

На правах рукописи

СИТНОВА
ОЛЬГА ВЛАДИМИРОВНА

РГБ ОД

- 7 ФЕЗ 2000

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКТИВНОСТЬ
ВЕСЛОНОСА (POLYODON SPATHULA (WALB.)) /
В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО РАЗВЕДЕНИЯ

Специальность: 03.00.10 - ихтиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



МОСКВА 2000

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте пресноводного рыбного хозяйства (ВНИИПРХ)

Научный руководитель:

Доктор биологических наук

Вихман А. А.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук,
профессор

Илясов Ю. И.

Доктор биологических наук,
профессор

Симаков Ю. Г.

Ведущая организация:

Государственный научно-
исследовательский институт озерного
и речного рыбного хозяйства
(ГосНИОРХ)

Защита диссертации состоится "29" февраля 2000 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 117.04.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте пресноводного рыбного хозяйства (ВНИИПРХ) по адресу: 141821, Московская обл., Дмитровский р-он, пос. Рыбное

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИИПРХ

Автореферат разослан "19" "января" 2000 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Трямкина С. П.

П729.49 Веселое -28,0

П 836.3,0

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Разведение ценных пород рыб, к которым относятся осетровые, представляет большой интерес для рыбного хозяйства страны. Современная аквакультура связана с воздействием на организм разнообразных факторов интенсификации: химических компонентов водной среды, механических стресс факторов и др. Изучение реагирования организма рыб на указанные факторы, возникающих отклонений деятельности физиологических систем и оценка их рыбоводного значения являются актуальными задачами при культивировании нового объекта, представителя осетрообразных - веслоноса. Организация воспроизводства веслоноса как объекта аквакультуры требует разработки систем контроля его важнейших физиологических функций и способов их направленного регулирования.

Одной из важнейших сторон деятельности организма является резистентность к воздействию токсических агентов, физических параметров среды обитания и т. д. Достаточный уровень резистентности организма к воздействию факторов среды обитания, способных нарушить жизненно важные функции, является обязательным условием воспроизводства вида. Эта устойчивость обусловлена, в основном, активностью иммунологических систем, мало изученных у веслоноса. В связи с этим методы иммунологического исследования веслоноса требуют дальнейшего совершенствования.

Цель и задачи работы. Цель настоящего исследования - оценка резистентности и иммунологической реактивности промышленного стада американского веслоноса при воздействии природных и технологических факторов. Для решения указанной цели ставились следующие задачи:

- анализ и обобщение сведений по резистентности веслоноса к факторам среды обитания и иммунологической реактивности осетрообразных;
- совершенствование методов оценки иммунологического статуса веслоноса и их применение в условиях производства;
- рыбоводная и иммунологическая характеристика состояния стада веслоноса в условиях промышленного хозяйства;
- изучение изменчивости гуморальных факторов иммунитета в зависимости от возраста рыб и сезона обследования;
- оценка влияния на выживаемость и иммунологическую реактивность веслоноса некоторых химических воздействий, связанных с искусственным воспроизводством.

Фактический материал. В диссертации обобщен и проанализирован материал наблюдений и опытов, проводимых автором совместно с сотрудниками лаборатории осетроводства и акклиматизации Всероссийского научно-исследовательского института пресноводного рыбного хозяйства (ВНИИПРХ) за период 1988-1994 гг. Работа проведена в рамках КЦП "Амур", в той ее части, которая посвящена новым объектам разведения, в частности, разработке технологии разведения веслоноса. При анализе и обобщении полученных данных использованы отечественные и зарубежные литературные источники.

Научная новизна. Впервые проведены иммунологические исследования в условиях искусственного воспроизводства. Получены новые данные по сравнительной оценке устойчивости различных возрастных групп веслоноса при промышленном разведении к двум видам химического воздействия, различающихся по природе и технологической принадлежности. Установлены пороговые летальные и сублетальные уровни воздействия концентрации водородных ионов в водной среде и лечебно-профилактического средства фиолетового К. Показано различное реагирование веслоноса в течение онтогенеза на испытанные воздействия. Найдены два гуморальных фактора иммунитета: естественные антитела (гемагглютинины) и лизоцим. Выявлено несколько уровней изменчивости иммунологической реактивности. Полученные данные по структуре иммунологической реактивности являются новым методологическим подходом при характеристике состояния систем резистентности веслоноса.

Практическая значимость. Полученные данные дополняют разрабатываемую технологию промышленного разведения веслоноса и могут быть включены в соответствующие инструктивно-методические документы. Данные о сублетальном и летальном действии водной среды с высоким значением pH и лечебно-профилактического средства фиолетового К могут быть использованы при оценке ухудшения состояния веслоноса и его гибели. Разработана экономичная и более простая модификация диффузно-гелевого метода определения лизоцима.

Апробация. Результаты исследований, составляющих основу диссертации, обсуждались на заседаниях Ученого совета ВНИИПРХ, VIII научной конференции по экологической физиологии и биохимии рыб (Петрозаводск, 1992), 2 Международном симпозиуме по осетровым (Кострома, 1993), совещании "Развитие аквакультуры на внутренних водоемах" (Москва, 1995), Международном симпозиуме "Ресурсосберегающие технологии в аквакультуре" (Краснодар, 1996), Первом конгрессе ихтиологов России (Астрахань, 1997), 1 российско-американском симпозиуме по аквакультуре и болезням рыб (Рыбное, 1998).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста. Состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и практических рекомендаций. Список литературы включает 173 наименования, в том числе 63 иностранных. В тексте 28 рисунков и 51 таблица.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследований являлся веслонос *Polyodon spathula* Walbaum (Polyodontidae, Acipenseriformes). Исследования проводили в Краснодарском крае на базе рыбплемхоза "Горячий Ключ" (VI зона рыбоводства) в период с 1988 по 1994 гг. Эксплуатируемое стадо состояло из производителей, выращенных в прудах от завезенных из США в конце 80-х годов личинок, и их потомства (Виноградов, 1984; Мельченков, 1991). Для получения сравнительных данных были исследованы рыбы, выращенные на Краснодарском специализированном заводе растительной пищи.

Для наблюдений и экспериментальных работ были взяты различные возрастные группы веслоноса. При производственных наблюдениях и проведении экспериментов определяли массу рыб, морфометрические показатели, количество полученной от самок икры, процент оплодотворения и выживаемость потомства (Правдин, 1966). Учитывали также поведение рыб, проводили их внешний осмотр, отмечали другие признаки в соответствии с правилами ихтиопатологического исследования (Мусселиус и др., 1983).

Для определения иммунологических показателей при исследовании неоплодотворенной икры, развивающихся эмбрионов и личинок использовали тотальный гомогенат материала. Отдельные особи объединяли в суммарные пробы в зависимости от стадии развития: неоплодотворенная икра - 30 экз., эмбрионы - 15, личинки - 6 экз. Органы мальков и сеголетков отбирали после вскрытия рыб по общепринятой в ихтиопатологии методике. В связи с небольшим размером органов у мальков пробы сердца и селезенки объединяли от 10 рыб, жабр - от 2 рыб. По той же причине пробы селезенки и почки у сеголетков объединяли от 3 рыб. По данным измерений массы и объема органов высчитывали индекс органов (Яржомбек и др., 1986).

В качестве иммунологических показателей были использованы два гуморальных фактора: один вид естественных антител - агглютинины - к чужеродным эритроцитам, и фермент лизоцим. Для определе-

ния гемагглютининов применяли микротитратор системы Такачи. С целью совершенствования методов определения лизоцима были проведены исследования по комбинированному использованию диффузного метода и метода серийных разведений. На основе полученных данных нами разработан модифицированный метод учета активности лизоцима.

Для оценки общей резистентности и изменения уровня гетероагглютининов и лизоцима при технологических воздействиях изучали влияние лечебно-профилактического средства - органического красителя фиолетового К и водной среды с различным показателем рН. Во всех экспериментах с икрой при обработке органическим красителем концентрация его составляла 10 и 30 мг/л. В опытах с личинками (в бассейнах) и сеголетками (в прудах) концентрация составляла 0,2 и 0,4 мг/л. Обработка икры и рыб красителем соответствовала методике, принятой в ихтиопатологии (Бауэр и др., 1977).

При изучении влияния рН воды значения активной реакции варьировали от 6,0 (опыты в чашках Петри) до 12,0 (опыты с двухлетками в прудах). Значения рН выше нейтральной достигались путем подщелачивания воды NaOH. Более подробно условия опытов описаны в соответствующих разделах. Для выявления изменения содержания иммунологических факторов у веслоноса по разным сезонам и годам рыбе индивидуально метили термоклейменем.

Статистическую обработку результатов исследований осуществляли с помощью непараметрического критерия Крускала-Уоллиса по программе BMDP3S (критическое значение 3,84) и критерия Манна-Уитни (критическое значение 0,05). Корреляцию определяли по критерию Спирмена (критическое значение 0,45). Объем исследованного материала приведен в табл. 1.

АНАЛИЗ СВЕДЕНИЙ ПО РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВЕСЛОНОСА И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ОСЕТРОВЫХ

Иммунологические исследования веслоноса носили чисто академический характер и были связаны с изучением эволюции иммунной системы позвоночных. В значительной мере они касались морфологической организации органов и тканей, участвующих в иммуногенезе, а также тесно связанных с ним систем кроветворения и др. Изучение кроветворной системы веслоноса, лимфоидных органов и их клеточного состава показали, что этот вид обладает достаточно развитыми элементами, определяющими иммунологическую реактивность (Купер, 1980; Галактионов, 1995).

Таблица 1

Объем исследованного материала

Показатель	Количество
Количество исследованных рыб, шт.:	
эмбрионы	241980
личинки	3430
мальки	170
сеголетки	424
годовики	94
двухлетки	140
двухгодовики	83
трехлетки	90
трехгодовики	11
четырёхлетки	20
четырёхгодовики	10
пятiletки	20
пятигодовики	11
шестiletки	20
производители	174
Размерно-весовой анализ рыб, шт.	915
Постановка реакций, число анализов, шт.	2000

Анализ литературных данных по изменению резистентности веслоноса при воздействии природных и биотехнологических факторов показал:

1. Данный вид характеризуется длительным периодом существования, эвритермностью, незначительной патологией, возможностью использования как объекта рыбоводства, что позволяет считать веслоноса видом с высокой, в целом, резистентностью.

2. Установлены параметры сублетального и летального действия ряда физических (температура и др.), химических (ионный состав водной среды, содержание кислорода, питательные вещества) и механических (транспортировка, пересадка) факторов.

3. Определены основные условия, позволяющие обеспечить деятельность важнейших физиологических систем веслоноса при искусственном выращивании в рыбоводном хозяйстве. Полученные данные использованы для разработки биотехнологии разведения веслоноса и создания промышленного стада.

4. Выявлено летальное действие на веслоноса ряда неблагоприятных факторов в естественной среде обитания (изменение гидрологического режима водоемов, ухудшение токсикологической ситуации). При искусственном разведении высокочувствительны к грибковому поражению эмбриональные стадии развития.

5. Отсутствуют или требуют расширения сведения о влиянии на жизнеспособность веслоноса ряда факторов, действие которых необходимо учитывать при его разведении: водной среды с высоким значением рН, различных концентраций лечебно-профилактических средств.

6. Полностью отсутствуют сведения об изменении иммунологической реактивности веслоноса при воздействии природных и биотехнологических факторов. Имеющиеся данные по островым позволяют предположить возможность экологической модуляции деятельности иммунной системы веслоноса и использование этих показателей как тестов оценки общего физиологического статуса, уровня резистентности и иммунитета, адекватности среды обитания.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ВЕСЛОНОСА

Организация разведения веслоноса как объекта аквакультуры требует разработки системы контроля его важнейших физиологических функций и способов их направленного регулирования (Виноградов и др., 1987; Мольченко, 1991). Одним из актуальных направлений исследований является изучение иммунологической реактивности, отражающей уровень защитной способности организма и характер его адаптивной реакции. На первом этапе исследований первостепенное значение имеет формирование методических основ оценки иммунологической реактивности веслоноса с учетом его анатомофизиологических особенностей.

Для изучения иммунологической активности анатомических образований у веслоноса необходимо иметь методы оценки содержания в них иммунологических факторов гуморальной и клеточной природы. В наших исследованиях изучали два естественных гуморальных показателя, характеризующих образование антител - гемагглютинины и неспецифический фактор - лизоцим. Определяли два вида гемагглютининов: агглютинины к эритроцитам кролика (АЭК) и агглютинины к эритроцитам человека (АЭЧ). Кроме того, устанавливали индексы некоторых органов и связь иммунологических показателей с рыбоводной характеристикой объектов выращивания.

Топография лимфоидных органов и их индексы

Для более полной характеристики иммунологической реактивности были уточнены анатомические особенности некоторых органов и тканей сеголетков вслоноса, связанных с образованием защитных факторов.

У сеголетков и мальков были взяты органы: жабры, сердце, почка, селезенка. При обработке результатов была определена сначала масса органов, а затем их морфофизиологические индексы (табл. 2).

Таблица 2
Показатели измерений массы рыб и органов
и их индексы

Показатели	Сеголетки 1988 г.	Сеголетки 1989 г.	Мальки 1991 г.
Вес рыб, г	77,7	63,6	23,6
Вес селезенки, мг	120	50	29
Вес жабр, мг	300	400	259
Вес сердца, мг			34
Вес почки, мг	140	140	
МФИ селезенки	1,5	0,7	12,3
МФИ жабр	3,8	6,5	109,7
МФИ сердца			14,3
МФИ почки	1,9	2,4	

Статистическая обработка результатов по критерию Крускала-Уоллиса показала достоверность различия между органами сеголетков вслоноса по их массе и морфофизиологическим индексам. Наибольшую массу имели жабры, значение которой примерно в 2 раза превышала другие органы. Массы селезенки и почки в исследовании 1988 г. не отличались, а в 1989 г. различия наблюдали. Аналогичные результаты получены и у мальков. Масса органов и их индексы достоверно отличались. Масса жабр была значительно больше по сравнению с селезенкой и сердцем, а масса сердца выше массы селезенки. При сопоставлении индексов органов достоверность различия показателей оказалась идентичной установленной для масс органов.

Модификация диффузно-гелевого метода определения лизоцима

С целью совершенствования методов определения лизоцима были проведены исследования по комбинированному использованию диффузного метода и метода серийных разведений в жидкой среде.

При отработке метода использована техника подготовки гелевой среды с микрококком, параметры инкубации реакционной среды и методы учета, используемые при определении лизоцима у рыб известным диффузным методом (Каграманова, Ермолева, 1966).

Основным материалом для исследования служила сыворотка крови веслоноса. Первые эксперименты были посвящены разбору минимальных концентраций микрококка в агаровой и агарозной средах, пригодных для визуального учета в диапазоне 1,0-3,0 мг/мл. В первом опыте было изучено влияние на результат реакции вида геля и его концентрации, а также длительности экспозиции при 37⁰С. Показано, что для определения данного фермента пригодны оба геля, агар и агароза, в концентрациях, соответственно, 1,25-1,5 и 1,5%. Опыты проводили при экспозиции 3 и 6 ч. Второй вариант оказался наиболее эффективным.

В следующем опыте была проверена пригодность полученных в предыдущем опыте данных для титрования материала (сыворотки) веслоноса. Концентрация микрококка составила 1,5 мг/мл. Экспозиция была увеличена до 17 ч при 37⁰С, что привело к увеличению чувствительности реакции. В этом опыте подтверждена приемлемость использования агара и агарозы в концентрации 1,5%.

Предлагаемая модификация использует положительные стороны диффузного метода (использование небольшого количества материала любого вида, визуальный учет) и метода разведения (простота). Его принцип заключается в локальном воздействии каждого разведения на гелевый столбик с индикаторным микрококком в лунке серологического планшета.

Распределение гетерогемагглютининов и лизоцима у мальков и сеголетков веслоноса

Для изучения распределения факторов резистентности в органах и тканях сеголетков веслоноса (генерация 1988 г.) определяли содержание гетерогемагглютининов в почке, селезенке, жабрах и сыворотке крови. В почке и селезенке отметили низкий уровень гемагг-

лютининов. Учет реакции проводили двумя различными методами: по обратному титру и более чувствительному способу - по сумме крестов. Наибольшее количество агглютининов установлено в жабрах, особенно по уровню АЭК. Различие между сывороткой и жабрами было подтверждено статистически - коэффициент Крускала-Уоллиса составил 25,4-30,9. По абсолютному содержанию уровню АЭК в жабрах достоверно превышал содержание АЭЧ (коэффициент Крускала-Уоллиса равен 15,5). Корреляция содержания АЭК и АЭЧ между сывороткой и жабрами отсутствовала, так как величина коэффициента Спирмена составила $< 0,45$. Как в сыворотке, так и в жабрах не наблюдали корреляции между АЭК и АЭЧ (коэффициент Спирмена колебался в пределах $-0,14-0,38$).

Помимо гемагглютининов было изучено содержание лизоцима в органах и тканях сеголетков генерации 1989 г. Высокой лизоцимной активностью обладали все исследованные образования, причем наиболее высокие уровни фермента отмечали в почке и селезенке. Статистический анализ не выявил различия в содержании факторов в органах. Исключение составило содержание лизоцима в почке и селезенке по сравнению с сывороткой. Корреляция содержания АЭК, АЭЧ и лизоцима в основном отсутствовала, кроме 2-х случаев при исследовании соотношения АЭК-АЭЧ и АЭК-лизоцим в почке (табл. 3).

Таблица 3

Корреляция содержания различных факторов
в органах и сыворотке сеголетков веслоноса

Исследуемый материал		Сравниваемые показатели		
		АЭЧ- лизоцим	АЭК- лизоцим	АЭК-АЭЧ
Почка	абсол. сод., усл. ед.	0,40	0,76	0,66
	относ. сод., усл. ед. /мл	0,27	0,79	0,66
Селезенка	абсол. сод., усл. ед.	-0,21	-0,21	-0,17
	относ. сод., усл. ед. /мл	0,10	0,10	-0,17
Жабры	абсол. сод., усл. ед.	0,19	-0,30	0,24
	относ. сод., усл. ед. /мл	0,15	-0,05	0,34
Сыворотка	относ. сод., усл. ед. /мл	-	0,01	-

В 1991 г. для определения гуморальных факторов были исследованы органы и сыворотка крови мальков веслоноса. Содержание агглютининов в сыворотке крови оказалось меньше, чем в жабрах в 1,5 раза, лизоцим в сыворотке также был меньше в 3,9 раза. При сравнении уровня АЭК и лизоцима наблюдали такую же тенденцию: в сыворотке содержание агглютининов было в 3,6 раза, а в жабрах в 9,3 раза меньше, чем содержание в них лизоцима (табл. 4).

Таблица 4

Содержание гуморальных факторов в сыворотке и жабрах мальков веслоноса, усл. ед. /мл

№№ п/п	Сыворотка		Жабры	
	АЭК	Лизоцим	АЭК	Лизоцим
1	8,0	8,0	9,7	38,0
2	6,0	16,0	18,0	144,0
3	18,0	32,0	9,0	144,3
4	12,0	16,0	11,9	49,7
5	3,0	8,0	9,8	79,0
6	6,0	0	12,4	99,5
7	6,0	24,0	20,7	164,9
8	10,0	24,0	3,8	30,3
9	3,0	48,0	4,0	194,3
10	3,0	96,0	13,4	106,0
Среднее	7,5	27,2	11,3	105,0

Результаты исследований выявили различный характер распределения каждого изученного фактора в исследованных образованиях и отличие в распределении разных факторов. По уровню гемагглютининов, особенно АЭК, более активными оказались жабры и сыворотка, а по содержанию лизоцима - лимфоидные органы, хотя сыворотка и жабры дали четкий положительный результат.

Полученные данные определили выбор материала для оценки иммунологического статуса. Оказалось вполне целесообразным определять гуморальные естественные факторы (гетерогемагглютинины и лизоцим) прижизненно в сыворотке крови, а при вскрытии рыб использовать в качестве источника факторов жабры, почку и селезенку.

ИЗМЕНЕНИЕ РЫБОВОДНЫХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ПРОМЫШЛЕННОМ ВЫРАЩИВАНИИ ВЕСЛОНОСА

Использование показателей оценки резистентности веслоноса для оптимизации условий его выращивания требует определения иммунологических показателей всех рыбоводных групп, начиная с эмбрионального периода и кончая производителями. В настоящей главе представлены материалы по оценке выживаемости и иммунологической реактивности различных по рыбоводным признакам групп стада веслоноса.

Характеристика рыбоводных и иммунологических показателей у производителей и потомства на ранних стадиях развития

Особого внимания при определении уровня резистентности веслоноса заслуживает изучение ранних этапов эмбриогенеза, которые определяют численность потомства и физиологические свойства выживших особей. Резистентность потомства зависит от двух основных причин: наследственных признаков, полученных от родителей, и формирующейся в процессе онтогенеза приобретенной реактивности.

В эксперименте 1990 г. от 12 самок были исследованы пробы развивающейся икры и выклюнувшихся эмбрионов. У потомства не обнаружены АЗК, а содержание фактора у самок было незначительным (2-4 усл. ед./мл). Содержание лизоцима у самок отличалось в большей степени и колебалось в пределах 16-128 усл. ед./мл.

В опыте 1991 г. изменение содержания АЗК и лизоцима изучали у полусибсов без обработки красителем, чтобы определить изменение реактивности, максимально приближенное к естественным процессам (табл. 5). Содержание АЗК было наименьшим в неоплодотворенной икре, затем постепенно повышалось на ст. 31. В этот период развивающаяся икра в 1 и 3 группах погибла от сапролегнии. Уровень агглютининов во 2 группе личинок на выклеве понижался до 0 и вновь повышался у 7-дневных личинок. Колебание уровня лизоцима было иным: по сравнению с неоплодотворенной икрой его уровень понижался на ст. 31, затем вновь повышался у личинок на выклеве. У 7-дневных личинок содержание лизоцима было наиболее высоким. Наибольшие различия между группами по уровню лизоцима наблюдали в неоплодотворенной икре, причем в 3 группе две пробы отличались более, чем в 2 раза. Выживаемость 2 группы в отсутствие обработки красителем была крайне низкой и составила 4,6%.

Таблица 5

Относительное содержание АЭК и лизоцима
у эмбрионов и личинок веслоноса
без обработки красителем

Группы полу- сиссов	АЭК, усл. ед. /мл				Лизоцим, усл. ед. /мл			
	Э ₀	Э ₃₁	Л ₀	Л ₇	Э ₀	Э ₃₁	Л ₀	Л ₇
1	0,85	2,03	-	-	13,7	4,0	-	-
	0,73	1,95			11,4	3,9		
2	0,83	2,25	0	1,85	3,3	1,3	6,9	27,1
		1,93		3,35	3,9			59,7
3	0,55	2,50	-	-	9,0	5,5	-	-
	0,68	1,95			21,3	3,9		

Примечание: Э₀ - икра до оплодотворения, Э₃₁ - эмбрион на ст.31, Л₀ - личинка на выклеве, Л₇ - личинка на 7 день после выклева

Выявленное изменение содержания факторов на ранних стадиях развития является, по нашему мнению, соотношением двух различных процессов: постепенным уменьшением запасов гуморальных факторов, находящихся в икре до оплодотворения и синтезом факторов активными клетками развивающегося организма.

Влияние возраста и сезонности на уровень гуморальных иммунологических факторов

В процессе онтогенеза и перехода из одной возрастной рыбодной группы в другую развиваются органо-тканевые образования, связанные с продуцированием иммунологических факторов молекулярной и клеточной природы.

Более точное представление о характере и стабильности изменчивости реактивности могло дать изучение индивидуальных отклонений в уровне фактора, т.е. определение иммунограмм. С этой целью осенью 1991 г. у двухлетков дважды брали пробы крови с интервалом в 7 дней. Индивидуальное исследование изменения гуморальных факторов позволило отнести каждую особь к одному из трех функциональных типов: +реакция (стимуляция реактивности), -реакция (сни-

жение реактивности), 0-реакция (отсутствие изменений). Реактивность рыб по типам распределилась следующим образом:

Показатели	АЭК			Лизоцим		
	+	-	0	+	-	0
Кол-во рыб, шт.	18	3	19	11	29	-
%	45,0	7,5	47,5	27,5	72,5	-

По уровню АЭК количество рыб с положительной динамикой и нейтральным состоянием было почти равным, а рыб с отрицательной реакцией - всего 7,5%. По содержанию лизоцима, наоборот, количество рыб с отрицательной динамикой было наибольшим, а нейтральное состояние вообще не зафиксировано. Выявление связи характера реагирования с массой и длиной рыб показало, что различные в функциональном отношении группы мало отличаются по массе и длине.

В течение вегетационного периода 1991 г. определяли характер изменения активности сыворотки у годовиков в начале и конце нагула, когда наблюдали увеличение массы в 9,3 раза, а длины в 1,8 раза. Агглютинины к эритроцитам кролика не были обнаружены весной, а осенью их количество колебалось в пределах 2-32 усл.ед./мл. При сравнении индивидуальной активности рыб по уровню лизоцима отмечали неравнозначную направленность и степень изменения реактивности (рис. 1). Основная часть рыб (72%) характеризовалась отчетливым снижением уровня лизоцима к осени. Две другие группы рыб были отнесены к "нейтральному" и "положительному" типам реагирования (соответственно 12 и 16%).

Осенью 1992 г. у трехлетков трижды индивидуально брали пробы крови. Содержание АЭК не превышало, в основном, 4 усл.ед./мл и не изменилось в течение опыта. Несколько выше было содержание АЭК, которое снижалось к концу наблюдения. Колебания уровня лизоцима носили иной характер: увеличивалось число рыб с активностью выше 80 усл.ед./мл. Распределение рыб по типам индивидуального реагирования, отражающего динамику ответа, представлено в табл. 6.

Многолетнее выращивание рыб в условиях полносистемного хозяйства открыло возможность длительного наблюдения за отдельными особями и выяснения изменчивости реактивности в зависимости от возраста и сезонных факторов. С этой целью изучили динамику содержания АЭК и лизоцима в 2 группах рыб от годовиков до трехлет-

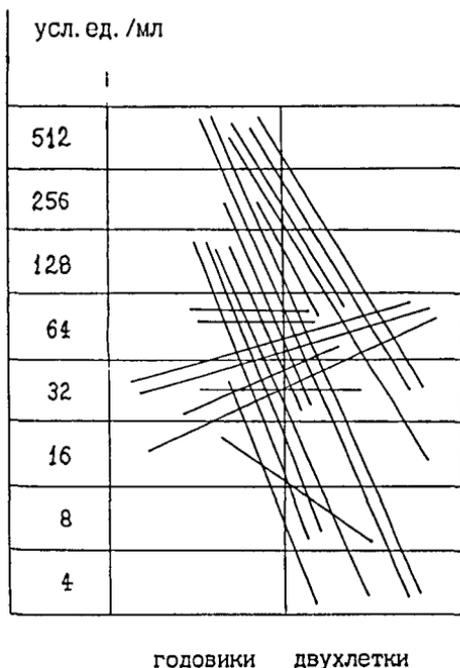


Рис. 1. Индивидуальное содержание лизоцима у годовиков и двухлетков веслоноса

Таблица 6

Распределение трехлетков по типу реагирования (n=36)

Исследованные факторы	Типы реагирования								
	++ ^x	+-	+0	0+	--	--	00	0-	-0
АЭК	1	6	1	4	6	1	3	3	11
АЭЧ	4	5	4	3	2	1	6	8	3
Лизоцим	4	13	5	4	4	1	2	2	1

Примечание: ^{x)} - первый знак - от первого ко второму сроку взятия крови;
 второй знак - от второго к третьему сроку взятия крови

ков. Сопоставление динамики индивидуального содержания факторов по сезонам показало, что наблюдались различия как между характером изменений разных факторов, так и между сезонами исследования. При определении АЭК у двух- и трехлетков установлено повышение уровня фактора осенью по сравнению с предшествующим весенним периодом. В обеих группах отмечена большая доля рыб, у которых не изменилось содержание фактора по сравнению с осенью. При установлении уровня лизоцима выявлено четкое его снижение к весеннему периоду и затем повышение к осени. С этими данными согласуется изменение лизоцима у двухгодовиков 2 группы, но у двухлетков повышение лизоцима осенью не наблюдали. Определение активности производителей в разные сезоны 1989-1992 гг. дало возможность сопоставить изменчивость их реактивности (табл. 7), при этом учитывали отдельно самок и самцов. Более высокий уровень агглютининов отмечен в октябре 1989 г., самый низкий - в апреле 1991 г. Не совпала активность рыб, исследованных в апреле в разные годы: в 1992 году наблюдали высокие уровни АЭК по сравнению с 1990 и 1991 гг. как у самок, так и самцов. В отношении лизоцима получены иные данные: при высоком уровне фермента отметили его наибольшее содержание в апреле 1991 г. и наименьшее - в октябре 1989 г.

Таблица 7

Распределение производителей по уровню содержания АЭК и лизоцима в 1989-1992 гг.

Пол рыб	Сроки исследования		Всего рыб, шт.	Число рыб (шт.) по рангам активности (усл. ед. /мл)									
	год	месяц		0	2	4	8	16	32	64	128	256	512

Агглютинины к эритроцитам кролика

Самки	1989	октябрь	13	-	-	-	6	3	4	-	-	-	-
	1990	апрель	24	1	2	20	1	-	-	-	-	-	-
	1991	апрель	11	7	-	4	-	-	-	-	-	-	-
	1991	октябрь	18	-	-	7	8	2	1	-	-	-	-
	1992	апрель	9	-	-	-	8	1	-	-	-	-	-
Самцы	1989	октябрь	16	-	-	2	4	4	2	1	2	1	-
	1990	апрель	16	-	-	12	3	1	-	-	-	-	-
	1991	апрель	15	7	-	8	-	-	-	-	-	-	-
	1991	октябрь	13	-	-	8	3	1	1	-	-	-	-
	1992	апрель	19	-	-	-	6	7	2	4	-	-	-

Продолжение таблицы 7

Пол рыб	Сроки исследования		Число рыб, шт.	Число рыб (шт.) по рангам активности (усл. ед. /мл)									
	год	месяц		0	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Лизоцим													
Сам- ки	1989	октябрь	13	-	2	4	6	1	-	-	-	-	
	1990	апрель	24	-	-	-	-	2	8	8	6	-	
	1991	апрель	11	-	-	-	-	-	1	1	-	2	
	1991	октябрь	18	-	-	-	2	3	5	1	4	2	
	1992	апрель	9	-	-	-	-	1	5	3	-	-	
Сам- цы	1989	октябрь	16	-	3	5	7	1	-	-	-	-	
	1990	апрель	16	-	-	-	3	4	3	5	1	-	
	1991	апрель	15	-	-	-	-	-	-	2	1	4	
	1991	октябрь	13	-	-	-	1	1	7	4	-	-	
	1992	апрель	19	-	-	-	1	1	4	4	5	4	

По многолетним данным было проведено сравнение содержания иммунологических факторов у разных возрастных групп веслоноса. Для анализа были взяты двухлетки, трехлетки и производители в возрасте тринадцатилеток. Наибольший уровень как АЗК, так и лизоцима был у производителей, наименьший - у двухлеток.

Проведенные исследования показали широкую изменчивость иммунологических показателей. Выявлено отчетливое влияние на уровень активности исследованных гуморальных факторов возраста рыб, сезонности и года выращивания.

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ВЕСЛОНОСА

Одним из элементов технологии выращивания прудовых рыб является контроль их физиологического состояния, в том числе, уровня резистентности к действию двух видов факторов: природных и рыбо-водно-технологических. Проведенные нами наблюдения касались влияния в условиях прудового хозяйства на некоторые возрастные группы веслоноса водной среды с различным показателем pH и применяемого для профилактики заболсваний препарата фиолетового К.

Критические значения pH для разных
возрастных групп и изменение реактивности
в условиях повышения pH

При выращивании веслоноса в прудах возникает вопрос об устойчивости данного вида к резким отклонениям pH воды применительно к различным этапам, начиная с эмбрионального.

Первые наблюдения по влиянию pH водной среды на развивающуюся икру были проведены в чашках Петри. Наблюдения велись вплоть до вылупления эмбрионов. Полная гибель эмбрионов происходила при pH 10,0. При pH 8,0 гибель замедлялась, но была большей по сравнению с инкубацией при pH 6,0. Средняя выживаемость составила 25,3% и 49,3%, соответственно. Наибольшая выживаемость эмбрионов, равная 90,6%, была отмечена при 20-минутной экспозиции при pH 8,0 с последующим переносом икры в воду с pH 6,0.

В последующем изучали влияние воды с различными параметрами pH на 4-дневных личинках. При pH 11,0 все личинки погибали через 15 мин после кратковременной резкой двигательной реакции (выпрыгивание из воды) с последующей адинамией и потерей плавучести. При более низком значении pH равном 10,0 средняя выживаемость через 6 сут составила 92,6%, в контроле при pH 7,8 - 94,3%. К концу опыта у 10-дневных личинок содержание АЭК и лизоцима в опыте и в контроле повышалось. Статистическая обработка данных по Манна-Уитни достоверных различий не выявила. Величина критерия составила 0,18-0,44 при критическом значении 0,05.

Было проведено наблюдение за мальками средней массой 24 г, содержащихся в бассейнах при различных значениях pH. Средняя температура в бассейнах была равна 28,7⁰С. При pH 10,0 наблюдали полную гибель мальков. В опыте pH был равен 9,5, контролем служила водная среда с pH 7,8. Результаты определения гуморальных факторов представлены на рис. 2. Достоверное различие уровня АЭК и лизоцима отмечали между двумя контрольными группами. Величина критерия Крускала-Уоллиса составила 5,03. В опытных группах отмечали достоверное различие уровня лизоцима (коэффициент Крускала-Уоллиса 4,54). Сравнение объединенных повторностей не выявило влияния pH 9,5 на уровень агглютининов и лизоцима.

Был поставлен также опыт по влиянию водной среды с повышенным pH на двухлетков веслоноса. В опыте уровень pH равнялся 12,0, в контроле - 9,0. Данные по содержанию гуморальных факторов в исследуемых группах представлены в табл. 8.

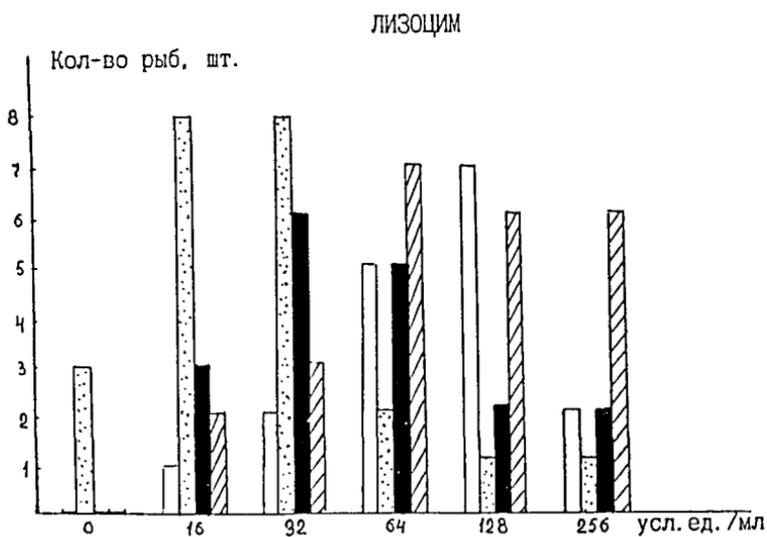
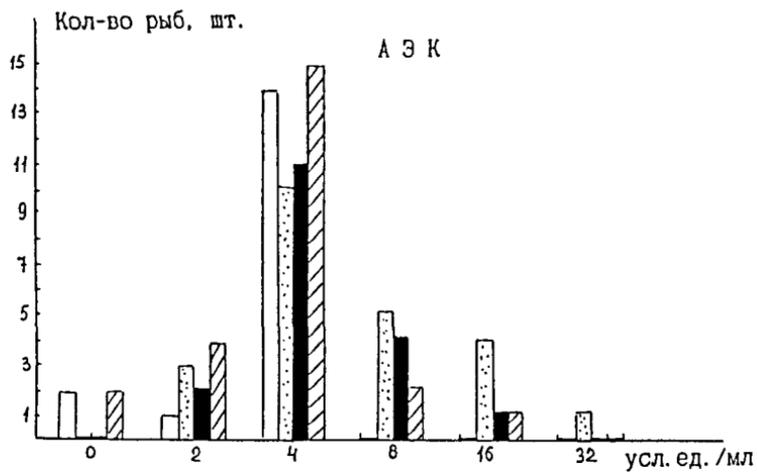


Рис. 2. Содержание агглютининов и лизоцима в сыворотке крови мальков веслоноса

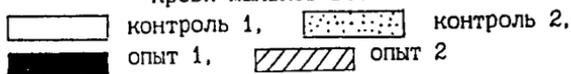


Таблица 8

Содержание АЭК и лизоцима у двухлетков веслоноса
при разных значениях pH

Группа рыб	АЭК, усл. ед. /мл		Лизоцим, усл. ед. /мл	
	начало	окончание	начало	окончание
O ₁	6,8	7,6	29,6	45,6
O ₂	6,6	10,7	31,2	21,0
K ₁	5,1	12,2	39,6	25,7
K ₂	4,8	7,2	45,1	22,2

Сравнение рыб, содержащихся в контрольных группах показало, что за период опыта отмечено достоверное увеличение АЭК к концу опыта, что свидетельствует о влиянии новых условий содержания. В отношении лизоцима показано снижение фактора в контроле к концу опыта. Можно полагать, что выявленные изменения обоих факторов отражают адаптацию организма рыб после пересадки в пруд.

Оценка действия антипаразитарного средства
фиолетового К на состояние веслоноса
на первом году жизни

Препарат фиолетового К широко применяется в рыбоводной практике, т.к. обладает выраженным противопаразитарным действием. Представляет интерес испытание более высоких (по сравнению с принятыми) концентраций, пытаясь повысить эффективность препарата, а также прогнозировать ситуацию при его передозировке. Поэтому на разных этапах выращивания рыб были испытаны две концентрации фиолетового К: близкая к используемой на практике (10 мг/л) и более высокая (30 мг/л).

Первые наблюдения за развивающейся икрой были проведены в лабораторных условиях в чашках Петри со ст. 8 бластомеров и до вылупления при температуре 23⁰С. Уровень лизоцима в икре до постановки опыта был равен 37 усл. ед. /мл. После проведения эксперимента содержание фактора понизилось при концентрациях 10 и 30 мг/л. В контроле без обработки красителем этот показатель увеличился в несколько раз. Прослеживалась корреляция между средними показателями выживаемости и уровнем лизоцимной активности.

Опыты по воздействию фиолетового К на разных этапах развития трех групп полусибсов были продолжены в бассейнах. Опыт был поставлен без контроля (не подвергнутая действию препарата икра), чтобы избежать гибели эмбрионов. Поэтому полученные результаты позволили сопоставить влияние двух концентраций фиолетового К. Результаты изменения иммунологических факторов представлены в табл. 9.

Таблица 9

Относительное содержание гуморальных факторов и выживаемость на ранних стадиях развития веслоноса при воздействии фиолетового К, усл. ед. /мл

Группы полусибсов	До оплодотворения	Ст. 31 эмбрионального периода		7 сут. личиночного периода		Выживаемость, %	
		10 мг/л	30 мг/л	10 мг/л	30мг/л	10мг/л	30мг/л
Агглютинины к эритроцитам кролика							
1	20,0	10,3	6,5	1,8	25,4	8,1	27,4
2	7,5	8,8	8,9	8,5	14,5	3,2	6,7
3	10,5	7,2	10,0	7,2	10,7	5,5	13,2
Агглютинины к эритроцитам человека							
1	10,0	8,3	3,9	0	0		
2	6,2	3,1	5,6	0	0		
3	10,0	3,9	4,9	0	0		
Лизоцим							
1	21,9	19,2	7,8	31,2	37,4		
2	18,2	7,3	4,2	27,5	21,5		
3	20,2	5,9	2,7	16,5	16,9		

Изменения иммунологических факторов характеризовались на ст. 31 снижением агглютининов и лизоцима по сравнению с неоплодотворенной икрой. В дальнейшем у 7-дневных личинок обнаружено падение гемагглютининов к эритроцитам человека, повышение содержания лизоцима. Соответственно изменилось соотношение уровня агглютининов после оплодотворения в сторону преобладания агглютининов к эритроцитам кролика. Сопоставление количества факторов у всех групп эмбрионов выявило отличие в их иммунологическом статусе, за исключением содержания АЭК у 7-дневных личинок, у которых при воздействии 30 мг/л красителя уровень фактора не изменился.

В последующих экспериментах изучали влияние красителя на 4-дневных личинок. При концентрации 0,2 мг/л выживаемость составила 16%, а при 0,4 мг/л наблюдали полную гибель личинок через сутки. Изменение содержания факторов при воздействии красителя в дозе 0,2 мг/л представлено в табл. 10.

Таблица 10

Относительное содержание факторов и выживаемость при обработке личинок веслоноса красителем

Концентрации красителя	Определяемый иммунологический фактор	Содержание факторов на различных сроках выращивания, усл.ед./мл				Относительная выживаемость, %
		4 дснь ^x	6 дснь	7 дснь	10 дснь	
0,2 мг/л	АЭК	13,0 ^{xx}	13,3	17,4	22,8	16,0
	АЭЧ	0	0	3,2	0	
	Лизоцим	14,2	20,6	14,4	28,2	
Контроль	АЭК	13,0	21,2	23,5	18,0	73,5
	АЭЧ	0	2,1	0	0	
	Лизоцим	14,2	24,9	19,1	22,0	

Примечание: ^x) - до обработки красителем,
^{xx}) - средний уровень фактора

По динамике уровня факторов отметили тенденцию к увеличению содержания АЭК и лизоцима по сравнению с 4-дневными личинками, однако статистический анализ не выявил различий между опытной и контрольной группой, т.к. величина критерия Манна-Уитни колебалась в пределах 0,06-1,0 (при критическом значении 0,05).

Последующие опыты были направлены на изучение реагирования иммунологических систем при воздействии фиолетового К на сеголетков. Было проведено два опыта в 1988 и 1989 гг. В первом опыте в сыворотке крови определяли агглютинины к эритроцитам кролика, во втором - агглютинины к эритроцитам кролика и лизоцим. Концентрации красителя были применены такие же, как и для 4-дневных личинок: 0,2 и 0,4 мг/л. Для выявления достоверных различий между отдельными группами рыб был проведен статистический анализ материалов с помощью непараметрического критерия Крускала-Уоллиса. Было установлено, что между всеми исследованными группами отсутствует различие в содержании гемагглютининов (критерий Крускала-Уоллиса

составил 0-3, 3). Опытные и контрольные группы были сопоставлены также между собой путем объединения групп с одинаковым воздействием красителя. И в этом случае не отмечено различия между опытом и контролем и между группами с разной концентрацией внесенного красителя (критерий Крускала-Уоллиса 0-3, 6). Иные результаты получены во втором опыте при определении содержания сывороточного лизоцима. После статистической обработки материала установлено неодинаковое соотношение активности опытных и контрольных групп. Между группами рыб, обработанных фиолетовым К в концентрации 0,4 мг/л и контрольными особями установлено достоверное различие, причем уровни лизоцима у опытных рыб были значительно меньше. При меньшей концентрации препарата между опытными и контрольными группами эти различия отсутствовали. Следует отметить одинаковый уровень фактора у однотипных групп в опыте и контроле (рис. 3).

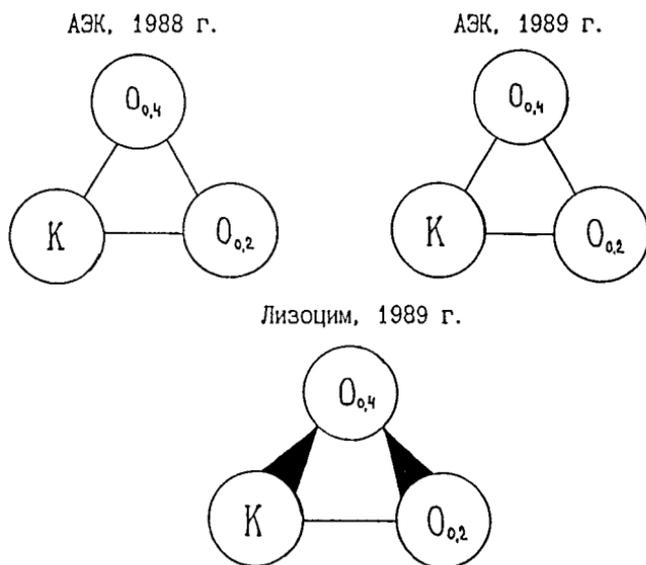


Рис. 3. Достоверность изменения содержания гуморальных факторов у сеголетков веслоноса при воздействии фиолетового К

Таким образом, представленные выше материалы позволили характеризовать некоторые стороны реагирования разных возрастных групп веслоноса на воздействие водной среды с различными значениями pH и используемым при профилактической обработке химического агента - красителя фиолетового К.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа касается изучения резистентности американского веслоноса, выращиваемого в промышленном рыбноводном хозяйстве в условиях действия природно-климатических факторов Северного Кавказа и рыбноводно-технологических факторов воспроизводства.

Иммунологическая реактивность формируется начиная с ранних этапов развития, сменяя фазу наследования факторов, полученных в материнском организме. В отношении лизоцима активное его образование начинается, видимо, у 7-дневных личинок, а для гетерогемагглютининов - у более старших возрастов. Следующий этап увеличения образования факторов для лизоцима после двухлетнего возраста, для гемагглютининов - после года. Влияние сезонности на уровень гуморальных иммунологических факторов было подтверждено на разных возрастных группах и показало при использовании интегральных групповых показателей сравнения неодинаковый характер изменения лизоцима и гетерогемагглютининов.

Оценка резистентности по интегральному клиническому показателю - выживаемости показала, что имеются существенные различия в летальном действии водной среды с высоким значением pH на различные возрастные группы. Установлено абсолютно летальное действие на эмбрионов и мальков среды с pH 10,0, но мальки полностью выжили при pH 9,5. Еще более устойчивыми оказались двухлетки, выдержавшие pH 12,0. В этих опытах отчетливо проявилось действие возрастного фактора и повышение устойчивости с увеличением возраста.

В отношении фиолетового К, применяемого для борьбы с сапролегниозом, установлено отсутствие летального действия на эмбриональные стадии при 3-кратном увеличении концентрации препарата. Однако, концентрация 0,4 мг/л вызывала полную гибель 4-дневных личинок. При действии фиолетового К в отличие от влияния pH самые ранние стадии развития оказались более устойчивыми.

ВЫВОДЫ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанная технология искусственного воспроизводства и выращивания американского веслоноса позволяет создать уровень резистентности, необходимый для эффективного функционирования физиологических систем рыб и создания промышленных ремонтно-маточных стад.

2. При действии ряда факторов химической и физической природы, уровень резистентности является недостаточным. В этих ситуациях наблюдали ухудшение состояния и гибель рыб.

3. Установлено абсолютно летальное действие водной среды с $pH=10,0$ на эмбрионов и мальков веслоноса и частичное при $pH=9,5$; двухлетки полностью выживали при $pH=12,0$.

4. Летальное действие лечебно-профилактического средства фиолетового К наблюдали у сеголетков при концентрации препарата $0,4$ мг/л; в эмбриональном периоде концентрации свыше 10 мг/л не вызывали гибели рыб.

5. Иммунологическая активность органов и тканей по данным определения двух гуморальных факторов - лизоцима и гетерогемагглютининов - зависит как от факторов, полученных в материнском организме, так и от новообразования собственными физиологическими системами.

6. Наиболее выражена изменчивость иммунологической реактивности в эмбриональном и личиночном периодах, а также в зависимости от сезона исследования рыб однотипных возрастных групп.

7. Реагирование иммунной системы веслоноса при воздействии щелочной среды и фиолетового К оказалось достаточно инертным; наиболее изменчивым оказался показатель, характеризующий уровень лизоцима; отмечено снижение этого показателя при действии на сеголетков летальных концентраций фиолетового К.

8. В процессе выращивания веслоноса в прудах следует избегать применения интенсификационных мероприятий, которые могут вызвать резкие колебания pH среды обитания и привести к гибели рыбы.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Вихман А. А., Ситнова О. В. Изучение иммунофизиологической реактивности веслоноса, выращиваемого в прудовых условиях (предварительное сообщение) // Растительоядные рыбы и новые объекты рыбоводства и акклиматизации / Сб. науч. тр. ВНИИПРХ. - М., 1990. -

Вып. 61. - С. 103-107.

2. Ситнова О.В., Генералова Л.П., Мельченков Е.А., Вихман А.А. Оценка иммунофизиологического статуса веслоноса (*Polyodon spathula* (Walb.)) в условиях промышленного выращивания // Водные биоресурсы, воспроизводство и экология гидробионтов / Сб. науч. тр. ВНИИПРХ. - М., 1992. - Вып. 66. - С. 96-106.

3. Ситнова О.В., Генералова Л.П., Мельченков Е.А., Илясова Н.Ю. К изучению иммунофизиологической реактивности веслоноса в онтогенезе // Тез. докл. VIII науч. конф. по экологич. физиологии и биохимии рыб. - Петрозаводск, 1992. - Т. 2. - С. 104-105.

4. Генералова Л.П., Ситнова О.В. Методика определения лизоцима жидкостно-гелевым способом. - М.: ВНИИПРХ, 1993. - 4 с.

5. Godovich P.L., Melchenkov E.A., Sitnova O.V., Vinogradov V.K. The content of steroid hormones in the blood serum of paddle fish, *Polyodon spathula* (Walb.), during postembryonic development // 2 nd Int Symp. on Sturgeons, 6-11 Septem. 1993, Moscow-Kostroma-Moscow: Abstr. Bull./ VNIRO. - Moscow, 1993. - P. 16-17.

6. Ситнова О.В., Вихман А.А., Мельченков Е.А. Изучение иммунофизиологического статуса различных возрастных групп веслоноса (*Polyodon spathula* (Walb.)), выращиваемого в прудовом хозяйстве // Рыбное хозяйство. - Сер.: Аквакультура. Информ. пакет "Прудовое и озерное рыбоводство". - М.: ВНИЭРХ, 1995. - Вып. 3. - С. 18-23.

7. Вихман А.А., Ситнова О.В., Генералова Л.П., Шарт Л.А., Борщев В.Н. О методах изучения изменчивости иммунофизиологической реактивности рыб // Развитие аквакультуры на внутренних водоемах / Тез. докл. - М.: МСХА, 1995. - С. 58-59.

8. Мельченков Е.А., Виноградов В.К., Ерохина Л.В., Чертихин В.Г., Илясова В.А., Бреденко М.В., Ситнова О.В., Хрисанфов В.Е., Канидьева Т.А., Бубунец Э.В., Харзин О.Б. Отечественный опыт разведения и выращивания веслоноса // Рыбное хозяйство. Обзор. информ. Сер.: Аквакультура. - М., 1996. - Вып. 1. - 68 с.

9. Мельченков Е.А., Чертихин В.Г., Бреденко М.В., Ситнова О.В. Отечественный опыт освоения веслоноса // Ресурсосберегающие технологии в аквакультуре / Тез. докл. Междунар. симпоз. - Краснодар, 1996. - С. 49.

10. Мельченков Е.А., Виноградов В.К., Ерохина Л.В., Чертихин В.Г., Илясова В.А., Бреденко М.В., Ситнова О.В., Хрисанфов В.Е., Канидьева Т.А., Бубунец В.Е., Харзин О.Б. Руководство по разведению и выращиванию веслоноса. М., 1997. - 88 с.

11. Vikhman A.A., Ford L.A., Sitnova O.V. Paddlefish, *Polyodon spathula* (Walbaum), adaptation in nature and aquaculture / First Russia-USA Symposium "Aquaculture and fish health" // Program and abstracts (12-19 July, 1998, Rybnoe, Dmitrov Region, Moscow Province, Russia). - Moscow, 1998. - P. 82-83.