

РГБ ОД

27 СЕН 1993

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПРУДОВОГО
РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА (ВНИИПРХ)

На правах рукописи

РОДИНА ТАТЬЯНА ЕВГЕНЬЕВНА

УДК 597-1.044:597-III.13

МЕТЕМОГЛОБИНИЯ НИТРИТНОЙ ПРИРОДЫ У КАРПОВ
И ПУТИ ЕЕ УСТРАНЕНИЯ

03.00.10 - Ихтиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 1993

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПРУДОВОГО
РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА (ВНИИПРХ)

На правах рукописи

РОДИНА ТАТЬЯНА ЕВГЕНЬЕВНА

УДК 597-1.044:597-III.13

МЕТЕМОГЛОБИНЕМИЯ НИТРИТНОЙ ПРИРОДЫ У КАРПОВ
И ПУТИ ЕЕ УСТРАНЕНИЯ

ОЗ.00.10 - Ихтиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Москва 1993

Работа выполнена в секторе физиологии питания рыб ГП
НТЦ "Аквакорм" Всероссийского научно-исследовательского
института прудового рыбного хозяйства (ВНИИПРХ)

Научный руководитель - доктор биологических наук,
профессор ЩЕРБИНА М.А.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор КОНСТАНТИНОВ А.С.,
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
ГОЛОБИНА Н.А.

Ведущее учреждение - АЗНИИРХ

Защита диссертации состоится " 5 " октября 1993 г.
в " II " часов на заседании специализированного совета
Д 117.04.01 во Всероссийском научно-исследовательском
институте прудового рыбного хозяйства (ВНИИПРХ) по адресу:
141821 Московская область, Дмитровский район, пос. Рыбное,
ВНИИПРХ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Всероссийского научно-исследовательского института
прудового рыбного хозяйства

Автореферат разослан " 31 " августа 1993 г.

Ученый секретарь
специализированного
совета

С.П.Тряпкина

ВВЕДЕНИЕ

Накопление в воде азотсодержащих метаболитов рыб, остатков корма и экскрементов является одним из факторов, лимитирующих производство товарной продукции в индустриальных хозяйствах. Промежуточным продуктом их окисления является нитриты, которые оказывают токсическое влияние на рыб (Colt, Tchobanoglous, 1976; Руссо, 1981). Механизм их действия изучен недостаточно, однако, известно, что одной из главных причин является свойство нитритов инактивировать гемоглобин, переводя его в метгемоглобин, неспособный к переносу кислорода. При накоплении метгемоглобина в крови выше определенного уровня возникает патологическое состояние, называемое метгемоглобинемией. Вследствие метгемоглобинемии снижается кислородная емкость крови и развивается гипоксия, что сопровождается торможением обменных процессов и накоплением недоокисленных продуктов в тканях. Это приводит к снижению темпа роста и нередко к гибели рыб. Известно, что летальным для рыб является уровень метгемоглобина около 70% (Bath, Eddy, 1980).

Влияние нитритов изучалось на отдельных видах рыб, в частности, на форели (Rivzo et al., 1974), чазыче (Smith, Williams, 1974), кижуче (Peterson, Meade, 1977), канальном соме (Tetzlaff et al., 1979). Приводимые в этих работах данные дают основание полагать, что уровень образования метгемоглобина зависит от ряда факторов, в том числе, от концентрации нитритов в воде, времени их воздействия, массы и физиологического состояния рыб. Что касается традиционного для нашей страны объекта рыбоводства - карпа, то известны работы М.М. Шахмурзова с соавт. (1990, 1991), в которых приводятся сведения о повышении уровня метгемоглобина у карпов до 23% при содержании нитритов в воде 0,5-0,7 мг/л. В то же время, нам не известны данные, количественно характеризующие зависимость образования метгемоглобина у карпов от условий окружающей среды и физиологического состояния организма. Выяснение этой зависимости представляется крайне важной задачей, поскольку дает возможность определить, какое содержание нитритов в воде может привести к интоксикации, развитию метгемоглобинемии, гипоксии, ухудшению роста рыб и их гибели.

В литературе приводятся сведения о возможных способах снижения токсичности нитритов для рыб (Samerton, 1971; Crawford, Allen, 1977; Руссо, 1981; Шахмурзов и др., 1991). Однако, для

карпа этот вопрос изучен недостаточно полно. Поэтому, цель нашей работы заключалась в исследовании влияния различных факторов на развитие нитритной метгемоглобинемии и разработке на этой основе относительно простого и эффективного способа восстановления кислородсвязывающих свойств гемоглобина у карпов.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие основные задачи:

- изучить влияние абиотических факторов на интенсивность образования метгемоглобина у карпов, в частности, концентрации нитритов в воде, времени их воздействия, температуры воды;
- исследовать влияние массы и физиологического состояния карпов на развитие нитритной метгемоглобинемии;
- разработать способ устранения и предотвращения нитритной метгемоглобинемии и определить оптимальные условия его применения;
- проверить эффективность разработанного способа в промышленных условиях.

Научная новизна работы заключена в комплексе сведений, характеризующих воздействие биотических и абиотических факторов на развитие нитритной метгемоглобинемии у карпов.

Установлено, что определяющее влияние на интенсивность образования метгемоглобина оказывает концентрация нитритов в воде (68%). Сила воздействия биотических факторов значительно меньше (массы - 8%, физиологического состояния - 2%). Температура не оказывает существенного влияния на развитие метгемоглобинемии.

Количественно охарактеризована связь между концентрацией нитритов в воде и содержанием метгемоглобина в крови рыб. Установлено, что она имеет вид, близкий к экспоненциальной зависимости, с наиболее резким подъемом уровня метгемоглобина в диапазоне концентраций нитритов 0,3-0,6 мг/л.

Впервые изучена динамика образования метгемоглобина в зависимости от продолжительности воздействия нитритов. Она характеризуется резким повышением содержания метгемоглобина в течение первых часов воздействия нитритов, затем следует некоторое снижение его уровня до середины-конца первых суток. На протяжении вторых и третьих суток уровень метгемоглобина вновь возрастает, а на четвертые - стабилизируется на достигнутом уровне.

На основании анализа литературы и собственных экспериментальных данных предложен эффективный и простой способ устранения

и предупреждения нитритной метгемоглобинемии. Способ основан на внесении в воду минерального комплекса, ионы которого конкурируют с нитритами за проникновение в организм рыб через жабры, предотвращая образование метгемоглобина. Комплекс получил название "ТРЕСМА-1". Определены оптимальные условия его применения в зависимости от био- и абиотических факторов. Разработанный препарат обладает широким диапазоном действующих концентраций. Величина минимально действующей концентрации зависит от содержания нитритов в воде. Восстановление кислородсвязывающих свойств гемоглобина под действием препарата происходит в течение 24-48 часов.

Внесение препарата в воду в условиях нитритного загрязнения снижает токсичность нитритов, предупреждая развитие метгемоглобинемии. Одновременно происходят благоприятные для организма изменения в обмене веществ, которые выражаются в активации липогенеза и синтеза белка и повышенной энергообеспеченности прироста. Все это способствует увеличению темпа роста рыб на 20-40 % при снижении затрат корма.

Показано, что препарат предотвращает накопление нитритов в организме рыб, что дает возможность получать рыбную продукцию более высокого качества.

Практическая значимость. Разработан и апробирован в промышленных условиях способ предупреждения нитритной метгемоглобинемии и восстановления кислородсвязывающих свойств у карпа. Способ применим в индустриальных хозяйствах.

Апробация работы. Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на Второй симпозиуме по экологической биохимии рыб (Ростов Великий, 1991), конференции "Методы исследования и использования гидросистем" (Рига, 1991), Второй Всесоюзной конференции по рыбохозяйственной токсикологии (Санкт-Петербург, 1991), Восьмой научной конференции по экологической физиологии и биохимии рыб (Петрозаводск, 1992), коллоквиумах сектора физиологии питания рыб ГП ИТЦ "Акватория" (1990-1993).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 154 стр. машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, приложения. Текст иллюстрирован 12 таблицами и 20 рисунками. Список литературы включает 65 работ на русском и 87 на иностранных языках.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе представлена сводка литературных данных, посвященных современному состоянию проблемы возникновения нитритной метгемоглобинемии у рыб. Приводятся сведения о возможных механизмах токсического действия нитритов и образования метгемоглобина. Рассмотрено влияние биотических и абиотических факторов на развитие нитритной метгемоглобинемии у различных видов рыб. Описаны клинические признаки нитритного отравления у рыб и компенсаторные процессы, развивавшиеся в их организме в ответ на нитритную интоксикацию.

Из обзора следует, что имеющиеся в литературе данные не дают достаточно полного представления о влиянии различных факторов на развитие метгемоглобинемии у карпов. Большинство из существующих способов предупреждения нитритной метгемоглобинемии и восстановления кислородсвязывающих свойств гемоглобина недостаточно эффективны или неудобны для широкого применения.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальная часть работы, химическая и аналитическая обработка материала выполнены в течение 1989–1993 гг. в секторе физиологии питания рыб ГП НТЦ "Акваком". Отдельные эксперименты проводились на рециркуляционной установке для выращивания карпов в подсобном хозяйстве "Тауроста" Литовского объединения "Азот", г. Йонава.

Объектом исследования служил карп (*Cyprinus carpio L.*). В опытах использовались рыбы, имевшие различное физиологическое состояние и массу. Схема исследований представлена на рис. I.

Развитие метгемоглобинемии у рыб вызывали путем добавления в воду раствора химически чистого нитрита натрия. Планировалось испытание следующих концентраций азота нитритов: 0 (контроль); 0,5; 1,5; 2,5 мг/л. Фактический диапазон концентраций нитритов несколько отличался от задаваемого в результате процессов жизнедеятельности рыб и микрофлоры. Содержание нитритов в воде определяли колориметрическим методом с реактивом Грисса (Шестерин и др., 1985).

Во время исследований проводили опыты продолжительностью 48–96 часов, а также ростовые эксперименты длительностью 14 и 41 день.

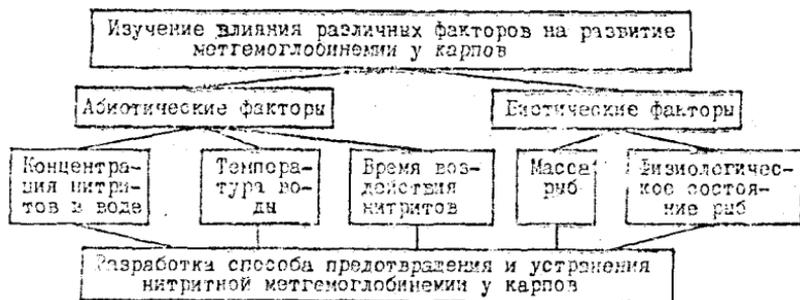


Рис. 1. Схема и основные направления исследований по изучению развития нитритной метгемоглобинемии у карпов

Для проведения краткосрочных опытов использовали непроточные аквариумы емкостью 7 и 60 л. Выбор объема аквариумов определялся массой и количеством рыб. Ростовые эксперименты проводили на лабораторной установке с рециркуляционным водоснабжением, принципиальная схема которой описана А.А.Ярханбеком (1980). Научно-хозяйственные опыты выполняли на промышленной рециркуляционной установке подсобного хозяйства "Тауреста" ГО "Азет" Литовской Республики, г.Йонава.

Перед началом 48-96-часовых опытов рыб адаптировали к условиям эксперимента не менее двух недель. Опыты проводили при температуре воды 20°C. Контроль за развитием метгемоглобинемии осуществляли путем определения содержания метгемоглобина, общего и неокисленного гемоглобина.

Ростовые эксперименты проводили при температуре воды 25°C. Рыб кормили комбикормом ВЕС-РК, который задавали в количестве 5-7 % от их массы. Ежедневно учитывали несъеденные остатки корма. Потери комбикорма от механического рассеивания при погружении в воду определяли по методике М.А.Шербина и А.Ю.Киселева (1985). Для контроля за ростом один раз в 10 дней проводили отлов и взвешивание всех рыб, которые были индивидуально помечены. Биологический эффект препарата "ТРЕСМА-1" оценивали по таким показателям как абсолютный прирост, среднесуточный прирост, кормовой коэффициент (Шербина, 1983). Реакцию крови определяли по содержанию метгемоглобина, а также общего и неокисленного гемоглобина. Об изменениях в обмене веществ судили по химическому составу тела рыб и

жирнокислотному составу общих липидов в начале и конце опытов.

Влажность тела рыб определяли путем высушивания при 105°C; содержание сырого протеина – по общему азоту, установленному способом Кинга, с последующим умножением на коэффициент 6,25; жира – экстракционно-гравиметрическим методом; минеральных веществ – методом сухого озоления в муфельной печи; фосфора – по Фиске и Суббароу (Шербина, 1983). Анализы химического состава тела были выполнены при помощи сотрудников сектора физиологии питания рыб Т.Г.Столяровой и В.И.Кононовой. Жирнокислотный состав общих липидов тела рыб был определен в Институте питания АМН СССР.

При гематологических анализах применяли следующие методы: метгемоглобин определяли колориметрическим методом В.Н.Поляковой с соавт. (1989), содержание гемоглобина в лабораторных условиях устанавливали унифицированным гемиглобинцианидным методом (Кушаковскй, 1968), при проведении промышленных опытов использовали метод Сали (Sahli, 1894). Количество неокисленного гемоглобина вычисляли как разницу между содержанием гемоглобина и метгемоглобина. Концентрацию нитритов в плазме крови определяли колориметрическим методом с реактивом Грисса (Шестерин и др., 1985). Статистическую обработку материала проводили по общепринятым методикам (Лакин, 1968).

За время работы было проведено 48 краткосрочных и 20 хронических опытов на 3200 рыбах, а также 2 научно-хозяйственных на 8000 рыб. Выполнено 6640 определений метгемоглобина и гемоглобина на 3320 пробах крови рыб, 607 анализов плазмы крови на содержание нитритов, 205 химических определений состава тела рыб.

ГЛАВА III. ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РАЗВИТИЕ МЕТГЕМОГЛОБИНЕМИИ У КАРПОВ

Глава посвящена исследованиям, проводившимся с целью определения зависимости между интенсивностью образования метгемоглобина в крови рыб и такими факторами как концентрация нитритов в воде, продолжительность их воздействия на рыб, температура воды, а также масса и физиологическое состояние карпов.

I. Зависимость между концентрацией нитритов в воде и уровнем метгемоглобина в крови карпов

Для изучения влияния концентрации нитритов в воде на содержание метгемоглобина у карпов была проведена серия опытов на ры-

бах, имевших нормальное физиологическое состояние и ослабленных зимним голоданием. Результаты представлены на рис. 2.

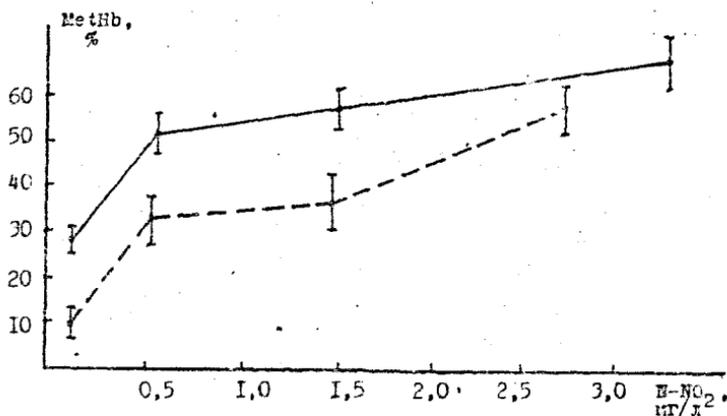


Рис. 2. Влияние концентрации нитритов на уровень метгемоглобина в крови карпов с хорошим физиологическим состоянием и ослабленных зимовкой

- MetHb - метгемоглобин, % от общего гемоглобина;
 N-NO₂ - концентрация азота нитритов в воде, мг/л;
 —●— - карпы с хорошим физиологическим состоянием;
 - - - - - карпы, ослабленные зимовкой;
 I - ошибка средней.

Полученные данные свидетельствуют о том, что количество метгемоглобина зависит от концентрации нитритов в воде. Наиболее резко изменения обнаружены в диапазоне малых концентраций нитритов (от 0,03 до 0,6 мг/л), при которых количество метгемоглобина нередко возрастало до 50% от общего уровня гемоглобина. Дальнейшее повышение уровня нитритов вызвало значительно меньший подъем концентрации метгемоглобина: при содержании нитритов 1,0-1,5 мг/л уровень метгемоглобина изменялся незначительно, при 2-3 мг/л возрастал до 55-63%. Математический анализ показал, что полученное семейство графиков можно аппроксимировать показательной (экспоненциальной) зависимостью.

Известно, что метгемоглобинемия может быть физиологической и патологической (Кушаковский, 1968). Для карпов нормальным предлагалось считать уровень метгемоглобина 2-20% (Полякова и др., 1989). По нашим данным содержание метгемоглобина у карпов в проточной воде не превышает 10%. На этом основании можно предположить, что повышение уровня метгемоглобина более 10% свидетельствует о развитии патологической формы метгемоглобинемии.

Обнаружены различия в реакции организма рыб на присутствие нитритов в воде в зависимости от физиологического состояния. У карпов с хорошим физиологическим состоянием интенсивность образования метгемоглобина в крови была выше, чем у голодавших. Несмотря на это, уровень неокисленного гемоглобина у обеих групп рыб был примерно одинаковым, поскольку у упитанных карпов содержание общего гемоглобина изначально было более высоким.

2. Развитие метгемоглобинемии у карпов в зависимости от продолжительности воздействия нитритов

С целью изучения динамики образования метгемоглобина в зависимости от времени воздействия нитритов были проведены опыты длительностью 96 ч. Сеголетков карпа разделили на 2 группы, составившие 2 варианта опыта. В одном из вариантов концентрацию нитритов в воде повысили до 1,5 мг/л. Другой, в котором нитрит натрия не добавляли, служил контролем. Реакцию крови определяли через 3, 6, 12, 24, 48 и 96 ч. Результаты опытов представлены на рис. 3.

Согласно графику, динамика накопления метгемоглобина в крови рыб была ступенчатой. Через час после повышения концентрации нитритов у рыб происходило некоторое увеличение содержания метгемоглобина. Затем в течение 11 ч его количество опускалось до первоначального уровня. В последующие 60 ч процент метгемоглобина постепенно увеличивался и, достигнув 60%, в оставшиеся 24 ч сохранялся на этом уровне. В повторной серии экспериментов динамика развития метгемоглобинемии была аналогичной.

Одновременно происходили изменения в содержании общего гемоглобина: в первые 6 ч оно снижалось с 71 до 57 г/л, затем в течение 42 ч постепенно увеличивалось до 74 г/л, а в последующие 48 ч вновь медленно снижалось, достигнув 64 г/л.

По аналогии с теплокровными животными (Кушаковский, 1968), подобную динамику образования метгемоглобина можно объяснить пос-

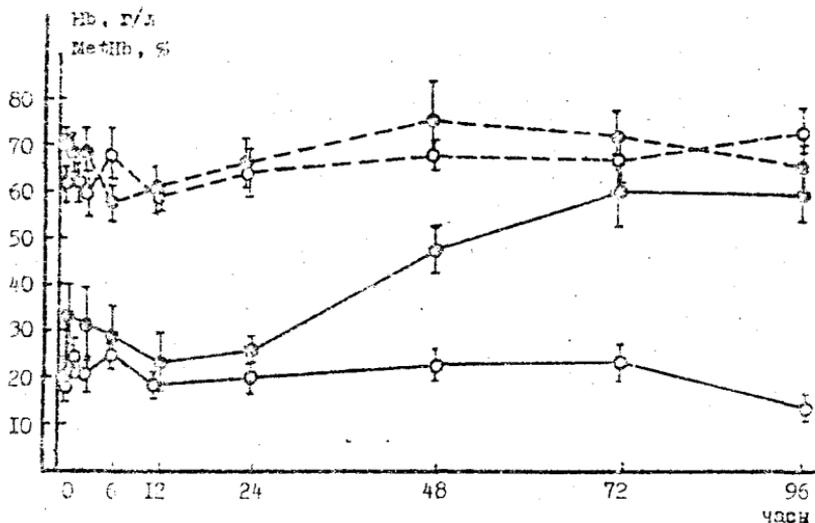


Рис. 3. Динамика развития метгемоглобинемии у карпов в зависимости от продолжительности воздействия нитритов при их концентрации 0 (контроль) и 1,5 (опыт) мг/л MetHb - метгемоглобин, % от общего гемоглобина:
 —○— контроль, —○— опыт;
 Нб - гемоглобин, г/л: —○— опыт, ---○--- контроль;
 ⊕ - ошибка средней.

тепленным включением компенсаторных механизмов, в частности, постепенной активацией метгемоглобинредуктазной системы (Кушаковский, 1968). Повышение содержания метгемоглобина через 1 ч после увеличения концентрации нитритов может свидетельствовать о том, что нитриты быстро проникают в кровь через жабры и окисляют гемоглобин. Это служит условным моментом к включению компенсаторных механизмов, в результате чего уровень метгемоглобина в течение последующих 11 ч снижается. Однако, продолжавшееся проникновение нитритов в кровь, очевидно, приводит к истощению компенсаторных возможностей организма, следствием чего является новое увеличение уровня метгемоглобина. Спустя 72 ч после повышения концентрации нитритов в воде содержание метгемоглобина стабилизируется.

По всей вероятности, этому способствует развивающиеся в ответ на нарастающую гипоксию компенсаторные механизмы другого уровня.

3. Влияние температуры на развитие метгемоглобинемии у карпов

С целью выяснения влияния температуры на образование метгемоглобина в условиях изменяющихся концентраций нитритов в воде была проведена серия опытов на годовиках карпа. Схема опытов предусматривала выявление реакции рыб, находившихся в воде с содержанием нитритов в диапазоне 0–2,5 мг/л, при температурах 10°, 20° и 26°C. Подопытных рыб адаптировали к указанным температурам в течение двух недель, затем в воду добавляли нитрит натрия и выдерживали карпов в течение трех суток. Через 72 ч отбирали пробы крови. Результаты представлены на рис. 4.

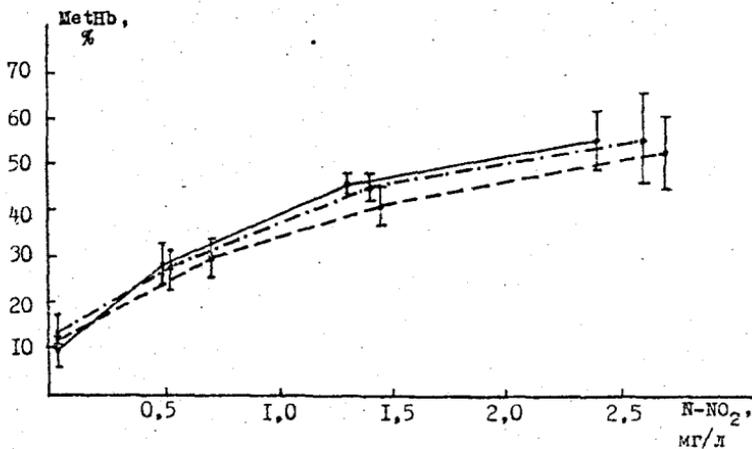


Рис. 4. Образование метгемоглобина у карпов при различных температурах воды и концентрациях нитритов
 { — ошибка средней; MetHb — метгемоглобин, % от общего гемоглобина;
 T°C — 10°, ————— 20°, - - - - - 26°.

Полученные данные дают основание полагать, что у адаптированных карпов температура воды не оказала существенного влияния на интенсивность образования метгемоглобина. В то же время, зависимость образования метгемоглобина от концентрации нитритов сохранилась вне влияния температуры.

4. Развитие метгемоглобинемии у рыб разной массы и физиологического состояния

Следующие серии опытов были проведены с целью изучения влияния массы и физиологического состояния рыб на интенсивность образования метгемоглобина при повышении концентрации нитритов в воде.

Опыты проводили на группах рыб массой 17-25, 50-60 и 300 г, имевших хорошее физиологическое состояние после летнего нагула и ослабленных зимовкой. Концентрация нитритов в воде аквариумов различных вариантов опытов колебалась в пределах 0,5-0,7; 1,1-1,6; 2,1-3,2 мг/л. Время пребывания рыб в воде с указанными концентрациями нитритов составило 72 ч.

Согласно рис. 5, с увеличением массы интенсивность образования метгемоглобина возрастает. У ослабленных рыб массой около 20 и 50 г нитриты вызвали менее выраженную реакцию, чем у рыб такой же массы, но имевших хорошее физиологическое состояние. У 300-граммовых упитанных рыб инактивация гемоглобина происходила в меньшей степени, чем у голодавших.

Расчет содержания неокисленного гемоглобина позволил выявить его снижение у обеих групп рыб в 1,2-3 раза при повышении концентрации нитритов в воде. В то же время, не обнаружено четкой зависимости между физиологическим состоянием, массой и содержанием неокисленного гемоглобина.

Полученные результаты согласуются с данными о повышении чувствительности к нитритам у форели (Руссо, 1981) и кижуча (Reggione, Meade, 1977) с увеличением массы рыб.

Математическая обработка всего массива данных, представленных в главе, характеризующих влияние био- и абиотических факторов показала, что на интенсивность образования метгемоглобина наиболее сильное и определяющее влияние оказывает концентрация нитритов в воде (66%). Сила влияния массы рыб почти в 9 раз меньше (7,8%), физиологическое состояние влияет очень слабо (2%).

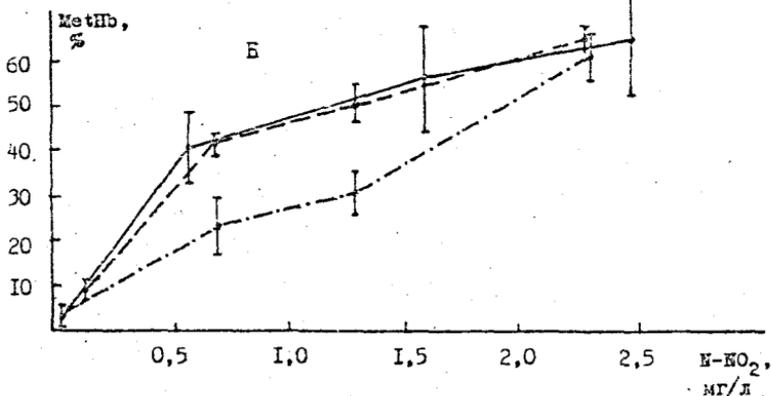
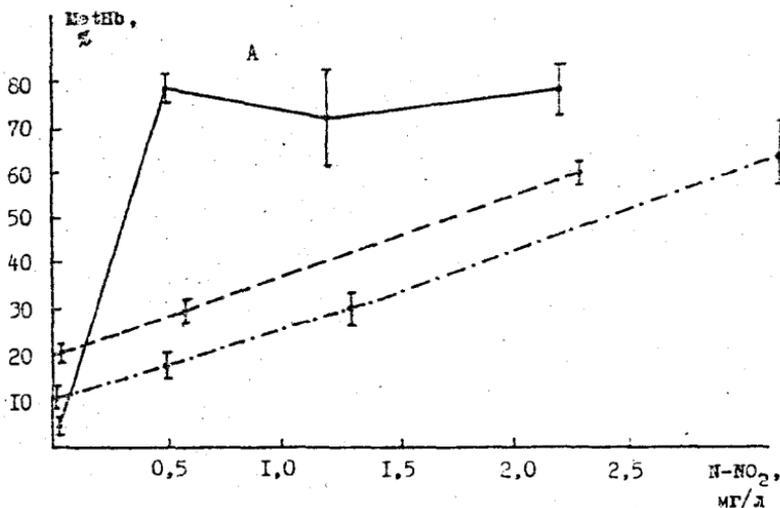


Рис. 5. Влияние массы на образование метгемоглобина у карпов, ослабленных зимовкой (А) и после летнего нагула (Б)
 MetHb - метгемоглобин, % от общего содержания гемоглобина;
 N-NO₂ - концентрация азота нитритов в воде, мг/л;
 масса рыб: - - - - 20 г, - - - - 50 г, ———— 300 г;
 I - ошибка средней.

ГЛАВА IV. РАЗРАБОТКА СПОСОБА УСТРАНЕНИЯ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ НИТРИТНОЙ МЕТГЕМОГЛОБИНИЕМИИ У КАРПОВ

I. Разработка способа снижения токсичности нитритов для рыб

После того, как в наших исследованиях было изучено развитие метгемоглобинемии у карпов в зависимости от их массы, физиологического состояния и условий окружающей среды, мы поставили задачу изыскать способ предупреждения и устранения метгемоглобинемии.

В настоящее время известно несколько основных путей снижения токсичности нитритов для рыб: первый — уменьшение концентрации нитритов в воде (усиление протока воды (Kleu et al., 1980), распыление в воду перманганата калия и перекиси водорода (Шахмурзов и др., 1991)); второй — создание условий, при которых в организме ускоряется восстановление гемоглобина (например, использование аскорбиновой кислоты и метиленового синего (Sawyer, 1971; Наумова, 1986)); третий — создание препятствий на пути проникновения нитритов в организм рыб путем внесения в воду ионов, конкурирующих с нитритами при проникновении через жабры (Petroni, Meade, 1977; Tomazvo et al., 1973; Руссо, 1981 и др.). По данным Р. Руссо (1981), такое действие оказывают ионы Br^- , SO_4^{2-} , Cl^- , IO_4^{3-} , NO_3^- . Р.Н.Бат и Р.Б.Эдди (Bath, Eddy, 1980) полагают, что образование метгемоглобина препятствуют катионные части хлоридов. Однако, все эти способы дороги и имеют ряд недостатков, затрудняющих их широкое применение.

На основании анализа литературных данных и собственных исследований мы сочли целесообразным пойти по пути подбора комплекса соединений, которые обладают свойством конкурировать с ионами нитрита за проникновение в организм рыб через жабры. В результате нами совместно с М.А.Шербиной и С.В.Ермаковым был создан препарат, получивший название "ТРЕСМА-1". В его состав входят различные макро- и микроэлементы в виде неорганических солей. С целью определения его эффективности нами был проведен ряд экспериментов на сеголетках карпа. Результаты представлены на рис. 6.

Через 48 ч после повышения концентрации нитритов в воде до 1,5 мг/л уровень метгемоглобина в крови рыб возрос с 12% до 62%, т.е., более чем в 5 раз. Убедившись, что у рыб развилась метгемоглобинемия, мы добавили в воду препарат "ТРЕСМА-1" в концентрации

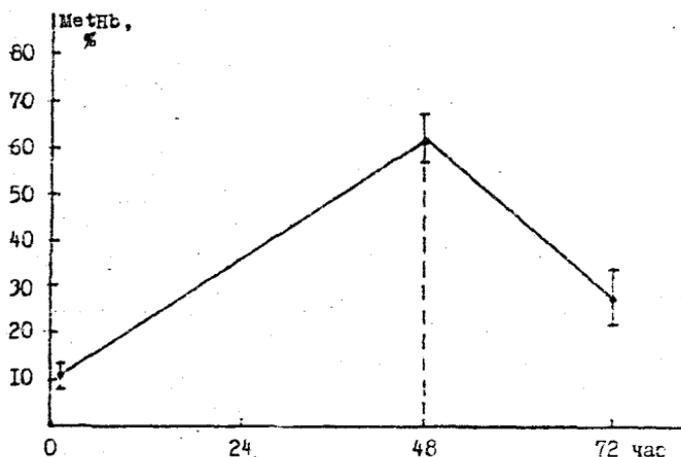


Рис. 6. Изменение содержания метгемоглобина в крови карпов при внесении в воду препарата "ТРЕСМА-1"

МетНб - метгемоглобин, % от общего гемоглобина;
 | - время внесения препарата; | - ошибка средней.

20 мг/л. Исследование крови через 24 ч выявило снижение уровня метгемоглобина до 28%, что уже не являлось опасным для жизни рыб.

Таким образом, результаты первой серии опытов убедили нас, что разработанный препарат способствует снижению уровня метгемоглобина в крови рыб.

2. Определение диапазона действующих концентраций препарата "ТРЕСМА-1" в зависимости от концентрации нитритов в воде

Цель дальнейших исследований состояла в определении диапазона действующих концентраций препарата в зависимости от уровня нитритов в воде. Для этого были проведены опыты на сеголетках карпа, имевших после летнего нагула хорошее физиологическое состояние. Препарат испытывали на фоне содержания нитритов 0,5-

2,5 мг/л. Испытуемые концентрации препарата составили 2-4000 мг/л.

Установлено, что действующая концентрация препарата зависит от содержания нитритов в воде. При уровне нитритов 0,5-0,7 мг/л восстановление кислородсвязывающих свойств гемоглобина наблюдалось при внесении 4-6 мг/л препарата. При повышении концентрации нитритов до 1,5 мг/л препарат начинал действовать при внесении его из расчета 10-12 мг/л, а при содержании нитритов 2-2,5 мг/л - 50 мг/л. В диапазоне концентраций 500-2500 мг/л он оказался эффективным при всех испытанных концентрациях нитритов.

Полученные данные дали основание полагать, что препарат "ТРЕСМА-Г" обладает широким диапазоном действующих концентраций. Сравнивая его эффект с другими способами, можно сказать, что он оказывает действие в значительно меньших концентрациях. Так, для снижения токсичности нитритов В.И.Филатов с соавт. (1986) на основании данных Дж.Томасо с соавт. (Tomasso et al., 1979) по канальному сому, рекомендует вносить смесь, состоящую из равных частей хлорида кальция и хлорида натрия из расчета 1,5 г/л, М.М.Шахмурзов с соавт. (1991) - хлорид натрия в концентрации 3 г/л. В то же время, действующие концентрации нашего препарата исчисляются в миллиграммах на литр.

3. Эффективность действия препарата в зависимости от физиологического состояния и массы карпов

С целью изучения влияния массы на снижение уровня метгемоглобина у рыб с различным физиологическим состоянием нами были проведены опыты на группах рыб массой 17-25 г, 50-60 г и 300 г, имеющих хорошее физиологическое состояние (после летнего нагула) и ослабленных зимовкой.

Опыты проводили при заведомо действующих концентрациях препарата - 0,5; 2,5; 4,0 г/л и содержании нитритов в воде 0,5; 1,5; 2,5 мг/л. Уровень нитритов повышали на 48 ч, затем вносили препарат "ТРЕСМА-Г". Еще через 24 ч у рыб отбирали пробы крови для определения содержания метгемоглобина и нитритов в плазме.

Полученные результаты показали, что у рыб, имеющих хорошее физиологическое состояние, масса не оказывала влияния на снижение уровня метгемоглобина. У ослабленных зимовкой карпов массой 300 г содержание метгемоглобина оставалось в 2-3 раза более высоким, чем у рыб массой 17 и 60 г.

На восстановление кислородсвязывающих свойств гемоглобина

под действием препарата оказывало влияние физиологическое состояние рыб. У ослабленных рыб процесс снижения количества метгемоглобина происходил, очевидно, более медленно, поэтому его уровень оставался в 2-5 раз более высоким, чем у рыб в хорошем физиологическом состоянии.

Определение содержания нитритов в плазме крови показало, что нитриты накапливаются в ней в концентрациях, значительно превышающих их уровень в контроле (в 27-60 раз). После внесения препарата "ТРЕСМА-1" содержание нитритов в плазме крови снизилось до уровня контроля. Это свидетельствует о возможности получения рыбной продукции более высокого качества, содержащей меньшее количество нитритов.

Таким образом, эффективность действия препарата зависит от физиологического состояния рыб: уровень метгемоглобина у ослабленных карпов снижался в меньшей степени, чем у имевших хорошее физиологическое состояние. Масса не оказывала существенного влияния на снижение количества метгемоглобина под действием препарата.

4. Динамика снижения уровня метгемоглобина у карпов после внесения в воду препарата

Следующим этапом нашей работы было изучение динамики снижения количества метгемоглобина в крови карпов под действием препарата "ТРЕСМА-1". Опыт проводили на соголетках карпа при содержании в воде азота нитритов 1,5 мг/л. Период наблюдения составил 96 ч. В одном из вариантов через 48 ч после повышения концентрации нитритов был внесен препарат из расчета 20 мг/л. В другом варианте препарат не вносили, он служил контролем. Результаты приведены на рис. 7.

Согласно рисунку, после внесения препарата снижение количества метгемоглобина в крови карпов начиналось через 6 ч и происходило постепенно. Полное восстановление кислородсвязывающих свойств гемоглобина наблюдалось через 48 ч, однако уже через 24 ч содержание метгемоглобина достигло уровня, неопасного для жизни рыб.

5. Предупреждение нитритной метгемоглобинемии у карпов

На основании полученных данных о способности препарата снижать уровень метгемоглобина у рыб мы предположили существование реальной возможности предупреждать развитие нитритной метгемоглобинемии. С этой целью были проведены эксперименты на соголетках

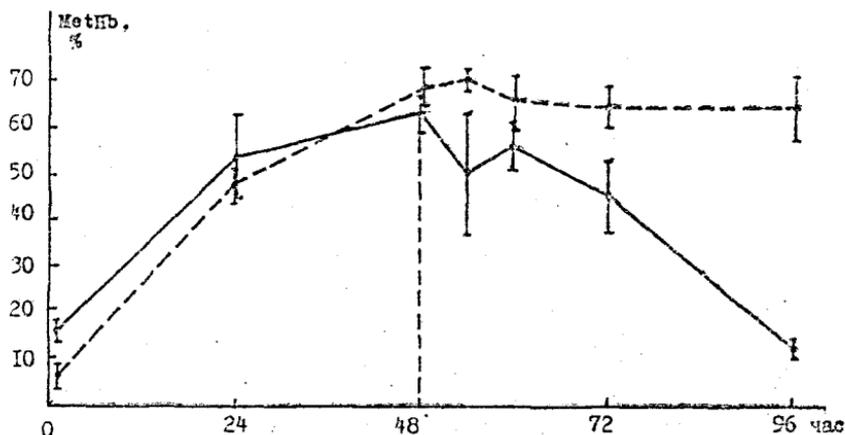


Рис. 7. Развитие нитритной метгемоглобинемии у карпов в воде с добавлением и без добавления препарата "ТРЕСМА-І"

— — — без препарата; ————— с препаратом;

— — — время внесения препарата "ТРЕСМА-І";

— — — ошибка средней.

карпа. Перед началом опытов одна группа рыб в течение двух недель содержалась в воде без добавления препарата, а две других - в воде с добавлением препарата в концентрациях 2,5 и 4,0 г/л. После адаптации рыб к препарату концентрация нитритов в воде была повышена. Реакция крови рыб показана в табл. I.

Полученные данные показывают, что повышение концентрации нитритов в воде не вызвало статистически значимых различий в содержании гемоглобина. Что касается метгемоглобина, то его содержание в вариантах без препарата увеличилось в 1,8-2,3 раза. При этом абсолютное количество неокисленного гемоглобина, способного переносить кислород к тканям, снизилось в 1,5-2 раза, что не могло не отразиться на течении обменных процессов, обеспечивающих рост рыб. В вариантах с препаратом повышение концентрации нитритов не вызвало увеличения содержания метгемоглобина и снижения кислородной

Таблица I

Влияние препарата "ТРЕСМА-Г" на содержание гемоглобина и метгемоглобина у карпов при повышении концентрации нитритов в воде

Концентрация N-NO ₂ в воде, мг/л	Концентрация препарата "ТРЕСМА-Г" в воде, г/л								
	0			2,5			4,0		
	Показатели крови								
	Hb, г/л	Hb-O ₂ , г/л ²	MetHb, %	Hb, г/л	Hb-O ₂ , г/л ²	MetHb, %	Hb, г/л	Hb-O ₂ , г/л ²	MetHb, %
0,06-0,1	62	45	27,4	66	44	33,0	72	57	21,0
0,3-0,9	60	30	50,3	64	44	31,2	66	46	30,5
1,4-2,0	66	30	54,7	68	44	36,0	65	44	33,0
3,0-4,1	66	22	62,8	65	50	23,6	63	44	30,1

Примечание: Hb - общий гемоглобин, Hb-O₂ - неокисленный гемоглобин, MetHb - метгемоглобин.

емкости крови. Таким образом, применение препарата дает возможность предупредить возникновение метгемоглобинемии у карпов при повышенных концентрациях нитритов в воде.

ГЛАВА V. ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА "ТРЕСМА-Г" НА РОСТ И ОБМЕН ВЕЩЕСТВ КАРПОВ В УСЛОВИЯХ НИТРИТНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДЫ

Приведенные выше результаты наших исследований показали, что у рыб, содержащихся в воде с добавлением препарата, при повышении концентрации нитритов в воде метгемоглобинемия не развивается и, следовательно, не возникает сопровождающие ее нарушения обменных процессов. Поэтому, можно было предположить, что темп роста рыб в воде, содержащей нитриты, при внесении препарата будет более высоким, чем без него. Для проверки мы провели серию опытов, цель которых состояла в исследовании влияния препарата "ТРЕСМА-Г" на рост, состояние системы крови и обмен веществ у карпов в условиях нитритного загрязнения воды.

Подопытных сеголетков карпа выращивали в аквариумах с рециркуляционным водоснабжением при температуре воды 25°C. В период опыта концентрация кислорода в воде аквариумов не опускалась ниже 5 мг/л. Уровень нитритов в среднем составлял 0,5 мг/л с колебаниями от 0,1 до 0,95 мг/л. Препарат вносили в воду установок из расчета 20, 50, 500 и 2500 мг/л. В одну из установок препарат не

вносили, этот вариант служил контролем. Период выращивания составил 41 день, в каждом варианте было по 16 рыб (4 повторности с 4 рыбами в каждом аквариуме).

Как можно видеть (табл. 2), во всех вариантах с препаратом рыбы росли лучше. Однако, при содержании препарата 20 мг/л темп роста был наиболее высоким, а кормовой коэффициент - самым низким.

Таблица 2

Влияние препарата "ТРЕСМА-1" на рост карпов в лабораторной установке с замкнутым водоснабжением при нитритном загрязнении воды

Концентрация препарата, мг/л	Средняя масса рыб, г		Среднесуточный прирост, %/сут	Кормовой коэффициент
	начальная	конечная		
0	20,9	31,7	1,00	4,6
20	20,5	36,8	1,39	3,6
50	21,6	35,7	1,20	3,9
500	21,8	36,1	1,20	3,7
2500	22,0	37,4	1,26	4,1

Дальнейшее увеличение концентрации препарата не привело к видимому улучшению роста рыб или снижению кормовых коэффициентов. Это свидетельствует о том, что при содержании нитритов 0,1-1 мг/л для предотвращения их токсического действия достаточно поддерживать концентрацию препарата около 20 мг/л. Связи между дальнейшим повышением концентрации препарата в воде и интенсивностью роста рыб не обнаружено.

Определение в конце периода выращивания показателей крови показало, что в вариантах с препаратом содержание неокисленного гемоглобина было на 25-34 % выше, чем у карпов, содержащихся в воде без его внесения. Это свидетельствует о лучшей обеспеченности организма кислородом, необходимым для успешного осуществления обменных процессов. Следствием этого и явился более быстрый рост рыб в вариантах с препаратом.

Внесение в воду препарата "ТРЕСМА-1" не оказало существенного влияния на химический статус карпов. Зависимости между концентрациями препарата и относительным содержанием основных групп органических и минеральных веществ не выявлено. В то же время, в вариантах с препаратом отмечена общая тенденция к увеличению жирности тела рыб и снижению фосфора.

Расчеты концентрации веществ и энергии в единице прироста позволили установить, что интенсивность синтеза липидов у рыб с повышением концентрации препарата в воде возрастала на 4-22%. Несколько активизировался синтез белка (2-13%), причем максимальное увеличение отмечено в варианте с наибольшей концентрацией препарата. В расчете на 1 г первоначальной массы у подопытных рыб накопилось на 42-60% больше липидов, на 29-44% белка, на 27-36% сумми органических и 34-46% минеральных веществ. При этом обращает внимание снижение накопления фосфора (до 38%), причина которого в настоящее время нам не ясна. Прирост массы был больше на 25-54%, энергии - на 33-66%.

В связи с тем, что наиболее заметное влияние препарат оказал на липидный обмен, мы исследовали жирнокислотный состав обих липидов тела рыб. Однако, существенных и закономерных сдвигов в соотношении групп и отдельных насыщенных, мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот не выявлено. Обращает внимание только повышение уровня пальмитиновой кислоты на 11-13% в диапазоне концентраций препарата 20-500 мг/л. Таким образом, активизация липогенеза шла в основном за счет усиления нормального синтеза липидов без проявления патологических сдвигов.

Резюмируя результаты исследований, представленные в главе, можно сделать заключение, что препарат "ТРЕСМА-1", помимо способности протодерматать развитие метгемоглобинемии, обладает свойством оказывать положительное влияние на обмен веществ и энергии у карпов.

С целью проверки эффективности препарата в промышленных условиях нами был проведен опыт на рециркуляционной установке по выращиванию карпов в подсобном хозяйстве "Тауроста" Государственного объединения "Азот" Литовской республики. Работа была выполнена по просьбе администрации п/х "Тауроста" по причине отсутствия роста рыб в течение длительного времени.

Анализ технологии кормления и гидрохимических условий позволял предположить, что одной из главных причин торможения роста могла являться плохая работа биофильтра и накопление в воде продуктов разложения белка, что не исключало возможности развития у карпов метгемоглобинемии и гипоксии. Проведенные гидрохимические исследования показали, что содержание нитритов в воде рыбободных емкостей было невысоким (0,3 мг/л), однако, уровень нитратов достигал 164 мг/л, аммиака - 4,7 мг/л. Согласно литературным данным,

помимо нитритов, образование метгемоглобина у рыб могут вызывать и нитраты (Grabda et al., 1974). Поэтому, решено было проверить эффективность действия препарата "ТРЕСМА-1" в условиях повышенных концентраций нитратов и аммиака.

К началу работы средняя масса рыб колебалась в пределах 260 г, температура воды была 24°C, содержание кислорода составляло 6,0 мг/л, pH - 5,8. Гематологический анализ подтвердил наши предположения и позволил установить у рыб четко выраженную метгемоглобинемию (табл. 3). Около половины гемоглобина (46%) было инактивировано и находилось в виде метгемоглобина.

Таблица 3

Изменение содержания метгемоглобина и гемоглобина в крови карпов при внесении препарата "ТРЕСМА-1" в воду рециркуляционной установки п/х "Тауроста"

Показатели крови	До внесения препарата	Через сутки после внесения препарата
Общий гемоглобин, г/л	95	91
Неокисленный гемоглобин, г/л	51	67
Метгемоглобин, г/л	44	24
%	46	26

После определения гематологических показателей в воду был добавлен препарат из расчета 20 мг/л. Судя по приведенным в табл. 3 данным, через 24 ч после внесения препарата уровень метгемоглобина снизился в 1,8 раза, составив 26% от общего содержания гемоглобина. Количество неокисленного гемоглобина возросло в 1,3 раза, до 67 г/л. Таким образом, внесение в воду рециркуляционной установки препарата "ТРЕСМА-1" способствовало нормализации уровня метгемоглобина и гемоглобина, и обеспечило лучшие условия доставки кислорода к тканям.

Полученные результаты дали основание применить препарат на той же рециркуляционной установке для повышения эффективности выращивания карпов в условиях загрязнения воды азотистыми продуктами. Под наблюдением находилось 4 емкости, в которых выращивали 8 тыс. годовиков карпа. Концентрация нитритов в воде колебалась в пределах 2-4 мг/л, нитратов - 65-80 мг/л, аммиака - 1,1-2,1 мг/л. До внесения препарата содержание метгемоглобина у карпов составляло 46%. Через сутки после его внесения в воду из расчета 20 мг/л

уровень метгемоглобина снизился до 25% и сохранялся на этом уровне до конца опыта. -

Результаты, представленные в табл. 4, свидетельствуют о том, что до внесения препарата рост карпов был крайне низким. Внесение препарата снизило токсическое влияние нитритов, что привело к ускорению темпа роста карпов на 40% при одновременном снижении затрат корма в 1,7-1,8 раза.

Таблица 4
Эффективность применения препарата "ТРЕСМА-Г" при
выращивании карпов в рециркуляционной установке
подсобного хозяйства "Тауроста" (Литва)

к- бас- сей- на	Без внесения препарата				! При внесении препарата						
	Масса рыб, г		СВ	ЗК	Масса рыб, г		СВ	ЗК	Масса рыб, г		ЗК
	M ₀	M _{II}			M ₂₀	M ₂₉					
1	68,0	70,5	0,33	2,2	75,4	0,75	2,8	88,2	1,74	1,1	
2	64,0	72,8	1,17	1,9	80,6	1,13	1,7	95,2	1,85	0,9	
3	62,0	71,4	1,28	1,8	78,0	0,98	2,0	90,1	1,60	1,1	
4	61,0	68,5	1,05	2,2	75,3	1,05	2,0	84,2	1,24	1,5	
Сред- нее за дек.	63,8	70,8	0,96	2,0	77,3	0,98	2,1	89,4	1,61	1,2	

Примечание: M₀, M_{II}, M₂₀, M₂₉ - масса рыб в начале и через II, 20, 29 суток; ЗК - затраты корма; СВ - среднесуточный прирост, % от массы рыб.

Таким образом, полученные результаты показывают, что в условиях нитритного загрязнения воды при использовании препарата эффективность выращивания карпов может быть повышена.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

I. Изучение воздействия абиотических и биотических факторов на интенсивность образования метгемоглобина в крови карпов позволило установить следующее:

- наиболее сильное и определяющее влияние оказывает концентрация нитритов в воде (68%); сила воздействия биотических факторов существенно меньше: массы - 8%, физиологического состояния - 2%; влияния температуры не установлено;

- связь между концентрацией нитритов в воде и уровнем метге-

моглобина имеет характер, близкий к экспоненциальной зависимости с наиболее резким подъемом уровня метгемоглобина в диапазоне концентраций нитритов 0,3-0,6 мг/л (до 50% от общего гемоглобина);

- динамика развития метгемоглобинемии в зависимости от продолжительности воздействия нитритов характеризуется резким повышением содержания метгемоглобина в течение первых часов, затем следует некоторое снижение его уровня до середины-конца первых суток; на протяжении вторых и третьих суток уровень метгемоглобина вновь возрастает, а на четвертые - стабилизируется на достигнутом уровне;

- реакция рыб различной массы на изменение содержания нитритов в воде не одинакова. Карпы массой 50-300 г более чувствительны к токсическому влиянию нитритов, чем 20-граммовые. С повышением концентрации нитритов и массы рыб уровень метгемоглобина возрастает при снижении общего гемоглобина;

- влияние физиологического состояния рыб на их чувствительность к нитритам выражается в большей интенсивности образования метгемоглобина у упитанных сеголетков массой 20-50 г, чем у голодавших. В то же время, у питавшихся двухлетков (300 г) метгемоглобинемия развивается менее интенсивно, чем у перекормившихся двухгодичков.

2. На основании результатов исследований и анализа литературы разработан способ предотвращения нитритной метгемоглобинемии, сущность которого состоит в добавлении в воду препарата "ТРЕСМА-Г". Его составные части проникают в организм рыб через жабры и вступают в конкурентные взаимоотношения с нитритами, препятствуя тем самым их реакции с гемоглобином.

3. Разработанный препарат имеет следующие свойства:

- широкий диапазон действующих концентраций (4-4000 мг/л);
- высоко эффективен в малых концентрациях;
- минимально действующая концентрация зависит от содержания нитритов в воде;

- проявляет способность не только снижать содержание метгемоглобина, но и не допускать его образование при повышении концентрации нитритов в воде;

- вызывает благоприятные для организма изменения в обмене веществ, которые выражаются в активации липогенеза и синтеза белка и повышении энергообеспеченности прироста, что приводит к ускорению темпа роста рыб на 20-40 % при снижении затрат корма на при-

рост на 9-20 %;

- способен уменьшать накопление нитритов в организме рыб при повышении их концентрации в воде: через 24 ч после его внесения содержание нитритов в плазме крови рыб снижается до уровня контроля.

4. Эффективность действия препарата зависит от физиологического состояния рыб: уровень метгемоглобина у ослабленных карпов снижается в меньшей степени, чем у имеющих хорошее физиологическое состояние.

5. Масса не оказывает существенного влияния на снижение количества метгемоглобина под действием препарата.

6. Восстановление кислородсвязывающих свойств гемоглобина у карпов после внесения препарата начинается через 6 ч и происходит постепенно в течение 1-2 дней. К концу первых суток содержание метгемоглобина снижается до уровня, неопасного для жизни рыб.

7. Испытание препарата "ТРЕСМА-1" на промышленной установке свидетельствует, что при его использовании в условиях нитритного загрязнения воды эффективность выращивания карпов может быть повышена (в наших условиях рост годовиков карпа возрос на 40% при одновременном снижении затрат корма в 1,7-1,8 раза).

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

На основании проведенных исследований разработан эффективный и простой способ устранения и предотвращения нитритной метгемоглобинемии у карпов, сутью которого состоит во внесении в воду препарата "ТРЕСМА-1". Применение препарата в промышленных рециркуляционных установках при их загрязнении продуктами обмена, в том числе, нитритами, предупреждает развитие метгемоглобинемии, что способствует повышению темпа роста карпов при одновременном снижении затрат корма. Действующая концентрация препарата зависит от содержания нитритов в воде. При уровне нитритов 0,5-0,7 мг/л для снижения количества метгемоглобина достаточно внести 4-6 мг/л препарата. При повышении концентрации нитритов до 1,5 мг/л препарат действует при его внесении из расчета 10-12 мг/л, а при содержании N-NO_2 2-2,5 мг/л - 50 мг/л. В диапазоне 500-4000 мг/л препарат эффективен при всех испытанных концентрациях нитритов (0,5-2,5 мг/л N-NO_2).

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Родина Т.Е., Коробов В.Н., Щербина М.А., Великий Н.Н. Динамика образования метгемоглобина в крови карпов при изменении содержания нитритов в воде // Тезисы докл. Второго симп. по экологической биохимии рыб.- Ярославль, 1990.- С. 204-206.
2. Щербина М.А., Родина Т.Е. Развитие метгемоглобинемии у перезимовавших карпов при нитритной интоксикации // Методы исследования и использования гидросистем / Тезисы докл. конф.- Рига, 1991.- С. 194-195.
3. Родина Т.Е., Щербина М.А. Развитие нитритной метгемоглобинемии у карпов в зависимости от физиологического состояния и массы // Тезисы докл. Второй Всесоюзной конф. по рыбохозяйственной токсикологии.- Санкт-Петербург, 1991.- Т. 2.- С. 120-121.
4. Щербина М.А., Родина Т.Е., Ермаков С.В. Нитритная метгемоглобинемия у карпов, выращиваемых в промышленных условиях и возможность ее предотвращения // Экологические аспекты и природоохранные мероприятия при использовании теплых вод с энергетических объектов / Сб. докл. конф.- Москва, 1992.- С. 154-161.
5. Щербина М.А., Родина Т.Е. Нитритная метгемоглобинемия у карпов и пути ее предотвращения // Тезисы докл. Восьмой науч. конф. по экологической физиологии и биохимии рыб.- Петрозаводск, 1992.- Т. 2.- С. 172-173.
6. Родина Т.Е. Восстановление кислородсвязывающих свойств гемоглобина у карпов при нитритной интоксикации // Тезисы докл. Восьмой науч. конф. по экологической физиологии и биохимии рыб.- Петрозаводск, 1992.- Т. 2.- С. 58-59.
7. Великий Н.Н., Коробов В.Н., Климишин Н.И., Родина Т.Е., Щербина М.А. Система красной клетки периферической крови карпа в условиях нитритной интоксикации // Тезисы докл. Восьмой науч. конф. по экологической физиологии и биохимии рыб.- Петрозаводск, 1992.- Т. 1.- С. 54-55.
8. Щербина М.А., Родина Т.Е., Ермаков С.В. Способ снижения токсичности нитритов для карпов, выращиваемых в промышленных условиях // Информ. пакет ВНИЭРХ, серия "Аквакультура".- 1992.- Вып. 2.- С. 10-12.

Формат 60x90/8

Тираж 100 экз.

Объем 1,5 п.л.

Подписано к печати 19.8.93г.

Заказ № II

Участок оперативной полиграфии ИНИИРХ, п. Рыбное,
Дмитровского р-на, Московской обл.