

На правах рукописи



Романова Наталья Николаевна

**ОЦЕНКА СТРЕСС-РЕАКТИВНОСТИ РЫБ –
ОБЪЕКТОВ АКВАКУЛЬТУРЫ И ЕЕ КОРРЕКЦИЯ ПИСЦИНОМ**

Специальность 03.00.10. - ихтиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2005

Работа выполнена во ФГУП "Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства" (ФГУП "ВНИИПРХ")

Научный руководитель - кандидат биологических наук
Головин Павел Петрович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Илясов Юрий Иванович
кандидат биологических наук, ст.н.с.
Бекина Елена Николаевна

Ведущая организация: Межведомственная Ихтиологическая комиссия

Защита состоится " 7 " июня 2005 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д.307.003.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте пресноводного рыбного хозяйства (ВНИИПРХ) по адресу: 141821, Московская обл., Дмитровский р-н, пос. Рыбное

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП "ВНИИПРХ"

Автореферат разослан " 4 " мая 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, к.б.н.

Подоскина Т.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

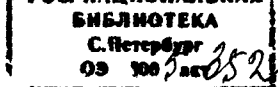
Актуальность проблемы. Выращивание рыбы в условиях аквакультуры сопряжено с влиянием на нее различных сильнодействующих факторов среды (стрессоров), вызывающих общий адаптационный синдром (Vedemeyer, McLeay, 1976; Мартемьянов, 1982; Pickering et al., 1982; Лебедева и др., 1985; Крепис, 1989; Запруднова, 2003 и др.). В процессе эволюции у животных выработалась сложная система адаптивных механизмов, реализация отдельных звеньев которой определяет физиологическую стресс-реактивность вида (Mazeaud et al., 1977; Хайдарлиу, 1984). Изучение этих адаптивных механизмов позволяет выяснить особенности их проявлений, определить степень пластичности вида и решать конкретные вопросы акклиматизации и разработки технологий выращивания рыб – объектов аквакультуры (Виноградов и др., 1986; Багров, 1993 и др.). Наиболее перспективным представляется комплексный подход к изучению механизмов адаптаций на клеточном, тканевом, органном и организменном уровнях, без которого нельзя понять и правильно оценить значение того или иного стрессора или их синергическое воздействие на рыбу.

Другой немаловажной негативной стороной стрессовых воздействий является снижение резистентности у рыб к возбудителям заболеваний и возникновение ряда болезней, сопряженных со стрессом (Snieszko, 1974; Головин, 1984; Вихман 1996).

Диагностика стресса у рыб направлена на выявление первичных или вторичных его эффектов. Проведение таких анализов достаточно трудоемко и не всегда доступно практикам. Последние достижения биологической и медицинской науки направлены на разработку экспрессивных методов диагностики (Лебедева и др., 1993; Тушмалова и др., 1998). Принцип проведения их основан на полуколичественном быстро протекающем на твердой фазе аналитическом методе. Апробация и отработка таких методов весьма перспективна и практически значима для аквакультуры.

В мировой аквакультуре для снижения стресс-реакции рыб используют в основном анестетики. В настоящее время отмечена тенденция по использованию с этой целью биологически активных препаратов.

В том числе и в ультрамалых дозах.



Одним из таких является разработанный в НТЦ "Омела" – антистрессовый препарат "Писцин" (Томкевич и др., 1999). В этой связи изучить реакцию различных видов рыб на писцин и выяснить возможность его использования для коррекции стресса является актуальным.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы являлось оценить стресс-реактивность рыб – основных объектов отечественного рыборазведения при использовании принципиально нового для аквакультуры метода экспресс-диагностики и отработать способ коррекции негативных последствий стресса с помощью биологически активного препарата "Писцин".

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Определить стресс-реактивность отдельных видов рыб, выращиваемых в аквакультуре России, по изменениям биохимического состава наружной слизи и крови.
2. Оценить течение общего адаптационного синдрома у рыб в зависимости от вида и силы стрессора.
3. Провести сравнение стресс-реактивности различных видов рыб на хендлинг.
4. Определить влияние стресс-факторов на пищевую активность рыб.
5. Выяснить воспроизводимость и стабильность седативной активности препарата "Писцин".
6. Испытать антистрессовое действие писцина в условиях транспортировки и при хендлинге (биотехнические манипуляции с рыбой).
7. Оценить влияние писцина на резистентность рыб к некоторым заболеваниям.

Научная новизна. Впервые проведена сравнительная оценка стресс-реактивности рыб на основе использования принципиально нового для аквакультуры полуколичественного метода экспресс-диагностики стресса с помощью мульти- и глюкостиксов. Определена специфичность изменений наружной слизи у различных видов рыб и их стресс-реактивность. Впервые получены материалы по коррек-

ции стресс-реакции рыб биологически активным антистрессовым препаратом "Писцин", используемым в ультрамалых дозах.

Практическое значение. Результаты работы направлены на оценку здоровья рыб в аквакультуре и могут применяться в качестве критерия их стресс-реактивности. Предложены эффективные способы использования антистрессового препарата "Писцин" для предупреждения и коррекции стресс-реакции у рыб. Отработаны физиолого-биохимические параметры, которые могут служить критериями оценки стресс-устойчивости при проведении селекционно-племенных работ. Полученные данные по изменению активности питания после хендлинг-стресса следует учитывать при нормировании кормления молоди осетровых рыб и карпа.

Апробация. Основные результаты диссертации были представлены и обсуждались на международных конференциях: "Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб", Борок, 2003; "Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов", Петрозаводск, 2004; Научных чтениях посвященных памяти профессора В.А. Мусселиус-Богоявленской, Рыбное, 2003 и на отчетных сессиях ФГУП "ВНИИПРХ".

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 работ и 1 в печати.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста, включая 18 таблиц, 12 рисунков, и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты исследований (три главы с подглавами), заключение, выводы, список литературы, включающий 191 источник (отечественных – 134 и иностранных – 57) и 2 приложения.

ГЛАВА 1. СТРЕСС-РЕАКТИВНОСТЬ РЫБ, ФАКТОРЫ, ЕЕ ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ, И МЕТОДЫ КОРРЕКЦИИ (обзор литературы)

В литературном обзоре обобщены наиболее значимые аспекты проблемы стресса в аквакультуре. Они посвящены стресс-реактивности рыб, механизмам формирования общего адаптационного синдрома, формам его проявления, нормам реакции задействованных систем. Многочисленные литературные данные показывают, что проявление реакции организма рыбы на воздействие стрессоров зависит от

ее физиологического состояния, уровня доместификации, видовой, групповой принадлежности и ряда других условий. Рассмотрен вопрос о применении антистрессовых препаратов в аквакультуре.

СОДЕРЖАНИЕ И РЕЗУЛЬТАТЫ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работу проводили в лаборатории ихтиопатологии, в условиях аквариальной ФГУП "ВНИИПРХ" и на кафедре ихтиологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Материал собирали в период с 2000 по 2004 гг. в производственных условиях ЭПО "Якоть", ОАО "Бисеровский рыбокомбинат" и форелевого хозяйства "Сходня" (Московской области), Ардонского рыбзавода (Республика Северная Осетия – Алания), Конаковского осетрового завода (Тверская область) и Умбского лососевого завода (Мурманская область). Объектами исследования явились основные виды рыб, выращиваемые в аквакультуре в количестве 976 экз. (табл.).

Таблица. Объем обследованного материала

Вид рыбы	Число рыб, экз.		
	в производственных условиях	в эксперименте	Всего
Пестрый толстолобик	70	258	328
Радужная форель	72	67	139
Карп	-	125	125
Ленский (сибирский) осетр	214	63	277
Стерлядь и ее гибриды	14	4	18
Каспийский лосось (кумжа)	59	-	59
Атлантический лосось (семга)	30	-	30

Стресс-реактивность рыб оценивали по результатам поведенческих реакций (изменению поведения и пищевой активности) и по физиолого-биохимическим показателям.

Биохимические параметры наружной слизи и глюкозу в крови измеряли полуколичественным экспресс-методом с помощью индикаторных тест-полосок (стиксов) "Multistix" и "Glucostix" фирмы "Bayer". Считывание результатов со стиксов проводили на приборе "Clinitek-50" и "Глюкометр-ГН" соответственно, или визуально сопоставляя интенсивность полученной окраски с прилагаемой стандартной шкалой. Одновременно с измерением биохимических параметров определяли такие показатели крови, как гемоглобин, число эритроцитов, гематокрит, лейкоцит, содержание гемоглобина в одном эритроците (СТЭ) и средний объем эритроцитов (СОЭ) по принятым в ихтиопатологии методам (Головина, 1979).

Всего на рыбах было проведено 19 экспериментов (10 – для оценки стресс-реакции рыб и 9 – для отработки способа коррекции стресс-реакции писцином). За контроль принимали интактную (нестрессированную) группу рыб. Стресс-факторами служили хендлинг, резкое повышение или понижение температуры воды, дефицит кислорода и транспортировка (или ее имитация). В качестве хендлинга использовали определенный набор технологических манипуляций с рыбой: отлов, выдерживание на воздухе, имитация сортировки, пересадка в другую емкость. Отбор проб у опытных групп рыб проводили спустя 1 ч после воздействия стрессора.

Первичную оценку активности писцина проводили методом биотестирования на тест-объекте - ресничной инфузории *Spirostomum ambiquum*. За основу был принят показатель ее спонтанной двигательной активности (СДА).

Статистическую обработку полученных материалов проводили по пакету программ Statistica и Harvard Graphics для РС.

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА СТРЕСС-РЕАКЦИИ РЫБ

3.1. Оценка стресс-реакции рыб в зависимости от вида и силы воздействия стресс-фактора

Оценку стресс-реакции рыб в зависимости от вида стресс-фактора проводили на годовиках карпа, сеголетках и двухлетках ленского осетра.

На *карпе* средней массой 36 г действие хендлинга исследовали при двух температурах - 14 и 23⁰С. При температуре воды 14⁰С хендлинг вызывал достоверные

изменения уровня глюкозы в крови, белка и гемоглобина в слизи, а при 23⁰С – только глюкозы в крови и гемоглобина в слизи.

Гипертермию вызывали перепадом температуры воды на 6⁰С (с 14 до 20⁰С). В результате у стресс-реактивных особей возрастали число эритроцитов (на 18%), гематокрит (почти на 80%), уровень глюкозы в крови (на 153 %) и гемоглобин в слизи (на 60 %), а содержание белка в слизи достоверно снижалось по сравнению с интактной группой рыб (на 26%).

Гипотермию вызывали резким снижением температуры воды на 7⁰С (с 23 до 16⁰С). В результате у стресс-реактивных особей возрастал уровень глюкозы в крови на 56 %, белка и гемоглобина в слизи соответственно на 31 и 96 %.

Хроническую гипоксию вызывали постепенным снижением кислорода в воде в течение 5 ч до уровня 1 мг/л. В результате у карпа отмечено увеличение уровня гемоглобина и белка в слизи соответственно в 5 и 3 раза. При этом глюкоза в крови резко не изменяется за счет медленно развивающейся стресс-реакции. Однако острая гипоксия, вызванная более резким снижением кислорода в воде до 1,3 мг/л, показала, что у карпа уровня глюкозы в крови увеличивается в 2 раза.

На *ленском осетре* средней массой 140 г влияние хендлинга оценивали при температуре воды 16⁰С. Из исследованных показателей достоверно увеличился уровень глюкозы в крови (на 15%) и гемоглобина в слизи (на 19%), а содержание белка в слизи снизилось относительно контроля (на 54%).

Гипертермия (перепад температуры на 9⁰С с 17 до 26⁰С) у двухлеток осетра средней массой 450 г вызывала кратковременный (3-5 мин) шок, или по классическим канонам развития стресс-реакции - стадию тревоги. Спустя 30 мин у рыб наблюдала стадию контрашока или резистентности. При этом изменения физиолого-биохимических параметров крови и слизи по направленности оказались аналогичны тем, что имели место у карпа, т.е. происходило увеличение глюкозы в крови (на 99%) и гемоглобина в слизи (на 41%) относительно контроля.

Таким образом, стресс-реакция рыб (карпа и ленского осетра) на гипертермию была выражена сильнее, чем на хендлинг. При этом рыбоводные манипуляции при 14⁰С вызывали у карпа более сильный стресс, чем при 23⁰С, когда рыба уже активно

питалась. Гипотермию карпы переносят легче, чем гипертермию. Уровень глюкозы в крови у них достоверно увеличивался лишь при остром стрессе (температурный шок, хендлинг), тогда как гемоглобин в слюзи реагирует и на хроническую гипоксию.

Оценку стресс-реакции рыб в зависимости от силы стресс-факторов проводили на годовиках карпа и двухлетках ленского осетра.

У *карпа* стресс-факторами служили гипер- и гипотермия, сила воздействия которых определялась в скачках температуры на 6 и 12⁰С. В результате было показано, что действие этих стрессоров вызывает у карпа значительные изменения уровня глюкозы в крови, белка и гемоглобина в слюзи. При гипертермии из этих показателей только изменение гемоглобина в слюзи коррелировало с силой воздействия стрессора. Содержание же глюкозы в крови независимо от величины скачка температуры одинаково резко возрастало в 2,5 раза, а белка в слюзи падало (на 30%) по сравнению с интактной группой рыб. При гипотермии эти показатели изменялись несколько по-другому. Увеличение глюкозы с возрастанием силы стрессора происходило всего на 10 %, белка - на 40%, а изменение содержания гемоглобина в слюзи меняет свою направленность. Так, если у стресс-реактивных особей при снижении температуры на 6⁰С содержание гемоглобина в слюзи возрастает почти в 2 раза, то при снижении температуры на 12⁰С оно остается на уровне контрольной группы рыб.

У *ленского осетра* стресс-фактором служила гипертермия, сила воздействия которой определялась в скачках температуры на 7 и 9⁰С. Реакция рыб на гипертермию в обоих случаях проявлялась в виде температурного шока. С усилением силы стрессора число стресс-реактивных особей увеличивалось от 25 до 100%. Спустя 25-35 мин эти рыбы адаптируются и восстанавливают свое поведение. У таких особей в крови возрастал уровень глюкозы на 99% и 137% при перепаде температуры воды на 7 и 9⁰С соответственно. Гемоглобин в слюзи возрастал с увеличением силы стресс-фактора почти в 1,5 раза.

Таким образом, в зависимости от силы воздействия температурного стресс-фактора, у рыб выявлен ряд наиболее значимых ответных реакций. При этом как на

повышение, так и на понижение температуры воды у карпа при усилении силы действия стрессора увеличивался уровень глюкозы в крови. У ленского осетра стресс на гипертермию проявляется в виде шока, то есть через реакцию тревоги, которая сменяется через адаптивные механизмы стадией резистентности. Указанные изменения у этих видов рыб следует относить к физиологическому стрессу (или эустрессу), который приводит к увеличению интенсивности анаболических процессов и повышению неспецифической резистентности организма.

3.2. Влияние стресс-факторов на пищевую активность рыб

Влияние стресс-факторов на пищевую активность рыб оценивали в экспериментах, проведенных в аквариальных условиях на годовиках ленского осетра и сеголетках карпа. В течение месяца рыбу адаптировали к максимальной суточной поедаемости корма, а затем одну из групп подвергали хендлингу, а другая оставалась в виде контроля. После этого наблюдали за динамикой пищевой активности.

В результате у *ленского осетра* на 1-е, 2-е и 3-е сутки после хендлинга было отмечено снижение пищевой активности на 80, 70 и 30 % соответственно (рис.1).



Рис. 1. Динамика пищевой активности рыб после хендлинга (% от контроля)

В то же время у *карпа* в период активного питания хендлинг не вызвал столь сильного снижения пищевой активности. В первый день после хендлинга средняя

суточная поедаемость корма составила 62%, а в последующие дни в пределах той величины, которая была до стресса (рис.1).

3.3. Оценка стресс-устойчивости форели

Все возрастающие стрессовые нагрузки на рыб в условиях аквакультуры, особенно высокоинтенсивной, ставят перед специалистами задачу селекционирования объектов выращивания с повышенной стресс-устойчивостью. В этой связи в условиях форелевого хозяйства "Сходня" в течение 2-х лет радужная форель проходила отбор на стресс-устойчивость. Проведенное нами экспресс-тестирование селекционной группы на хендлинг показало отсутствие у большинства исследуемых особей выраженной стресс-реакции, тогда как у обычной для этого хозяйства форели при стрессе изменилось 5 показателей крови (увеличились гематокрит и доля палочкоядерных нейтрофилов, понизились гемоглобин, лейкоциты и СГЭ). Большой разброс значений показателей, отмеченный у стресс-устойчивой форели, свидетельствует о высокой гетерогенности этой группы и отражает, вероятно, физиологическую перестройку организма при переходе на новый, повышенный уровень устойчивости к неблагоприятным факторам среды. Косвенным признаком меньшей подверженности стрессу может служить и отсутствие признаков некроза дорзального плавника (холодноводного флексибактериоза) у этой группы рыб, как заболевания, сопряженного со стрессом.

Проведенные работы позволили отобрать группу физиолого-биохимических показателей, помогающих при формировании маточного стада форели, вести отбор особей, отличающихся устойчивостью к стрессу.

ГЛАВА 4. ИСПЫТАНИЕ АНТИСТРЕССОВОГО ПРЕПАРАТА "ПИСЦИН" ДЛЯ КОРРЕКЦИИ НЕГАТИВНЫХ ПОСЛЕДСТВИЙ СТРЕССА У РЫБ

4.1. Отработка условий сохранности биологической активности антистрессового препарата "Писцин"

Первичная оценка активности писцина с помощью тест-объекта ресничной инфузории спиростомы показала, что в разведениях D^{15} и D^{20} препарат проявляет

седативное действие. При дальнейшем изучении было определено, что стабильность его активности сохраняется в темной стеклянной или пластиковой таре в течение 2-х месяцев при температуре 18-20⁰С и только после этого срока отмечаются небольшие изменения. При температуре хранения 24-26⁰С происходит быстрое снижение его активности, вплоть до полного исчезновения в течение 2-х месяцев. Хранение препарата при температуре 6-8⁰С в те же сроки не приводит к изменению СДА.

Писцин рекомендовали к применению, если седативный эффект на инфузориях достигал 60-80% от контроля.

4.2. Отработка эффективных методов использования антистрессового препарата "Писцин" на рыбе

Работу проводили на двухлетках *пестрого толстолобика* средней массой 350 г. Было поставлено три эксперимента в различных вариантах по применению писцина (до стресса, после и комбинированно - до и после). Опытные группы рыб подвергали хендлингу. Препарат вносили в воду до или сразу после стрессирования согласно схеме, представленной на рис. 1.

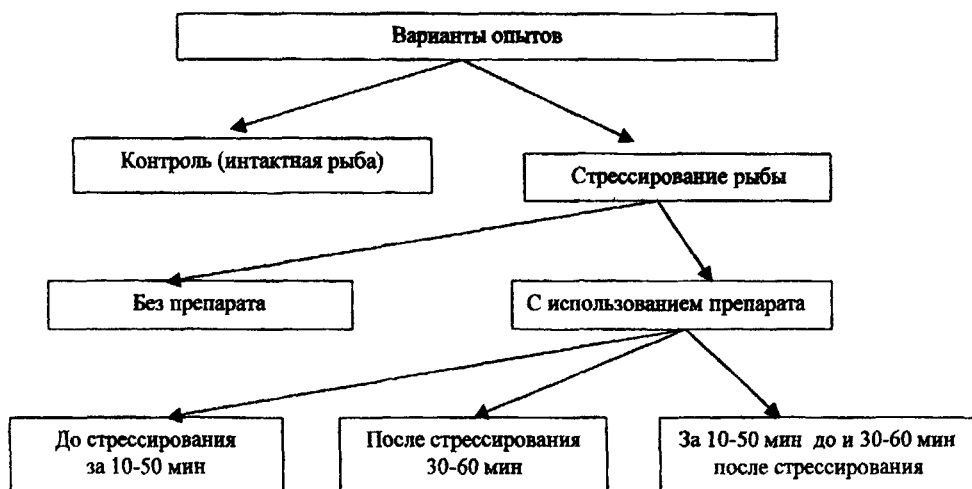


Рис.1. Схема испытания препарата "Писцин" при стрессировании пестрого толстолобика хендлингом

Результаты показали, что использование piscина до стрессирования снижает стресс-реакцию толстолобиков во всех группах. При этом максимальное восстановление глюкозы до уровня контроля было отмечено у рыб при внесении препарата за 50 мин, а гемоглобина в слизи - за 20 мин.

Использование piscина после стрессирования также приводило к снижению стресс-реакции. При этом отмечено, что уровень глюкозы в крови был на 29%, а гемоглобина в слизи на 50% ниже, чем у рыб при хендлинге без применения piscина. Кроме этого произошло восстановление кетонов в слизи до уровня контроля.

При комбинированном способе внесения препарата было отмечено, что наибольшее восстановление глюкозы в крови произошло при внесении препарата за 20 и 50 мин, а кетонов и гемоглобина в слизи - за 10 и 30 мин.

Таким образом, проведенные исследования показали, что piscин эффективно работает при кратковременном стрессе небольшой силы. Наиболее оптимальным вариантом является внесение препарата в воду за 20-30 мин до воздействия стресс-фактора и обработка в нем в течение 30-60 мин после. Максимальный эффект отмечен при комбинации этих ванн. В этом случае piscин не дает полностью развиться стресс-реакции, сдерживая изменения таких лабильных параметров, как содержание гемоглобина в слизи, глюкозы в крови и СГЭ.

4.3. Испытание piscина с целью коррекции стресса у рыб

Антистрессовое действие piscина проверяли на рыбах при хендлинге и транспортировке в производственных условиях.

Результаты экспериментов по коррекции стресс-реакции при хендлинге на молоди *ленского осетра* показали, что обработка piscином скорректировала стресс-реакцию и не привела к увеличению уровня глюкозы, как это произошло у необработанной рыбы. Кроме этого, число особей с высоким содержанием гемоглобина в слизи (от 80 до 200 эр./мкл) снижается с 33 до 20%.

Аналогичный опыт был проведен на молоди *атлантического лосося* средней массой 18 г. Результаты, полученные после обработки одной из групп рыб piscином

после действия хендлинга, показали, что препарат приводит к снижению числа рыб с уровнем гемоглобина в слизи более 80 эр./мкл с 62 до 24%.

Проведена оценка антистрессового эффекта писцина на молоди *каспийского лосося* средней массой 20 г после хендлинга и имитации транспортировки. На основании однофакторного кластерного анализа полученного материала по уровню глюкозы в крови среди контрольной группы (интактная рыба) доля стресс-устойчивых рыб составляла 39%. Под воздействием писцина число таких рыб возросло до 74%.

Двухгодовиков *пестрого толстолобика* средней массой 350 г весной сразу после разгрузки зимовала подвергали транспортировке в течение 1 ч, после чего рыба была пересажена в проточные бассейны. В одну из транспортных емкостей был внесен писцин (опыт), а в другую нет (контроль). Результаты оценки стресс-реакции показали, что в крови рыб контрольной группы были отмечены выше физиологической нормы уровень глюкозы, СГЭ и СОЭ, а в слизи снизилось количество кетонов и возросло содержание белка и гемоглобина. У опытных рыб часовое воздействие писцина не уменьшило уровень глюкозы в крови - основного индикатора стресса. Однако другие показатели в крови - СГЭ и СОЭ, а в слизи - кетоны и белок достоверно отличались от контрольной группы, что свидетельствует о восприятии рыбой препарата. Исходя из полученных результатов, был сделан вывод о том, что препарат не способен оказывать требуемого антистрессового эффекта на фоне уже сформировавшегося сильного стресса у пестрого толстолобика. Вероятно, у такой стресс-реактивной рыбы обработку писцином необходимо проводить не только после, но и до воздействия стрессора, тогда будет более значим седативный эффект.

Проведены испытания действия писцина на *радужной форели* средней массой 120 г при хендлинге и имитации транспортировки. В результате был выявлен высокий индивидуальный разброс изучаемых физиолого-биохимических показателей даже в контрольной группе рыб. Проведенный кластерный и однофакторный дисперсионный анализ массива данных по трем основным переменным (гемоглобину в слизи, глюкозе и СГЭ в крови) показал, что в данной популяции форели около 55% рыб являются стресс-реактивными, а остальные 45% - стресс-устойчивыми. При использовании писцина доля стресс-устойчивых возросла до 70%, то есть 25%

стресс-реактивных особей под влиянием препарата скорректировали стресс-реакцию.

Таким образом, выявлена хорошо выраженная коррекция стресса под воздействием pisciina, которая наиболее значимо проявилась в изменении концентрации глюкозы в крови и снижении процента рыб с гемоглобином в слизи. Это свидетельствует об эффективности препарата и перспективе его применения в производственных условиях при проведении биотехнологических манипуляций с выращиваемой рыбой.

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ПИСЦИНА НА ОБЩУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ РЫБ

На заводах Северо-Запада России к заболеванию, сопряженному со стрессом относится "некроз спинного плавника", вызываемый *Flavobacterium sp.*, *Fl. aquatili*, *F. veve*, а также и другими бактериями (Сердюк, 1995). В эксперименте, проведенном на Умбском рыбзаводе в одном из производственных бассейнов, молодь атлантического лосося сразу после сортировки обработали piscином. Дальнейшее наблюдение за этой рыбой (в течение 15 дней) показало, что поражение "некрозом спинного плавника" у обработанных рыб было значительно (на 37%) меньше, чем у необработанных (рис. 2).

Известно, что при снижении уровня неспецифической резистентности после стрессовых нагрузок у таких стресс-реактивных видов рыб, как толстолобики, сапролегниевые грибы (*Saprolegniales*) поражают травмированные участки тела. Заболевание может протекать длительно, особенно при низкой температуре, вызывая повышенную гибель рыбы (Головина и др., 2003).

В экспериментальных целях одну из 2-х групп двухлеток пестрого толстолобика после транспортировки в течение 20 мин обработали piscином. Результаты наблюдения за рыбой показали, что уровень поражения сапролегниозом составил у необработанных 48 %, а у обработанных piscином - 25 % (рис. 2).



Рис. 2. Влияние тисцина на восприимчивость рыб к заболеваниям

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы нами дана оценка стресс-реактивности рыб – основных объектов аквакультуры по отношению к наиболее часто встречаемым при рыборазведении стресс-факторам. Отработан способ коррекции негативных последствий стресса с помощью биологически активного препарата "Писцин".

При экспресс-диагностике стресса в наружной слизи рыб с помощью мультистиксов было выявлено 10 биохимических параметров: глюкоза, билирубин, кетоны, удельный вес, гемоглобин, рН, белок, уробилиноген, нитриты, лейкоциты. Анализ собранного материала по обследованию интактных групп рыб показал, что слизь разных видов содержит различный уровень гемоглобина, белка, кетонов, глюкозы, билирубина и имеет различный рН и удельную массу. Такие параметры, как уробилиноген, нитриты, лейкоциты оказались мало информативными и в наших исследованиях для оценки стресса не использовались. У некоторых видов обнаружены возрастные колебания ряда биохимических параметров. Так, например, у радужной форели отмечено возрастание гемоглобина в слизи с 10 у сеголетков до 80 эр./мкл у двухлеток. У ленского осетра билирубин в слизи появляется только к концу первого года выращивания и достаточно стабилен у двухлетков.

При сравнительной оценке стресс-реактивности рыб были взяты результаты экспериментов по тестированию хендлингом. Наиболее информативными из показателей слизи оказались изменения гемоглобина, кетонов и белка. При этом у толстолобика эти отличия от интактных рыб были достоверны по всем трем показателям, у карпа – по гемоглобину и белку, у форели только по кетонам, у осетровых по белку и билирубину.

Результаты проведенного тестирования хендлингом позволили распределить рыб в зависимости от их стресс-устойчивости в следующий ряд (от менее устойчивых к более устойчивым): **пестрый толстолобик** → **атлантический лосось (семга)** → **ленский осетр** → **каспийский лосось (кумжа)** → **радужная форель** → **карп**.

Для коррекции стресс-реакции у рыб проведено испытание антистрессового препарата "Писцина", содержащего активно действующее начало в ультрамалых дозах. Метод биотестирования на инфузориях позволил провести оценку седативной активности писцина и выяснить условия его хранения.

Использование писцина на рыбах с различной стресс-реактивностью (толстолобик и форель) при хендлинге и транспортировке показало принципиальную возможность снятия им негативных последствий стресса. Наибольший антистрессовый эффект достигается при комбинированном внесении препарата в воду до, а затем сразу после стрессирования рыбы.

Таким образом, нами обнаружено отсутствие видоспецифичности биологической реакции на препарат, используемый в ультрамалых дозах. Но было отмечено, что при сильно развитой стресс-реакции (например, облов прудов и последующая транспортировка) у таких стресс-реактивных рыб, как пестрый толстолобик, препарат работает с наименьшим эффектом.

Проведенные исследования позволили выяснить, что выращиваемые в производственных условиях популяции радужной форели, каспийского лосося и семги по своему ответу на стресс-фактор гетерогенны и делятся на две группы: стресс-устойчивые и стресс-реактивные. Под воздействием писцина определенное число стресс-реактивных рыб корректируют свою стресс-реакцию. Разница между долей изначально стресс-устойчивых и долей особей, составивших эту группу при воздей-

ствии пискина, отражает эффект действия препарата. По полученным результатам проведенных экспериментов эффект действия пискина при работе с форелью составил 25%, а в экспериментах с каспийским и атлантическим лососем - 90-100%, то есть среди наиболее реактивных рыб количество особей с пониженной стресс-реакцией увеличилось почти в 2 раза.

Применение антистрессового препарата "Пискин" положительным образом отразилось на уровне неспецифической резистентности рыб, в частности на восприимчивости к возбудителям заболеваний, сопряженных со стрессом, таких, как "некроз спинного плавника" (флавобактериоз) и сапролегниоз.

Показана объективность оценки стресс-реакции у рыб экспресс-методом с использованием глюко- и мультитиксов. Их применение позволяет оперативно и прижизненно проводить определение биохимических параметров в слизи и глюкозы крови. На основании проведенных исследований подготовлен проект "Методических указаний по экспресс-диагностике стресса у рыб" и "Рекомендаций по применению пискина для коррекции стресса у рыб в пресноводной аквакультуре".

ВЫВОДЫ

1. Стресс-реактивность является одним из главных свойств организма рыб, обеспечивающих его адаптацию к условиям окружающей среды. Ее проявление в виде изменений физиолого-биохимических реакций имеет большое значение в диагностике стресса. Диапазон этих изменений отражает индивидуальную стресс-реактивность, что позволяет выделить в выращиваемых популяциях рыб, особенно у радужной форели, каспийского и атлантического лосося, стресс-реактивные и стресс-устойчивые особи.

2. Отработан экспресс-метод диагностики стресса у рыб с использованием глюко- и мультитиксов. Их применение позволяет оперативно и прижизненно проводить определение до 10 биохимических параметров в слизи и глюкозу в крови в течение 2-3 мин. Получена устойчивая корреляция некоторых из них с такими гематологическими показателями, как гематокрит, лейкоциты, СОЭ и СГЭ.

3. У всех исследованных видов рыб при стрессе наблюдается увеличение уровня глюкозы в крови. Из показателей биохимического состава слизи наиболее информативными оказались изменения гемоглобина, кетонов и белка. Колебания по гемоглобину в слизи рыб были в пределах от 25 до 200 эр./мкл, кетонам - от 0,05 до 2,1 ммоль/л, белку - от 0,30 до 3,0 г/л, билирубин - от негатива до ++ у.с. При этом у толстолобика при стрессе достоверно изменяется гемоглобин, белок и кетоны, у карпа - гемоглобин и белок, у форели - кетоны, у осетровых - белок и билирубин.

4. Действие различных стресс-факторов (хендлинга, гипертермии, гипотермии и гипоксии) вызывает у рыб изменения ряда физиолого-биохимических параметров, характеризующих общий адаптационный синдром. Течение стресс-реакции зависит от силы стрессора и от стресс-реактивности вида. В зависимости от силы воздействия температурного стрессора у карпа и ленского осетра выявлен ряд наиболее значимых ответных реакций в биохимическом составе слизи (гемоглобина и белка) и показателях крови (глюкозы, гематокрита и числа эритроцитов). При этом гипотермию рыбы переносят легче, чем гипертермию. При гипертермии реакция тревоги у ленского осетра проявляется в виде шока, которая у карпа визуально не наблюдается, но выражена в более значительном отклонении от нормы некоторых физиолого-биохимических показателей, особенно глюкозы в крови.

5. Оценка действия хендлинга на пищевое поведение выявила, что осетры более медленно восстанавливают пищевую активность, чем карп. Полное восстановление пищевой активности у осетра происходит на 4-й день, а у карпа на 2-й. Поэтому целесообразно изменять режим кормления после хендлинга у ленского осетра, снизив суточную норму корма на 80, 70 и 30 % соответственно на 1, 2 и 3-е сутки, а у сеголетков карпа - на 38% в этот день.

6. Для коррекции стресс-реакции рекомендуется биопрепарат "Писцин", используемый в ультрамалых дозах - 10^{-15} - 10^{-16} . Эффект его действия отмечали при внесении препарата в воду за 20-30 мин до стресса и 60 мин после стресса. Оптимальной схемой его применения является комбинация этих ванн.

7. Выявлено, что антистрессовое влияние писцина положительно отражается на резистентности рыб к заболеваниям, сопряженным со стрессом. Пораженность

атлантического лосося "некрозом спинного плавника", а толстолобика - сапролегниозом оказалась в 2 – 2,5 раза ниже после применения piscinia.

8. Проведенный анализ стресс-реактивности на хендлинг исследованных объектов аквакультуры позволил распределить рыб в следующий ряд (от менее устойчивых к более устойчивым): пестрый толстолобик → атлантический лосось (семга) → ленский осетр → каспийский лосось → радужная форель → карп.

9. Установлено, что активность антистрессового препарата "Писцин" в ходе его хранения изменяется. Выявлено, что хранение в темной стеклянной или пластиковой таре при температуре не выше 20⁰С гарантирует его активность в течение 2-х месяцев со дня изготовления.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Лебедева Н.Е., Головина Н.А., Головин П.П., Головкина Т.В., Романова Н.Н. Эффект сверхмалых воздействий биопрепарата "Писцин" на рыб // Рыбное хоз-во. Аналит. и реферат. информ. / Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре.- М.:ВНИЭРХ, 2002. - Вып. 4. - С. 1-9.

Головин П.П., Головина Н.А., Лебедева Н.Е., Головкина Т.В., Романова Н.Н. Оценка стресс-устойчивости рыб – объектов аквакультуры // Сб. научных трудов ВНИИПРХ / Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры. – М.:Изд-во ВНИРО, 2002. -Вып. 78. - С.171-174.

Романова Н.Н. Применение антистрессовых препаратов в аквакультуре // Сб. научных трудов ВНИИПРХ / Болезни рыб. - М.: Компания Спутник+, 2004. - Вып. 79.– С.138-147.

Головин П.П., Головина Н.А., Романова Н.Н. Адаптивные физиолого-биохимические реакции рыб на резкие температурные изменения воды / Расширенные мат-лы Всерос. науч.-практ. конф., Борок, 16-18 июля 2003 г. – М., 2004. - С.235-242.

Головин П.П., Головина Н.А., Романова Н.Н. Адаптивные механизмы слизи рыб на резкие температурные изменения воды / Мат-лы Межд. конф. "Современные

проблемы физиологии и биохимии водных организмов" (6-9 сентября 2004 г., г. Петрозаводск, Респ. Карелия, Россия). - Петрозаводск, 2004. - С. 35.

Лебедева Н.Е., Головкина Т.В., Головин П.П., Головина Н.А., Романова Н.Н. К вопросу о специфичности биохимического состава слизи у рыб при стрессе / Матлы Межд. конф. "Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов" (6-9 сентября 2004 г., г. Петрозаводск, Респ. Карелия, Россия). - Петрозаводск, 2004. - С. 79-80.

А.В. Линник, Н.А. Головина, Н.Н. Романова. Физиолого-биохимическая характеристика форели (*Oncorhynchus mykiss* *Wale.*) при селекции на стресс-устойчивость (в печати).

Отпечатано в ООО «Компания Спутник+»

ПД № 1-00007 от 25.09.2000 г.

Подписано в печать 27.04.05

Тираж 100 экз. Усл. п.л. 1,31

Печать авторефератов (095) 730-47-74, 778-45-60



№ - 8 7 7 7

РНБ Русский фонд

2006-4

14087