

На правах рукописи

КОРОТЕНКО АННА ВИКТОРОВНА

**ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ РЫБ –
ОБЪЕКТОВ АКВАКУЛЬТУРЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СТРЕССОРНЫХ
ВОЗДЕЙСТВИЯХ И ПОИСК АДАПТОГЕНОВ**

Специальность 06.04.01 – Рыбное хозяйство и аквакультура

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

17 НОЯ 2011



005002265

Астрахань – 2011

Работа выполнена в Астраханском государственном университете (АГУ) и в Каспийском научно-исследовательском институте рыбного хозяйства (ФГУП «КаспНИРХ»)

Научный руководитель:
доктор биологических наук

Лазько Марина Владимировна

Официальные оппоненты:
Доктор биологических наук,
профессор, заслуженный
деятель науки РФ

Воробьев Владимир Иванович

Доктор биологических наук,
заслуженный работник
рыбного хозяйства

Сокольский Аркадий Федорович

Ведущая организация:

Волгоградское отделение Федерального
государственного научного учреждения
«Государственный научно-исследовательский институт
озерного и речного рыбного хозяйства»
(Волгоградское отделение ФГНУ «ГосНИОРХ»)

Защита диссертации состоится 30 ноября 2011 года в 12⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д.212.009.13 при Астраханском государственном университете по адресу: 414000, г. Астрахань, пл. Шаумяна 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Астраханского государственного университета по адресу: 414000, г. Астрахань, пл. Шаумяна, 1. С авторефератом можно ознакомиться на сайте ВАК: <http://vak.ed.gov.ru/ru/>

Автореферат разослан

«___» октября 2011 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А.С. Дулина

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследований. Современная ситуация в Волго-Каспийском регионе характеризуется усилением бурного развития добычи и переработки углеводородного сырья не только в традиционных районах юго-запада Каспийского моря, но и непосредственно на территории его северного шельфа. Такое эколого-техногенное воздействие отрицательно влияет на естественное воспроизводство ценных аборигенных видов рыб, в частности, осетровых и лососёвых, вносит серьёзные трудности в биотехнику их искусственного разведения, ведущегося по типу пастбищной аквакультуры (Журавлёва, 2010).

Снижение величины рН в искусственных пресноводных водоёмах вследствие усиленного поступления CO_2 органического происхождения, сброса кислых стоков ведёт к развитию разных по направленности, длительности, выраженности и обратимости физиолого-биохимических изменений в организме рыб (Лукияненко, 1983, 1987; Рыжков, Кучко, Дзюбук, 2010; Thomas, 1982; Bhaskar et al., 1985; Höbe et al., 1983; Haya et al., 1985; Iwama et al., 1992).

Строительство и развитие Астраханского газового комплекса (АГК) вызвало обоснованную тревогу за судьбу уникальной ихтиофауны Волго-Каспийского региона. Здесь находятся основные нерестилища и пути миграции ценных видов рыб. Степень загрязнения атмосферного воздуха хорошо прослеживается по насыщению снежного покрова загрязняющими веществами, которые влияют на рН талых вод. По данным В.А. Андрианова с соавт. (1998) за период 1989-1997 годов минимальные величины рН снежного покрова колебались в пределах 4,7-5, 4. В этой связи, прежде всего, следует отметить ухудшение рыбоводного качества и резкое снижение репродуктивного потенциала заготавливаемых производителей ценных видов рыб. Сохранение генофонда и поддержание численности ценной ихтиофауны Каспийского моря на оптимальном уровне является важной проблемой искусственного воспроизводства (Бурцев, 2009; Васильева, 2010; Васильева, Абдрахова, 2010; Багров и др., 2010; Матишов и др., 2010; Matishov, 2010). Следует отметить, что в Астраханской области сосредоточена одна из мощнейших рыбоводных индустриальных баз Российской Федерации, насчитывающая свыше 120 рыбоводных заводов, в том числе 7, специализирующихся на разведении осетровых рыб. Их общий годовой объём выпуска в Северный Каспий молоди осетровых составляет 50 млн шт., белорыбицы – 1 млн шт.

Особо следует отметить проблему купирования негативных последствий стресса, различного генезиса у гидробионтов, принадлежащих к различным филогенетическим и экологическим группам (лососевые и осетровые виды рыб). В этом плане целесообразно упомянуть о работе В.М. Кычанова, С.А. Леонтьева (1981), в которой впервые приводятся сведения о

биопротекторном свойстве солоноватой воды. L.V.Vitvitskaya et al.,(1998), М.А. Егорова и др., (1999, 2000), М.А. Егорова (2002), подробно описывают особенности физиологического действия адаптогена эписброассинолида на организм рыб.

В связи с этим, в условиях интенсивной аквакультуры необходимо знать степень влияния на организм производителей молоди повреждающих факторов внешней среды, хэндлинг- (различные манипуляции с рыбой в процессе искусственного разведения) и краудинг-стрессов (стресс перенаселения) (Скопичев, Максимюк 2009; Сеин, Жеребилов, 2009; Силкина, Микряков, Микряков, 2009; Моисеенко, 2010). Усиленная антропогенная активность, наблюдающаяся в последние десятилетия, непосредственно сказывается на функционировании различных экосистем.

Для выхода из сложившейся ситуации крайне необходим дальнейший поиск эффективных биопротекторов. В этом аспекте проанализировано действие на функциональное состояние производителей и молоди севрюги протопорфирина (Цитохром-С). Он является одним из основных окислительно-восстановительных ферментов дыхательной цепи.

Цель исследования. Выявить особенности влияния стрессорных воздействий различного генеза на биологические показатели филогенетически и экологически различных групп рыб, необходимых для их сохранения.

В ходе работы предстояло решить следующие задачи:

1. Выявить особенности функционального состояния тилапии, как модельного объекта, в условиях кислотного стресса.

2. Исследовать особенности влияния метилтестостерона на выживаемость, реверсию пола и темп роста молоди тилапии.

3. Изучить протекторное действие раствора поваренной соли в жестких стрессирующих условиях на организм каспийской кумжи.

4. Определить протекторное действие Цитохрома-С на анадромных производителях севрюги позднего захода в Вогу в условиях термо- и краудинг-стрессов.

5. Выявить протекторное действие Цитохрома-С на заводскую молодь севрюги в условиях стресса голодания.

6. Оценить физиолого-биохимический интерьер и репродуктивный потенциал самок русского осетра с различными рыбоводными характеристиками в условиях хэндлинг-стресса.

7. Изучить функциональное состояние самок белорыбицы в различные сезоны года, установив связь уровня интегрального физиологического параметра – скорости оседания эритроцитов (СОЭ) с температурой водной среды, стадиями зрелости гонад, гонадо-соматическим индексом, фертильностью и важными физиолого-биохимическими показателями (уровнями общего сывороточного белка,

коллоидоустойчивостью сывороточных белков, концентрацией общего гемоглобина).

Научная новизна. Впервые получены данные по связи уровня интегрального физиологического параметра СОЭ у анадромных и заводских самок белорыбицы с экзо- и эндогенными факторами и изучено влияние кислотного стресса на уровни тканевой глюкозы и креатинина у рыб (на примере тилапии).

Изучено влияние гормональной диеты, содержащей МТ, на функциональное состояние и половую принадлежность молоди тилапии.

В результате регрессионного и корреляционного анализов впервые выявлена тесная связь уровня фертильности самок русского осетра с относительным содержанием а- и γ -глобулинов.

Обнаружено выраженное протекторное действие раствора поваренной соли (5%) в жёстких стрессирующих условиях на организм молоди каспийской кумжи. Впервые в аквариальных условиях достигнуто серебрение пестряток кумжи, связанное с готовностью обитания в морской воде.

Дана характеристика Цитохрома-С, как эффективного адаптогена при экстремальных воздействиях (хэндлинг, неблагоприятный термический режим) на самок севрюги и их потомства. Впервые при инъекции самок севрюги раствором Цитохрома-С в условиях экстремальной температуры водной среды удалось получить потомство от 50% исследованных рыб.

Практическая значимость работы. На основании исследований и полученных данных разработаны рекомендации по тестированию функционального состояния самок ценных проходных видов рыб, позволяющих прогнозировать их репродуктивный потенциал. В условиях интенсивной аквакультуры для купирования хэндлинг- и термо-стрессов необходимо рекомендовать в качестве эффективных биопротекторов растворы поваренной соли барьерной солёности и растворы Цитохрома-С.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Содержание тилапий в подкисленной воде приводит к тяжёлым последствиям – нарушениям функционального состояния и, как следствие, торможению роста, повышенному отходу рыб.

2. Использование гормональной диеты (на основе тестостерона) при выращивании молоди тилапии влияет на биологические показатели (рост, отход); обуславливает формирование половой принадлежности мужского типа.

3. Экспериментальные исследования указывают на возможность практического применения при заводском воспроизводстве ценных видов рыб в качестве биопротекторов растворов воды барьерной солёности и растворов препарата «Цитохром-С».

4. Физиолого-биохимические и рыбоводные исследования самок русского осетра позволили обнаружить наличие тесных математических

связей уровня фертильности с величиной важнейших белковых фракций сыворотки крови.

5. На основании изучения физиологического состояния анадромных самок белорыбицы в различные сезоны года показано, что уровень СОЭ обуславливается температурой водной среды и стадиями зрелости гонад. Выявлено, что уровень СОЭ обратно пропорционален фертильности.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы обсуждались на II Международной конференции «Комплексные исследования биологических ресурсов южных морей и рек» (Астрахань, 11-13 апреля 2007 г.), на Международной научно-практической конференции, посвящённой 110-летию КаспНИРХа «Проблемы изучения, сохранения и восстановления водных биологических ресурсов в XXI веке» (Астрахань, 2007), Международном симпозиуме «Тепловодная аквакультура и биологическая продуктивность водоёмов аридного климата» (Астрахань, 16-18 октября 2007), Международной научно-практической конференции, посвящённой 450-летию юбилею г. Астрахани «Комплексный подход к проблеме сохранения и восстановления биоресурсов Каспийского бассейна» (Астрахань, 13-16 октября 2008 г.), Международной конференции «Экокультура и фитобиотехнологии улучшения качества жизни на Каспии» (Астрахань, 7-10 декабря 2010 г.).

Публикации. По теме диссертации издана 1 монография и опубликовано 11 научных статей, 3 из них изданы в журналах ВАК РФ.

Структура диссертации. Работа состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 234 источника, в том числе 94 на иностранных языках. Диссертация изложена на 132 страницах текста, содержит 8 таблиц и 15 рисунков.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика полевого материала

Тяляния. Экспериментальные работы по характеристике влияния *кислотного стресса* на функциональное состояние тялянии проводились в аквариальных условиях. Опытных и контрольных особей содержали в аквариумах объёмом в 50 л.

Гормональная реверсия пола у костистых рыб (на примере тялянии). Одним из *стрессорных* воздействий является *кормление* с использованием медикаментозных средств. Гормональная диета проводилась при изучении влияния синтетического андрогена – метилтестостерона (метилтестостерон-17 α -метиландростен-4ол-17- β -он-3) на реверсию пола,

Молодь кумжи в количестве 20 экземпляров средней длиной 55 мм подверглась следующим *жестким стрессирующим* условиям:

1. *транспортировка* рыбы проводилась в пакетах с кислородом, водой и льдом с высокогорной выростной базы на реке Терек (Дагестан) в аквариальный комплекс ФГУП «КаспНИРХ»;

2. *длительность* перевозки составила около 8 часов;

3. *пересадка* осуществлялась в 200-литровый аквариум;

4. значение *температуры воды* в аквариуме колебалось в пределах 22-23°C.

Экспериментальные работы с производителями *севрюги* проводились на Кизанском ОРЗ при повышенной температуре (23°C) речной воды (*термо-стресс*). После транспортировки в течение 5 часов в живорыбной прорези (*краудинг-стресс*) все выжившие производители севрюги (8 из 10 особей) были проинъекцированы аптечным Цитохромом-С из расчета 2 мл на одну особь (5 мг чистого препарата).

Для проведения экспериментальных работ по повышению адаптационных возможностей *молодь севрюги* подращивали в воде, содержащей малые (0,0125 мг/л) концентрации Цитохрома-С, в условиях *стресса голодания*.

Полевые работы с производителями *русского осетра* проводились в 2008, 2009 годах на Кизанском и Лебяжьем осетровых рыбоводных заводах (КОРЗ, ЛОРЗ) в условиях *хэндлинг-стресса*. В общей сложности исследовано 57 самок.

Сбор исследовательского материала по оценке функционального состояния *самок белорыбицы* с помощью СОЭ проводился в марте-ноябре (*миграция*) 1973-1975; 2002-2005 гг. в дельте Волги и непосредственно в приплотинной зоне Волгоградской ГЭС (были использованы как собственные данные, так и архивный первичный материал). Эколого-физиологические и рыбоводные показатели изучали и у производителей в условиях Александровского осетрового рыбоводного завода (АОРЗ). В общей сложности анализу подверглись около 400 самок белорыбицы.

Математический анализ результатов исследований проведён в информационно-вычислительном центре КаспНИРХа по программам «OREGAN», «REGRESS-30».

Таблица 1

Виды стрессорных воздействий и применяемые методики на различных видах рыб

Вид рыбы	Количество исследуемых рыб	Вид стрессорного воздействия	Используемые методики
Тилапия	520	Кислотный стресс; Кормление с использованием	Определение глюкозы в водных вытяжках из мышечной ткани проводили с помощью цветной реакции с

		гормональной диеты	орто-толуидином (Кондрахин и др., 1985). <i>Измерение содержания креатинина в супернатанте мышц</i> осуществляли с помощью цветной реакции Яффе (Кондрахин и др., 1985). <i>Концентрацию ионов аммония</i> определяли калориметрически с использованием реактива Несслера (Агатова, Налетова, Зубаревич, 1991).
Каспийская кумжа	20	Длительная транспортировка; хэндлинг-стресс	Вода барьерной солёности в 5‰ приготавливалась путём разведения 5 г обыкновенной поваренной соли в 1л водопроводной воды.
Севрюга	122 (из них 80 молодь)	Термо-краудинг-стрессы; стресс голодания	<i>Содержание свободноразирующих сульфгидрильных групп</i> в водных мышечных вытяжках определяли фотокolorиметрическим ультрамикрометодом по В.Ф. Фоломееву (1981) в модификации В.М. Кычанова и др., (1986). <i>Концентрацию триглицеридов в сыворотке крови</i> и мышечносупернатанте определяли энзиматическим колориметрическим способом (Trinder, 1969).
Русский осетр	57	Хэндлинг-стресс	<i>Белковые фракции в сыворотке крови</i> определяли турбидиметрическим методом (Кондрахин и др., 1985). <i>Уровень β-липопротеидов</i> оценивали по Бурштейну (Кычанов, Попов, 1974) <i>Расчетный параметр</i>

			<p><i>Т/ОСБ</i> измеряли по схеме, предложенной В.М. Кычановым (2003) – патент на изобретение.</p> <p><i>Количественный анализ холестерина</i> в сыворотке крови и мышечном супернатанта проводили по методу Мрско-са и Товарека (Тодоров, 1963).</p>
Белорыбца	400	Миграция	<p><i>Концентрацию общего сывороточного белка (ОСБ)</i> определяли рефрактометрически с помощью рефрактометра – ИРФ-22; ИРФ 454 Б (Шелухин, 1974; Кычанов, 2003).</p> <p><i>Уровень коллоидоустойчивости сывороточных белков (КСБ)</i> устанавливали по Вельтману (Тодоров, 1963) и по разработанному способу (Гераскин, Кычанов, 1997; Кычанов, 2003).</p> <p><i>Концентрацию гемоглобина</i> измеряли фотометрическим методом.</p> <p><i>СОЭ</i> оценивали по методу <i>Панченкова</i> (Плотичер, 1962; Кириллов, Кокоза, 2000).</p> <p><i>Стадию зрелости ооцитов</i> определяли на основании визуального и гистологического анализов (Кычанов, Володина, 1985).</p> <p><i>Определение уровня фертильности</i> – относительного содержания оплодотворённой икры – проводили под бинокляром МБС-1 на 3 – 4 сутки после искусственного осеменения.</p>

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Тестирование функционального состояния рыб (на примере тилапии) в условиях закисления водной среды

Выдерживание молоди тилапий в подкисленной воде замедляло интенсивность их роста. После завершения серии опытов (возраст молоди - 60 суток). Средняя масса тела у этих рыбок была в два с лишним раза меньше, чем у контрольных экземпляров (табл. 2).

Таблица 2

Изменение средней массы тела тилапии в течении опыта

$p < 0,05$

Возраст (сутки)	8	20	30	45	60
Контроль (масса тела, мг)	$13 \pm 0,4$	$83,0 \pm 3,0$	$105,0 \pm 9,0$	$595,0 \pm 27$	1830 ± 77
Опыт (масса тела, мг)	$13 \pm 0,4$	$44,0 \pm 2,0$	$58,0 \pm 4,0$	$172,0 \pm 34$	$860,0 \pm 43$

Анализ прироста массы тела молоди тилапии позволяет судить о негативном влиянии пониженных величин рН воды на этот показатель.

Изменение концентрации глюкозы в водных вытяжках из мышечной ткани довольно тесно коррелирует со временем содержания молоди тилапии в подкисленной воде (рис. 1).

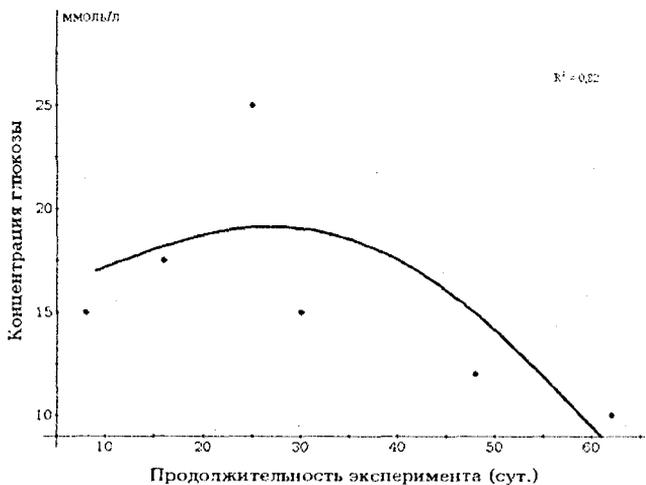


Рис. 1. Изменение концентрации глюкозы мышц тилапии в течение эксперимента

Концентрация глюкозы = f (времени экспозиции). Уравнение регрессии имеет вид: $Y = 13,66 + 0,405 X - 0,0079X^2$; $\eta = 0,71$; ($P < 0,05$).

Изменения концентрации глюкозы в супернатанте мышц в динамике развития стресса носят фазовый характер.

При длительном содержании в подкисленной воде концентрация креатинина в водных вытяжках из мышечной ткани постоянно возрастает (рис. 2).

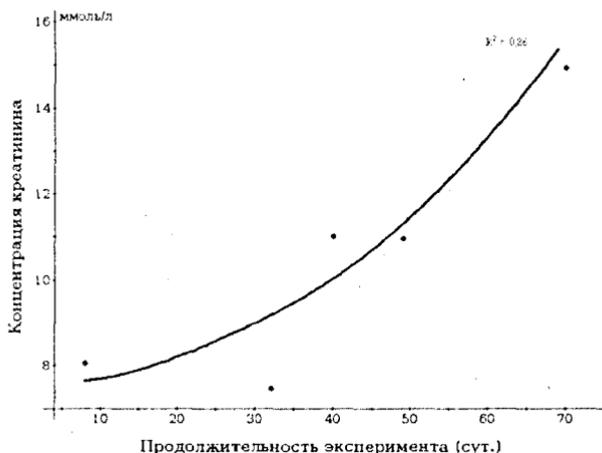


Рис. 2. Изменение содержания креатинина в мышечной ткани молоди тилапии

$Y = f(X)$, Концентрация креатинина = f (времени экспозиции)
Уравнение регрессии имеет вид: $Y = 7,56 - 0,0062X + 0,0017X^2$
 $\eta = 0,93$; ($P < 0,05$).

Гормональная реверсия пола у рыб (на примере тилапии)

В начале эксперимента темп роста молоди был замедлен в варианте I и контроле; в варианте, получавшем 10 мг МТ/1кг (II вариант) привыкание к корму произошло довольно в короткие сроки, что сказалось на увеличении их массы тела (табл. 3).

При использовании гормональной диеты, у тилапии во II и III вариантах опыта отмечался повышенный рост, что может свидетельствовать о возможном положительном воздействии гормонального препарата на её линейно-соматические характеристики.

Выживание в течение всего периода эксперимента во всех его вариантах существенно не отличались от контроля.

В результате проведённых опытов выявлено характерное влияние МТ на половую детерминацию рыб. В III варианте, количество самцов достигало – 95%, против контроля – 31% (табл. 4).

Таблица 3
Выживаемость и темп роста теляпии в период экспериментального кормления рыб МТ ($p < 0,05$)

	Варианты опыта			
	I	II	III	контроль
<i>2 неделя</i>				
длина (мм)	11,8 ± 0,30	14,0 ± 0,25	13,5 ± 0,21	10,6 ± 0,26
масса (г)	0,023 ± 0,002	0,042 ± 0,001	0,036 ± 0,002	0,021 ± 0,002
Выживаемость, %	100	99	100	100
<i>3 неделя</i>				
длина (мм)	13,7 ± 0,40	19,1 ± 0,83	15,6 ± 0,72	13,8 ± 0,60
масса (г)	0,039 ± 0,004	0,096 ± 0,012	0,059 ± 0,005	0,041 ± 0,005
Выживаемость, %	90	89	94	97
<i>4 неделя</i>				
длина (мм)	14,4 ± 0,48	19,7 ± 0,62	16,8 ± 0,31	14,4 ± 0,57
масса (г)	0,045 ± 0,004	0,10 ± 0,01	0,063 ± 0,002	0,044 ± 0,004
Выживаемость, %	80	71	74	91
<i>8 месяцев</i>				
длина (мм)	13,0 ± 0,71	14,7 ± 0,30	15,6 ± 0,14	11,6 ± 0,72
масса (г)	36,3 ± 3,74	55,5 ± 2,67	60,7 ± 3,62	27,1 ± 1,67
Выживаемость, %	56	51	59	60

Таблица 4
Половой состав теляпии в опытных вариантах, %

Половая принадлежность	Варианты опыта			
	I	II	III	контроль
♂♂	95	95	97	31
♀♀	5	5	3	69

Протекторное действие отдельных химических соединений на организм рыб

Влияние протопорфирина (Цитохрома-С) на физиологическое состояние рыб

Проведённые исследования позволили охарактеризовать влияние Цитохрома-С (как препарата, купирующего негативные последствия термо- и краудинг-стрессов) на физиолого-биохимический интерьер анадромной севрюги и подращиваемой молоди.

Самки севрюги

Результаты проведенных работ показали, что из всех отловленных при критической температуре воды (22-23⁰С) производителей, к тому же, подвергшихся во время транспортировки (в течение 5 часов) в живорыбных прорезях жёсткому хэндлинг- и краудинг-стрессу, выжило 80%. Спустя сутки после предварительной инъекции Цитохромом-С (5 мг чистого препарата на одну рыбу) и последующей гипофизарной инъекции самок половые продукты (со средним уровнем фертильности равным 45%) удалось получить от 50% рыб.

Сравнение физиолого-биохимического интерьера рыб после гипофизарной инъекции выявило у благополучных самок севрюги (первая крупa) пониженный уровень β -глобулинов. Это, по-видимому, связано с влиянием Цитохрома-С на процесс завершения созревания и перехода в пограничное состояние между V и VI стадиями зрелости гонад. У второй группы рыб не произошло заметных изменений, что может быть следствием их незрелости. Таким образом, действие препарата оказалось более эффективным для первой группы самок.

Влияние воды барьерной солёности на функциональное состояние пестряток каспийской кумжи

Молодь кумжи в количестве 20 экземпляров средней длиной 55 мм транспортировали в пакетах с кислородом, водой и льдом с высокогорной выростной базы на реке Терек (Дагестан) в аквариальный комплекс ФГУП «КаспНИРХ». Перевозка заняла около 8 часов. При пересадке в 200-литровый аквариум с водой температурой 23⁰С в течении короткого времени погибло 50% особей кумжи. У оставшихся в живых рыбок почти полностью отсутствовала тактильная чувствительность и координация движений. Они спонтанно переносились током воды. После быстрого доведения поваренной солью солёности в аквариумах до 5‰ картина поведения молоди кардинально изменилась: пестрятки приобрели характерное для них поведение. Отход полностью прекратился. Через неделю пестрятки стали превращаться в серебрянок, которые отличались высокой двигательной

активностью, острой реакцией на внешние раздражители, эффективным потреблением сухих и живых кормов

Молодь севрюги

Анализ физиологического состояния молоди севрюги, полученной от опытных самок, позволил отметить у рыб, содержащихся в воде с малым количеством испытываемого препарата (0, 0125 мг/л), более высокие уровни холестерина, глюкозы и альбуминов. Все эти вещества активно участвуют в метаболических процессах и свидетельствуют о стрессовой устойчивости организма. В опытах с голоданием в течение одной недели у рыб, предварительно подвергавшихся воздействию Цитохрома-С, значительно снизился уровень альбуминовой фракции в супернатанте. Их функциональную роль по переносу различных веществ взяли на себя α -глобулины. У контрольной группы рыб компенсаторные функции водорастворимых белков мышечных вытяжек не активизировались.

Функциональное состояние самок русского осетра с различными рыбоводными характеристиками

В результате проведённого исследования оказалось, что 1 группа рыб достоверно отличалась от 2-ой и 3-ей групп самок осетра по относительному уровню сывороточных альбуминов и глобулинов (табл. 5, 6).

Анализ относительного содержания альбуминов у исследованных самок русского осетра показал, что первая группа рыб достоверно отличается от 2-ой и 3-ей более низким его уровнем. Вместе с этим, следует отметить, что по концентрации общего сывороточного белка все группы самок осетра не имели достоверных различий. Такая ситуация может сложиться лишь в результате перераспределения физиологической нагрузки сывороточных белков.

При вскрытии у рыб 1-ой группы в абдоминальной полости практически не обнаружено овариальной жидкости. У самок 2-ой и 3-ей групп овариальная жидкость присутствовала в достаточном количестве. В результате анализа отмечена достоверная тесная связь уровня фертильности самок осетра с относительным содержанием сывороточных α -глобулинов (рис. 3).

Таблица 5
Физиолого-биохимические показатели сыворотки крови самок осетра с различной фертильностью

Показатели	Группа 1. Фертильность 0 %	Группа 2. Фертильность 1,4 %	Группа 3. Фертильность 94,1 %
	$M \pm m^*$	$M \pm m^{**}$	$M \pm m^{***}$

Общий сывороточный белок (г %)	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,6 ± 0,1
Относительный уровень альбуминов, %	20,9 ± 2,6	27,6 ± 1,1	29,0 ± 2,1
Относительный уровень α-глобулинов, %	18,5 ± 2,2	29,3 ± 2,0	23,4 ± 2,7
Относительный уровень β-глобулинов, %	35,0 ± 1,7	23,9 ± 1,9	26,4 ± 2,1
Относительный уровень γ-глобулинов, %	25,6 ± 2,6	25,2 ± 2,0	22,2 ± 2,9

Примечание: * -n=7; ** -n=5; *** -n=15

Таблица 6

Достоверность различий показателей сыворотки крови у 3 групп самок осетра

Показатель	Сравниваемые группы	
	1-2	1-3
Общий сывороточный белок (г %)	P > 0,05	P > 0,05
Относительный уровень альбуминов, %	P < 0,05	P < 0,05
Относительный уровень α-глобулинов, %	P > 0,05	P > 0,05
Относительный уровень β-глобулинов, %	P < 0,05	P < 0,05
Относительный уровень γ-глобулинов, %	P > 0,05	P > 0,05

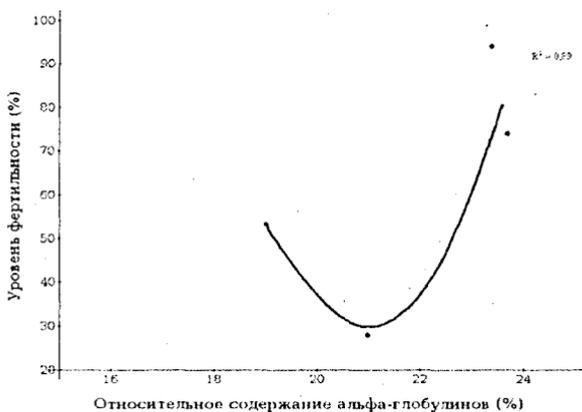


Рис. 3. Зависимость уровня фертильности самок осетра от относительного содержания α-глобулинов в сыворотке крови

Фертильность (%) = f (относительного содержания α-глобулинов, %):

Уравнение регрессии имеет вид: $Y = 2911,9 - 277,0 X + 6,66 X^2$;
 $\eta = 0,89$; $P < 0,05$; $X_{\text{оптимальное}} = 23,4\%$ и $Y_{\text{оптимальное}} = 98,7\%$.

Другим показателем, тесно коррелирующим с уровнем фертильности самок осетра, является относительное содержание сывороточных γ -глобулинов (рис. 4).

Фертильность (%) = f (относительного содержания γ -глобулинов, %),
 $Y = 470,72 - 23,43 X + 0,29 X^2$; ($\eta = 0,98$; $P < 0,005$);

Находим $X_{\text{оптимальное}} = 22,2\%$ и $Y_{\text{оптимальное}} = 89\%$. Регрессионный анализ позволил выявить достаточно тесную связь между фертильностью и концентрацией сывороточного холестерина $\eta = 0,75$; $P < 0,05$. Она описывается следующим уравнением регрессии: $Y = 2434,82 - 73,156 X + 0,719 X^2 - 0,00273 X^3$,

где X – концентрация сывороточного холестерина (мг%); Y – уровень фертильности (%).

$dy/dx = 0$: $X_{\text{максимальное}} = 125,52$ и $Y_{\text{максимальное}} = 85,28\%$.

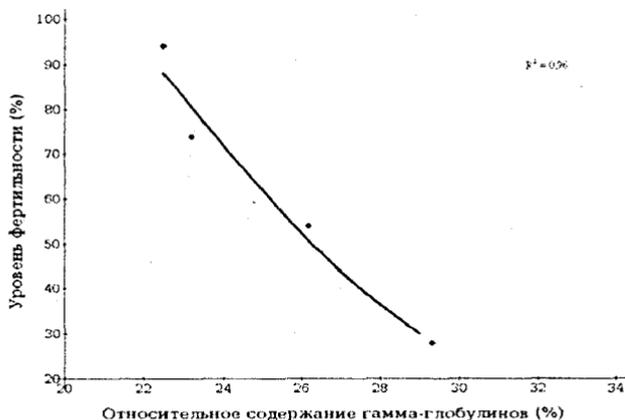


Рис. 4. Зависимость уровня фертильности самок осетра от относительного содержания γ -глобулинов сыворотки кров

Физиолого-биохимические особенности скорости оседания эритроцитов у белорыбицы (*Stenodus leucichthys* (Güldenstädt, 1772))

В результате проведённых исследований обнаружена тесная корреляционная зависимость СОЭ с гонадосоматическим индексом (рис. 5).

СОЭ, мм/ч = f (ГСИ, %);

$y = 0,9996 + 0,5553x - 0,0459x^2 + 0,0011x^3$; $\eta = 0,994$; $P < 0,05$; $d^2y/dx^2 = 0$

$X_{\text{критическое}} = 13,9\%$ ($y_{\text{критическое}} = 2,8$ мм/ч).

Это значение СОЭ у самок сигнализирует о формировании, в основном, относительной массы яичников. Таким образом, уровень СОЭ –

2,8 мм/ч сигнализирует о процессе завершения накопления белково-липидных компонентов в гонадах анадромных мигрантов.

В этой связи целесообразно рассмотреть связь изменений концентрации общего сывороточного белка и СОЭ (рис. 6).

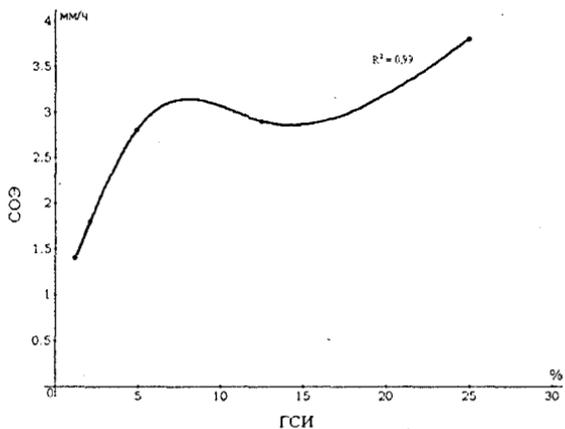


Рис. 5. Динамика величины СОЭ в зависимости от уровня ГСИ самок белорыбицы

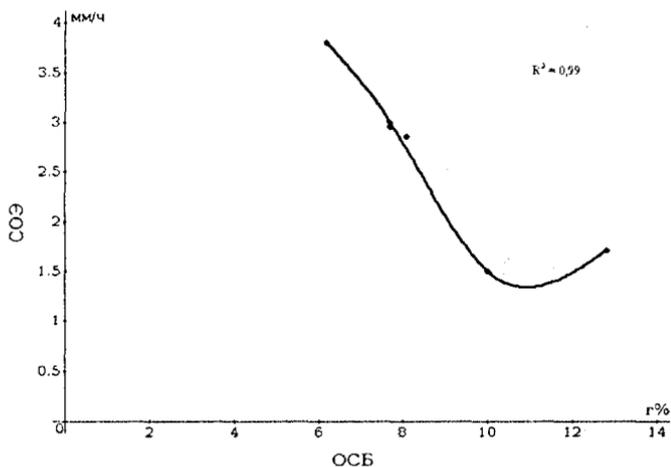


Рис. 6. Динамика уровня СОЭ у белорыбицы в зависимости от ОСБ

СОЭ, мм/ч = f (концентрации общего сывороточного белка, г%);

$$y = -8,137 + 5,2108x - 0,7029x^2 + 0,0278x^3; \eta = 0,995; P < 0,05; d^2y/dx^2 = 0;$$

$$x_{\text{критическое}} = 8,7 \text{ г\%} (y_{\text{критическое}} = 2,3 \text{ мм/ч}).$$

В связи с тем, что СОЭ является гематологическим показателем, вполне определённый интерес представляет его связь с уровнем содержания в крови общего гемоглобина, данная математическая зависимость представлена на рисунке 7.

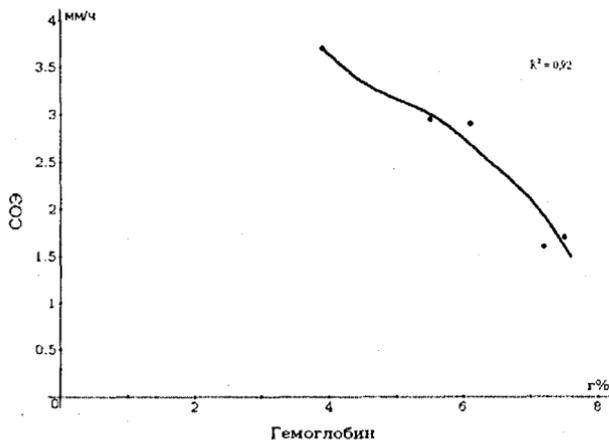


Рис. 7. Зависимость величины СОЭ от концентрации гемоглобина в крови самок белорыбицы

Она описывается следующим уравнением регрессии:

$$y = 16,88 - 7,302x + 1,325x^2 - 0,0833x^3; \eta = 0,96; P < 0,05; d^2y/dx^2 = 0$$

$$x_{\text{критическое}} = 5,3 \text{ г\%} (y_{\text{критическое}} = 2,96 \text{ мм/ч}).$$

В результате анализа материалов полевых исследований выявлена достоверная тесная связь уровня фертильности самок белорыбицы с величиной СОЭ (рис. 8).

$$\text{Уровень фертильности, \%} = f(\text{СОЭ, мм/ч}) y = 57 + 39,25x - 10,75x^2$$

$$\eta = 0,983; P < 0,05.$$

Используя данную зависимость, можно оценить уровни фертильности самок при максимальной (4,5 мм/ч ~ 16%) и минимальной величине СОЭ (1,5 мм/час ~ 92%), что соответствует нашим наблюдениям.

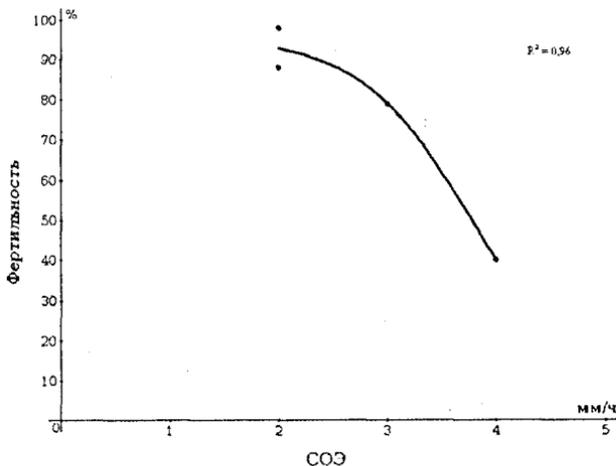


Рис. 8. Связь уровня фертильности самок белорыбицы с величиной СОЭ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интенсивное развитие добычи и переработки углеводородного сырья в Волго-Каспийском бассейне отрицательно влияет на экологическое состояние водной среды и приводит к стрессу гидробионтов, в частности, рыб. Для повышения эффективности искусственного воспроизводства ценных видов рыб необходима разработка и совершенствование комплекса методов оценки их физиологического состояния при различных стрессорных воздействиях.

В результате проведенных исследований при моделировании кислотного стресса у тилляпии обнаружено специфическое нарушение метаболических процессов. При низком рН воды возрастает сопротивление транспорту аммония. Его концентрация в воде снижается. В таких случаях расстройство ионной регуляции выражается в торможении роста рыб и может закончиться летальным исходом, что согласуется с данными McDonald et al., 1980; 1983. В этих условиях изменение концентрации глюкозы в супернатанте мышц носит по Г. Селье фазовый характер. В конце эксперимента наблюдается резкое снижение содержания глюкозы в водных вытяжках из мышц. Это характерно для выраженной фазы истощения и неминуемого летального исхода. При содержании тилляпии в подкисленной среде концентрация креатинина в водных вытяжках из мышечной ткани постоянно возрастает, отражая нарушение энергетического обмена.

Введение в рацион синтетического андрогена оказало выраженное влияние на половую детерминацию молоди тилляпии, что проявлялось увеличением доли самцов в опыте 95%. Анализ результатов проведенных исследований показал, что применение метилтестостерона способствует

формированию у подавляющего большинства из них половой принадлежности мужского типа при кормлении индифферентной молоди тилапии. Это обстоятельство открывает широкую перспективу гормональной индукции половой принадлежности рыб, в частности тилапии, при ведении интенсивной товарной аквакультуры.

Испытания раствора поваренной соли концентрацией 5‰ в качестве адаптогена вызвали досрочное серебрение у пестряток каспийской кумжи. В области аквакультуры любой вид деятельности сопряжён с различными неадекватными воздействиями на организм культивируемых гидробионтов. Наиболее «жесткими» из них являются хэндлинг- и краудинг-стрессы, являющиеся наиболее обычным явлением при транспортировке молоди и взрослых рыб. Он угнетает способность рыб поддерживать гомеостаз и снижает уровень физиологических реакций, необходимых для выживания, роста и воспроизводства. В качестве биопротектора при перевозке и содержании различных в филогенетическом отношении гидробионтов был использован раствор поваренной соли концентрацией 5‰. В качестве тест-объекта была использована молодь каспийской кумжи. Через неделю пестрятки каспийской кумжи стали превращаться в серебрянок, которые отличались высокой двигательной активностью, острой реакцией на внешние раздражители, эффективным потреблением сухих и живых кормов, проявляя эффект биопротекции и акселерации. Можно полагать, что 5‰-ный раствор поваренной соли эффективен в качестве биопротектора при подращивании и транспортировке молоди.

Цитохром-С позволяет купировать негативные последствия термо- и краудинг-стрессов у производителей севрюги и повышает стрессовую устойчивость ее молоди. В результате воздействия Цитохрома-С при экстремально высокой температуре воды (23°C) удалось получить половые продукты от 50% самок. У молоди севрюги, содержащейся в воде с малыми концентрациями Цитохрома-С, обнаружено более высокое, в сравнении с контролем, содержание глюкозы, холестерина, альбумина, что отражает повышенный уровень обменных процессов.

Физиолого-биохимические параметры сыворотки крови самок русского осетра с различной фертильностью в условиях хэндлинг-стресса у рыб с незрелыми половыми продуктами достоверно отличались от созревших самок более низким относительным уровнем альбуминов. Исследование белкового обмена самок русского осетра с различной фертильностью: с нулевой, низкой и высокой фертильностью показало, что 1 группа рыб достоверно отличалась от 2-й и 3-й групп самок осетра по относительному уровню белковых фракций. Снижение содержания альбуминов в крови, в первую очередь, зависит от снижения интенсивности их синтеза в печени. Основной белковой фракцией, расходуемой при голодании, являются альбумины. Проходные осетровые Волго-Каспийского региона после захода на нерест в Волгу практически не питаются. В

результате физиолого-биохимического корреляционного и регрессионного анализов выявлено, что из всех исследованных тестов наиболее тесно с уровнем фертильности самок русского осетра коррелирует относительное содержание сывороточных γ -глобулинов ($r=0,98$ при $P<0,05$). В γ -глобулиновую фракцию белков входят различные антитела, играющие защитную роль. Их высокое содержание характеризует повышенную резистентность организма самок к неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам. Показатель уровня сывороточных γ -глобулинов может использоваться для оценки потенциальной фертильности самок русского осетра.

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ), являясь простым в техническом отношении тестом, дает более расширенную картину и представляет определенный интерес в плане оценки состояния производителей белорыбицы, обитающих в естественных и заводских условиях. С начала захода анадромных мигрантов весной в Волгу и до наступления нерестового состояния ее уровень повышается. Это обусловлено истощением в крови пластических материалов при отсутствии экзогенного питания. Происходит изменение структуры сывороточных белков из-за снижения относительного уровня наиболее подвижных и лёгких альбуминов. Об этом можно судить по величине коллоидной устойчивости белков сыворотки крови. Ко времени созревания рыб в их крови отмечается значительное снижение концентрации гемоглобина, тоже обуславливающее увеличение СОЭ. Обнаружено, что и величина СОЭ очень тесно коррелирует с фертильностью (физиологическое и рыбоводное качество производителей белорыбицы, близких к нерестовому состоянию, зависит от температурного фона водной среды). СОЭ отражает особенности физиологического состояния анадромных мигрантов белорыбицы, обитающих при разных температурных режимах, характерных для того или иного сезона года. В этом аспекте впервые из всех физиолого-биохимических показателей у белорыбицы удалось обнаружить тесную связь температуры водной среды с уровнем СОЭ. Таким образом, СОЭ может служить универсальным эколого-физиологическим показателем при оценке состояния ихтиофауны.

ВЫВОДЫ

1. В экспериментальных условиях кислотного стресса обнаружено специфическое нарушение метаболических процессов, которое стало причиной торможения роста и повышенного отхода рыб. При длительном содержании в воде с пониженными значениями рН концентрация креатинина в супернатанте мышц постоянно возрастает, отражая особенности обменных процессов в период гликонеогенеза.

2. Введение в рацион синтетического андрогена влияет на половую детерминацию молоди тилапии. В вариантах с использованием гормональной диеты количество самцов достигало 95% против контроля – 31%.

3. Испытанный в качестве адаптогена раствор поваренной соли концентрацией 5‰ сыграл роль эффективного акселератора роста у пестряток каспийской кумжи и вызвал их досрочное серебрение.

4. Инъектирование производителей севрюги Цитохромом-С позволяет купировать негативные последствия термо- и краудинг-стрессов. В результате этого удалось получить половые продукты от 50% самок при экстремально высокой (23⁰С) температуре водной среды (без предварительной адаптации).

5. У молоди севрюги, содержавшейся в воде с малыми концентрациями Цитохрома-С отмечена повышенная стрессовая устойчивость, что позволяет рекомендовать к использованию Цитохром-С в качестве эффективного адаптогена.

6. Исследование физиолого-биохимических параметров сыворотки крови самок русского осетра с различной фертильностью в условиях хэндлинг-стресса показало, что рыбы с незрелыми половыми продуктами достоверно отличались от созревших самок более низким относительным уровнем альбуминов.

7. У заводских самок белорыбицы в период нерестовой кампании уровень СОЭ обратно пропорционален фертильности. Снижение коллоидоустойчивости связано с изменением структуры сывороточных белков и зависит от соотношения альбуминов и глобулинов. Значение СОЭ сигнализирует о процессе завершения накопления белково-липидных компонентов. В результате регрессионного и корреляционного анализов удалось выявить тесную связь величины фертильности самок русского осетра с относительным уровнем α - ($\eta = 0,89$; $P < 0,05$) и γ -глобулинов ($\eta = 0,98$; $P < 0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В заводском воспроизводстве ценных видов рыб использовать интегральный показатель функционального состояния (СОЭ) и относительное содержание γ -глобулинов, позволяющих эффективно прогнозировать репродуктивный потенциал производителей.

2. Добавлять в корм метилтестостерон из расчёта 15 мг на 1 кг (молоди тилапии) для гормональной индукции половой принадлежности рыб.

3. Воздействовать Цитохромом-С (из расчёта 5 мг чистого препарата на одну самку и концентрацией препарата 0,0125 мг/л на молодь) с целью повышения их резистентности к различным видам стресса.

4. Перед выпуском подрошенной в заводских условиях молоди каспийского лосося выдерживать её в солоноватой воде для завершения процесса смолтификации и повышения промыслового возврата.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кычанова, А.В. Эффект влияния воды барьерной солености при хэндлинге и подрачивании гидробионтов / А.В. Кычанова // Комплексные исследования биологических ресурсов южных морей и рек: материалы II Международной конф. (11-13 апреля 2007 г., г. Астрахань). – Астрахань, 2007. – С. 56-58.

2. Кычанова, А.В. Реакция ацидофикации водной среды / А.В.Кычанова, Е.С. Казанцева, В.М. Кычанов // Проблемы изучения, сохранения и восстановления водных биологических ресурсов в XXI веке: материалы докл. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 110-летию КаспНИРХ, 16-18 октября 2007 г., Астрахань, Россия. – Астрахань: КаспНИРХ, 2007. – С. 310-313.

3. Казанцева, Е.С. Тилыпия как перспективный объект разведения в условиях Астраханской области / Е.С. Казанцева, Г.П. Даудова, П.В. Чернова, А.В. Кычанова, М.Е. Шишова // Тепловодная Аквакультура и биологическая продуктивность водоемов аридного климата: материалы и доклады Междунар. Симпозиума, 16-18 апреля 2007 г. – Астрахань: АГТУ, 2007. – С. 115-117.

4. Казанцева, Е.С. Гормональная реверсия пола у тилыпии (*Tilapia*) / Е.С. Казанцева, А.В. Кычанова // Проблемы изучения, сохранения и восстановления водных биологических ресурсов в XXI веке: Материалы докл. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 110-летию КаспНИРХа, 16-18 октября 2007 г., Астрахань, Россия. – Астрахань: КаспНИРХ, 2007. – С. 297-299.

5. Кычанова, А. В. Морфологический статус потомства осетровых на ранних стадиях онтогенеза / А.В. Кычанова, Е.С. Казанцева // Комплексный подход к проблеме сохранения и восстановления биоресурсов каспийского бассейна: материалы докл. Междунар. науч.- практ. конф., посвящ. 450-летию г. Астрахани, 13-16 октября 2008 г., Астрахань, Россия. – Астрахань: КаспНИРХ, 2008. – С. 369-371.

6. Зайцев, В.Ф. Влияние кислотного стресса на функциональное состояние рыб (на примере тилыпии) / В.Ф. Зайцев, А.В. Кычанова // Юг России: экология, развитие. – №3. – Институт прикладной экологии Республики Дагестан. – 2008. – С. 71-74.

7. Кычанов, В.М. Эколого-физиологическая оценка состояния объектов аквакультуры / Кычанов В.М., Кычанова А. В. // Астрахань, 2008. – 84 с.

8. Коротенко, А.В. Белковый обмен самок русского осетра с различными рыбоводными характеристиками / А.В. Коротенко, М.В. Лазько, В.М. Кычанов // Экокультура и фитобиотехнологии улучшения качества жизни на Каспии: материалы Международной конференции с элементами научной школы для молодежи (7-10 декабря 2010 г., г. Астрахань). – Астрахань, 2010. – С. 218-220.

9. Коротенко, А.В. Самки русского осетра с различными физиолого-рыбоводными характеристиками / А.В. Коротенко // Журнал фундаментальных и прикладных исследований. – Естественные науки, №11. – 2011. – с. 157-161.

10. Коротенко, А.В. Физиолого-биохимические аспекты тестирования репродукционного потенциала самок русского осетра в условиях аквакультуры / А.В. Коротенко, В.М. Кычанов // Журнал фундаментальных и прикладных исследований. – Естественные науки. – №11. – 2011. – С. 161-165.