссертационная работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований ОНЗ РАН «Развитие технологий мониторинга, экосистемное моделирование и прогнозирование при изучении природных ресурсов в условиях аридного климата», темы управления «Севкас-прибывод» «Разработка методов длительного хранения половых продуктов ценных видов осетровых рыб для дальнейшего применения с целью воспроизводства и формирования маточных стад на осетровых заводах Нижней Волги».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 132 страницах машинописного текста. Состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, приложения. Список литературы содержит 242 источника, из них 50 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 13 рисунками и 35 таблицами.

ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В главе проведен анализ литературных данных о влиянии различных биологически активных веществ на организм рыб. Исследованы биологические функции цианокобаламина, возможности его использования для улучшения физиологического состояния животных и человека. В результате выявлена целесообразность применения цианокобаламина в качестве сильного биологического стимулятора развития, повышающего жизнестойкость рыб на ранних стадиях онтогенеза, а также репродуктивные качества производителей рыб.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования выполняли в 2003 – 2006 г.г. на Волгоградском (Волгоградская область), Донском (Ростовская область), Бертопольском и Сергиевском (Астраханская область) осетровых рыбоводных заводах (ОРЗ), в Чаганском рыбопитомнике (Астраханская область), а также в лаборатории базовой кафедры Южного научного центра Российской академии наук «Аквакультура и биологические ресурсы» (г. Астрахань).

В качестве объектов использовали различные виды осетровых рыб: русский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii Brandt*), севрюга (*Acipenser stellatus Pallas*), стерлядь (*Acipenser ruthenus Linnaeus*) волжской и донской популяции, а также их икра, личинки и молодь. Материалом для научных работ по криоконсервации служила сперма осетровых, карповых и окуневых рыб. Схема проведения исследований представлена на рисунке 1.

Нормы введения медицинского препарата цианокобаламина определяли на основе анализа научной литературы о физиологическом со-

стоянии производителей и доз, принятых в медицине (Глубоков, 1988, 1993; Духовенко, Сергеева, 1996; Остроумова, 2001).



Рис. 1. Схема проведения исследований

В экспериментальных работах по определению оптимальных норм инъекций цианокобаламина производителям осетровых рыб испытывались следующие дозировки: 25; 50; 75; 100 мкг/кг массы тела рыб. Инъектирование проводили в преднерестовый период за месяц до стимулирования созревания половых продуктов с интервалом 7 суток.

При подготовке осетровых рыб к нересту применяли комплекс витаминов С, Е и В₁₂.

В работе использовали нормы аскорбиновой кислоты и α -токоферол-ацетата для производителей осетровых рыб, разработанные ранее (Сорокина, 2004).

Иньецирование комплексом витаминов (С, Е и В₁₂) самок русского осетра озимой расы проводили перед посадкой на зимовку (октябрь-ноябрь) и весной при подготовке к нересту трехкратно с недельным интервалом. Самцов русского осетра озимой расы кололи осенью и весной перед нерестом однократно. Производителей русского осетра яровой расы, а также производителей севрюги и стерляди инъецировали двукратно перед нерестом. В контроле производителей инъецировали витаминами С и Е. Витамин В₁₂ вводили на следующий день после введения витаминов Е и С.

Обработку икры русского осетра цианокобаламином проводили в период обесклеивания в аппаратах АОИ в течение 45 минут. Испытывали следующие концентрации цианокобаламина: 0,5 мг/л, 1,0 мг/л и 1,5 мг/л.

Влияние цианокобаламина определяли на основании данных созревания производителей, процента оплодотворения икры, а также выживаемости эмбрионов, личинок и выхода молоди. Плодовитость самок определяли общепринятым способом (Правдин, 1966). Для определения процента оплодотворения икры брали пробы на стадии второго деления – 4 бластомера, стадия 5 (Детлаф, Гинзбург, 1981). Активность спермы определяли по 5-ти бальной шкале Г.М. Персова (1953).

Процесс эмбрионального развития осетровых рыб изучали по методике Т.А. Детлаф, А.С. Гинзбург и О.И. Шмальгаузен (1981). Взвешивание и измерение молоди проводили по методике И.Ф. Правдина (1966).

Среднесуточную скорость роста рыб вычисляли по формуле сложных процентов (Castell, Tiewa, 1979), коэффициент массонакопления по методике ВНИИПРХ (Резников и др., 1978; Купинский и др., 1985). Гематологические показатели определяли согласно рекомендациям В.В. Лиманского с соавторами (1984).

Криоконсервацию осуществляли по методике Цветковой с соавторами (1997). Для модификации криопротекторного действия ДМСО в среде добавляли раствор цианокобаламина в концентрациях 0,5; 1,0 и 1,5 мг/л. В качестве контроля служили эякуляты, замороженные без витаминов. Хранение спермы осуществлялось в жидком азоте (-196°C) в биологическом хранилище (ХБ 300), объемом 300 литров.

Анализ химического состава спермы, икры, личинок и молоди определяли общепринятыми методами (Щербина, 1983).

Экстракцию липидов выполняли по методу J. Folch et al (1957), разделение липидов на фракции – способом тонкослойной хроматографии. Количество (фосфолипиды, триглицериды и др. фракции) устанавли-

ливали на основе методики G. Rouser et al. (1966). Липиды подвергали прямой перестрификации в абсолютном метаноле. Полярные метиловые эфиры высших жирных кислот разделяли на хроматографе «Hewlett-Packard» (Ахрем, Кузнецова, 1965). Данные обработаны статистически по Г.Ф. Лакину (1990).

В процессе исследований выполнено 560 биохимических анализов тела, икры и спермы различных видов рыб, обработано около 130 гематологических проб, 200 проб икры, 750 проб спермы, проанализировано более 2000 экз. личинок, около 14000 экз. молоди, порядка 450 экз. производителей.

ГЛАВА III. ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕРЕСТА ОСЕТРОВЫХ РЫБ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИАНОКОБАЛАМИНА ПРИ ИСКУССТВЕННОМ ВОСПРОИЗВОДСТВЕ

При искусственном воспроизводстве качество и жизнестойкость личинок и молоди зависят не только от условий выращивания, но и от качества исходного материала (икры и спермы) которое определяется состоянием производителей (Соколова, Горюнова, 2000).

Необходимым условием получения жизнестойкого потомства является использование физиологически полноценных производителей и их подготовка к нересту при использовании витаминов.

В наших исследованиях важно было дать оценку действия цианокобаламина на физиологическое состояние производителей осетровых рыб и повышение их репродуктивных качеств.

3.1. Эффективность использования витамина В₁₂ для подготовки производителей осетровых рыб к нересту в искусственных условиях

Поскольку кортикостероидные гормоны, а также нейролептики способствуют «вымыванию» цианокобаламина из организма, то при созревании ооцитов наблюдается снижение содержания этого витамина. В связи с этим введение самкам витамина В₁₂ в период созревания является весьма целесообразным.

Экспериментальные работы по определению оптимальных норм ввода цианокобаламина производителям осетровых рыб показали, что происходит улучшение всех биологических и репродуктивных показателей инъецированных витамином рыб (табл. 1).

Результаты опытов показали, что наиболее эффективной нормой цианокобаламина следует считать 50 мкг/кг массы тела рыб. Введение такого количества препарата привело к 100 %-ному созреванию произво-

дителей, что на 40 % выше контроля. Увеличение дозы цианокобаламина до 100 мкг/кг не привело к изменению показателей. При этом процент оплодотворения икры во всех опытных вариантах были выше в среднем на 14,9 %, процент развивающейся икры – на 15,5 %, выход свободных эмбрионов – на 14,3 % в сравнении с контролем.

Таблица 1

Показатели самок русского осетра при инъектировании цианокобаламином

Показатели	Варианты опытов				Конт- роль
	25 мкг/кг	50 мкг/кг	75 мкг/кг	100 мкг/кг	
Средняя масса, кг	19,7±0,37	19,3±0,13**	20,7±0,17	19,0±0,25**	20,5±0,16
Средняя длина, см	130,4±1,9	128,0±2,1	135,0±1,5	128,8±1,9	134,8±1,4
Созревание, %	80	100	100	80	60
Плодовитость, тыс. шт.	134,4±1,6	185,5±3,8***	186,0±2,4***	177,2±3,5***	137,2±1,3
% оплодотворения	87,3	93,9	94,5	92,0	76,0
% развития (17 ст.)	82,0	89,7	88,0	88,0	70,4
Выход эмбрионов, %	78,0	84,8	85,0	84,6	67,2

Примечание: различия достоверны при ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Установленная норма проверена в условиях производства на самках русского осетра. Показано, что количество ответивших на гипофизарную инъекцию рыб увеличилось на 10%, процент оплодотворения икры на 17%, в сравнении с контролем. Отмечено повышение в опытном варианте процента нормально развивающейся икры на стадии малой желточной пробки (17 ст.) на 18 %, на стадии вылупления эмбрионов из оболочек (36 ст.) – на 20% по сравнению с контролем.

Биохимический анализ икры, полученной от самок опытной группы, выявил более высокое содержание протеина (на 2,3 %) и липидов (на 1,1 %) в сравнении с контролем. Высокая концентрация липидов являлась свидетельством стабилизации их расхода в организме. Очевидно, в преднерестовый период содержания у самок в контроле происходили значительные траты липидных веществ на генеративный синтез и поддерживающие жизненных функций.

Дальнейшие исследования были проведены на ослабленных производителях русского осетра разных биологических групп. У всех производителей в опыте были отмечены нарушения кожных покровов: потертости, кровоподтеки, сбывте «жучки». При дефиците производителей этих самок использовали в нерестовой кампании.

Через неделю после введения цианокобаламина улучшились репродуктивные показатели и состояние производителей (рис. 2).

В дальнейшем аналогичные результаты были получены на самках севрюги и стерляди. При этом произошло увеличение процента созревания на 16 %, процента оплодотворения икры – на 10 %.



Рис 2. Репродуктивные показатели самок русского осетра

Таким образом, введение 50 мкг/кг цианокобаламина самкам осетровых рыб в преднерестовый период перед проведением гипофизарных инъекций значительно повышает их рыбоводно-биологические показатели. Ведет к увеличению процента созревания самок на 10 – 40 %, оплодотворения икры на 10 – 17,9 % и выхода свободных эмбрионов на 20 %.

3.2. Использование витамина В₁₂ для повышения

резистентности осетровых рыб на ранних этапах онтогенеза

В наших исследованиях необходимо было выявить влияние цианокобаламина на развивающуюся икру и личинок русского осетра.

При обработке икры русского осетра водным раствором витаминного препарата лучшие результаты были получены при введении 1,0 мг/л цианокобаламина, был отмечен высокий выход свободных эмбрионов – 77 %, в контроле – 69,5 % (табл. 2).

Таблица 2

Результаты обработки икры русского осетра цианокобаламином перед инкубацией

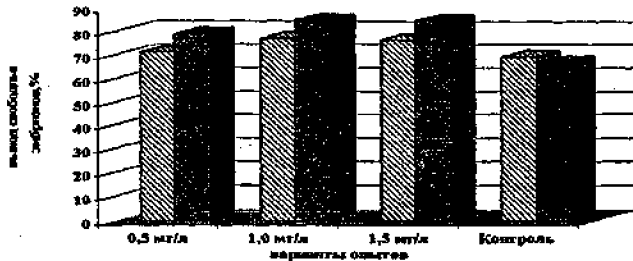
Показатели	Варианты			
	0,5 мг/л	1,0 мг/л	1,5 мг/л	Контроль
Выход свободных эмбрионов, %	71	77	76,5	69,5
Выживаемость предличинок, %	66	70	69	63,3
Отклонения в развитии, %	5	3	3	18

Обработка икры русского осетра цианокобаламином в концентрации 1,5 мг/л оказала положительный эффект, мало отличающийся от варианта обработки в концентрации 1,0 мг/л.

Обработка витамином В₁₂ приводит не к материальной кумуляции препарата, а посредством воздействия на рецепторы вызывает в дальнейшем повышение эффективности его усвоения при поступлении в организм и интенсификацию биосинтеза. Следовательно, можно сделать вы-

вод о триггерном типе действия цианокобаламина в повышении жизнестойкости и токсикорезистентности рыб в ранние периоды онтогенеза.

Результаты, полученные в условиях осетровых заводов представлены на рисунке 3.



▨ Волгоградский ОРЗ ■ Донской ОРЗ

Рис. 3. Результаты инкубации икры, обработанной цианокобаламином

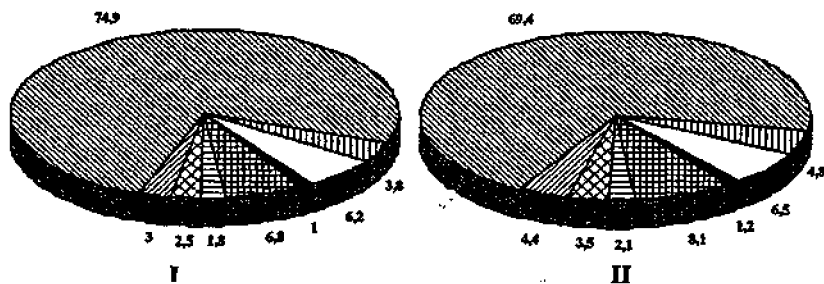
Биохимический анализ показал, что икра, обработанная витамином B_{12} в концентрации 1,0 мг/л, отличалась от контрольной группы более высоким содержанием протеина (на 5,7 %) и жира (на 3 %), что важно в период эмбрионального развития и в дальнейшем может оказать влияние на жизнестойкость эмбрионов.

Высокая смертность эмбрионов отмечалась в период прохождения критических стадий развития, однако в контрольном варианте она была выше, чем в опыте (рис. 4).

Наибольшая гибель эмбрионов отмечалась на стадиях: начало гастрюляции (12 – 13 стадии); конец гастрюляции (18 – 19 стадии); образования зачатка сердца (28 стадия); вылупления (35 – 36 стадия). В опытном варианте выход свободных эмбрионов был высоким и составил 74,9 %, в контроле – 69,4 %.

В результате обработки икры цианокобаламином в период эмбрионального развития отмечено снижение процента нарушений в развитии в среднем на 8,1 % (табл. 3).

Анализ морфометрических показателей выявил некоторое преимущество предличинки полученных от икры, обработанной витамином B_{12} в концентрации 1,0 мг/л. Предличинки опытной группы отличались большей массой (на 2,7 мг) и длиной (на 1,0 мм), имели высокие потенции к росту. В контрольном варианте получен значительный процент нарушений в развитии: у 5 % предличинки обнаружено искривление позвоночника, у 7 % – недоразвитие передних отделов головы.



- [Штриховка] - Общая выживаемость эмбрионов. Гибель на критических стадиях;
 [Диагональная штриховка] - Начало дробления 4 стадия; [Крестовидная штриховка] - Начало гаструляции 12-13 стадия;
 [Горизонтальная штриховка] - Стадия малой желточной пробки; [Вертикальная штриховка] - Конец гаструляции начало органогенеза 18-19 стадия; [Сплошной черный] - Органогенез; [Белый] - Образование зачатка сердца 28 стадия; [Штриховка] - Вылупление единичных экземпляров.

Рис. 4. Общая выживаемость и гибель эмбрионов на критических стадиях при обработке икры препаратом цианокобаламина, %
I-опыт, II-контроль

Таблица 3

Нарушения в развитии эмбрионов, %

Вид нарушений	Опыт	Контроль
Нарушения дробления, неправильная закладка борозды дробления	2,4±0,41**	4,1±0,33
Позднее закрытие бластопора	1,0±0,30*	1,8±0,17
Недоразвитие передних отделов головы	2,5±0,25***	5,8±0,49
Искривленное тело	3,0±0,62**	5,3±0,54

Примечание: различия достоверны при * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

В опытном варианте таких нарушений было значительно меньше – 5,5 %. Предличинки опытной группы своевременно переходили на смешанное питание, следствием чего явилась их высокая выживаемость – 88 %, в контроле – 80 %.

В опытной группе личинки отличались активным поведением, лучше потребляли комбикорм и опережали в росте личинок контрольной группы, имели высокие биохимические показатели состава тела: содержание протеина – 59,9 %, липидов 30 %, в контрольной группе этот показатель был ниже на 2,5 %.

Липидный статус рыб может характеризовать их способность преодолевать неблагоприятные условия, стрессы, действия низких температур, отсутствие достаточного количества пищи, влияние состава отдельных компонентов потребляемых кормов (Яржомбек и др., 1981; Касаскова и др., 1998).

При выращивании молоди русского осетра лучшие показатели роста и выживаемости были отмечены в опытном варианте. Масса молоди была выше на 14 %, чем в контроле. Гематологические показатели молоди в опыте были значительно выше: гемоглобин на 8%, гематокрит на 11%, эритроциты на 2%, что свидетельствует о лучшем физиологическом состоянии.

Таким образом, проведенный комплексный анализ биологических, биохимических и гематологических показателей свидетельствовал об эффективности обработки икры витамином В₁₂ в период подготовки к инкубации.

ГЛАВА IV. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЦИАНОКОБАЛАМИНА В КОМПЛЕКСЕ С ВИТАМИНАМИ С И Е ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ РЕПРОДУКТИВНОГО КАЧЕСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Резервирование производителей в бассейнах и прудах на рыбоводных предприятиях, в том числе продолжительное – для озимых форм, в условиях постоянных стрессовых воздействий, вызывает нарушения в обмене веществ, приводит к дополнительным тратам биологически активных веществ.

Для улучшения физиологического состояния и повышения репродуктивных свойств производителей русского осетра была проведена подготовка их к нересту с использованием комплекса витаминных инъекций С, Е и В₁₂ (рис. 5).

Перед нерестом у самок русского осетра был исследован завершающий этап гаметогенеза. Установлено, что процесс завершения формирования гонад проходил нормально, без нарушений. По показателям поляризации ядра, размерам ооцитов, каких-либо отклонений в формировании репродуктивной функции не обнаружено.

От проиньжецированных витаминами С, Е и В₁₂ озимых и яровых самок русского осетра получена доброкачественная икра с высоким процентом оплодотворения (84 - 86 %), что на 4% выше контроля (рис. 5).



Рис 5. Показатели развития икры, полученной от производителей, инъецированных витаминами: опыт – комплекс витаминов С, Е и В₁₂, контроль – комплекс витаминов С и Е

Использование комплекса витаминов С и Е в контроле показало высокие результаты инкубации икры, полученной от производителей. Однако, дополнительное введение витамина В₁₂ к ранее разработанному комплексу оказалось более эффективным. Инъекция цианокобаламина восполняли дефицит этого витамина у рыб, поскольку он не синтезируется организмом, а при созревании ооцитов идет снижение его содержания.

Рыбоводные показатели, как правило, коррелируют с физиологическим состоянием рыб, что подтверждается гематологическими показателями (Пономарева, 2003). Кобальт в составе цианокобаламина оказывает влияние на процессы кроветворения: стимулирует образование красных кровяных телец и гемоглобина, а в отсутствие или при недостатке кобальта у определенных видов животных наступает анемия.

При введении комплекса витаминов показатели гемоглобина и эритроцитов в крови самок опытной группы находились на высоком уровне – 90 г/л и 1,350 млн/мм³, соответственно.

Высокое содержание белка (4,1 г%) в сыворотке крови в пределах установленных норм явилось благоприятным признаком, т.к. значительные его потери связаны со снижением жизнестойкости и могут сопровождаться гибелью рыб (Лиманский, 1978; Яржомбек и др., 1986).

Биохимический анализ показал, что икра полученная от проинъецированных витаминами самок отличалась более высоким содержанием протеина (56,8%) и жира (29%).

Масса икринок зависит от величины накопления белка в икре рыб (Афонич и др., 1971; Остроумова, 2000). В икре, полученной от самок

русского осетра, в опытных группах этот показатель был выше (ср. масса икры озимых - 18,5 мг, яровых - 18,6 мг).

Проведение подготовки самцов яровой и озимой группы к нересту при использовании витаминов выявило повышение качества половых клеток.

При оценке спермы, полученной от самцов русского осетра подготовленных к нересту с использованием витаминов, ее качество соответствовало 5-ти баллам, в контроле 4-м баллам, время подвижности спермиев увеличилось на 20-50 сек. Повышение качества спермы объясняется действием цианокобаламина, который способствует увеличению потребления кислорода клетками.

Дальнейшие исследования были проведены с самками севрюги и стерляди. После проведения инъектирования витаминами С, Е и В₁₂ икра была получена от 90 % самок. В контроле этот показатель был ниже на 2,5 %. От 85,5 % самок опытной группы была получена доброкачественная икра, которая отличалась более высоким процентом оплодотворения - 90 %.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показали эффективность применения комплекса витаминов С, Е и В₁₂ для производителей осетровых рыб разных биологических групп.

ГЛАВА V. ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОХРАНЕНИЯ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК РЫБ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВИТАМИНА В₁₂

Одним из направлений в области сохранения популяций исчезающих видов рыб является криоконсервирование их половых продуктов. Для защиты клеток от криоповреждений наиболее важны оптимальный выбор криопротекторов и режимы самого охлаждения.

Нашей задачей было улучшить результат криоконсервации путем введения в криосреды цианокобаламина.

Перед началом работ по криоконсервации было проведено определение качества половых продуктов осетровых рыб. Для криоконсервации спермы русского осетра была отобрана сперма с активностью 5 баллов по шкале Г.М. Персова (1953), временем подвижного состояния спермиев 99 сек.

Результаты исследований показали, что выживаемость сперматозоидов русского осетра после разбавления криосредой Штайна и выдерживания в течение часа составила 80 %, процент спермиев с поступательным движением составил 63,1 % при подвижности 57,5 сек. В дефростированной сперме все показатели снизились в 1,3 - 1,8 раза.

При использовании в качестве среды трис-НСI-буфер активность разбавленной спермы снизилась на 16,7 %, спермиев с поступательным движением на 23,9 % в сравнении со средой Штайна. При дефростировании выживаемость и активность спермиев снизилась в 1,7 – 2,7 раза. Результаты опытов подтвердили эффективность использования среды Штайна для криоконсервации спермы осетровых рыб.

5.2. Применение цианокобаламина на начальных этапах криоконсервации спермы рыб

В наших экспериментах для смягчения осмотического стресса в клетках и предотвращения свободнорадикального окисления в криораствор (среда Штайна) вводили цианокобаламин в различной концентрации.

При добавлении цианокобаламина в среду при криоконсервации спермы лучшие показатели выживаемости спермиев отмечены в варианте с добавлением витамина в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л (рис. 6).

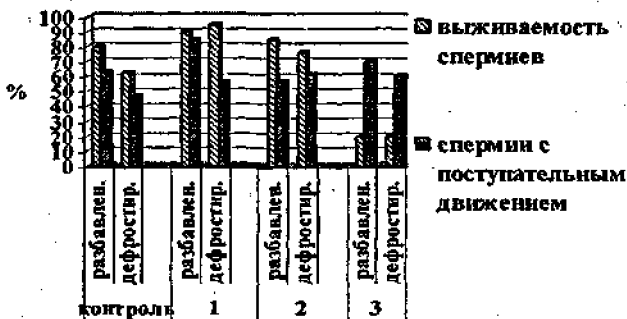


Рис. 6. Показатели спермы русского осетра при криоконсервации
Примечание: концентрация цианокобаламина 1 – 0,5 мг/л, 2 – 1,0 мг/л, 3 – 1,5 мг/л, контроль – среда без витамина.

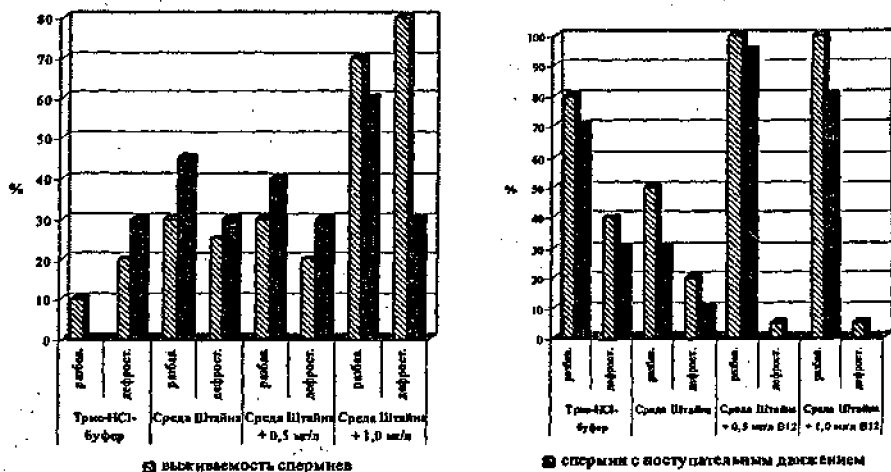
При добавлении витамина V_{12} в концентрации 0,5 мг/л в среду произошло увеличение выживаемости на 31,9 %, процента спермиев с поступательным движением – на 10,1 %, времени движения – на 50,8 сек. При концентрации 1,0 мг/л также произошло повышение всех показателей на 5 – 14 %.

При введении в криосреду витамина V_{12} в концентрации 1,5 мг/л происходит резкое снижение всех показателей спермы.

Таким образом, выявлена эффективность введения в криораствор цианокобаламина в концентрации 0,5 мг/л и 1,0 мг/л.

Для исследований по криоконсервации половых клеток карповых рыб с добавлением в криосреду витамина B_{12} использовалась сперма белого и пестрого толстолобиков.

Результаты экспериментов показали увеличение активности спермы белого толстолобика при введении 1,0 мг/л витамина B_{12} по сравнению с контролем (рис. 7а). При этом выживаемость спермы была выше на 55 – 60 %, время движения – на 15 сек.



а) белый толстолобик

б) пестрый толстолобик

Рис 7. Результаты криоконсервации спермы растительноядных рыб

Результаты криоконсервации спермы пестрого толстолобика были лучше в варианте с применением цианокобаламина (рис. 7б). При этом выживаемость спермиев составила 40 %, время движения спермиев увеличилось на 12 сек.

Проведенные исследования по криоконсервации 4-х балльной спермы окуня дали положительные результаты при использовании среды Штайна.

Введение витамина B_{12} в среду в концентрации 1 мг/л привело к увеличению показателей дефростированной спермы окуня. Так, выживаемость спермиев повысилась на 3 %, процент спермиев с поступатель-

ным движением – на 15 %, время движения – на 5 сек. В среде трис-НСI-буфер вся сперма погибла.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют об улучшении результатов криоконсервации спермы осетровых, карповых и окуневых рыб при введении в криосреду Штайна витамина В₁₂.

5.3. Применение цианокобаламина на этапах глубокого замораживания и хранения спермы осетровых рыб

В механизмах холодовой адаптации особо важная роль отводится степени насыщенности жирных кислот: с увеличением числа двойных связей в жирнокислотных хвостах липидов температура фазового перехода понижается, что позволяет мембране нормально функционировать в области пониженных температур (Остроумова, 2001). Сперма русского осетра, используемая для глубокого замораживания, содержала большое количество воды (94,1 %). На такое количество жидкой фазы требуется эквивалентное количество криозащитного раствора. Замещение такого количества воды криозащитным раствором должно производиться в течение одного часа. После размораживания необходимо добавление физиологически индифферентной среды.

Количество белка в сухом веществе спермы составляло 78,2 %, такое количество белковых структур при охлаждении будет видоизменяться в связи с трансформацией. Количество липидов составило 9,7 %. Структура липидов меняется при замораживании, важны дальнейшие исследования жирнокислотного состава липидов.

Сперма исследованных рыб по составу общих липидов и фосфолипидов оценивается как хорошая. Определение жирнокислотного состава фосфолипидов спермы осетровых перед криоконсервацией имеет большое значение, так как кислоты линолевого и линоленового ряда защищают клеточные мембраны от разрушения. Жирнокислотный состав фосфолипидов спермы русского осетра в наших исследованиях (сумма $\omega 3$ - $12,4 \pm 0,2$; сумма $\omega 6$, $2,8 \pm 0,4$; $\omega 3/\omega 6$ $-4,4 \pm 0,2$) свидетельствовал о хорошем качестве половых продуктов.

Таким образом, образцы спермы можно рекомендовать для глубокого замораживания и долгосрочного хранения.

Лучшие результаты по глубокому замораживанию спермы русского осетра получены в варианте с использованием среды Штайна с витамином В₁₂ в концентрации 0,5 мг/л (рис. 8). Получен больший процент выживаемости спермиев после дефростирования, в сравнении средой трис-НСI-буфер (25 и 20 % соответственно), а также большее количество спермиев, с поступательным движением (60 и 45 % соответственно).



Рис. 8. Показатели дефростированной спермы русского осетра после глубокого замораживания

В среде трис-НСI-буфер с витамином B₁₂ наблюдали снижение активности (выживаемость – 10 %, спермиев с поступательным движением – 30 %). Полученные результаты объясняются содержанием в цианокобаламине активного кобальта, который взаимодействует с составными частями раствора трис-НСI-буфера, образуя прочные соединения, вследствие чего не происходит криопротекторного эффекта.

После хранения образцов спермы русского осетра в течение месяца при температуре – 196 °С в среде Штайна с добавлением витамина B₁₂ в концентрации 0,5 мг/л показатели активности не изменились, что указывало на возможность хранения спермы долгое время без негативных последствий.

Таким образом, для криоконсервации спермы исследованных рыб следует рекомендовать комбинацию среды Штайна с витамином B₁₂.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате экспериментов по определению оптимальной дозы цианокобаламина, необходимой для повышения репродуктивных показателей самок, установлено, что лучшие рыболовные показатели получены при введении 50 мкг/кг массы тела, при этом отмечено 100%-ное созревание производителей, что на 10 – 40 % выше показателя в контроле. Процент оплодотворения икры увеличился на 10 – 17,9 %.

Икра, полученная от самок, проинъецированных цианокобаламином, отличалась от контрольной более высоким содержанием протеина (на 2,3 %) и липидов (на 1,1 %), что в последствии будет способствовать лучшей обеспеченности эмбриона питательными веществами. Высокое содержание протеина и липидов в икре связано с тем, что цианокобаламин входит в состав основных ферментов, катализирующих реакции бел-

кового, липидного и углеводного обмена, вместе с фолиевой кислотой участвует в синтезе аминокислот.

Исследование в период инкубации показало, что процент оплодотворения икры на стадии четырех бластомеров и процент развивающейся икры (17 ст.) в опытном варианте был выше контроля на 17,9 % и 19,3 %, соответственно.

Проведение испытаний в производственных условиях, показало эффективность использования препарата цианокобаламина в период подготовки икры к инкубации. При исследовании различных норм витамина В₁₂ лучшие результаты получены при обработке икры цианокобаламином в концентрации 1,0 мг/л, при этом выход свободных эмбрионов составил 77 % - 85 % (соответственно на Волгоградском и Донском ОРЗ), в контроле - 69,5 % - 67 %, кроме того в период эмбрионального развития отмечено снижение процента нарушений в развитии в среднем на 8,1 %

Дальнейшие наблюдения за развитием личинок и молоди русского осетра подтвердили положительное влияние витамина В₁₂ на рыб в разные периоды онтогенеза. Проведенный анализ полученных рыбоводно-биологических и физиолого-биохимических данных позволяет с достоверностью утверждать, что у опытной группы удалось повысить выживаемость личинок на 8 % при снижении отклонений в развитии в 2 раза. Молодь в опыте отличалась хорошим физиологическим состоянием, о чем свидетельствует повышение содержания протеина на 2,5 %, липидов - на 1,4 %. Отмечено положительное влияние витамина В₁₂ на показатели крови молоди опытной группы, которые соответствовали состоянию здоровой рыбы.

Для более эффективной подготовки производителей осетровых рыб разных биологических групп была разработана схема инъектирования производителей осетровых рыб комплексом витаминов С, Е и В₁₂. Использование витаминов С, Е и В₁₂ позволяет улучшить физиологическое состояние функционально ослабленных производителей озимой расы русского осетра и ведет к увеличению процента оплодотворения икры на 4 %. Процент оплодотворения икры яровых самок составил 87 %, что на 2 % больше контроля. Гематологические показатели самок яровой и озимой расы, инъектированных комплексом витаминов, свидетельствовали о лучшем физиологическом состоянии, содержание белка в сыворотке крови на 4,1 г%, гемоглобина на 4 г/л, гематокрита на 0,05 л/л, количество эритроцитов на 0,022 млн/мм³ было выше, чем у контрольной группы самок.

Оценка влияния комплекса витаминов на самцов осетровых рыб показала, что введение витаминных инъекций улучшает качество спермы до 5-ти баллов, увеличивает время подвижности спермиев на 50 сек.

Применение данной схемы подготовки к нересту севрюги и стерляди показало, что процент оплодотворенной икры севрюги был на 3 % выше контроля, а количество самок, отдавших доброкачественную икру, в опытной группе увеличилось, икра, полученная от этой группы, имела высокий процент оплодотворения — 90 % (в контроле — 85 %).

Исследования по использованию цианокобаламина для методов криоконсервации половых клеток рыб позволило рекомендовать его качестве модификатора криопротекторного действия ДМСО, а также для смягчения осмотического стресса в клетках и предотвращения свободно-радикального окисления.

Введение цианокобаламина в криораствор (среда Штайна) в концентрации 0,5 мг/л повышало выживаемость спермиев осетровых рыб на 31,9 %, время движения спермиев — на 50,8 сек. Добавление витамина в трис-НСI-буфер не способствовало увеличению криопротекторного действия среды из-за взаимодействия кобальта в составе цианокобаламина с составными частями раствора с образованием прочных связей.

Активность спермы белого толстолобика увеличивалась при введении 1,0 мг/л витамина В₁₂ в сравнении с контролем. Выживаемость спермы была выше на 55 — 60 %, время движения — на 2 — 15 сек. Введение витамина В₁₂ в среду при консервации спермы окуни в концентрации 1 мг/л также привело к увеличению показателей дефростированной спермы.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что введение цианокобаламина в период преднерестового содержания улучшает рыбоводно-биологические показатели самок осетровых рыб. Норма введения витамина В₁₂ составляет 50 мкг/кг массы тела, что способствует повышению созревания самок на 10 — 40 % и увеличивает процент оплодотворения на 18 %, выхода эмбрионов на 20 %.
2. Выявлено, что оптимальной дозой препарата цианокобаламина для обработки икры осетровых рыб является 1 мг/л при длительности обработки 45 мин. Это позволяет снизить гибель эмбрионов на критических этапах развития на 5,4 %, количество уродливых эмбрионов и личинок — на 8,1 %, при повышении процента выхода свободных эмбрионов. Икра, обработанная витамином В₁₂, отличалась от контрольной группы более высоким содержанием протеина (на 5,7 %) и жира (на 3 %).
4. Определено, что молодь, полученная от икры, обработанной цианокобаламином, имела лучшие показатели роста и выживаемости, прирост массы тела на 14% выше, чем в контроле. Содержание белка в

теле молоди составило 67,7 % (на 2,7 % выше показателя в контроле), концентрация гемоглобина в крови – 74 г/л, что свидетельствовало о хорошем физиологическом состоянии.

5. Введение цианокобаламина в комплексе с витаминами С и Е производителям осетровых рыб повысило их репродуктивные качества при длительной резервации, что позволило увеличить процент оплодотворения икры русского осетра на 2 – 4 %, севрюги – на 3 %; стерляди – на 5 %, концентрацию спермы самцов (на 0,05 – 0,25 млн./мм³) и продолжительность поступательного движения спермиев (на 20 – 50 сек), в сравнении с контрольной группой.

6. Показано, что введение цианокобаламина в концентрации 0,5 мг/л в криозащитную среду на начальных этапах криоконсервации спермы русского осетра повышает выживаемость и время подвижного состояния спермиев на 31,9 % и 50,8 сек, соответственно. Концентрация 1 мг/л цианокобаламина в криосреде способствует увеличению выживаемости спермы белого толстолобика – на 55 %, окуня – на 3 %, времени движения спермиев – на 15 и 5 сек, соответственно. При глубокой заморозке спермы русского осетра и хранении в течение месяца выживаемость после размораживания составила 25 %; активность 3 балла; количество спермиев с поступательными движениями – 60 % при времени движения – 80 с.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для улучшения рыбоводно-биологических показателей и физиологического состояния производителей осетровых рыб, а также повышения выживаемости потомства рекомендуется проводить подготовку производителей к нересту с использованием препарата цианокобаламина при норме введения 50 мг/кг массы тела.

2. С целью улучшения физиолого-биохимического состояния выращиваемой молоди осетровых рыб рекомендуется проводить обработку икры цианокобаламином перед закладкой на инкубацию в концентрации 1,0 мг/л и экспозиции 45 мин.

4. Для повышения физиологического состояния производителей осетровых рыб разных биологических групп при длительной резервации рекомендуется проводить подготовку к зимнему содержанию (осенью) и к нересту (весной) комплексом витаминов С, Е и В₁₂.

5. С целью сохранения спермы рыб во время криоконсервации в среде Штайна рекомендуется добавлять цианокобаламин в концентрации

0,5 мг/л – для осетровых, 1,0 мг/л – для карповых, 1,0 мг/л – для окуневых.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Храмова А.В., Сорокина М.Н., Чипинов В.Г. Эффективность обработки икры осетровых рыб медицинским препаратом цианокобаламина (витамина В₁₂). Вестник АГТУ. – 3(26)/2005, май-июнь. – Астрахань: АГТУ, 2005. – С. 55-61.

2. Чипинов В.Г., Сырбулов Д.Н., Пономарев С.В., Чипинова Г.М., Храмова А.В. Повторное получение посадочного материала для целей искусственного воспроизводства от самок русского осетра в условиях осетрового рыбоводного завода. Вестник АГТУ. Спец. приложение. – 5(28)/2005, сентябрь-октябрь. – Астрахань: АГТУ, 2005. – С. 74-77.

3. Пономарева Е.Н., Сырбулов Д.Н., Храмова А.В. Использование витаминов для повышения эффективности искусственного воспроизводства осетровых рыб. Аквакультура и интегрированные технологии: проблемы и возможности: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 60-летию Московской рыбоводно-мелиоративной опытной станции и 25-летию ее реорганизации в ГНУ ВНИИР. Сборник научных докладов. Т. 2 – Москва, 11–13 апреля 2005 г. ГНУ ВНИИР ирригационного рыбоводства – Москва, 2005. – С. 291-296.

4. Пономарева Е.Н., Пономарев С.В., Сорокина М.Н., Храмова А.В. Повышение резистентности осетровых рыб на ранних этапах онтогенеза при использовании витаминных препаратов. // Вестник Южного научного центра Российской академии наук. – М.: Наука. 2005. – Т. 1, вып. 1. – С. 41-44.

5. Букин В.Г., Храмова А.В., Богатырева М.М., Гаврилкин А.В. Использование витаминов при криоконсервации спермы осетровых рыб // Современные технологии мониторинга и освоение природных ресурсов южных морей России. Тезисы докл. Межд. Семинара (г. Ростов-на-Дону, 15 – 17 июня 2005 г.). Ростов-на-Дону: изд-во ООО «ЦВВР», 2005. – С. 31-33.

6. Храмова А.В., Сырбулов Д.Н., Пузанков И.В. Использование цианокобаламина для повышения выживаемости осетровых рыб. – Первая ежегодная научная конференция студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН. Материалы молодежной конференции (Ростов-на-Дону, 15–21 апреля 2005 г.). Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2005. – С. 337-339.

7. Пономарева Е.Н., Сорокина М.Н., Храмова А.В., Богатырева М.М. Использование биологически активных веществ витаминов при криоконсервации спермы осетровых рыб // Повышение эффективности

использования водных биологических ресурсов Мирового океана. Международная научно-практическая конференция: Материалы конференции. – М.: Изд-во ВНИРО, 2005. – С. 139-140.

8. Храмова А.В., Богатырева М.М., Болонина Н.В. Криопротекторный эффект цианокобаламина при замораживании спермы осетровых рыб.// Вторая ежегодная научная конференция студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН: Материалы молодежной конференции (Ростов-на-Дону, 5-26 апреля 2006 г.). Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2006. – С.44-45.

9. Матишов Г.Г., Матишов Д.Г., Пономарева Е.Н., Чипинов В.Г., Лужняк В.А., Ковалева А.В. Результаты выращивания донской стерляди в условиях замкнутой системы водообеспечения. – Состояние и перспективы развития фермерского рыбоводства аридной зоны: Тезисы докладов международной научной конференции (г. Азов, июнь 2006 г.) / Отв. Ред. Ак. Г.Г. Матишов. Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2006. – С. 7-9.

10. Чипинов В.Г., Коваленко М.В., Храмова А.В. Особенности выбора видов осетровых для выращивания в УЗВ и опыт транспортировки молоди при высоких летних температурах.// Вестник АГТУ: Астрахань: Изд-во АГТУ, 2006. С. 59-63.

11. Пономарева Е.Н., Сорокина М.Н., Храмова А.В., Богатырева М.М., Гавришкин А.В. Подбор криопротекторов и оптимизация режимов охлаждения спермы русского осетра при криоконсервации. – Вестник КБГУ. Биологические науки. Вып. 8 – Нальчик: Каб-Балк. ун-т, 2006. –С. 66-69.

